

**EFFECTO DE LA RELACIÓN CARBONO/NITRÓGENO EN LA PRODUCTIVIDAD  
DE BIOMASA Y LÍPIDOS EN CULTIVOS DE *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 EN  
FOTOBIOREACTORES A ESCALA DE LABORATORIO.**

**Andrea Milena Rodríguez González**

**Firson Andres Serrano Luna**

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

**2012**

**EFFECTO DE LA RELACIÓN CARBONO/NITRÓGENO EN LA PRODUCTIVIDAD  
DE BIOMASA Y LÍPIDOS EN CULTIVOS DE *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 EN  
FOTOBIOREACTORES A ESCALA DE LABORATORIO.**

**Andrea Milena Rodríguez González**

**Firson Andrés Serrano Luna**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de:**

**Ingeniero Químico**

**Directores**

**Ph. D. Viatcheslav Kafarov**

**M.Sc. Crisóstomo Barajas**

**Codirector**

**Biól. Andrés Fernando Barajas Solano**

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

**2012**

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
INTRODUCCIÓN .....	13
1. FUNDAMENTO TEÓRICO .....	15
1.1 <i>Chlorella vulgaris</i> .....	15
1.2 CRECIMIENTO MICROBIANO .....	15
1.3 INFLUENCIA DE DIFERENTES NUTRIENTES EN LA PRODUCCION DE LÍPIDOS. ....	16
2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	19
2.1 Cultivo .....	20
2.1.1 Microorganismo .....	20
2.1.2 Medio de cultivo .....	20
2.1.3 Fotobiorreactor.....	20
2.2 Métodos de análisis .....	21
2.2.1 Separación de biomasa y sobrenadante.....	21
2.2.2 Extracción de lípidos.....	21
2.2.3 Cuantificación de nitrógeno y fósforo en el medio .....	21
2.2.3.1 Nitrógeno (NO <sub>3</sub> -N).....	21
2.2.3.2 Fósforo (PO <sub>4</sub> -P) .....	21
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	22
4. CONCLUSIONES .....	29
RECOMENDACIONES.....	30
BIBLIOGRAFÍA.....	31
ANEXOS.....	35

## LISTA DE TABLAS.

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Contenido de lípidos de algunas microalgas.....	17
Tabla 2. Razón de cambio en el consumo de nitrógeno al cuarto día. ....	24
Tabla 3. Razón de cambio del consumo de fósforo al quinto día.....	25

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Esquema de la metodología experimental.....	19
Figura 2. Consumo de nitrógeno en relación con la producción de biomasa.....	23
Figura 3. Consumo de fósforo en relación con la producción de biomasa.....	25
Figura 4. Porcentaje de contenido de lípidos después de 5 días en relación con la biomasa total. ....	26
Figura 5. Producción de lípidos en relación con el % de fósforo consumido. ....	27
Figura 6. Producción de lípidos en relación con el % de nitrógeno consumido. ..	28

## LISTA DE ANEXOS

<b>ANEXO A. CÁLCULO DEL COEFICIENTE MÁSIKO DE EXTINCIÓN .....</b>	<b>35</b>
---	-----------

## RESUMEN

**TITULO:** EFECTO DE LA RELACIÓN CARBONO/ NITRÓGENO EN LA PRODUCTIVIDAD DE BIOMASA Y LÍPIDOS EN CULTIVOS DE *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 EN FOTOBIORREACTORES A ESCALA DE LABORATORIO.\*

**AUTORES:** Andrea Milena Rodríguez González, Firson Andres Serrano Luna.\*\*

**PALABRAS CLAVES:** Microalgas, Cultivo Mixotrófico, *Chlorella vulgaris*, relación carbono/nitrógeno, Lípidos.

El crecimiento de microalgas, la velocidad de consumo de nutrientes y la acumulación de lípidos dependen de: concentración de nutrientes, la fuente de carbono y las condiciones de luz. Una adecuada relación de la concentración entre nitrógeno y fósforo permite que la acumulación de lípidos y el crecimiento celular sean continuos.

En el presente trabajo se estudió el efecto de la relación carbono/nitrógeno en la productividad de biomasa y lípidos de *C. vulgaris* a escala de laboratorio, mediante la variación programada de las concentraciones de acetato y nitrato en cultivos mixotróficos utilizando como cultivo de crecimiento el medio Bold Basal.

En la primera etapa se realizaron cultivos autotróficos, los cuales fueron tomados como referencia o control. En la segunda etapa se efectuaron cultivos mixotróficos con acetato de sodio (7, 10, y 20mM), posteriormente, con el fin de encontrar la relación carbono/nitrógeno adecuada para mejorar la productividad, se modificó la cantidad de solución de nitrato de sodio estipulada en el medio ya mencionado, (0; 1,029; 1,47 y 2,98mM de solución de NaNO<sub>3</sub>) manteniendo las concentraciones de acetato utilizadas en la etapa anterior.

El consumo de nitrógeno tuvo un efecto positivo en el crecimiento, se encontraron resultados sobresalientes para la concentración de acetato 1,47mM para todos los niveles de nitrógeno excepto en 0mM.

Entre los resultados se destaca la productividad obtenida en el tratamiento 10mM acetato: 1,47mM nitrato, el cual fue superior en productividad de Lípidos(aproximadamente 0,02gr) también se destaca la productividad de biomasa(3,4 gr/L) del cultivo 20mM acetato:2,94 mM Nitrato.

Este trabajo hace parte del proyecto “Bioprospección 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 FísicoQuímicas. Escuela de Ingeniería Química. Directores: Ph.D. Viatcheslav Kafarov y M.Sc. Crisóstomo Barajas. Codirector: Biólogo Andrés Fernando Barajas S.

## ABSTRACT

**TÍTULO:** EFFECT OF CARBON/NITROGEN RATIO ON BIOMASS AND LIPIDS PRODUCTION OF *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 ON LABSCALE PHOTOBIOREACTORS

**AUTHORS:** Andrea Milena Rodríguez González, Firson Andres Serrano Luna.\*\*

**KEYS WORDS:** Microalgae, mixotrophic culture, *Chlorella vulgaris*, carbón/nitrogen ratio, lipids.

Productive and commercial applications of microalgae are as diverse as many uses ranging from food production for human consumption to the production of biofuels such as biodiesel, bioethanol and others. Growth rate, nutrient uptake and lipids accumulation depend mainly on factors such as nutrient concentrations, addition of carbon sources (both organic and inorganic) and light conditions. Adequate concentration ratio between nitrogen and phosphorus allows the accumulation of lipids and cell growth are continuous.

