

PRODUCCIÓN DE MICROALGAS *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 USANDO COMO
SISTRATO GLICEROL RESIDUAL A ESCALA LABORATORIO

ROSA MILENA PESTANA DIAZ
ROSIBEL PESTANA DIAZ

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTA DE INGENIERIAS FISICO-QUIMICAS
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA
BUCARAMANGA

2012

PRODUCCIÓN DE MICROALGAS *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 USANDO
COMO SUSTRATO GLICEROL RESIDUAL A ESCALA LABORATORIO

ROSA MILENA PESTANA DIAZ
ROSIBEL PESTANA DIAZ

Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de:
Ingeniero Químico

Director
Ph. D. Viatcheslav Kafarov

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTA DE INGENIERIAS FISICO-QUIMICAS
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA
BUCARAMANGA
2012

AGRADECIMIENTOS

Queremos en esta oportunidad agradecer en primer lugar a Dios por su amor y misericordia a él sea toda la gloria y la honra. A nuestros padres por su apoyo incondicional.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	13
1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
1.1 ORGANISMO.....	16
1.2 CONDICIONES DE CRECIMIENTO Y MEDIO DE CULTIVO	16
1.3 CULTIVOS EXPERIMENTALES.....	17
1.4 PRETRATAMIENTO DEL GLICEROL CRUDO.....	18
1.5 CRECIMIENTO DE LAS ALGAS Y ANÁLISIS DE CLOROFILAS	18
1.5.1 Peso seco	18
1.5.2 Concentración de biomasa	18
1.5.3 Clorofilas totales	19
1.5.3 Diseño experimental y análisis estadístico	19
1.6 RESULTADOS.....	20
2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	27
3.CONCLUSIONES	31
BIBLIOGRAFÍA.....	32

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos establecidos a partir de diferentes porcentajes de glicerol y nitratos, como fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente.17

Tabla 2. ANOVA de efectos principales para el rango de efecto de la alteración del porcentaje de glicerol y nitrato como fuentes de carbono y nitrógeno, en la modificación de la acumulación de clorofilas y la producción de biomasa.....21

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Descripción del proceso y condiciones de operación.	20
Figura 2. Alteración en la concentración de clorofilas totales y en la producción de biomasa (peso seco) en la células de <i>C. vulgaris</i> expuestas a diferentes medios nutricionales con alteración en la fuente de carbono (glicerol) y nitrógeno (nitrato).	21
Figura 3. Trayectorias de la alteración diaria en las concentraciones de clorofilas totales y en la producción de biomasa (peso seco) en la células de <i>C. vulgaris</i> expuestas a diferentes medios nutricionales con alteración en la fuente de carbono (glicerol) y nitrógeno (nitrato).	22
Figura 4. Máximos contenidos de clorofila total (a + b) evaluado en los cuatro días de cultivo.	23
Figura 5. Resumen de las máximas concentraciones finales de clorofila total en cada nivel de nitrato en comparación con el cultivo control.	24
Figura 6. Máxima productividad de biomasa en los tratamientos glicerol/nitrato evaluado en los cuatro días de cultivo.	25
Figura 7. Máximas productividades de biomasa bajo un 10% de glicerol, en cada nivel de nitrato en comparación con el cultivo control.	26

RESUMEN

TITULO: PRODUCCION DE MICROALGAS *Chlorella vulgaris* UTEX 1803USANDO COMO SUSTRATO GLICEROL RESIDUAL A ESCALA LABORATORIO".*

AUTORES: Rosa Milena Pestana Díaz, Rosibel Pestana Díaz.**

PALABRAS CLAVES: *Chlorella sp.*, autotrófico, mixotrófico, producción de biomasa, glicerol, clorofila.

El incremento en la producción de biodiesel es generador de grandes cantidades de glicerol como un producto secundario. Una opción de manejo del glicerol y de reducción de los costos del biodiesel de microalgas, es su utilización como fuente de carbono orgánico en cultivos mixotróficos de microalgas. El principal objetivo experimental, fue evaluar la productividad de biomasa y clorofilas totales de *C. vulgaris* UTEX 1803, en cultivos mixotróficos, con la alteración de la disponibilidad de glicerol en porcentaje volumétrico (1%, 5%, 10%) y nitrato (25%, 50%, 100%).El glicerol, demostró ser una fuente de carbono útil en el crecimiento de *C. vulgaris*. Un 10% de glicerol y un 50% (1,39 mM) y 100% (2,78 mM),resultaron ser los medios, más favorables para la síntesis de clorofilas. Sin embargo, en la producción de biomasa no fue favorable frente al cultivo autotrófico control. El incremento en la concentración del gliceroestimuló la síntesis de clorofilas, e inhibió la magnitud de la acumulación de biomasa. Se debe estudiar más los procesos metabólicos de *C. vulgaris*, bajo diferentes regímenes nutricionales para así, poder establecer relaciones C/N (donde C representa el fuente de carbón en este caso el glicerol y N: nitrato) que permitan maximizar sus tasas de crecimiento y de síntesis de clorofilas.

Este trabajo hace parte del proyecto "Bioprospeccion de Microalgas Colombianas para la producción de biodiesel" código 2008D32006-6710 financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, con la participación de la Universidad Industrial de Santander, el instituto Colombiano del Petróleo ICP-ECOPETROL y la Corporación Instituto de Morrosquillo

*Proyecto de grado.

**Facultad de ingenierías fisicoquímicas. Escuela de IngenieríaQuímica. Director: Ph. D.Viatcheslav Kafarov.

ABSTRAC

TITULO: PRODUCTION OF MICROALGAE *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 AS SUBSTRATE GLYCEROL USING RESIDUAL SCALE LABORATORY.*

AUTHORS: Rosa Milena Pestana Díaz y Rosibel Pestana Díaz. **

KEYS WORDS: *Chlorella sp*, Mixotrophic, Biomass production, Glycerol, Chlorophyll.

The increase in the production of biodiesel is generating large amounts of glycerol as a byproduct. One management option of glycerol and reduced costs of biodiesel from microalgae, is its use as a source of organic carbon in mixotrophic cultures of microalgae. The main experimental target was to assess the productivity of total biomass and chlorophylls *Chlorella vulgaris* UTEX 1803, in mixotrophic, with the alteration of the available volume percent glycerol (1%, 5%, 10%) and nitrate (25% , 50%, 100%). the glycerol, proved a useful carbon source in the growth of *C. vulgaris*. 10% glycerol and 50% (1.39 mM) and 100% (2.78 mM), were found to be the media, most favorable for chlorophyll synthesis. However, in the biomass production was not favorable compared to autotrophic cultivation control. The increase in the concentration of glycerol stimulated the synthesis of chlorophylls, and inhibited the amount of biomass accumulation. Need further study the metabolic processes of *C. vulgaris* under different nutritional regimes as well, to establish relationships C / N (where C represents the carbon source in this case glycerol and N: nitrate) to maximize their rates of growth and chlorophyll synthesis.

This work it is part of the "Bioprospecting Colombian Microalgae for production" code 2008D32006-6710 funded by the Ministry of Agriculture and Rural Development, with the participation of the Universidad Industrial de Santander, the Instituto Colombiano del Petróleo ICP-ECOPETROL and la Corporación Instituto de Morrosquillo

*Research Project.

**Physical – Chemical Engineering college. Chemical Engineering Department. Advisor: Ph.D. ViatcheslavKafarov.

INTRODUCCIÓN

Las microalgas constituyen un grupo muy heterogéneo de microorganismoseucariotas, fotosintéticos, caracterizados por tener un rápido crecimiento, debido a su simplicidad estructural (Li *et al.*, 2008). Capturan y utilizan dióxido de carbono a través de la fotosíntesis y presentan una gran versatilidad metabólica (Guedes *et al.*, 2011; Raja *et al.*, 2008). Las microalgas convierten el dióxido de carbono atmosférico en numerosos metabolitos (proteínas y lípidos), biomasa y clorofilas a través de diversas rutas metabólicas (Chisti, 2007; Boyle y Morgan, 2009). Fijan casi la mitad del carbono inorgánico global, característica que les potencia como importantes fijadores de carbono y generadores de una valiosa biomasa, con potencial aplicación biotecnológica (Abalde *et al.*, 1995). Producen compuestos de gran importancia nutricional, farmacéutica e industrial (Borowitzka, 1995), susceptible de utilizarse en la elaboración de productos químicos, o como una fuente de lípidos y almidón que luego pueden ser convertidos en biocombustibles (Boyle y Morgan, 2009).

