

## DENSIDAD CELULAR Y ACUMULACIÓN DE LÍPIDOS EN CULTIVOS LIBRES DE *Chlorella vulgaris* Y *Neochloris oleoabundans* A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NITRÓGENO Y CARBONATO DE SODIO

### CELLULAR DENSITY AND ACCUMULATION OF LIPIDS IN FREE CULTURES GIVES *Chlorella vulgaris* AND *Neochloris oleoabundans* TO DIFFERENT CONCENTRATIONS OF NITROGEN AND CARBONATE OF SODIUM

Nain Elvira Antonio\*, Alejandro Ruíz Marín, Luis Jorge Pérez Reda, Reyes García Zarracino, Yunuen Canedo López, Silvia del Carmen Campos García, Mirna Yolanda Sabido Perez, Julia Griselda Cerón Bretón, Atl Víctor Cordova Quiroz, Joaquín Humberto Moreno López<sup>1</sup>

Fecha de recepción 14 de octubre del 2010

Fecha de aceptación 10 de diciembre del 2010

#### RESUMEN

La búsqueda en nuevas alternativas de combustibles ha llevado a considerar el aprovechamiento de microalgas para la obtención de biocombustible. Estudios han reportado que *Chlorella vulgaris* (59%), *Nannochloropsis sp* (68%), y *Neochloris Oleoabundans* (54 %) presentan alto contenido de lípidos, bajo ciertas condiciones de cultivo como, limitación de nitrógeno, salinidad, temperatura y enriquecimiento con CO<sub>2</sub>. En el presente trabajo se analizan los efectos en el crecimiento de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Neochloris oleoabundans* en cultivos libres en medios con variaciones en la concentración de nitrógeno y enriquecimiento con sal de carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>); así mismo evaluar el contenido de lípido bajo esas condiciones de cultivo. Los bio-reactores empleados fueron de polietileno tereftalato (PET) de 3 litros (l), con un volumen de operación de 2.5 litros (l) con agua residual artificial. El estudio consistió en cultivar *C. vulgaris* en medio de cultivo con cloruro

de amonio (NH<sub>4</sub>Cl) y *N. oleoabundans* con nitrato de potasio (KNO<sub>3</sub>), a concentraciones de 30, 15 y 10 mg l<sup>-1</sup> a 32 °C. En este estudio se seleccionó la concentración más favorable de acuerdo al crecimiento y acumulación de lípidos. Posteriormente agregó la sal de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en solución a una concentración de 0.1, 0.25 y 5 % en peso (1, 2.5 y 5 g l<sup>-1</sup>). La mayor densidad celular para *C. vulgaris* en el periodo de tratamiento de 8 días, fue de 21.80 x 10<sup>6</sup> cel ml<sup>-1</sup> en cultivo con una concentración de 30 mg N l<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>Cl, y para *N. oleoabundans* fue de 28.12 x 10<sup>6</sup> cel ml<sup>-1</sup> con similar concentración de KNO<sub>3</sub>. El máximo contenido de lípidos fue de 69.3 % para *C. vulgaris* y 69.18 % para *N. oleoabundans* a concentraciones de 30 mg N l<sup>-1</sup>. Los cultivos sometidos a sal de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> no mostraron cambios significativos en la acumulación de lípidos a las diversas concentraciones de la sal. Seleccionando al final el nivel de nitrógeno y la concentración de sal de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> favorable, para obtener el mayor contenido de lípidos y la máxima producción de biomasa.

<sup>1</sup> Universidad Autónoma del Carmen, Campeche. DES-DACQYP. Facultad de Química. Calle 56 x Av. Concordia. Col. Benito Juárez. C.P. 24180. México

\*Autor para correspondencia: nelvira@pampano.unacar.mx

**PALABRAS CLAVE:** *Chlorella vulgaris*, *Neochloris oleoabundans*, nitrógeno, contenido de lípidos, carbonato de sodio.

## ABSTRACT

The search for new alternative fuels has led to consider the use of microalgae for biofuel production. Studies have reported that *Chlorella vulgaris* (59%), *Nannochloropsis* sp. (68%) and *Neochloris Oleoabundans* (54%) have high lipid content, under certain culture conditions as a limitation of nitrogen, salinity, temperature and CO<sub>2</sub> enrichment. This paper examines the effects on growth of the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Neochloris oleoabundans* free cultures with variations in the concentration of nitrogen in culture media, so as to evaluate the lipid content under these culture conditions. The bioreactors used were polyethylene terephthalate (PET) of 3 liters (l), with a volume of operation of 2.5 liters (l) with artificial wastewater. The study consisted of cultivating *C. vulgaris* in the middle of culture with chloride of ammonium (NH<sub>4</sub>Cl) and *N. oleoabundans* with nitrate of potassium (KNO<sub>3</sub>), to concentrations of 30, 15 and 10 mg l<sup>-1</sup> to 32 °C. In this study the most favorable concentration of agreement was selected to the growth and accumulation of lipids. Later one added the salt of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in solution to a concentration of 0.1, 0.25 and 5 % in weight (1, 2.5 and 5 g l<sup>-1</sup>). The highest cell density for *C. vulgaris* in the treatment period of 8 was 21.80 x 10<sup>6</sup> cel ml<sup>-1</sup> in culture with a concentration of 30 mg

l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl, and *N. oleoabundans* was 28.12 x 10<sup>6</sup> cel ml<sup>-1</sup> with similar concentrations of KNO<sub>3</sub>. The maximum lipid content obtained was 69.3% for *C. vulgaris* and 69.18% for *N. oleoabundans*. The cultures submitted to salt of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> did not show significant changes in the accumulation of lipids to the diverse concentrations of the salt. Selecting the final nitrogen level more favorable for lipid content and the maximum biomass production.