This work focuses on the effect of carbon/nitrogen ratio in biomass and lipid productivity of *C. vulgaris* UTEX 1803 at lab scale by the variation of acetate and nitrogen concentrations.

In the first stage, autotrophic cultures were performed, which were taken as control. In second stage, mixotrophic cultures were carried out with different concentrations of sodium acetate (as carbon source) and sodium nitrate (7; 10 and 20mM for acetate and 0; 1,029; 1,47 and 2,98mM of nitrate). Reduction of the available nitrogen at the medium had a positive effect on biomass production, with high biomass values for the cultures with 1,47mM of acetate with every levels of nitrogen, except with 0mM of nitrate; however high lipids values (almost 0,02 gr) were obtained in the culture with 10mM acetate : 1,47 mM nitrate which was higher productivity of lipids (approximately 0,02 gr) also highlights the biomass productivity (3,4 gr/L) 20 mM acetate culture 2,94 mM nitrate.

This work is part of the "Bioprospecting Colombian Microalgae for biodiesel production" code 2008D32006-6710 funded by the Ministry of Agriculture and Rural Development, with the participation of the Universidad Industrial de Santander, the Colombian Petroleum Institute ICP-ECOPETROL and Morrosquillo Institute Corporation.

---

\* Research project

\*\* Physical-Chemical Engineering College. Chemical Engineering Department. Advisors: Ph.D. Viatcheslav Kafarov and M.Sc. Crisóstomo Barajas. Ph.D student research assistant: Andrés Fernando Barajas S.

## INTRODUCCIÓN

El desarrollo de las actividades humanas a través de las prácticas agrícolas, la urbanización, la industrialización y otras alteraciones, ha aumentado la entrada de nutrientes en los ciclos bioquímicos, especialmente nitrógeno y fósforo; por lo tanto, la eliminación de estos nutrientes es fundamental para prevenir la eutrofización [1, 2].

El género *Chlorella* ha sido reconocido en varios estudios por su diversidad en algunos procesos tales como la generación de una nueva alternativa de energía renovable, secuestro de gases de efecto invernadero, tratamiento de aguas residuales para la remoción de nitrógeno y fósforo, producción de alimentos de origen animal y producción de fertilizantes [1, 3]. Las especies pertenecientes a este género acumulan gran cantidad de lípidos, los cuales se producen internamente y varían con las condiciones de crecimiento. Existen diferentes nutrientes que rigen el crecimiento celular y la deposición de los lípidos, tales como la concentración de nitrógeno, fósforo y la fuente de carbono [1,4,5], cuando esta microalga crece en medios pobres en nitrógeno, pero con suficiente luz y/o fuentes orgánicas de carbono, es posible que acumule gran cantidad de lípidos en las células [4].

En el presente estudio se presenta la influencia de la relación Nitrógeno/Carbono en la productividad de biomasa y lípidos en cultivos de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 a escala laboratorio usando como fuente de carbono acetato [4].

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Determinar la Influencia de la relación Nitrógeno/Carbono en la productividad de biomasa y lípidos en cultivos de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Comparar el consumo de nitrógeno y fósforo en cultivos de *C. vulgaris* a diferentes concentraciones de carbono/nitrógeno para determinar la influencia en la producción de biomasa.
- Comparar el consumo de nitrógeno y fósforo en cultivos de *C. vulgaris* a diferentes concentraciones de carbono/nitrógeno para determinar la influencia en la producción de lípidos.

## 1. FUNDAMENTO TEÓRICO

### 1.1 *Chlorellavulgaris*

Este microorganismo pertenece al reino eucariota en la división *Chlorophytao* algas verdes [6], contiene clorofilastipo *a* y *b* en los cloroplastos [7]. Se reproduce de forma asexual, cuando la célula alcanza su tamaño máximo, el núcleo se divide formando en el interior de la célula madre 4 u 8 células más pequeñas, liberadas por la ruptura de la pared celular de la madre [8,9]. Sus ciclos de vida y necesidades nutricionales son simples [10]; al ser unicelulares, la energía se dirige a través de la fotosíntesis al crecimiento y la reproducción, ya que no es necesario formar y mantener tejidos y órganos muy complejos [11].

### 1.2 CRECIMIENTO MICROBIANO

El crecimiento microbiano depende del tiempo y la adaptación del microorganismo al sustrato [12]. La fase de adaptación ocurre luego de inocular el microorganismo, se caracteriza porque en este tiempo los microorganismos se adaptan al nuevo entorno, tomando los nutrientes necesarios para iniciar el proceso de división. Los microorganismos se encuentran metabólicamente muy activos pero la población se mantiene temporalmente sin aumentar [13]. La mayor parte de las bacterias crecen en forma exponencial, con una velocidad máxima de crecimiento y un tiempo mínimo de generación. En esta etapa los microorganismos consumen a velocidad máxima los nutrientes del medio [12]. La fase estacionaria se produce como consecuencia del agotamiento de algún nutriente esencial del medio, o porque los productos de desecho que han liberado durante la fase exponencial hacen que el medio sea inhóspito para el crecimiento microbiano [13]. Por último en la fase de muerte se produce una reducción del número de microorganismos viables del cultivo [14].

### 1.3 INFLUENCIA DE DIFERENTES NUTRIENTES EN LA PRODUCCION DE LÍPIDOS.

Las microalgas incorporan macronutrientes y micronutrientes los cuales usan para su estructura y crecimiento, los macronutrientes son los elementos limitantes del crecimiento por que forman parte de la estructura de la célula y que se necesitan en mayor porcentaje, estos son: N, P, C, H, Ca, Mg, S, K. Los micronutrientes son los elementos que la célula necesita para un buen crecimiento, usualmente forman parte de las enzimas, tales como: Fe, Mn, Cu, Mo, Co. Los requerimientos nutricionales mínimos pueden ser estimados con fórmulas empíricas de la biomasa [15].

Aproximadamente el 90% del peso seco de la célula se conforma de proteínas, carbohidratos, y lípidos, los porcentajes dentro de la célula pueden variar dependiendo de la cepa y las condiciones de cultivo [16]. Se ha reportado composiciones de cepas de *Chlorella* como *C.protothecoides*, *Chlorellaspcs-272*, y *Chorellasp cs-195*, las cuales contienen proteínas entre 15,2%-25,6%, carbohidratos 11%-16,1%, y lípidos 11,4%-18,4% en peso seco [16]. La biomasa obtenida de algas contiene hidrocarburos en forma de lípidos, tales como los ácidos grasos libres, triacilgliceridos (TAG), fosfolípidos y glucolípidos que son materia prima para la producción de biodiesel [17].