El agotamiento de las reservas de petróleo y la contaminación asociada al uso excesivo de los combustibles fósiles, han generado la necesidad de producir combustibles alternativos (Chisti, 2007; Meng *et al.*, 2008). Uno de sus potenciales sustitutos, es el biodiesel (Ma y Hanna, 1999) obtenido a partir de la transesterificación de lípidos de origen animal o vegetal, incluidos los sintetizados en microalgas (Chisti, 2007). El aumento en la producción de biodiesel, genera un subproducto de glicerol. Una importante alternativa, es su uso como fuente de carbono en cultivos de microorganismos fotosintéticos como las algas (Yokochi *et al.*, 1998).

A pesar de que cientos de cepas de microalgas son capaces de producir un alto contenido de lípidos (Huntley y Redalje, 2007), en el cultivo clásico fotoautotrófico, es limitada su productividad, debido a la limitada penetración de la luz en el cultivo, a causa del auto-sombreado ejercido por el incremento en la densidad celular, limitando con ello la cantidad de luz disponible para la fotosíntesis (Chen y Jhons, 1995). El crecimiento mixotrófico en organismos que poseen metabolismos fotoautotróficos y heterotróficos, es potencialmente útil para superar dichas limitaciones. Según la EPA para mejorar la productividad se requiere diseñar estrategias de cultivos mixotróficos y heterótrofos (Wen y Chen, 2000).

Chlorella sp. es una microalga fotoautótrofa que puede crecer heterotróficamente, si se le suministra una fuente idónea de carbono (Chen y Chen, 2006, Qiao *et al.*, 2009), o mixotróficamente, mediante una combinación de los dos mecanismos (Ogbonna *et al.*, 1997, Lee 2004). El crecimiento heterotrófico de *Chlorella sp.* ha sido evaluado desde hace décadas y se ha fundamentado en la adición de glucosa, acetato o glicerol como principales fuentes de carbono (Qiao *et al.*, 2009). Se ha evaluado en cultivos heterotróficos de *C. vulgaris*, una mayor tasa de crecimiento (Behrens, 2005) y producción de ATP, frente a cultivos autotróficos (Yang *et al.*, 2000). Dicha respuesta y su magnitud, dependen de la especie y cepa utilizada. El cultivo mixotrófico de microalgas, ha demostrado ser una buena estrategia para obtener altas tasas de crecimiento, biomasa (Lee y Lee, 2002; Cerón García *et al.*, 2005), así, como en la producción de clorofilas (Chen, 1996). El crecimiento en cultivos mixotróficos requieren intensidades de luz relativamente bajas, (Fernández *et al.*, 2004). La alta productividad lograda en cultivos mixotróficos, es posiblemente debido a un efecto sinérgico de la luz y el carbono orgánico (Cerón - García *et al.*, 2000).

En el laboratorio de transformación de biomasa de la escuela de ingeniería química se han realizado estudios de diferentes fuentes de carbono como el acetato, Ácido acético, glucosa y CO₂ en los cuales demostraron una mayor productividad de

biomasa de *C. vulgaris* entre 0,84:2,52mM en la fuente de carbóno ácido acético, (Alvarez-Rodriguez *et al.*, 2011) se encontró que una relación Acetato/ Nitrato 20/0,97mM mejora la productividad de biomasa en *C. vulgaris* (Hernandez- Rosas *et al.*, 2011)

El aporte de nuestro trabajo fue utilizar el glicerol como fuente de carbono y con la alteración de la fuente de nitrógeno con el objetivo de evaluar la productividad de biomasa y de clorofilas totales en la microalga *C. Vulgaris*.

El carbono es el principal macronutriente para el crecimiento y productividad de las microalgas. Por tal motivo, es muy importante evaluar diferentes fuentes de carbono orgánico e inorgánico en cultivos de microalgas (Bermúdez *et al.*, 2003). Aunque la productividad de biomasa y lípidos son significativamente mayores en cultivos mixotróficos, el costo de las fuentes orgánicas de carbono (glucosa y acetato) son altos, cuando se comparan con otros nutrientes adicionados; es así, que el glicerol crudo, podría suplir dicha necesidad (Liang *et al.*, 2009).

Nuestra hipótesis de trabajo afirma que bajo cultivo mixotrófico se lograría una mayor productividad en biomasa y clorofilas, frente a un cultivo autotrófico. El principal objetivo de este trabajo fue el de evaluar la productividad de clorofilas totales y de la acumulación de biomasa de *C.vulgaris*, en cultivos mixotróficos, con la alteración de la disponibilidad de glicerol y nitrato, como fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente. De igualmanera, evaluar la capacidad de *C. vulgaris*, de emplear el glicerol como fuente de carbono.

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 ORGANISMO

El experimento fue realizado en el Laboratorio de Biomasa, de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. Se utilizó la microalga *C. vulgaris* (UTEX 1803), la cual fue adquirida de la colección de cultivo de algas de la Universidad de Texas (Austin, TX, USA).

1.2 CONDICIONES DE CRECIMIENTO Y MEDIO DE CULTIVO

Las microalgas se mantuvieron durante cuatro días en biorreactores, correspondientes a botellas plásticas transparentes (2½ L) con diámetro interno de 14 cm y 35 cm altura, y con un volumen del cultivo de 2 L. Los reactores se acoplaron a un sistema de aireación por burbujeo (tubo-difusor) para la inyección de aire, buscando con ello mejorar la homogeneidad de todo el cultivo y evitandola sedimentación celular. Todos los reactores fueron inoculados con una concentración inicial de microalgas de 0.4 g/L. Los experimentos, se realizaron en laboratorio bajo condiciones controladas de temperatura $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, iluminación artificial provista por lámparas fluorescentes de luz blanca ($156 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$), fotoperiodo 12h: luz 12h: oscuridad y aireación constante.

Los cultivos de *C. vulgaris*, se realizaron en el medio nutritivo Bold Basal, compuesto por: (g/L) NaNO_3 (2.94×10^{-3}), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (3.04×10^{-4}), NaCl (4.28×10^{-4}), K_2HPO_4 (4.31×10^{-4}), KH_2PO_4 (1.29×10^{-3}), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1.70×10^{-4}) y micronutrientes (g/L) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (3.07×10^{-5}), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (7.28×10^{-6}), MoO_3 (4.93×10^{-6}), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (6.29×10^{-6}), $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1.68×10^{-6}), H_3BO_3 (1.85

$\times 10^{-4}$), EDTA (1.71×10^{-4}), KOH (5.53×10^{-4}), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.79×10^{-5}) (Bischoff y Bold, 1963).

1.3 CULTIVOS EXPERIMENTALES

Cultivo autotrófico – Correspondiente al “*control*”, representado por reactores con medio nutritivo Bold Basal y una concentración de 2,78mM de nitrato de sodio.

Cultivo mixotrófico –Cada uno de los “*tratamientos experimentales*”. Cada tratamiento se estableció a partir de tres biorreactores, con el medio Bold Basal, más una fuente adicional de carbono correspondiente al glicerol y una fuente de nitrógeno(**Tabla 1**).

Tabla 1.Tratamientos establecidos a partir de diferentes porcentajes de glicerol y nitratos, como fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente.