**Key words:** *Chlorella vulgaris*, *Neochloris oleoabundans*, nitrogen, content of lipids, carbonate of sodium.

## INTRODUCCIÓN

Varias estrategias de mitigación de CO<sub>2</sub> han sido investigadas y estas pueden ser divididas en dos categorías: 1) reacciones químicas de carbonatación / des-carbonatación y 2) mitigación CO<sub>2</sub> biológica. Esta última ha atraído la atención como una alternativa viable debido a que se puede llevar a cabo la producción de biomasa y energía en el proceso de fijación de CO<sub>2</sub> a través de la fotosíntesis (Ragauskas *et al.*, 2006).

La mitigación de CO<sub>2</sub> biológica puede ser realizada por plantas y microorganismos fotosintéticos. En especial atención al uso de las microalgas, las cuales corresponden a un grupo de microorganismos unicelulares de rápido crecimiento, con la habilidad de fijar CO<sub>2</sub> mientras capturan energía solar (Li *et al.*, 2008a).

Las microalgas son células que utilizan la luz solar para convertir el dióxido de carbono a biocombustibles potenciales (Metting *et al.*, 1996), y ofrece diferentes tipos de biocombustibles renovables, incluyendo al metano producido por la digestión anaerobia de la biomasa algal, biodiesel y biohidrógeno fotobiológico (Banerjee *et al.*, 2002; Kapdan *et al.*, 2006). Una característica importante es que el aceite acumulado en el caso de las microalgas esta constituido principalmente por triglicéridos (> 80%) los cuales pueden ser aprovechados para la producción de biodiesel (Papanikolaou *et al.*, 2002).

Los sistemas de cultivo de microalgas muestran una versatilidad que les permite ser utilizados en diferentes procesos tales como en el tratamiento de aguas residuales, producción de alimento para animales, producción de fertilizantes y producción de otros compuestos químicos (De la Noüe y De Pauw, 1988). El aprovechamiento de nutrientes presentes en agua residual o medios de cultivos convencionales por las microalgas es incorporado, como proteínas, carbohidratos y lípidos. Estos últimos son de mayor interés desde el punto de vista energético, dado que, las células con alto contenido de lípidos y baja concentración de carbohidratos y proteínas tiene un elevado valor calorífico (Scragg *et al.*, 2002). Las habilidades para producir y acumular aceite por las microalgas dependen de las condiciones de cultivo, tales como temperatura, intensidad de luz, pH, salinidad, minerales, aportes y contenido de nitrógeno y enriquecimiento de CO<sub>2</sub>. Estudios realizados por Illman *et al.* (2000) reportaron que la limitación de nitrógeno puede incrementar el contenido de lípidos en las cepas de *Chlorella*. La especie *Neochloris oleoabundans* bajo condiciones de limita-

ción de nitrógeno puede acumular de 35 a 54% de lípidos de la biomasa peso seco y triglicéridos en un 80% del total de lípidos (Torabene *et al.*, 1983), mientras que *C. vulgaris* puede llegar a presentar hasta un 59.7 % de lípidos (Illman *et al.*, 2000).

Otro factor que se ha reportado que interviene en el crecimiento y acumulación de lípidos es el dióxido de carbono. El CO<sub>2</sub> resulta ser uno de los gases que participan en el efecto invernadero y una alternativa propuesta para su captura desde chimeneas industriales es el uso de éste en cultivos de microalgas. Una de las formas en que se puede realizar la captura de CO<sub>2</sub> es por medio de reacciones químicas, produciendo carbonatos solubles (NaHCO<sub>3</sub> y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), los cuales posteriormente podrían ser adicionados a los medios de cultivo para la producción de biomasa algal. Esto proporcionaría una alta concentración de CO<sub>2</sub>, lo que resultaría benéfico siempre y cuando las microalgas sean capaces de tolerar niveles altos de CO<sub>2</sub> (Maeda *et al.*, 1995).

Especies de microalgas han demostrado ser capaces de utilizar carbonatos tales como Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y NaHCO<sub>3</sub> para su crecimiento celular (Huertas *et al.*, 2000; Ginzburg, 1993; Merrett *et al.*, 1996). Algunas de estas especies típicas, tienen una alta actividad carboanhidrasa extracelular, la cual es responsable de la conversión de carbonatos para liberar CO<sub>2</sub> y así facilitar la asimilación de éste. Por tanto algunas especies de microalgas pueden fijar el CO<sub>2</sub> liberado de los carbonatos y puede ser ventajosa en muchos aspectos: a) el CO<sub>2</sub> liberado de instalaciones industriales podría ser convertido a sal de carbonato mediante reacciones químicas; b) ya que sólo un número limitado de especies microal-

gales prospera en medios que contienen altas concentraciones de sal de carbonatos, el control de la especie es relativamente simple y, c) la mayoría de estas especies tienen altos valores óptimos de pH (9 - 11).

## MATERIALES Y MÉTODOS

La microalga fue cultivada en medio agua residual artificial estéril preparado con las siguientes concentraciones: 7 mg l<sup>-1</sup> NaCl; 4 mg l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>; 2 mg l<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 15 mg l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Los metales traza y vitaminas se agregaron en referencia a las concentraciones descritas del medio f/2 por Guillard y Ryther (1962), el aporte de nitrógeno para *C. vulgaris* fue NH<sub>4</sub>Cl y KNO<sub>3</sub> para *N. oleoabundans*. La microalga se mantuvo en condiciones no axénica en medio de agua residual artificial para su aclimatación en matraces de 250 ml a 32±1 °C con iluminación continua a 100 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> con lámparas de luz fría blanca fluorescente. Para el aporte de CO<sub>2</sub> se utilizó sal de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a concentraciones de 1, 2.5 y 5 g l<sup>-1</sup>.