El almacenamiento de lípidos no solo depende de la especie de microalga (Tabla 1), sino también de las condiciones del medio de cultivo [18, 15].

**Tabla 1.** Contenido de lípidos de algunas microalgas.

<b>Microalga</b>	<b>contenido de lípidos (% peso seco)</b>
<i>Botryococcus brawnii</i>	25-75
<i>Chlorella sp.</i>	28-32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16-37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis sp.</i>	25-33
<i>Monallanthus salina</i>	>20
<i>Nannochloris sp.</i>	20-35
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31-68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
<i>Nitzschia sp.</i>	45-47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20-30
<i>Schizochytrium sp.</i>	50-77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15-23

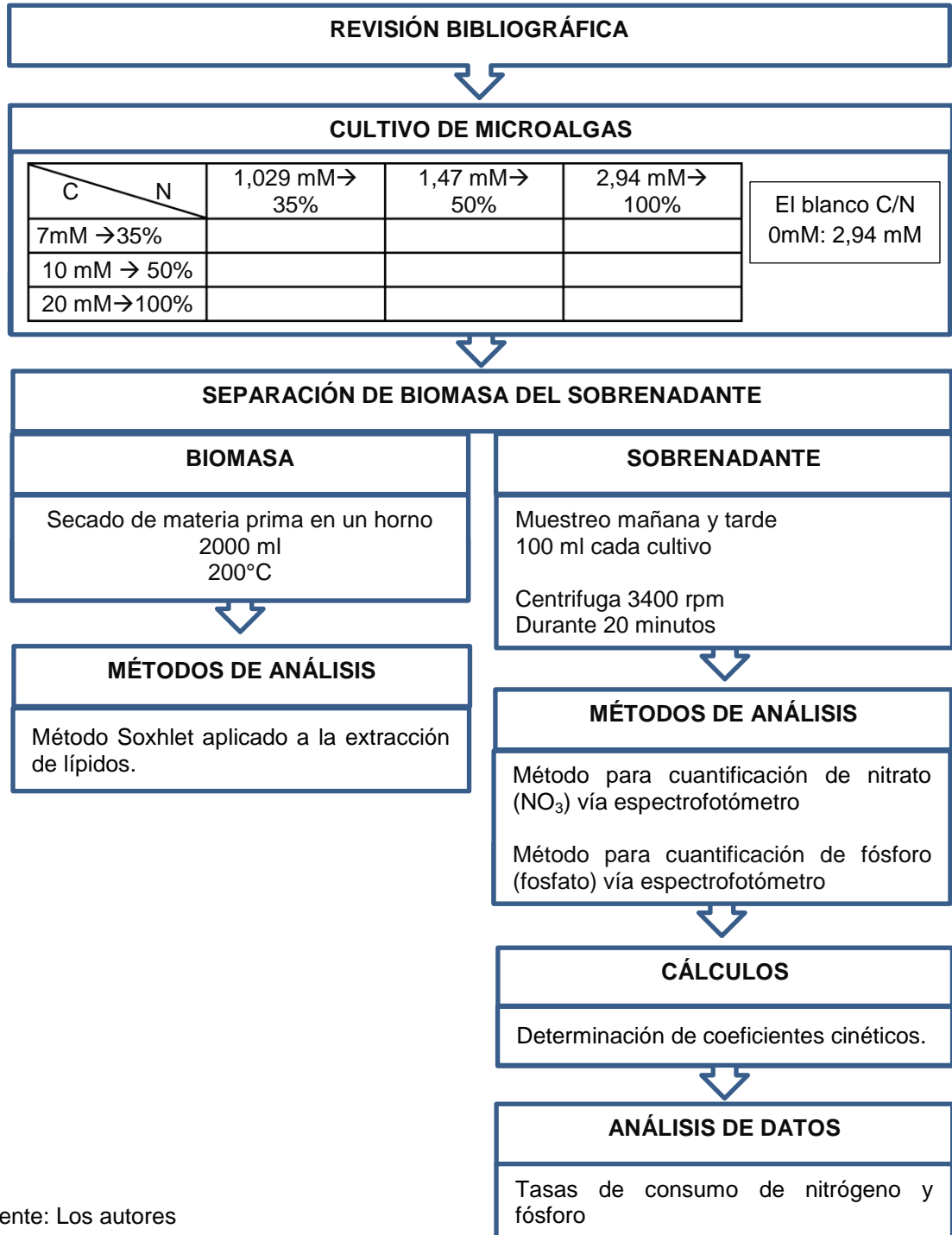
Fuente: Chisti. 2007

El nitrógeno es asimilado de fuentes como amoníaco, nitratos, nitritos y urea para sintetizar aminoácidos por medio de la transaminación, la diferencia entre una fuente y otra es la influencia en la tasa de crecimiento y acumulación de lípidos [18, 19, 20]. El porcentaje en peso de lípidos varía por intervención de la concentración de algunos nutrientes en el medio de cultivo, entre ellos el nitrógeno y fósforo. Se ha confirmado que varias condiciones de estrés como la baja concentración de nitrógeno puede modificar significativamente la composición del organismo, provocando mayor contenido de lípidos, en el caso de *C.vulgaris*, se han reportado valores de contenido de lípidos de hasta 0,629 g/g en peso seco [1, 4, 5,20].

El crecimiento celular, la velocidad de consumo de nutrientes y la acumulación de lípidos dependen principalmente de factores como: concentración de nutrientes (siendo el nitrógeno y fósforo los más importantes), adición de fuentes de carbono orgánico (peptona, ácido acético, glucosa, glicerina, acetato) e inorgánicos (dióxido de carbono) y las condiciones de luz [1,4,21]. Una adecuada relación de la concentración entre nitrógeno y fósforo permite que la acumulación de lípidos y el crecimiento celular sean continuos [1,22]; la relación adecuada para consumo de nutrientes es de 8:1 [23].

## 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Figura 1. Esquema de la metodología experimental.



Fuente: Los autores

## **2.1 Cultivo**

### **2.1.1 Microorganismo**

La cepa silvestre *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 fue adquirida de la Colección de Cultivo de Algas de la Universidad de Texas (Austin, Texas, USA). Esta permaneció en crecimiento en medio *Bold Basal (MBB)*, a 23 °C, pH neutro y aireación permanente, sin suministro complementario de CO<sub>2</sub>.