Tratamientos	%Glicerol	%Nitrato
1	1	100
2	1	50
3	1	25
4	5	100
5	5	50
6	5	25
7	1	100
8	10	50
9	10	25

Cantidades representadas de nitrato:

100%: 2.94×10^{-3} g/l

50%: $1,47 \times 10^{-3}$ g/l

25%: $0,735 \times 10^{-3}$ g/l

Glicerol para un cultivo de trabajo de 2 L

1%: 2mL, 5%: 10mL, 10%: 20mL

1.4 PRETRATAMIENTO DEL GLICEROL CRUDO

Siguiendo el procedimiento realizado por Chi *et al.* (2007), para evitar un efecto adverso en la inclusión al medio del glicerol crudo, se realizó un pre tratamiento correspondiente a retirar los jabones y metales contenidos en el glicerol. La glicerina se mezcló con agua destilada en proporción de 1:4 (v/v) para así reducir la viscosidad del fluido. Mediante la adición de ácido sulfúrico, se ajustó un pH 4 (PH- METRO Handylab pH 11 SCHOTT Instruments), convirtiendo el jabón soluble en insoluble en ácidos grasos libres, logrando su precipitación. Se removieron los sólidos sedimentados por decantación, y se adicionó agua destilada para ajustar el nivel de nutrientes (incluida la glicerina) a un nivel deseado.

1.5 CRECIMIENTO DE LAS ALGAS Y ANÁLISIS DE CLOROFILAS

1.5.1 Peso seco

Fue evaluado por triplicado, mediante toma de alícuotas de 1 mL en un tubo previamente pesado. Las muestras posteriormente se secó durante 12 horas en el horno (WTC BINDER) a 105 °C y posteriormente la muestra fue transferida 12 horas en un desecador, para finalmente, obtener el dato de peso seco (biomasa), mediante pesaje en balanza analítica (Precisa Gravimetrics AG).

1.5.2 Concentración de biomasa

La concentración de biomasa, se estimó para cada tratamiento, por triplicado, tomando alícuotas de 6 mL, realizado en horas de la mañana y tarde, mediante la estimación de la densidad óptica (DO), determinada a 500 nm, empleando un espectrofotómetro (Pharo 300 Merck). Los datos de absorbancia fueron correlacionados y convertidos a peso seco (biomasa).

1.5.3 Clorofilas totales

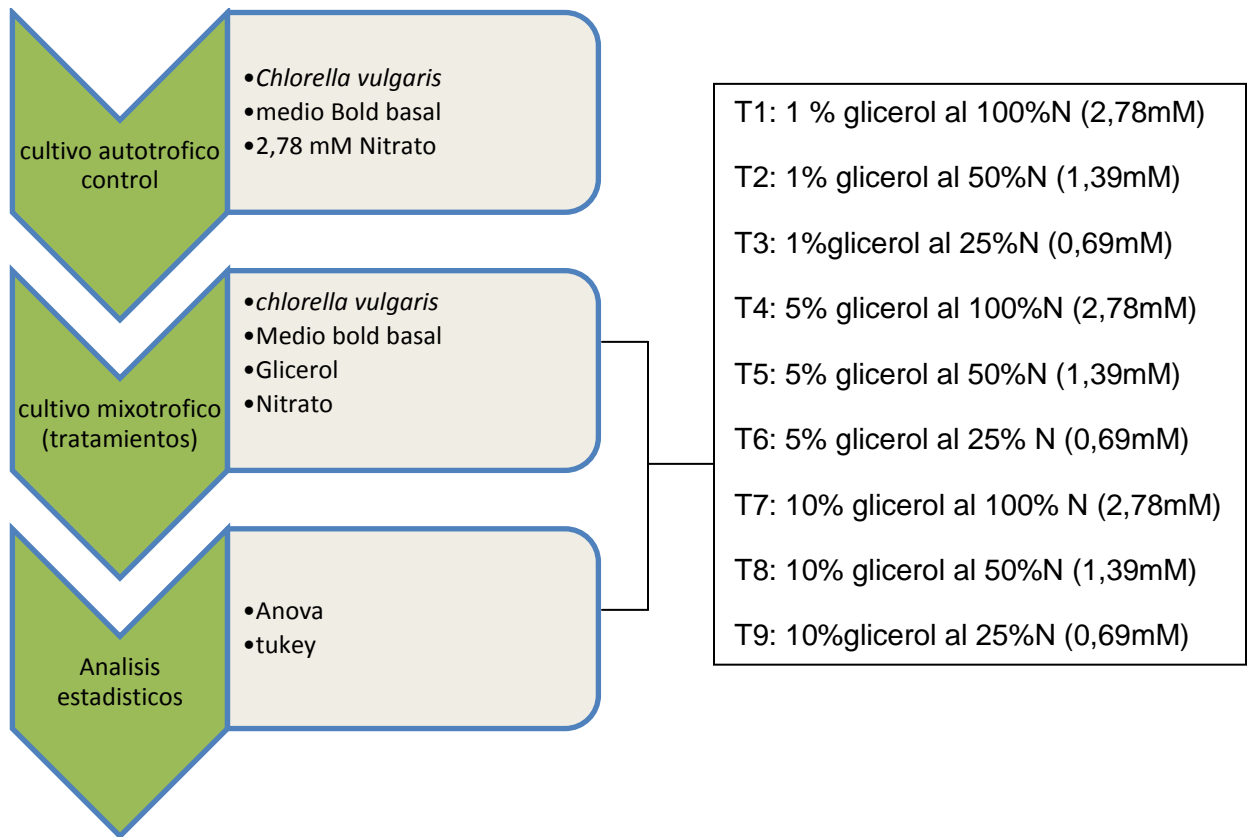
La concentración de clorofila total se calculó mediante modificación del método propuesto por Becker (1984), mediante la exposición de un extracto de clorofilas disueltas en etanol. Se tomó alícuota de 10 mL de cada cultivo y se centrifugó (Centrifuga PowerSpin™ MX) a 3400 rpm durante 7 minutos, luego se eliminó el sobrenadante y se adiciono 3mL de etanol al pellet, después se calentó durante 5 min en baño María. Posteriormente, la muestra se llevó a un volumen de 5 mL, para asegurar una concentración optima, se diluyó cinco veces, y posteriormente se evaluó su absorbancia a 650 nm y a 665 nm en un espectrofotómetro (Pharo300 Merck). Los resultados se incluyen en la ecuación y se obtiene la estimación (Ecuación 1).

$$\text{Clorofila a + b} = (4.0 * A_{665}) + (25.5 * A_{650}) \quad (1)$$

1.5.3 Diseño experimental y análisis Estadístico

Se evaluó el efecto de los diferentes tratamientos, representados por el glicerol (1%, 5%, 10%) como fuente de carbono y el nitrato de sodio: 25% (0,69 Mm), 50% (1,39 mM), 100% (2,78 mM) como fuente de nitrógeno, del horario del muestreo (mañana y tarde), y del efecto del tiempo (días de muestreo), en la alteración dela biomasa y clorofilas totales, evaluados por triplicado, a partir de células de *C. vulgaris* en cada biorreactor (Tabla 1, Figura 1). Para lograr que la variable clorofilas totales y la biomasa se ajustaran a las asunciones de normalidad y homogeneidad de varianza, previo a la ANOVA, dichas variables fueron normalizadas con la transformación $1/\text{Raíz } x$ (Zar, 1999). Se realizó una análisis de varianza (ANOVA), en la cual muestra las diferencias significativas con la probabilidad ($p < 0.05$) luego se realizó una prueba *a posteriori*, aplicando la prueba de Tukey, para mirar en donde fue significativo, con un nivel de significancia estadística $p < 0.05$., Para este análisis fue empleado el software SPSS versión 13.0 para Windows y MINITAB 15.

Figura 1. Descripción del proceso y condiciones de operación.