La microalga, una vez aclimatadas en medio de cultivo, se transfirieron a fotobiorreactores, los cuales consistieron en recipientes cerrados de polietilentereftalato (PET) de 3 litros (l) con volumen de operación de 2.5 litros (l). El aire de agitación en cada uno de los fotobiorreactores se proporcionó a través de un compresor adaptado a un filtro con carbón activado y membrana de fibra de vidrio (0.2 μm Whatman). El dispositivo difusor de aire se colocó a 1 cm de la base del biorreactor. Otra salida se adaptó como sistema de muestreo. Los fotobiorreactores se desinfectaron antes de cada cultivo me-

dante el lavado adecuado con una solución de agua y cloro.

El estudio consistió en cultivar *C. vulgaris* a concentraciones de 30, 15 y 10 mg de N-NH<sub>4</sub> l<sup>-1</sup> y para *N. oleoabundans* de 30, 15 y 10 mg de N-NO<sub>3</sub> l<sup>-1</sup>, ambas a 32±1 °C; se utilizó una densidad celular de inóculo de 1 x 10<sup>6</sup> células ml<sup>-1</sup> previamente determinado por conteo en cámara Neubauer Hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad y transferido a cada fotobiorreactor colocados por triplicado para cada especie de microalga con medio agua residual artificial.

Del experimento en cultivos con limitación de nitrógeno se seleccionó la concentración de nitrógeno más adecuada para cada especie de microalga, y nuevamente se cultivaron células libres variando la concentración de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Se realizaron tres tratamientos, con soluciones de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 0.1, 0.25 y 0.5 % en peso (1, 2.5 y 5 g l<sup>-1</sup>) adicionadas al medio de cultivo seleccionado. Además de un control que consistió en adicionar en un reactor sin sal de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Todos los tratamientos fueron por triplicado.

Muestras de biomasa cada 24 horas fueron obtenidas para determinar la biomasa peso seco. La remoción de nutrientes se determinó mediante el análisis de nitrógeno (NH<sub>4</sub>-N y NO<sub>3</sub>-N) en agua empleando las técnicas analíticas del método normalizado -Standard Methods- (AWWA, 1995) cada 48 horas, en un periodo máximo de tratamiento de 8 días. Los lípidos fueron extraídos siguiendo la metodología de Bligh y Dyer (1959) que consiste una extracción con una mezcla de cloroformo-metanol-agua, posteriormente es sometida a una evaporación a 45 °C, seguido de una extracción

con una solución de dicromato ácido al 2% sometido a calentamiento a 100 °C durante 15 minutos.

Para cada uno de los reactores se determinó la producción de biomasa, remoción de nitrógeno y contenido de lípidos, seleccionando al final el nivel de nitrógeno favorable para la producción de biomasa y contenido de lípidos.

Para conocer si existieron diferencias significativas en el crecimiento, remoción de nitrógeno y el contenido de lípidos de las dos especies de microalga cultivadas en estado libre, se realizaron análisis de covarianza (ANCOVA;  $\alpha = 0.05$ ).

## RESULTADOS

La densidad celular para ambas especies cultivadas en agua residual artificial a diferentes concentraciones de nitrógeno (10, 15 y 30 mg l<sup>-1</sup>), mostró diferencias significativas (ANCOVA;  $P < 0.005$ ). La mayor densidad celular para *C. vulgaris* en el periodo de tratamiento de 8 días, fue de  $21.80 \times 10^6$  cel ml<sup>-1</sup> en cultivo con una concentración de 30 mg N l<sup>-1</sup>, con respecto a los cultivos con 15 y 10 mg N l<sup>-1</sup> de  $17.85$  y  $17.80 \times 10^6$  cel ml<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 1), utilizando como aporte de nitrógeno el NH<sub>4</sub>Cl.

La máxima densidad celular para *N. oleoabundans* en cultivos con células libres en un periodo de tratamiento de 8 días fue de  $28.12 \times 10^6$  cel ml<sup>-1</sup> en el cultivo con 30 mg N l<sup>-1</sup>, mayor a lo observado en cultivos con 15 y 10 mg N l<sup>-1</sup> con una densidad celular de  $16.47$  y  $13.27 \times 10^6$  cel ml<sup>-1</sup>, respec-

tivamente (Figura 2), como aporte de nitrógeno el KNO<sub>3</sub>.

Esto soporta el hecho de que el contenido de lípidos (69.31 %) fue mayor en aquellos cultivos con 30 mg N l<sup>-1</sup> con respecto a 15 y 10 mg N-NH<sub>4</sub> l<sup>-1</sup> de 40 y 50 % de lípidos de la biomasa peso seco para *C. vulgaris* (Figura 3), al final del periodo de tratamiento. Para los cultivos de *N. oleoabundans* el máximo contenido de lípidos fue de 69.18, 59.28 y 55.99% a concentraciones de 30, 15 y 10 mg N-NO<sub>3</sub> l<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 4), al final del periodo de tratamiento. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas ( $P > 0.005$ ) entre los tratamientos para ambas especies de microalgas.

La remoción de nitrógeno para los cultivos de 30, 15 y 10 mg N-NH<sub>4</sub> l<sup>-1</sup> por *C. vulgaris* fue de 77.36 %, 70.37 % y 52.63 % (desde 30 a 6.7, de 15 a 4.4 y de 10 a 5.04 mg l<sup>-1</sup>) respectivamente en 144 horas de tratamiento (Tabla 1). Para el caso de *N. oleoabundans* la remoción de N-NO<sub>3</sub> fue de 100 % para las tres diferentes concentraciones de N-NO<sub>3</sub> (Tabla 1).