### **2.1.2 Medio de cultivo**

El microorganismo se mantuvo en crecimiento en MBB (Bold 1949, Bishoff and Bold 1963), cada litro de medio está compuesto por: NaNO<sub>3</sub>, 2,94x10<sup>-3</sup> M; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 3,04x10<sup>-4</sup> M; NaCl, 4,28x10<sup>-4</sup> M; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4,31x10<sup>-4</sup> M; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,29x10<sup>-3</sup> M; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 1,70x10<sup>-4</sup> M; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1,85x10<sup>-4</sup> M; KOH, 5,53x10<sup>-4</sup> M; EDTA, 1,71x10<sup>-4</sup> M ; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1,79x10<sup>-5</sup> M y 1 ml de solución de metales.

Por último, se modificó la concentración de la fuente de nitrógeno (nitrato de sodio) y carbono (acetato de sodio) como se muestra en la Figura 3, mientras que la concentración de las fuentes de fósforo (Fosfato monoácido de potasio, Fosfato diácido de potasio) se mantuvieron según las especificaciones del MBB.

### **2.1.3 Fotobiorreactor**

Se usaron botellas de plástico transparentes de 14 cm de diámetro, 35 cm de altura y 2,5 L de capacidad, con un volumen de trabajo de 2 L, 14 cm de diámetro y 35 cm de altura. Se utilizaron un total de 30 reactores (original y 2 replicas). En el extremo superior de cada uno de los reactores había un sistema de continuo suministro de aireación por burbujeo (tubo-difusor) con el fin de proveer de aire los cultivos y garantizar que todas las células estén expuestas a la luz y los nutrientes del medio.

Las células, se cultivaron en ciclos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. La iluminación fue proporcionada de ambos lados de los reactores con lámparas fluorescentes. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (23°C) durante 5 días.

## **2.2 Métodos de análisis**

### **2.2.1 Separación de biomasa y sobrenadante**

Se retiraron dos muestras diarias de 100 ml por cada cultivo (mañana y tarde), las cuales fueron centrifugadas a 3400 rpm durante 20 minutos, para asegurar que el medio estuviese libre de células, la muestra fue filtrada usando papel filtro (2  $\mu$ ).

### **2.2.2 Extracción de lípidos**

La extracción se realizó siguiendo el protocolo Soxhlet con hexano, modificado por el centro de investigación CIDES, el cual consiste en secar 2000 ml de cultivo a 200°C durante 12 h, después de secada, se homogeniza usando un mortero y se somete nuevamente a secado a 125°C durante 3 h. Finalmente, en un papel filtro (tamaño de poro) se pesan 5 gr de biomasa homogenizada y se ingresa al soxhlet. El proceso duró 16 h.

### **2.2.3 Cuantificación de nitrógeno y fósforo en el medio**

Para la cuantificación de Nitrógeno (NO<sub>3</sub>-N) y Fósforo (PO<sub>4</sub>-P) se recurrió a Standart Methods for Examination of Wáter and Wastewater, 20th edition.

#### **2.2.3.1 Nitrógeno (NO<sub>3</sub>-N)**

Se tomaron 50 ml de medio de cultivo libre de células y se agregó 1 ml de solución de HCL 1 N y se agita vigorosamente, después de 10 minutos, la muestra se lee a 220 y 275 nm. Los valores fueron reemplazados en la siguiente ecuación.

$$\text{valor corregido} = (2x\lambda_{275}) - \lambda_{220}$$

#### **2.2.3.2 Fósforo (PO<sub>4</sub>-P)**

Se tomaron 30 ml de medio libre de células, luego se agrego 10 ml de solución de Metavalanato-Molibdato y se aforó con agua destilada hasta un volumen de 50 ml. Después de 10 minutos la muestra se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 470 nm.

### 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Los siguientes resultados de productividad de biomasa y consumo de nitrógeno, corresponden al muestreo realizado en la tarde debido a que presentan mayores concentraciones, además los resultados recogidos en la mañana conservan la tendencia de proporcionalidad entre la concentración de nitrógeno y la productividad de biomasa, por lo tanto se les aplica el siguiente análisis y no se muestran en el presente estudio.

En la Figura 2 se muestra la acumulación de biomasa y el porcentaje de nitrógeno consumido en todos los experimentos después de 5 días, ordenados por sus concentraciones iniciales de acetato/nitrógeno. Según los resultados, altas concentraciones de nitrógeno llevaron a los valores más altos en producción de biomasa en cada nivel de acetato, estos resultados están de acuerdo a trabajos previos como el de Xiong et al [24].

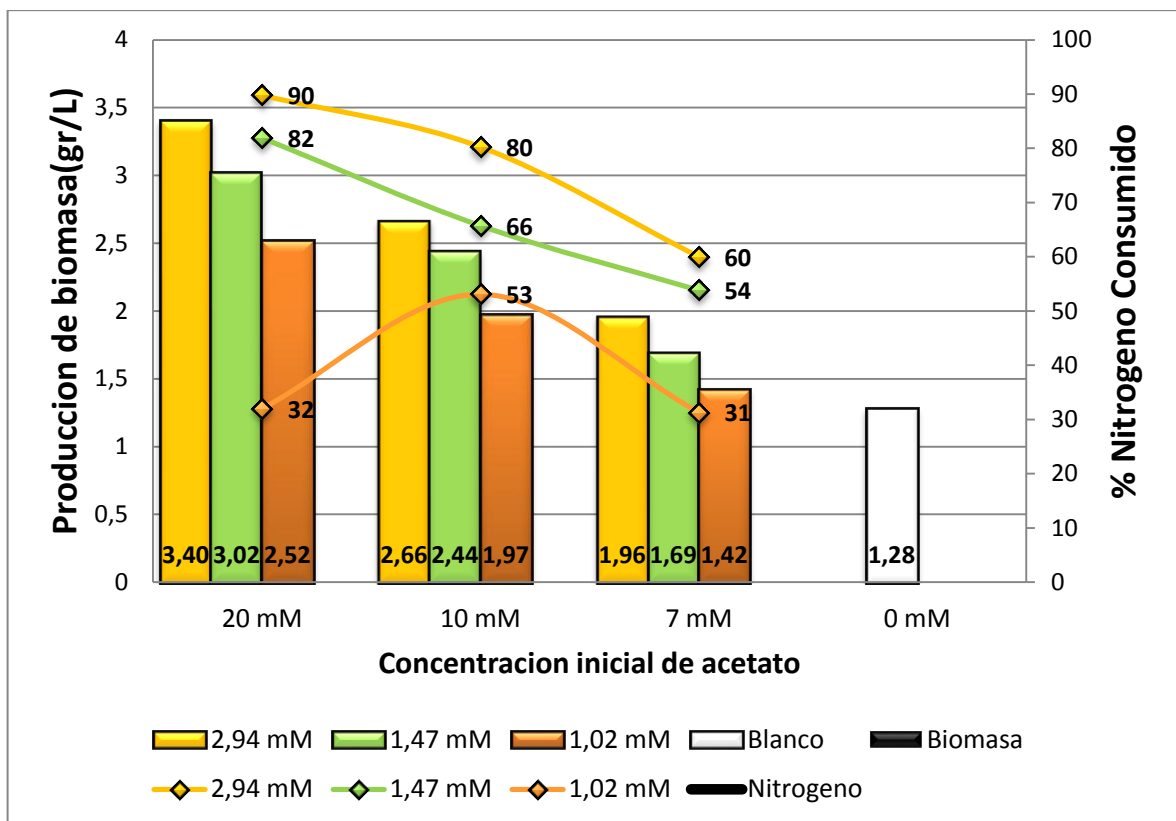
El cultivo que produjo más biomasa (3,4 gr/L) fue aquel con una relación de 20 mM A: 2,94 mM N, y un consumo de nitrógeno del 90%, también podemos observar que para los cultivos con una concentración inicial de 2,94 mM de nitrógeno, los resultados fueron superiores para los tres niveles de acetato; aquellos cultivos con una concentración inicial de 1,47 mM de nitrógeno mostraron resultados lineales similares,(ver Figura 2); por último, los cultivos con una concentración inicial de 1,02 mM de nitrógeno mostraron un comportamiento en forma de campana con un máximo de producción de biomasa de 1,97 gr/L y un consumo de nitrógeno de 53%.