1.6 RESULTADOS

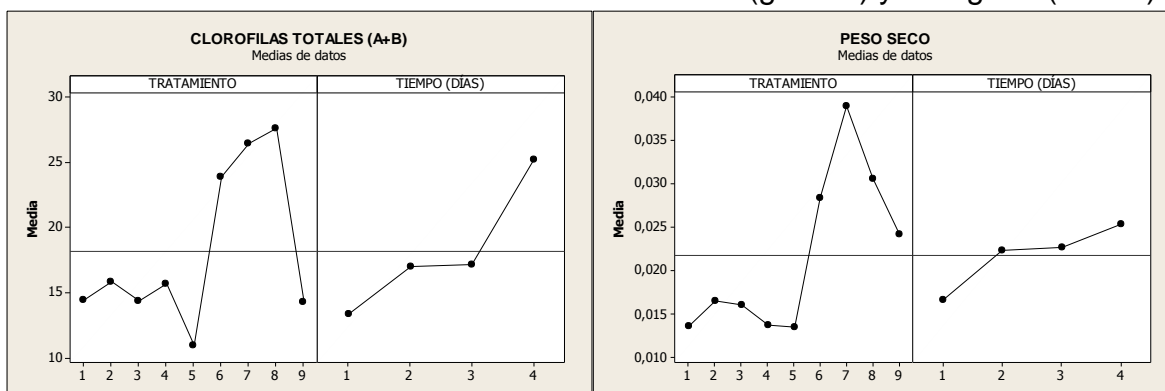
La biomasa celular y las concentraciones de clorofilas totales fueron alteradas significativamente ($p < 0,05$) por la influencia de los diferentes tratamientos nutricionales, así, como por el efecto de los muestreos realizados en el tiempo (Tabla 2; Figura 2, 3). No se evaluaron diferencias significativas en el contenido de clorofilas totales y en la biomasa de las microalgas de *C. vulgaris*, frente al horario de muestreo (mañana y tarde) de cada día de muestreo.

Tabla 2. ANOVA de efectos principales para el rango de efecto de la alteración del porcentaje de glicerol y nitrato como fuentes de carbono y nitrógeno, en la modificación de la acumulación de clorofilas y la producción de biomasa.

Variables	Tratamiento (T)		Tiempo (M)		Horario de muestreo	
	(gl= 8)		(gl= 3)		(gl= 1)	
	F	P	F	P	F	P
Clorofilas totales (A+B)	6,096	***	9,758	***	3,277	NS
Biomasa	38,196	***	12,953	***	6,185	NS

* $p < 0,05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0,001$; NS: No Significativo.

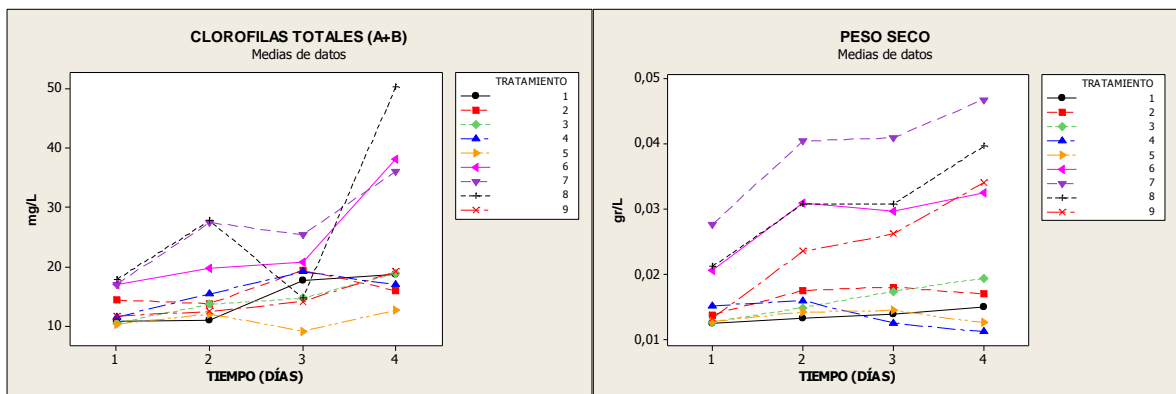
Figura 2. Alteración en la concentración de clorofilas totales y en la producción de biomasa (peso seco) en la células de *C. vulgaris* expuestas a diferentes medios nutricionales con alteración en la fuente de carbono (glicerol) y nitrógeno (nitrato).



Tratamientos: T1: 1% glicerol al 100% N; T2: 1% glicerol al 50% N; T3: 1% glicerol al 25% N; T4: 5% glicerol al 100% N; T5: 5% glicerol al 50% N; T6: 5% glicerol al 25% N; T7: 10% glicerol al 100% N; T8: 10% glicerol al 50% N; T9: 10% glicerol al 25% N.

Los tratamientos uno, dos, tres, cuatro, cinco y nueve (1% glicerol al 100% N, 1% glicerol al 50% N, 1% glicerol al 25% N, 5% glicerol al 100% N, 5% glicerol al 50% N, 10% glicerol al 25% N) evidencian una significativa limitación en la biomasa y en el contenido de clorofilas totales (Figura 2, 3). Según los resultados del test de Tukey, en el tratamiento cinco (5% glicerol al 50% N) se evaluó el menor contenido de clorofilas totales. Los tratamientos cuatro y cinco (5% glicerol al 100% N, 5% glicerol al 50% N) constituyeron los medios en los cuales *C. vulgaris* presentó las menores biomásas (Figura 2, 3).

Figura 3. Trayectorias de la alteración diaria en las concentraciones de clorofilas totales y en la producción de biomasa (peso seco) en la células de *C. vulgaris* expuestas a diferentes medios nutricionales con alteración en la fuente de carbono (glicerol) y nitrógeno (nitrato).

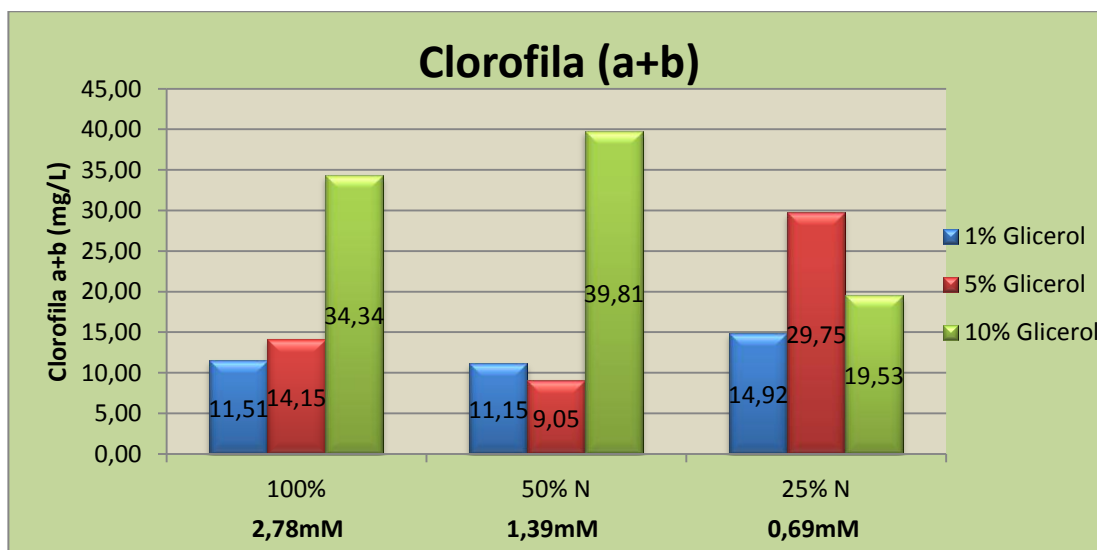


Tratamientos: T1: 1% glicerol al 100% N; T2: 1% glicerol al 50% N; T3: 1% glicerol al 25% N; T4: 5% glicerol al 100% N; T5: 5% glicerol al 50% N; T6: 5% glicerol al 25% N; T7: 10% glicerol al 100% N; T8: 10% glicerol al 50% N; T9: 10% glicerol al 25% N.

Según los resultados del test de Tukey, el mayor contenido de clorofilas totales se evaluó en el T8 (10% de glicerol al 50% N) (38,81 mg/L), seguido por el T7 (10%

glicerol al 100% N) (34,34 mg/L) y levemente inferior en el T6 (5% glicerol al 25% N) (29,75 mg/L), contrastando con los demás tratamientos, en los cuales el contenido de clorofilas totales fue significativamente inferior (Figura 2 y 4). Los contenidos de clorofilas totales evaluados en los tratamientos T8, T7 y T6, sin significativamente mayores a los evaluados en el control (21,72 mg/L) (Figura 5).