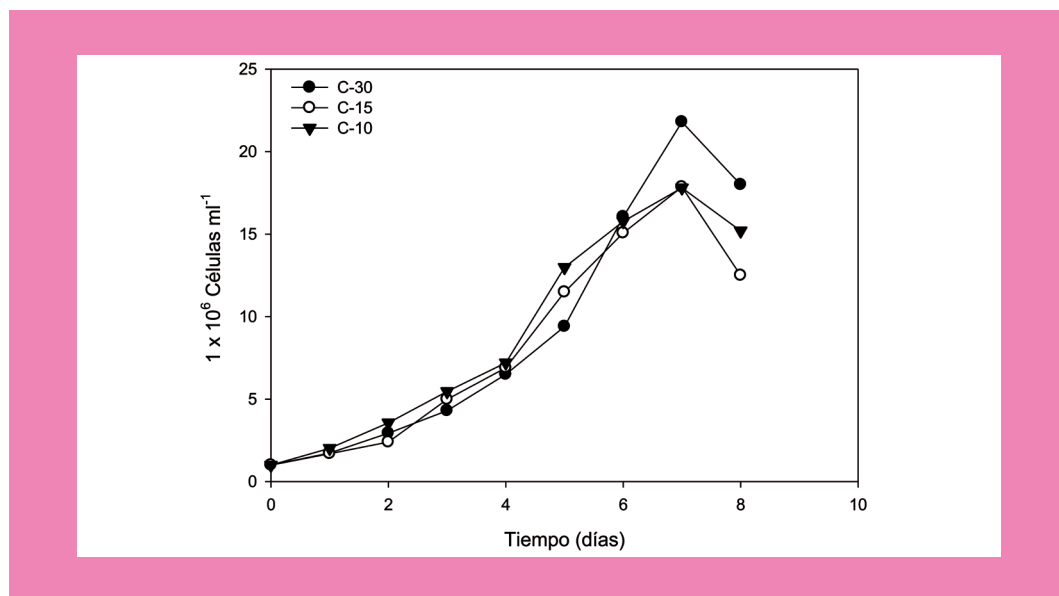


Figura 1. Curvas de crecimiento de *C. vulgaris* en cultivo libre con variación en la concentración de nitrógeno.

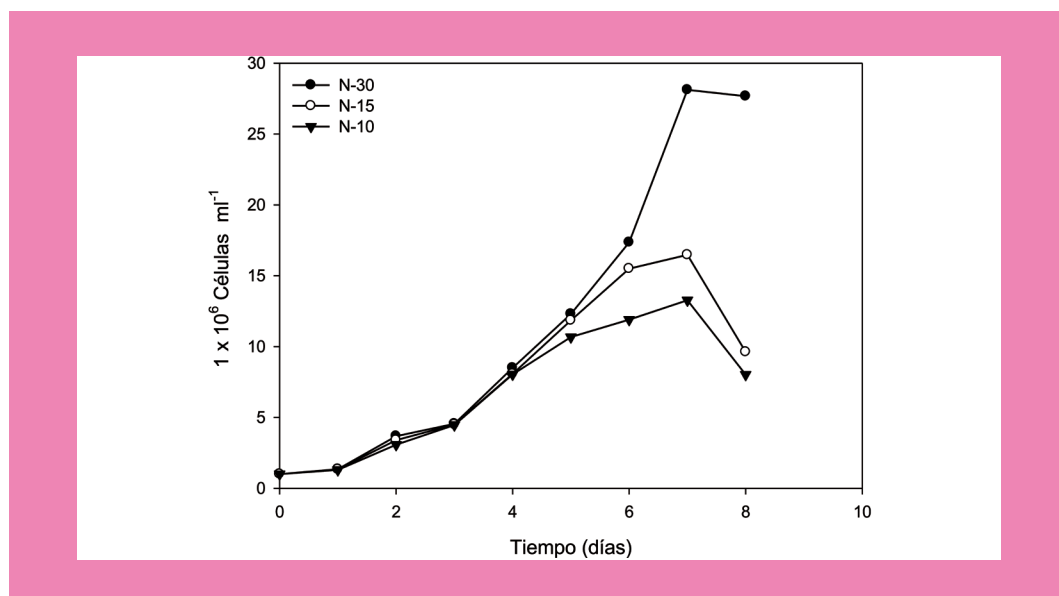


Figura 2. Curvas de crecimiento de *N. oleoabundans* en cultivo libre con variación en la concentración de nitrógeno.

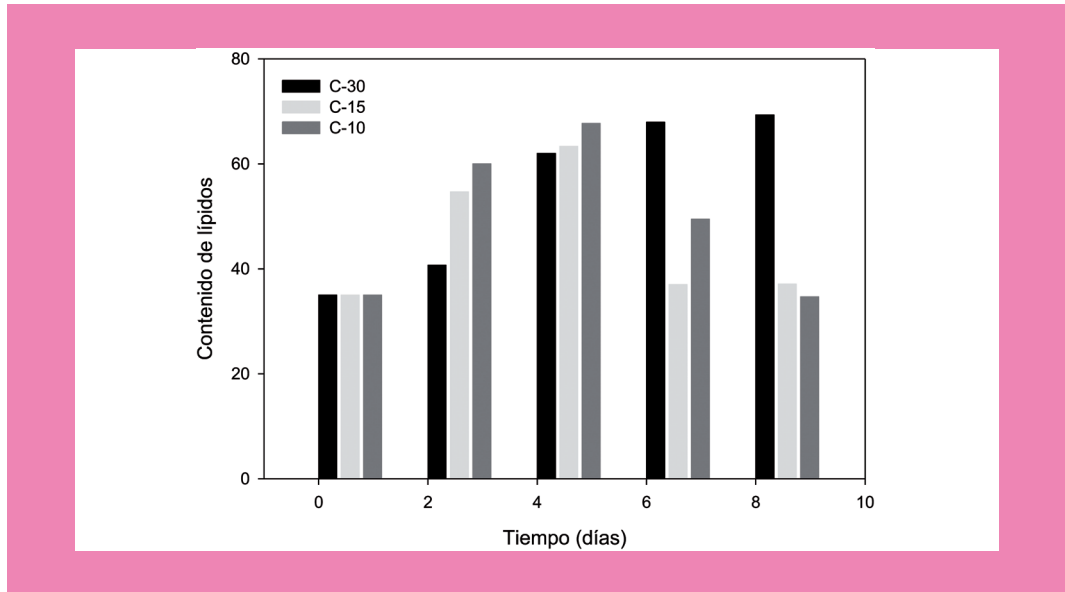


Figura 3. Contenido de lípidos de *C. vulgaris* en cultivo libre con variación en la concentración de nitrógeno.