Las mayores productividades de biomasa en los cultivos con una concentración inicial superior de nitrógeno se pueden explicar observando la relación entre el

porcentaje de nitrógeno consumido y la biomasa producida, en ella se observa que un mayor consumo de nitrógeno conlleva a una mayor cantidad de biomasa.

El cultivo que obtuvo las menores cantidades de biomasa fue el blanco (0 mM A: 2,94 mM N) con una producción de biomasa de 1,28 gr/L y un consumo de nitrógeno del 49%. En el trabajo de Hernández& Rosas [28], se encontró que las productividades más bajas de biomasa pertenecen al blanco (0 mM A: 2,94 mM N).

**Figura 2.** Consumo de nitrógeno en relación con la producción de biomasa.



Fuente: Los Autores.

Es importante resaltar que el consumo de nitrógeno se da entre los primeros dos días, y que al cuarto día el consumo de nitrógeno es despreciable, lo cual indicaría la importancia de ingresar al sistema nitrógeno para alcanzar la concentración

inicial y poder suplir las necesidades nutricionales del alga para poder alcanzar mayores valores de biomasa (Ver Tabla 2).

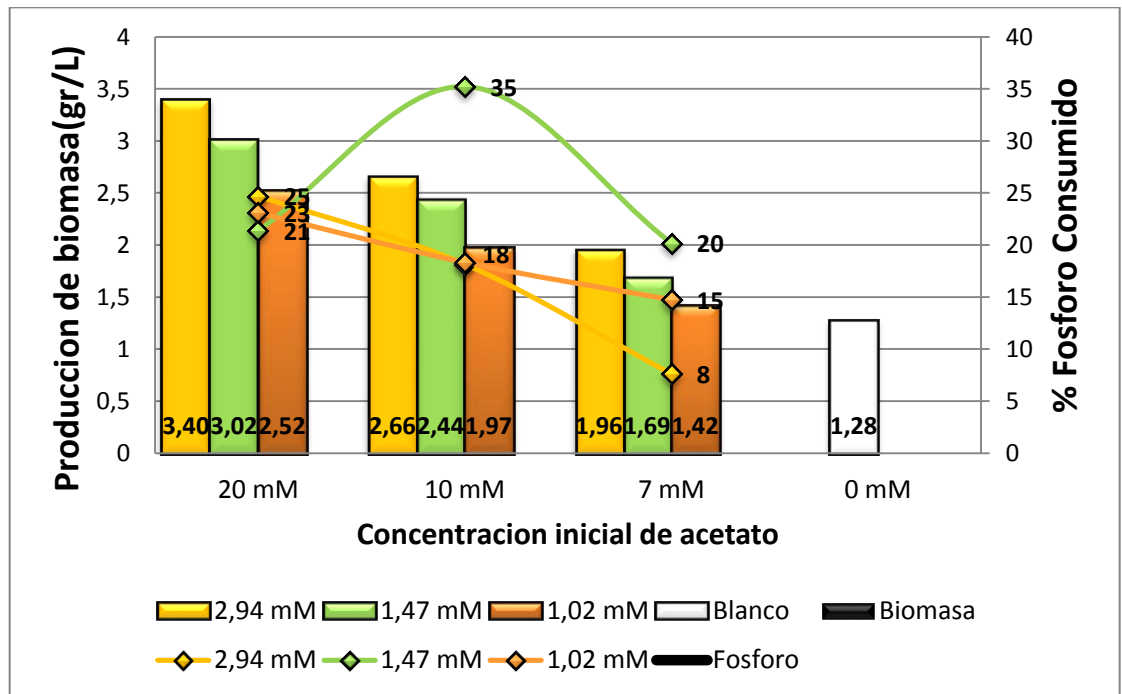
**Tabla 2.** Razón de cambio en el consumo de nitrógeno al cuarto día.

RAZON DE CAMBIO EN EL CONSUMO DE NITRÓGENO(%mmol)										
Ci Día	100%A, 100% N	50% A, 100% N	35% A, 100% N	100% A, 50% N	50% A, 50% N	35% A, 50% N	100% A, 35% N	50% A, 35% N	35% A, 35% N	A 0%, 100% N
4	0	0	0,24	0,48	0	0	0	0,68	0,68	2,52

Fuente: Los Autores.