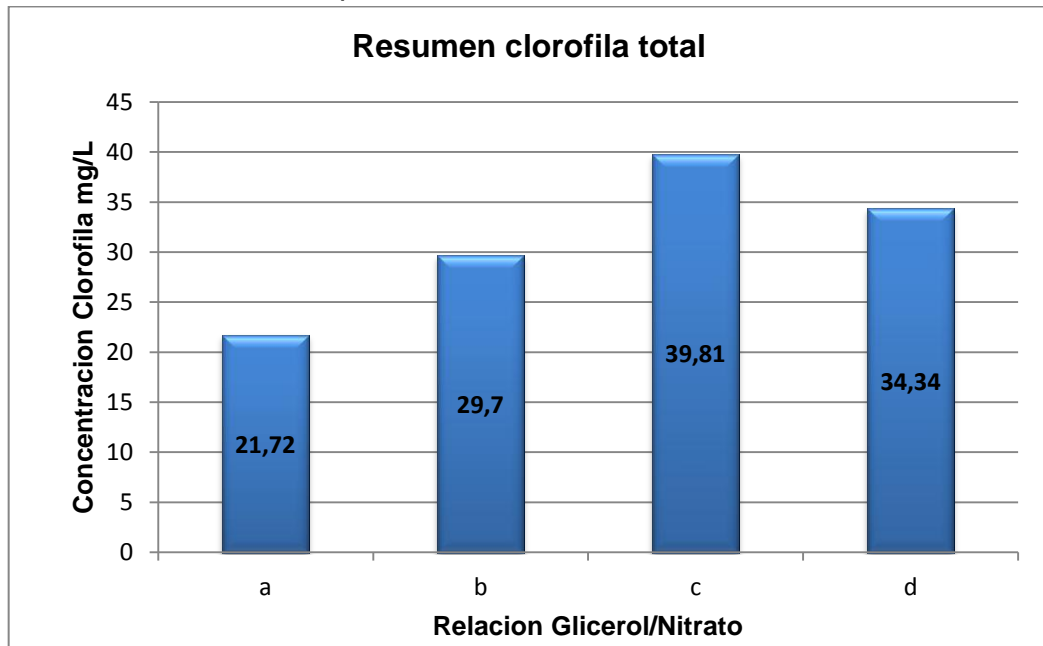
Figura 4. Máximos contenidos de clorofila total (a + b) evaluado en los cuatro días de cultivo.



Porcentajes de nitrógeno: 100% Nitrógeno (2,78mM), 50% Nitrógeno (1,39mM), 25% Nitrógeno (0,695mM).

Los resultados de clorofila me indican que fueron superiores al cultivo control autotrófico este se debe que las condiciones del experimento pudieron generar un patrón en la cual se distribuyeran una mayor proporción de fotoasimilados hacia la síntesis de clorofila (figura 5).

Figura 5. Resumen de las máximas concentraciones finales de clorofila total en cada nivel de nitrato en comparación con el cultivo control.

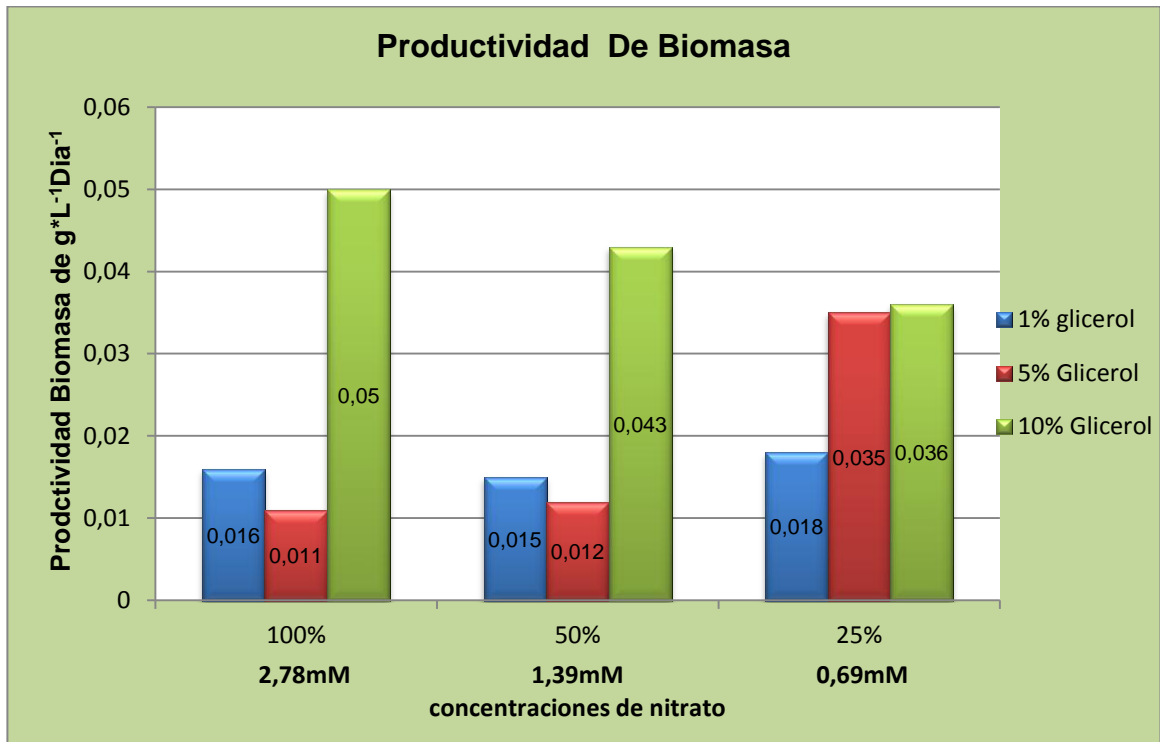


Las relaciones carbono/nitrógeno, representadas en las relaciones glicerol/nitrato corresponden a: a. 0/2,78 mM Control; b. 10% glicerol/ 0,69mM; c. 10% glicerol/1,39mM; d. 5% glicerol/2,78 mM.

La mayor productividad de biomasa a lo largo de los cuatro días de evaluación, se evaluó en el T7 (10% glicerol al 100% N), seguido por el T8 (10% glicerol al 50% N) y T6 (5% glicerol al 25% N), tratamientos (T8 y T6) donde hay ausencia de diferencias significativas (Figura 2).

Las máximas productividades de biomasa evaluadas en el experimento, se dieron bajo un 10% de glicerol, productividad que se incrementó, con el aumento de la disponibilidad de nitrógeno 25% (0,69mM), 50% (1,39mM), 100% (2,78mM). El patrón de mayor producción de biomasa a lo largo del tiempo, y de la máxima productividad, se logró en el T7 con 10% glicerol al 100% N (2,78mM de nitrato) (Figura 6).

Figura 6. Máxima productividad de biomasa en los tratamientos glicerol/nitrato evaluado en los cuatro días de cultivo.