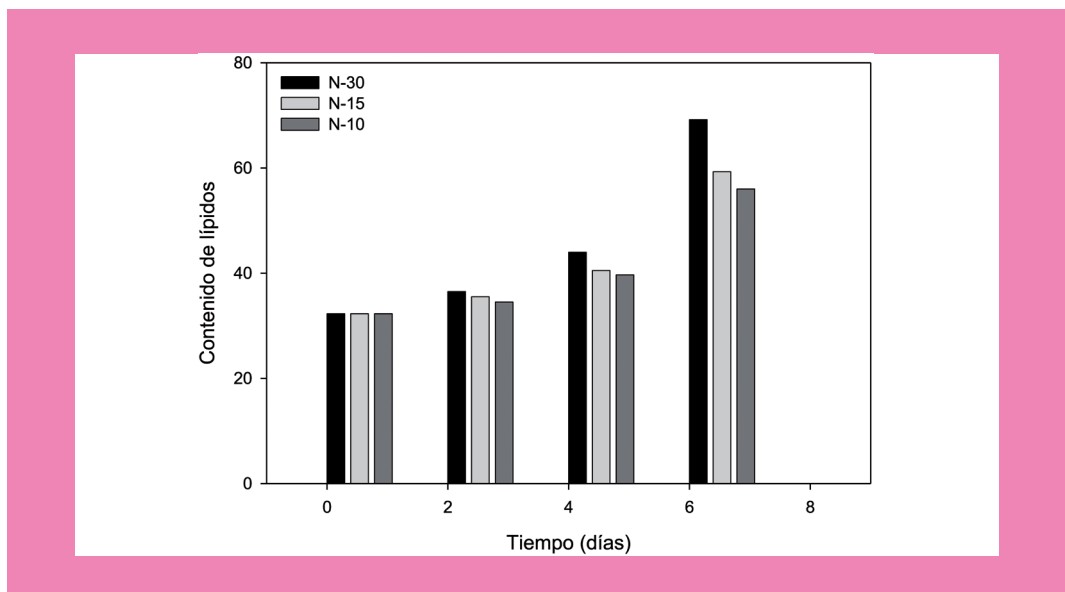


Figura 4. Contenido de lípidos de *N. oleoabundans* en cultivo libre, con variación en la concentración de nitrógeno.

Tabla 1. Valores promedio de los porcentajes ( $\pm$  desviación estándar) de remoción de  $N-NH_4$  y  $N-NO_3$ , durante el período de tratamiento de *C. vulgaris* y *N. oleoabundans*.

Tiempo (h)	<i>C. vulgaris</i>			<i>N. oleoabundans</i>		
	Tratamiento			Tratamiento		
	30 mg $N-NH_4$ l <sup>-1</sup>	15 mg $N-NH_4$ l <sup>-1</sup>	10 mg $N-NH_4$ l <sup>-1</sup>	30 mg $N-NO_3$ l <sup>-1</sup>	15 mg $N-NO_3$ l <sup>-1</sup>	10 mg $N-NO_3$ l <sup>-1</sup>
0	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
24	9.43 $\pm$ 1.71	7.41 $\pm$ 0.27	15.79 $\pm$ 4.44	15.63 $\pm$ 0.07	10.41 $\pm$ 0.15	62.98 $\pm$ 0.12
48	28.30 $\pm$ 0.92	40.74 $\pm$ 2.19	26.32 $\pm$ 3.89	36.27 $\pm$ 0.04	28.78 $\pm$ 0.04	100 $\pm$ 0.01
120	54.72 $\pm$ 0.85	51.85 $\pm$ 5.49	36.84 $\pm$ 3.33	81.27 $\pm$ 0.01	75.54 $\pm$ 0.01	100 $\pm$ 0.00
144	77.36 $\pm$ 0.42	70.37 $\pm$ 1.09	52.63 $\pm$ 7.78	100 $\pm$ 0.02	100 $\pm$ 0.01	100 $\pm$ 0.00

De acuerdo a los resultados obtenidos en cultivos de células libres de *C. vulgaris* y *N. oleoabundans* con distinta concentración de nitrógeno, se seleccionó la condición de cultivo favorable para ambas microalgas con respecto al contenido de lípidos obtenido (30 mg N l<sup>-1</sup>;  $NH_4$  o  $NO_3$  según fue el caso), de tal forma que esta condición se evaluó posteriormente con diversas concentraciones de una solución de sal de  $Na_2CO_3$ .

La densidad celular para *C. vulgaris* cultivada en agua residual artificial a 30 mg  $N-NH_4$  l<sup>-1</sup> y a las concentraciones de 0.1, 0.25 y 0.5 % en peso de solución de sal de  $Na_2CO_3$ , mostró diferencias significativas (ANCOVA;  $P < 0.05$ ). Mientras que en los cultivos de *N. oleoabundans* no se encontraron diferencias significativas (ANCOVA;  $P = 0.324$ ) en cultivos con 30 mg  $N-NO_3$  l<sup>-1</sup> a las mismas condiciones de cultivo que para *C. vulgaris*.