El consumo de fósforo y la acumulación de biomasa se puede observar en la Figura 3, en ella se aprecia que el máximo consumo de fósforo fue de 35% para el cultivo con una relación de 10 mM A: 1,47 mM N y una productividad de biomasa de 2,44gr/L, sin embargo, para los demás cultivos con concentración inicial 1,47 mM N no muestra una tendencia en los demás niveles de acetato, podemos resaltar que el consumo de fósforo fue mucho menor al del nitrógeno, esto significaría que el fósforo influye en menor medida en la producción de biomasa, además de las figuras 2 y 3 se puede concluir que, aquellos cultivos con una mayor producción de biomasa, tuvieron un mayor consumo tanto de nitrógeno como fósforo, sin embargo, el cultivo con una relación 10 mM A: 1,47 mM N fue el que consumió la mayor cantidad de fósforo en todos los experimentos, aun cuando la productividad de biomasa (2,44 gr/L) no se encuentra entre las más grandes.

**Figura 3.** Consumo de fósforo en relación con la producción de biomasa.



Fuente: Los Autores.

**Tabla 3.** Razón de cambio del consumo de fósforo al quinto día.

RAZON DE CAMBIO DEL CONSUMO DE FÓSFORO (%mmol)										
Ci / Día	100%A, 100% N	50%A, 100% N	35%A, 100% N	100%A, 50% N	50%A, 50% N	35%, 50% N	100%A, 35% N	50%A, 35% N	35%A, 35% N	A 0%, 100% N
5	0,06	0,06	0,00	0,00	0,87	0,29	0,17	0,12	0,35	0,06

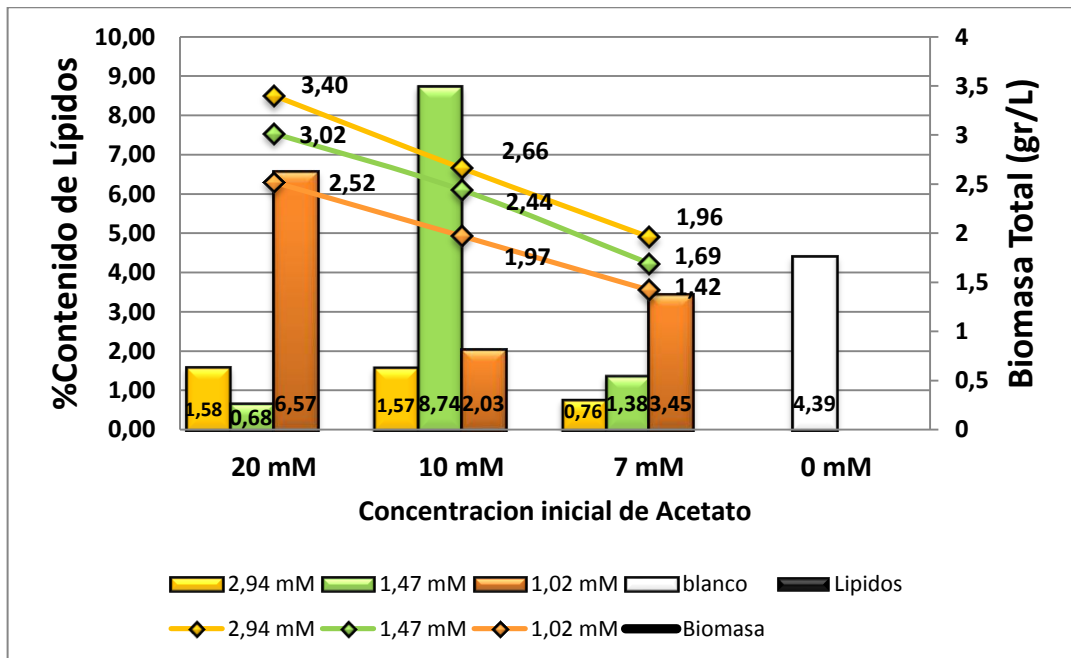
Fuente: Los Autores.

También es importante observar la Tabla 3 donde se encuentran los porcentajes de cambio del consumo de fósforo porque nos podemos dar cuenta que el fósforo tiene un bajo consumo y se estabiliza al quinto día; además como se observa en la Figura 3 no supera para ningún cultivo más del 35% del fósforo total, es

importante conocer estos resultados para futuros proyectos donde se quiera pasar de la escala laboratorio a batch.

La Figura 4 muestra la relación entre la biomasa total y la productividad de lípidos, podemos observar que, para cada relación de acetato/nitrógeno las microalgas tienden a consumir los nutrientes presentes en el medio tanto para la producción de biomasa total, o para la deposición de metabolitos específicos, en este caso, lípidos. El experimento con una mayor producción de lípidos fue 10 mM A: 1,47 mM N, sin embargo no fue el que produjo la mayor cantidad de biomasa, por el contrario el cultivo que produjo más biomasa fue 20 mM A: 2,94 mM N pero como observamos la deposición de lípidos de este cultivo fue baja.

**Figura 4.** Porcentaje de contenido de lípidos después de 5 días en relación con la biomasa total.

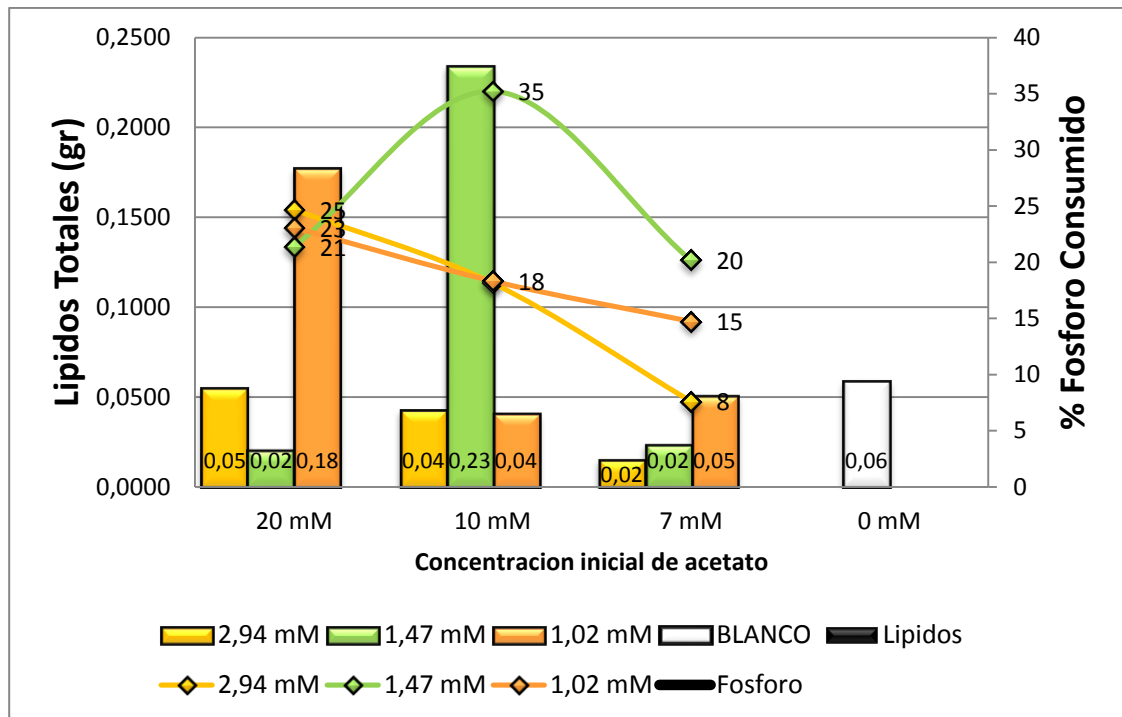


Fuente: Los Autores.