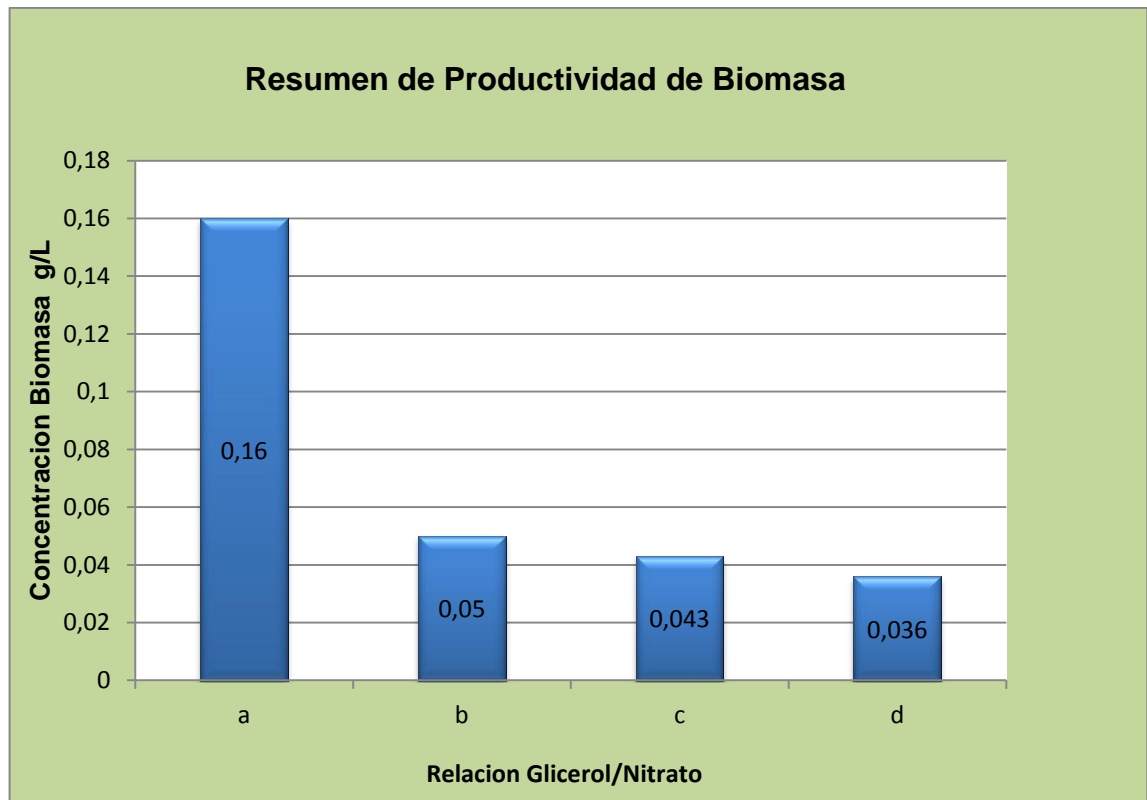
Los porcentajes de nitrógeno presentados corresponden en su orden a: 100% Nitrógeno (2,78mM), 50% Nitrógeno (1,39mM), 25% Nitrógeno (0,69mM).

La evaluación de la productividad al 10% de glicerol, en el cual previamente se reseñaron las máximas productividades en biomasa, T7: 100% Nitrógeno (2,78mM), T8: 50% Nitrógeno (1,39mM) y T9 25% Nitrógeno (0,69mM), confrontadas con el control experimental, permite, señalar, que aun cuando hay diferencias significativas en la producción de biomasa, en los diferentes tratamientos, dichas productividades son muy inferiores a la producción de biomasa evaluada en el cultivo autotrófico - control, a lo largo del experimento. Frente al control, la reducción en la disponibilidad de nitrato (100%, 50%, 25%), redujo la concentración de biomasa (Figura 7).

Esta respuesta es un posible limitante adicional del crecimiento del cultivo de microalgas en medios enriquecidos con fuentes alternas de carbono puede ser el hecho de que dicho carbono puede acelerar el crecimiento en la flora microbiana

asociada en detrimento de las microalgas, debido a la competencia interespecifica que se establecería entre ambos microorganismos. (Ortega *et al.*, 2004). Generalmente se considera que la relación carbono/ nitrógeno influyen en el contenido de lípidos en las células, (Perez-García *et al.* (2010). se han reportado que las fuentes de nitrógeno son un factor de estrés para el crecimiento de algas donde le suministro limitado podría cambiar significativamente la composición del microorganismo (liang *et al.*, 2009).

Figura 7. Máximas productividades de biomasa bajo un 10% de glicerol, en cada nivel de nitrato en comparación con el cultivo control.



Las relaciones carbono/nitrógeno, representadas en las relaciones glicerol/nitrato corresponden a: a. 0/2,78 mM Control; b: 10% glicerol/ 2,78mM; c: 10% glicerol/1,39mM; d: 10% glicerol/0,695mM.

2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los Resultados permiten afirmar que la alteración en los porcentajes de glicerol y nitratos, como fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente, afectó significativamente la concentración de biomasa de *C. vulgaris* (Tabla 2). La microalga *C. vulgaris* UTEX 1803 puede crecer mixotróficamente bajo diferentes porcentajes de glicerol. El tipo de cultivo (autotrófico o mixotrófico) afectó significativamente la productividad y la síntesis de clorofilas (Tabla 2; Figura 5, 7).

Kong *et al.* (2011) reportaron para *C. vulgaris*, bajo cultivo mixotrófico y empleo como fuentes de carbono de la glucosa, sacarosa y glicerina, se obtuvo mayores productividades en el crecimiento, frente al cultivo autotrófico control. Respuestas contrarias a nuestros hallazgos, en los cuales, en comparación con el grupo autotrófico control, los cultivos mixotróficos de *C. vulgaris*, crecieron más lentamente, y con una menor magnitud (Figura 5, 7).

El glicerol demostró ser una fuente de carbono útil en el crecimiento de *C. vulgaris*, el 10% de glicerol, resultó ser el porcentaje más favorable para la síntesis de clorofilas y acumulación de biomasa, sin embargo, dicho sustrato, no fue eficiente en el estímulo de la producción de biomasa frente al cultivo autotrófico (Figura 7). Un patrón similar, fue evaluado por Ortega *et al.* (2004), en cultivo mixotrófico de *Chlorella sp.* y en el cual, aun cuando el uso de acetato de sodio (10mM) fue útil como fuente de carbono para la microalga, no logró generar una producción de biomasa eficiente frente a condiciones axénicas del cultivo control.

Liang *et al.* (2009), reportaron una reducción en la producción de biomasa en *C. vulgaris*, con el incremento en el porcentaje (1%, 2%, 5%, 10%) de glucosa y glicerol, como fuentes de carbono; hallando así mismo, una menor magnitud en la productividad de biomasa en los cultivos con glicerol, frente a la glucosa. Un

patrón, contrario hallamos en nuestro trabajo, en el cual, aunque leve, el mayor incremento en biomasa ocurrió con el incremento del porcentaje de glicerol (1%, 5%, 10%). Sin embargo, la magnitud de la concentración de la biomasa, fue significativamente inferior al evaluado en el cultivo autotrófico, demostrando ello, una limitación en el crecimiento celular de *C. vulgaris*, una limitación global, generada por el glicerol, y un leve descenso en magnitud, guiado también por la reducción en la disponibilidad de nitrato (100%, 50%, 25%).

Reducciones significativas tanto en clorofilas a y b en *Scenedesmusacutus* (Ogawa y Aiba, 1981) y *Platymonassubcordiformis* (Xie *et al.*, 2001) se han evaluado bajo crecimiento mixotrófico con acetato. Nuestros resultados de forma opuesta y con el incremento en el porcentaje del glicerol empleado en los cultivos mixotróficos (1%, 5%, 10%), fue estimulador de un incremento significativo en la síntesis y contenido de clorofilas totales, en magnitud superior al del cultivo control, respuesta, similar a la evaluada en trabajo realizado con cultivo mixotrófico de *Clorella sp.* Bajo diferentes concentraciones (1,0mM, 5,0Mm, 10,0Mm) de acetato de sodio, como fuente de carbono (Ortega *et al.*, 2004). Kong *et al.*, 2011, encontraron en cultivos mixotróficos de *C. vulgaris* una mayor productividad de clorofilas, lípidos y de biomasa, frente a cultivos autotróficos y heterotróficos, hallando a la glucosa como la fuente de carbono óptima para el crecimiento del cultivo de *C. vulgaris*, en lo cual, bajos contenidos de glucosa (1 g/L) habría promovido la producción de biomasa y pigmentos fotosintéticos; mientras que altas concentraciones (≥ 5 g/L) incrementaron la acumulación de biomasa y lípidos y habría inhibido la biosíntesis de clorofila. Es así, que los cambios en la producción de pigmentos fotosintéticos bajo cultivos mixotróficos varían según la microalga y la cepa (Liu *et al.*, 2009), así, como con la fuente y concentración de carbono empleada.