La máxima densidad celular para *C. vulgaris* fue de  $11.67 \times 10^6$  cel ml<sup>-1</sup> en el cultivo con 30 mg  $N-NH_4$  l<sup>-1</sup> y 0.1 % de  $Na_2CO_3$ , mayor a lo observado en cultivos con de 0.25 y 0.5 % de  $Na_2CO_3$  con una densidad celular de  $3.55$  y  $2.73 \times 10^6$  cel ml<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura

5). De igual forma para *N. oleoabundans* la máxima densidad celular fue de  $9.62 \times 10^6$  cel ml<sup>-1</sup> en el cultivo con 30 mg  $N-NO_3$  l<sup>-1</sup> y 0.1 % de  $Na_2CO_3$ , mayor a lo observado en cultivos con 0.25 y 0.5 % de  $Na_2CO_3$  con una densidad celular de  $7.10$  y  $7.00 \times 10^6$  cel ml<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 6).

El contenido de lípidos para *C. vulgaris* y *N. oleoabundans* a 30 mg l<sup>-1</sup> ( $N-NH_4$  y  $N-NO_3$  respectivamente) y diferentes concentraciones de sales de  $Na_2CO_3$  no mostró diferencias significativas (ANCOVA;  $P = 0.896$  y  $P = 0.611$  respectivamente). Cabe mencionar que se determinó el contenido de los lípidos en la fase inicial y en la fase exponencial de crecimiento.

El contenido máximo de lípidos de la biomasa peso seco para *C. vulgaris* para un periodo de tratamiento de 6 días fue de 69.5, 57.14 y 56.54% en cultivos a 30 mg  $N-NH_4$  l<sup>-1</sup> y 0.1, 0.25 y 0.5% de  $Na_2CO_3$  respectivamente (Figura 7). Para *N. oleoabundans* el contenido de lípidos, muestra un máximo de 57.72, 56.12 y 46.07% de lípidos de la biomasa peso seco a 30 mg  $N-NO_3$  l<sup>-1</sup> y 0.1, 0.25 y 0.5 % de  $Na_2CO_3$  respectivamente (Figura 8) en un periodo de tratamiento de 5 días durante la fase exponencial.



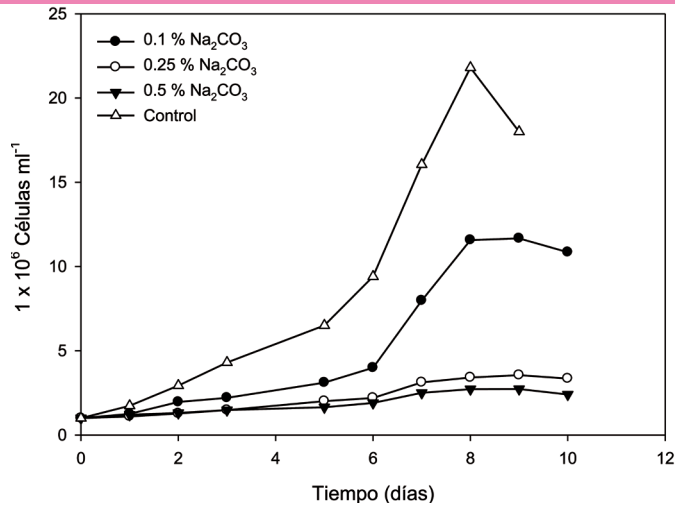


Figura 5. Curvas de crecimiento de *C. vulgaris* en cultivo libre con 30 mg N l<sup>-1</sup> y al 0.1, 0.25 y 0.5 % de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

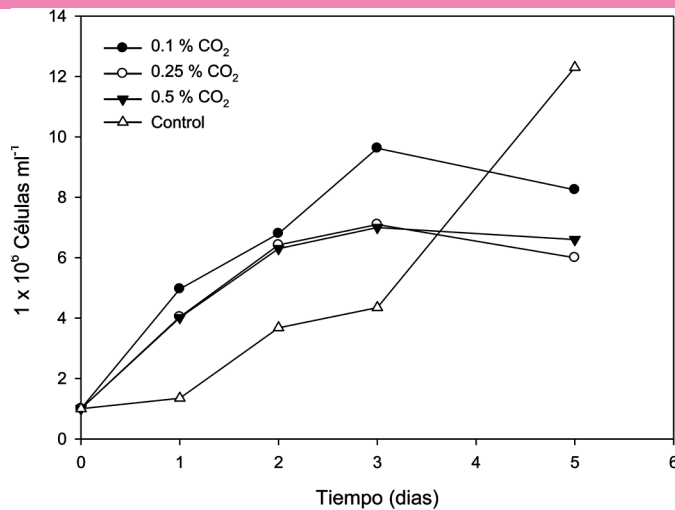


Figura 6. Curvas de crecimiento de *N. oleoabundans* en cultivo libre con 30 mg N l<sup>-1</sup> y al 0.1, 0.25 y 0.5 % de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