La producción de lípidos totales en relación con el % de fósforo y nitrógeno se muestra en la Figura 5 y 6 respectivamente. De estas graficas podemos resaltar que las mejores productividades de lípidos corresponden a los cultivos donde se dio más consumo de fósforo, ya que el experimento con una relación de 10 mM A:

1,47 mM N produjo 0,02 gr de lípidos, además podemos observar que el consumo de fósforo no se relaciona con la productividad de biomasa, sino con la productividad de lípidos.

**Figura 5.** Producción de lípidos en relación con el % de fósforo consumido.

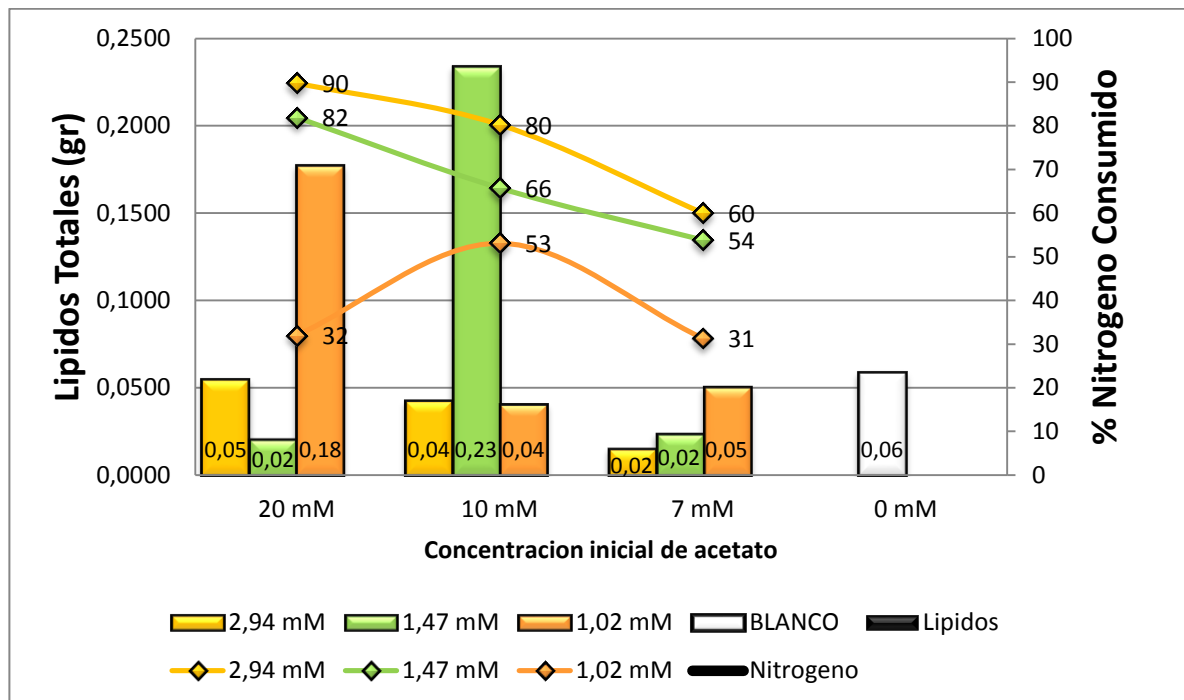


Fuente: Los Autores.

Sin embargo, a diferencia del fósforo, el porcentaje de nitrógeno consumido en relación con la productividad de lípidos fue menor. Muchos trabajos reportados en la literatura [28,29,30,31] se enfocan en la relación carbono/nitrógeno como una forma para la producción de lípidos sin tener que modificar genéticamente el organismo y aprovechando las características de los ciclos metabólicos inherentes de estos microorganismos; sin embargo, no existen estudios sobre el efecto de la relación nitrógeno/fósforo en la deposición de estos metabolitos, solo los trabajos de Xin et al & Kang et al [25,26] que se enfocan en que tan rápido es posible captar estos nutrientes de aguas residuales; de los resultados obtenidos de los diferentes experimentos, se puede concluir que el fósforo aparentemente, es un

factor clave para la deposición temprana de lípidos en las células; como ejemplo podemos tomar el experimento con una concentración inicial de 2,94 mM N, los cuales obtuvieron los resultados más bajos de lípidos producidos para cada nivel de acetato, debemos resaltar que estos experimentos fueron los que más biomasa produjeron, al igual que consumieron la mayor cantidad de nitrógeno presente.

**Figura 6.** Producción de lípidos en relación con el % de nitrógeno consumido.



Fuente: Los Autores.

En cuanto a la cantidad de nitrógeno y fósforo que se consume es posible obtener condiciones para un cultivo continuo o semicontinuo, sabiendo que el nitrógeno se consume a una mayor tasa; pero hasta ahora no sabemos si se requiere de un exceso de nitrógeno, por lo cual es posible diseñar un sistema de cultivo en el cual se realicen cosechas parciales cada cinco días con un contenido lipídico.

#### 4. CONCLUSIONES

- La productividad de biomasa es directamente proporcional a la cantidad de nutrientes presentes en el medio; en este caso nitrato como fuente de nitrógeno y acetato como fuente de carbono.
- Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, para obtener una mayor producción de biomasa (3,4 g/L) en un sistema de cultivo semi-continuo, se requiere agregar cada 5 días 2,64 mM de nitrato (90%), 0,4 mM de fosfato (25%) y 20 mM de acetato.
- Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, para obtener una mayor producción de lípidos (0,23 g/L) en un sistema de cultivo semi-continuo, se requiere agregar cada 5 días 0,97 mM de nitrato (66%), 0,57 mM de fosfato (35%) y 10 mM de acetato.
- Las mejores productividades de lípidos corresponden a los cultivos donde se dió más consumo de fósforo, sin embargo se encontró que el consumo de este nutriente favorece la productividad de biomasa.