Kong *et al.* (2012), reportan cómo la utilización de sustratos con complejos de carbono orgánicos podrían estimular la biosíntesis de lípidos y carbohidratos

solubles como las materias primas para la producción de biodiesel y bio-etanol, mientras que reduce el anabolismo de pigmentos fotosintéticos y proteínas, en *C. vulgaris*. Respuesta, opuesta a la nuestra, ya que el uso del glicerol en diferentes porcentajes, fue generador de biomasa en una magnitud inferior a la evaluada en el medio autotrófico control, mientras que las clorofilas se incrementaron. Respuesta que corrobora, los reportes de Perez-García *et al.* (2010), y en los cuales se señala que la respuesta a las fuentes de carbono son propias de la especie y cepa empleada.

Cultivos de *C. vulgaris*, bajo suministro de fuentes de nitrógeno como urea y nitrato, han evaluado un incremento en el crecimiento, en peso seco, pero reportan una limitación y reducción en las clorofilas con la adición de acetato, como fuente de carbono (El-Sayed *et al.*, 2011). Nuestros resultados, avalan al nitrato como un sustrato generador de crecimiento de *C. vulgaris*, pero, no corresponden estrictamente a dicha respuesta, ya que frente al suministro de glicerol, como fuente de carbono, y bajo una relación de 1% glicerol al 100% N, 1% glicerol al 50% N, 1% glicerol al 25% N, 5% glicerol al 100% N, 5% glicerol al 50% N, y 10% glicerol al 25% N, se generó una significativa limitación en el contenido de clorofilas totales en *C. vulgaris*, la cual contrastó con los mayores contenidos evaluados bajo una relación C/N que en su orden se dieron bajo un 5% glicerol al 25% N (29,7 mg/L), 10% glicerol al 100% N (34,34 mg/L) y 10% de glicerol al 50% N (38,811 mg/L). Por lo tanto, parece ser que las combinaciones porcentuales de glicerol y nitrógeno, se habría dado una relación C/N, favorable, en la promoción de la síntesis de clorofilas, pero en general limitante para la acumulación de biomasa.

C. vulgaris puede emplear el glicerol como sustrato para su crecimiento, al actuar como un importante estimulador de la producción de clorofilas, pero para las condiciones de nuestro experimento, con muy bajas tasas de crecimiento. Kong *et*

al. (2012), igualmente, demostraron que el glicerol se podía emplear como un sustrato de carbono único y estimulador de la producción de biomasa y componentes bioquímicos, pero con una magnitud inferior a la mezcla de glicerol y glucosa empleadas, y proponen que con una mezcla entre el glicerol y glucosa como fuentes de carbono, podrían mejorar las tasas de crecimiento, el contenido de biomasa, superando las tasas evaluadas en medio mixotrófico con una única fuente de carbono.

La glucosa puede reducir aparentemente la afinidad por el CO₂ en la fijación del CO₂ en especies como *Chlorella sp.* VJ79 (Lalucat *et al.*, 1984), y en *C. vulgaris* (Martinez y Orus, 1991). Adicionalmente, Steinmüller y Zetsche (1984), reportaron, cómo la glucosa puede generar un fuerte efecto inhibitorio en la síntesis de la enzima ribulosa bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBPCasa) del ciclo de Calvin. Algunos otros estudios también sugiere que la asimilación de glicerol por *Pyrenomonassalinade* los pigmentos fotosintético (Lewitus *et al.*, 1991). Por lo tanto, en algunas microalgas, el suministro de fuentes de carbono orgánicas como la glucosa, acetato y glicerol, podrían actuar negativamente al inhibir la maquinaria fotosintética de la microalga, limitando con ello la tasa de crecimiento, la acumulación de biomasa.

Así mismo, las condiciones del experimento, pudieron generar un patrón en el cual, se distribuyeran una mayor proporción de fotoasimilados hacia la síntesis de clorofilas en detrimento de la acumulación de biomasa. Respuestas que no fueron evaluadas en nuestro trabajo, pero lo cual, debería contemplarse y estudiarse en trabajos posteriores. La fisiología de las diferentes microalgas es particular, por lo tanto, es fundamental investigar diferentes variables y combinaciones de glicerol, con otros sustratos, evaluar la competencia con otros microorganismos, con la finalidad de ampliar el conocimiento sobre el crecimiento en cultivos mixotróficos, y así hallar un medio eficiente con el propósito de incrementar la productividad a niveles útiles industrialmente.

CONCLUSIONES

Fue demostrado que el glicerol puede servir como fuente de carbono y sustrato para el crecimiento mixotrófico de *C. vulgaris*, pero la producción de biomasa no fue favorable en la productividad de biomasa en el cultivo mixotrófico.

El incremento en la concentración del glicerol empleado estimuló significativamente una mayor producción de clorofilas totales en la cual se dio al 10% glicerol al 50% N, ya que las condiciones del experimento pudieron generar un patrón en el cual se distribuyeran una mayor proporción de fotoasimilados hacia la síntesis de clorofilas.

BIBLIOGRAFÍA

ABALDE J, CID A. FIDALGO P, TORRES E, Y HERRERO C. 1995. Microalgas: Cultivos y Aplicaciones. Monografía No 26. (pp 181). Coruña.: Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias, Universidad de Coruña.

ANDRADE MR and COSTA JAV. 2007. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. *Aquaculture*. 264: 130-134.

BECKER E.1994.Measurement of alga growth. In: *Microalgae Biotechnology & Microbiology*. Cambridge University Press.pp.56-62.

BEHRENS PW. 2005. Photobioreactor and fermentors: the dark side of growing algae. In Andersen, R. A.*Algal Culturing Techniques*.Phycological Society of America, Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp. 189–203.

BERMÚDEZ JL, SÁNCHEZ G, FUENTEMAYOR G Y MORALES E. 2003. Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento y producción de pigmentos de la microalga marina *Chroomonassp*.*Ciencia*. 11(4):265-269.

BISCHOFF HW and BOLD HC.1963.*Phycological Studies. IV. Some Algae from Enchanted Rock and Related Algae Species*.University of Texas Publications. (6318):1-95.

BOROWITZKA M.1995. *J Applied Phycology*7: 3-15.

BOYLE NR and MORGAN JA. 2009. Flux balance analysis of primary metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*.*BMC Systems Biology*.3(4):1-14.

CERÓN GARCÍA MC, FERNÁNDEZ SEVILLA JM, ACIÉN FERNÁNDEZ FG, MOLINA GRIMA E and GARCÍA CAMACHO F. 2000. Mixotrophic growth of *Phaeodactylumtricornutum* on glycerol: Growth rate and fatty acid profile. J. Appl. Phycol. 12:239-248.

CERÓN GARCÍA MC, SÁNCHEZ MIRÓN A, FERNÁNDEZ SEVILLA JM, MOLINA GRIMA E, and GARCÍA CAMACHO F.2005. Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylumtricornutum*. Influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition. Process Biochem. 40: 297-305.

CHEN F and JOHNS M. 1995. A strategy for high cell density culture of heterotrophic microalgae with inhibitory substrates. J. Appl. Phycol. 7(1): 43-46.

CHEN F. 1996. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. Trends Biotechnol. 14:421–6.

CHEN GQ and CHEN F. 2006. Growing phototrophic cells without light. Biotechnol.Lett. 28:607–16.

ANDRADE MR and COSTA JAV. 2007. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulinaplantensis* using molasses as organic substrate. Aquaculture. 264: 130-134.

BECKER E. 1994. **Measurement of alga growth.** In: Microalgae Biotechnology & Microbiology. Cambridge University Press.pp.56-62.

BEHRENS PW. 2005. Photobioreactor and fermentors: the dark side of growing algae. In Andersen, R. A. [Ed.] Algal Culturing Techniques. Phycological Society of America, Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp. 189–203.

BERMÚDEZ JL, SÁNCHEZ G, FUENTEMAYOR G Y MORALES E. 2003. Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento y producción de pigmentos de la microalga marina *Chroomonassp.* Ciencia. 11(4):265-269.

BISCHOFF HW and BOLD HC. 1963. Phycological Studies. IV. Some Algae from Enchanted Rock and Related Algae Species. University of Texas Publications. (6318):1-95.

BOROWITZKA M. 1995. J Applied Phycology 7: 3-15.

BOYLE NR and MORGAN JA. 2009. Flux balance analysis of primary metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. BMC Systems Biology. 3(4):1-14.