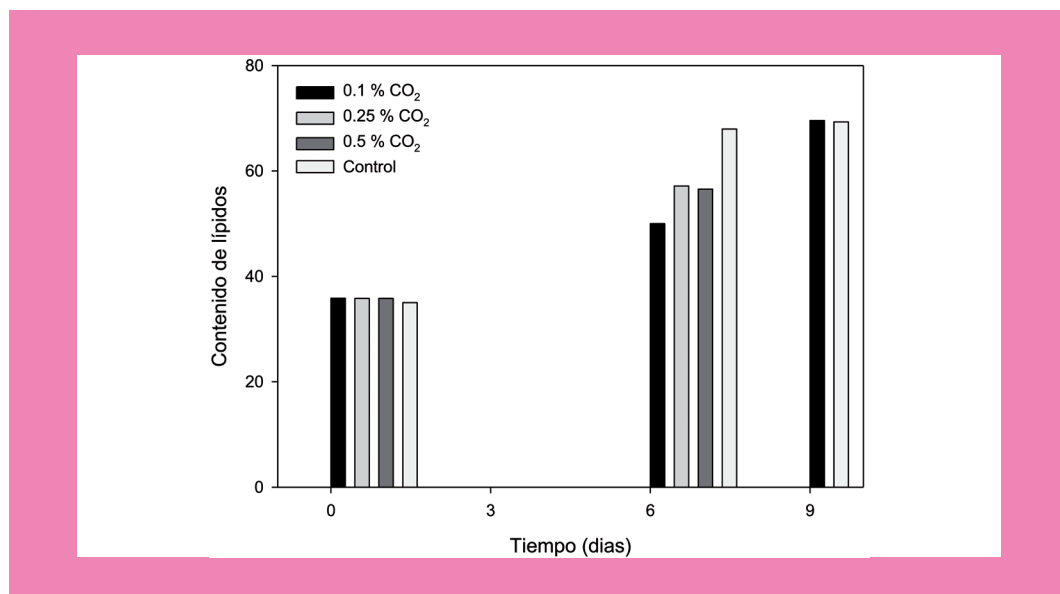


Figura 7. Contenido de lípidos de *C. vulgaris* en cultivo libre con 30 mg N l<sup>-1</sup> y al 0.1, 0.25 y 0.5 % de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

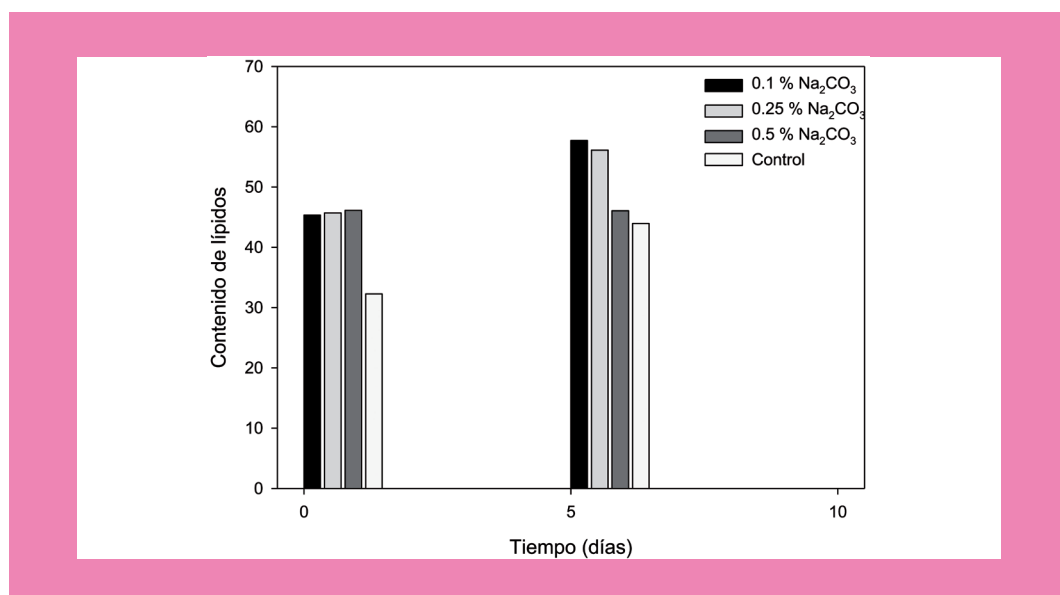


Figura 8. Contenido de lípidos de *N. oleoabundans* en cultivo libre con 30 mg N l<sup>-1</sup> y al 0.1, 0.25 y 0.5 % de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

## DISCUSIÓN

Existe un gran reto cuando se trata de maximizar la producción de aceite en algas, es un hecho que una alta concentración de aceite es alcanzado cuando las algas se someten a estrés, en particular dado a las restricciones de nutrientes. Sin embargo, se ha observado que mientras la concentración de lípidos puede llegar a incrementar significativamente en condiciones de limitación de nitrógeno, la tasa de crecimiento o producción de biomasa es reducida lo cual no es redituable cuando se pretende tener una alta productividad de aceite (Huntley y Redalje, 2007).

En el presente trabajo se pudo obtener un mayor crecimiento de *Chlorella vulgaris* de  $22 \times 10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$  con  $30 \text{ mg l}^{-1}$ , disminuyendo la densidad celular a  $17.8 \times 10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$  con una concentración de nitrógeno de  $15$  y  $10 \text{ mg l}^{-1}$ ; con tasas de crecimiento  $0.183 \text{ d}^{-1}$ ,  $0.170 \text{ d}^{-1}$  y  $0.157 \text{ d}^{-1}$ , respectivamente, a los 6 días de cultivo a  $32 \text{ }^\circ\text{C}$ , esto sugiere que una mayor concentración de N causa un crecimiento de la microalga, mientras que podemos observar que en todos los casos la tasa específica de crecimiento estadísticamente similar. Ruiz *et al* (2010) reportó para *C. vulgaris* una menor densidad celular de  $6.4 \times 10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$  y una tasa de crecimiento mayor de  $0.377 \text{ d}^{-1}$  cultivada en medio artificial con concentraciones de  $30 \text{ mg N l}^{-1}$  como  $\text{NH}_4\text{Cl}$  después de dos días de cultivo a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Esta diferencia probablemente esta atribuido a la diferentes temperaturas en que fueron cultivadas la microalga *C. vulgaris*. Mientras que para la microalga *Neochloris oleoabundans* la mayor preferencia fue por nitrato, alcanzando un máximo crecimiento para los cultivos con  $30$

$\text{mg N-NO}_3 \text{ l}^{-1}$  de  $28.12 \times 10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$ , disminuyendo la densidad celular a  $16.47$  y  $13.27 \times 10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$  a concentración de nitrógeno de  $15$  y  $10 \text{ mg l}^{-1}$  y tasas de crecimiento  $0.219 \text{ d}^{-1}$ ,  $0.182 \text{ d}^{-1}$  y  $0.168 \text{ d}^{-1}$  respectivamente, al igual que con *C. vulgaris* se puede observar que una mayor concentración de N favoreció al crecimiento de la microalga con una tasa de crecimiento estadísticamente similar.