## RECOMENDACIONES

La productividad de biomasa aumentó significativamente con los tratamientos aplicados en este trabajo, se recomienda hacer una exploración en el intervalo de relaciones cercanas a las que se encontró como superior en este estudio, además de aumentar el tiempo en el cual se toma el muestreo de 5 a 10 días para observar cómo cambia su productividad.

Para confirmar el consumo total del acetato suministrado a los cultivos de *C. vulgaris* se sugiere realizar un seguimiento a la variación de la concentración de este sustrato en el medio de cultivo.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., & Ying-xue, S. (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology* 101: 5494–5500.
- [2] Aslan, S., & Kapdan, I.K. (2006). Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering* 28: 64–70.
- [3] Gonzfilez, L.E., Cafiizares, R. O., & Baena, S. (1997). Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresource Technology* 60: 259-262.
- [4] Heredia-Arroyo, T., Wei, W., & Hu, B. (2010). Oil Accumulation via Heterotrophic/Mixotrophic *Chlorella protothecoides*. *Appl Biochem Biotechnol* 162: 1978–1995.
- [5] Mallick, N. (2002). Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review. *BioMetals* 15: 377–390.
- [6] Barsanti, L. & Gualtieri, P. (2006). General Overview. *Algae. Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*.
- [7] Hoek, C. Van Den. (1981). Chlorophyta: Morphology and classification. C., Wynne, M. Lobban. *The Biology of seaweeds*. 3.
- [8] Abbayes, H. Des. (1989). Clasificación de las algas. *Botánica: vegetales inferiores*.
- [9] Robert Edward Lee. (2008). Cambridge University. Chlorophyta. *Phycology*. 5.

- [10]Iwamoto, H.(2004). Industrial Production of Microalgal Cell-mass and Secondary Products – Major Industrial Species: Chlorella. A. Richmond. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology 11.
- [11]Xu, L., Weathers, P., Xiong, X. & Liu, C.(2009). *Microalgal bioreactors: Challenges and opportunities*. Engineering in Life Sciences9:178–189.
- [12]Ghasem D. Najafpour.(2007). Biochemical Engineering and Biotechnology. First edition. P 98-99.
- [13]Vera Garcia,Introducción a la microbiología (1995), Editorial Universidad estatal a distancia. P 52-55
- [14] Quintero, R. R. (1981) Ingeniería Bioquímica. P 27-54.
- [15]Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances 25: 294–306.
- [16]Richmond A. (2004). Handbook of Microalgal Culture - Biotechnology and Applied Phycology. 4 ed. Vol. 4. Estados Unidos.: Wiley-Blackwell.
- [17] Wang, L., Li, Y., Chen, P., Min, M., Chen, Y., Zhu, J., &Ruan, R. R. (2010). Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae Chlorella sp. Bioresource Technology 101: 2623–2628.
- [18] Chih-Hung Hsieh., Wen-Teng Wu., (2009). Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. Bioresource Technology.
- [19] Castilla, P. (2010).“Remoción de ortofosfato y amonio de agua residual municipal por tres cultivos libres e inmovilizados de microalgas”.Tesis para obtener el grado de especialidad en biotecnología. Universidad Autonoma Metropolitana.México D. F.

- [20] Becker, E.(1994). Measurement of alga growth. *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*.
- [21] Richmond, A. (2004). Principles for attaining maximal microalgal productivity in photobioreactors: an overview. *Hydrobiologia* 512: 33–37.
- [22] Xin, L., Hong-ying, H., & Jia, Y.(2010). Lipid accumulation and nutrient removal properties of a newly isolated freshwater microalga, *Scenedesmus* sp. LX1, growing in secondary effluent. *New Biotechnology*.
- [23] Kapdan, I.K., Aslan, S.(2008). Application of the Stover–Kincannon kinetic model tonitrogen removal by *Chlorella vulgaris* in a continuously operated immobilizedphotobioreactor system. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 83:998–1005.
- [24] Xiong, W., Li, X. F., Xiang, J. Y., & Wu, Q. Y. (2008). High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 78: 29–36.
- [25] Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G& Jia, Y. (2010). Growth and nutrient removal properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. LX1 under different kinds of nitrogen sources. *Ecological Engineering* 36: 379–381.
- [26] Kang, C. D., An, J. Y., Park, T. H., Sim, S. J. (2006). Astaxanthin biosynthesis from simultaneous N and P uptake by the greenalga. *Haematococcus pluvialis* in primary-treated wastewater. *Biochemical Engineering Journal* 31: 234–238.
- [27] Hernandez, P. A.; Rosas, C. F. (2011). “Efecto de la relación carbono/nitrógeno en la productividad de biomasa de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 en fotobiorreactores a escala de laboratorio”. Trabajo de grado en Ing. Química, Universidad Industrial de Santander, Colombia.

- [28]** Hernandez, J.P., Bashan, L.E., Bashan, Y. (2006). Starvation enhances phosphorus removal from wastewater by the microalga *Chlorella* spp. co-immobilized with *Azospirillum brasilense*. *Enzyme and Microbial Technology* 38: 190–198.
- [29]** M. Kaya, V., Goulet, J., Noiie, J., Picard, G., (1996). Effect of intermittent CO<sub>2</sub> enrichment during nutrient starvation on tertiary treatment of wastewater by alginate-immobilized *Scenedesmus bicellularis*. *Enzyme and Microbial Technology* 18:550-554.
- [30]** Orosa, M., Valero, J.F., Herrero, C., Abalde, J. (2001). Comparison of the accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* and other green microalgae under N-starvation and high light conditions. *Biotechnology Letters* 23: 1079–1085.
- [31]** Gouveia, L., Marques, A. E., Silva, L., Reis, T. A., (2009). *Neochloris oleabundans* UTEX #1185: a suitable renewable lipid source for biofuel production. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36:821–826.

## ANEXOS

### ANEXO A. CÁLCULO DEL COEFICIENTE MÁSIICO DE EXTINCIÓN

**Tabla A1.** Variación de la absorbancia con la concentración de la muestra.

Coeficiente de extinción másico	
peso (g/L)	abs (500 nm)
0,680	0,79
0,88	0,838
0,780	0,840
1,08	0,946
1,18	1,231
0,92	1,262
1,42	1,283
1,76	1,584
2,34	1,777
3,14	2,884

**Figura A1.** Grafica de los datos de absorbancia en función de la concentración, para el cálculo del coeficiente másico de extinción.