CERÓN GARCÍA MC, FERNÁNDEZ SEVILLA JM, ACIÉN FERNÁNDEZ FG, MOLINA GRIMA E and GARCÍA CAMACHO F. 2000. Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricorutum* on glycerol: Growth rate and fatty acid profile. J. Appl. Phycol. 12:239-248.

CERÓN GARCÍA MC, SÁNCHEZ MIRÓN A, FERNÁNDEZ SEVILLA JM, MOLINA GRIMA E, and GARCÍA CAMACHO F. 2005. Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricorutum*. Influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition. Process Biochem. 40: 297-305.

CHEN F and JOHNS M. 1995. A strategy for high cell density culture of heterotrophic microalgae with inhibitory substrates. J. Appl. Phycol. 7(1): 43-46.

CHEN F. 1996. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. Trends Biotechnol. 14:421–6.

CHEN GQ AND CHEN F. 2006. Growing phototrophic cells without light. Biotechnol.Lett. 28:607–16.

CHISTI Y. 2007. Biodiesel from microalgae. Biotechnol.Adv. 25:294-306.

CHI Z, PYLE D, WEN Z, FREAR C AND CHEN S. 2007. A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. Process Biochemistry. 42:1537-1545.

DE-BASHAN LE, ANTOUN H AND BASHAN Y. 2005. Cultivation factors and population size control uptake of nitrogen by the microalgae *Chlorella vulgaris* when interacting with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiol. Ecol. 54:197-203.

EL-SAYED AB, ABDEL-MAGUID AA AND HOBALLAH EM. Growth response of *Chlorella vulgaris* to acetate carbon and nitrogen forms. Nature and Science, 2011;9(9):53-58.

FERNÁNDEZ SEVILLA JM, CERÓN GARCÍA MC, SÁNCHEZ MIRÓN A, BELARBI EH, GARCÍA CAMACHO F AND MOLINA GRIMA E. 2004. Pilot plant-scale outdoor mixotrophic cultures of *Phaeodactylum tricorutum* using glycerol in vertical bubble column and airlift photobioreactors: Studies in fedbatch mode. Biotechnol.Prog. 20: 728-736.

GUEDES AC, AMARO HM, MALCATA FX. 2011. Microalgae as sources of high added-value compounds—a brief review of recent work. *BiotechnolProg.* 27(2):597-613.

HEIFETZ PB, FOSTER B, OSMOND CB, GILES LG AND BOYNTON JE. 2000. Effects of acetate on facultative autotrophy in *Chlamydomonas reinhardtii* assessed by photosynthetic measurements and stable isotope analyses. *Plant Physiol.* 122:1439–1445.

HUNTLEY ME AND REDALJE DG. 2007. CO₂ mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change.* 12: 573-608.

IP PF and CHEN F. 2005. Production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingensis* in the dark. *Process Biochem.* 40:733–738.

KANG CD, LEE GJS, PARK TH, SIM SJ. 2005. Comparison of heterotrophic and photoautotrophic induction on astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 68:237–241.

KONG W, SONG H, CAO Y, YANG H, HUA S AND XIA C. 2011. The characteristics of biomass production, lipid accumulation and chlorophyll biosynthesis of *Chlorella vulgaris* under mixotrophic cultivation. *African Journal of Biotechnology.* 10(55):11620-11630.

LALUCAT J, IMPERIAL J AND PARES R. 1984. Utilization of light for the assimilation of organic matter in *Chlorella* sp. VJ79. *Biotechnol Bioeng.* 26:677–681.

LEE K AND LEE CG. 2002. Nitrogen removal from wastewaters by microalgae without consuming organic carbon sources. *J. Microbiol. Biotechnol.* 12:979–85.

LEE YK. 2004. Algal nutrition. Heterotrophic carbon nutrition. In Richmond, A. [Ed.] Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp. 116–24.

LEWITUS AJ, CARON DA AND MILLER KR. 1991. Effects of light and glycerol on the organization of the photosynthetic apparatus in the facultative heterotroph *Pyrenomonassalina* (Cryptophyceae). *J Phycol.* 27:578–587.

LI Y, HORSMAN M, WU N, LAN CQ AND DUBOIS-CALERO N. 2008. Biofuels from Microalgae. *Biotechnolo.Prog.* 24:815-820.

LIANG Y, SARKANY N AND CUI Y. 2009. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophics growth conditions. *BiotechnolLett.* 31:1043-1049.

LIU X, DUAN S, LI A, XU N, CAI Z AND HU Z. 2009. Effects of organic carbon sources on growth, photosynthesis, and respiration of *Phaeodactylumtricornutum*. *J ApplPhycol.* 2009. 21:239–246.

MA F AND HANNA M. 1999. Biodiesel production: a review. *Biores Tech.* 70: 1-15.

MARTINEZ F AND ORUS MI. 1991. Interactions between glucose and inorganic carbon metabolism in *Chlorella vulgaris* strain UAM101. *Plant Physiol.* 95:1150–1155.

MENG X, YANG J, XU X, ZHANG L, NIE Q AND XIAN M. 2008. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Rev. Ener.* 34:1-5.

OGAWA T AND AIBA S. 1981. Bioenergetic analysis of mixotrophic GROWTH IN *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*. *BiotechnolBioeng.* 23:1121-1132.

OGBONNA JC, MASUI H AND TANAKA H. 1997. Sequential heterotrophic / autotrophic cultivation – an efficient method of producing *Chlorella* biomass for health food and animal feed. *J. Appl. Phycol.* 9:359–66.

ORTEGA J, MORONTA R AND MORALES E. 2004. Influencia del acetate sobre el crecimiento y contenido de pigmentos de la microalga *Chlorella* sp. *Ciencia.* 12(1):25-31.

PEREZ-GARCIA O, DE-BASHAN LE, HERNANDEZ JP AND BASHAN Y. 2010. Efficiency of growth and nutrient uptake from wastewater by heterotrophic, autotrophic, and mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* immobilized with *Azospirillum brasilense*. *J. Phycol.* 46:800–812.

QIAO H, WANG G AND ZHANG X. 2009. Isolation and characterization of *Chlorella sorokiniana* GXNN01 (Chlorophyta) with the properties of heterotrophic and microaerobic growth. *J. Phycol.* 45:1153–62.

RAJA R, HEMAI SWARYA S, KUMAR NA, SRIDHAR S, RENGASAMY R. 2008. A perspective on the biotechnological potential of microalgae. *Crit Rev Microbiol.* 34(2):77–88.

STEINMÜLLER K AND ZETSCHE K. 1984. Photo- and metabolite regulation of the synthesis of ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase and the phycobiliproteins in the alga *Cyanidium caldarium*. *Plant Physiol.* 76:935-939.

THOMPSON JC AND HE BB. 2006. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. *Applied Engineering in Agriculture.* 22(2): 261-265.

WEN ZY AND CHEN F. 2000. Production potential of eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia*. *Biotechnol.Lett.* 22: 727-733.

XIE JL, ZHANG YX, LI YG AND WANG YH. 2001. Mixotrophic cultivation of *Platymonassubcordiformis*. *J ApplPhycol.* 13:343–347.

XU F, CONG W, CAI ZL AND OUYANG F. 2004. Effects of organic carbon sources on cell growth and eicosapentaenoic acid content of *Nannochloropsis* sp. *J ApplPhycol.* 16:499–503.

YANG C, HUA Q AND SHIMIZU K. 2000. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/darkheterotrophic conditions. *Biochem. Eng. J.* 6:87–102.

YOKOCHI T, HONDA D, HIGASHIHARA T, NAKAHARA T. 1998. Optimization of docosahexaenoic acid production by *Schizochytriumlimacinum* SR21. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49:72-76.

ZAR, J. H. 1999. *Biostatistical analysis.* Prentice-Hall, New Jersey.

ZHANG XW, CHEN F AND JOHNS MR. 1999. Kinetic models for heterotrophic growth of *Chlamydomonasreinhardtii* in batch and fed-batch cultures. *Process Biochem.* 35: 385-389.