Aunque con diferente aporte de nitrógeno, Jeanfils *et al.*, (1993) reportó para *Chlorella vulgaris* una máxima densidad celular de  $11.5 \times 10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$  y una tasa de crecimiento de  $0.54 \text{ d}^{-1}$  en cultivos con fuente de nitrógeno como  $\text{KNO}_3$ . Esta diferencia en la máxima densidad celular puede ser atribuida a los diferentes aportes y concentración de nitrógeno dado que en el presente estudio se empleo  $\text{NH}_4\text{Cl}$  equivalente a  $30 \text{ mg N l}^{-1}$ , mayor a los reportado por Jeanfils *et al.*, (1993) con  $12 \text{ mM}$  de  $\text{NO}_3$ , lo que corresponde a una concentración de N de  $14 \text{ mg l}^{-1}$ .

Esta diferencia esta en relación a los diferentes aportes de nitrógeno en agua o medio de cultivo (amonio, urea, nitrito y nitrato) de tal forma que la concentración de dichos compuestos en los cultivos puede afectar la asimilación de nitrógeno inorgánico (Redalje *et al.*, 1989). En la preferencia de las diferentes formas de nitrógeno puede presentarse variaciones especie-específica, es decir, para algunas especies de microalgas, altas concentraciones de amonio y nitrito pueden llegar a ser tóxicas y no todas las microalgas tienen la facilidad de asimilar urea (Syrett, 1981). Jeanfils *et al.*, (1993) observaron que la acumulación de amonio puede inhibir el crecimiento celular y actividad de enzimas reductoras en cultivos de *C. vulgaris* en medio enriquecido con nitra-

to, reportaron una producción de  $10.5 \times 10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$  lo que indica que al ir aumentando las concentraciones de nitrato decrece la producción de biomasa.

De acuerdo a esto, en el presente trabajo se pudo observar que la inhibición por acumulación de amonio podría ser despreciable dado que se presentó un mayor producción de biomasa a lo reportado por Ruiz *et al* (2010) para *C. vulgaris* con una máxima densidad celular de  $6.4 \times 10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$  y una tasa de crecimiento de  $0.377 \text{ d}^{-1}$  cultivada en medio artificial con concentraciones de  $30 \text{ mg N l}^{-1}$  como  $\text{NH}_4\text{Cl}$  después de dos días de cultivo a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Aunque con diferente aporte de nitrógeno ( $\text{NO}_3$ ); Lau *et al.*, (1995) reportó una menor densidad de  $16 \times 10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$  con similar tamaño de inóculo ( $1 \times 10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$ ). De igual forma, Lau *et al* (1994) obtuvieron una tasa de crecimiento para *C. vulgaris* de  $0.364 \text{ d}^{-1}$  y Lau *et al* (1997) reportaron una densidad celular de  $26.5 \times 10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$  y una tasa de  $0.362 \text{ d}^{-1}$  en medio de cultivo Bristol con  $11.5 \text{ mg l}^{-1} \text{ N-NO}_3$ .

Aguilar-May (2002) encontró que cepas aisladas de una granja de cultivo de camarón mostraron mayor preferencia por el nitrato y no fueron capaces de crecer en medios de cultivo donde el principal aporte de nitrógeno fue el amonio. En el presente estudio, la concentración de nitratos no presentó variaciones importantes durante el periodo de tratamiento, indicando que la nitrificación (oxidación de amonio a nitrato) fue limitada y la posibilidad de pérdida de nitrato en forma de gas por procesos de desnitrificación fue improbable debido a que los reactores fueron mantenidos en condi-

ciones aerobias. Lo anterior también sugiere una mayor preferencia de *C. vulgaris* por el amonio antes que cualquier otro aporte de nitrógeno, debido a que la asimilación de nitrato por organismos implica una reducción química mediante enzimas nitrato reductasa y nitrito reductasa, lo cual significa un mayor gasto de energía (McCarthy *et al.*, 1977; Redalje *et al.*, 1989).

Diferentes especies de microalgas presentan variadas habilidades para producir aceite y estas dependen de las condiciones de cultivo, tales como temperatura, intensidad y calidad de luz, pH, salinidad, minerales, fuentes de nitrógeno y edad del cultivo. Illman *et al.* (2000) reportaron que la limitación de nitrógeno puede incrementar el contenido de lípidos en las cepas de *Chlorella*. Otros estudios sugieren que una alta intensidad de luz y deficiencia de nitrógeno son factores importantes para la acumulación de lípidos, como fue reportado para *Chlorella sp.* en la cual se observó un incremento de contenido de lípidos en condiciones de limitación de nitrógeno (Oh-Hama y Miyachi, 1988).

El contenido de lípidos obtenido en el presente trabajo fue mayor para una concentración de  $30 \text{ mg l}^{-1}$  para el 4 día en *C. vulgaris* y para el día 6 en *N. oleoabundans*, fue evidente que en este tiempo en contenido de lípidos no mostró diferencias significativas ( $P \geq 0.05$ ). Esto podría ser atribuido a los efectos de estrés al cual están sometidas las células, particularmente limitación de nitrógeno. Richardson *et al.*, (1969) sugiere que si la luz, dióxido de carbono y otros nutrientes no son limitantes, las células continúan creciendo, aunque menos rápido, después de que el medio llega a mostrar agotamiento

de nutrientes, todo el nitrógeno celular es aparentemente utilizado en enzimas y estructuras celulares esenciales.

De acuerdo a los resultados obtenidos fueron seleccionados aquellos cultivos con 30 mg N l<sup>-1</sup>; tanto para NH<sub>4</sub> o NO<sub>3</sub> para ambas microalgas, siendo posible evaluar posteriormente el efecto de estrés por efecto de la adición de sales carbonatadas como Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

Las algas son capaces de utilizar CO<sub>2</sub>, carbonato (CO<sub>3</sub><sup>-</sup>) y bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>). La fuente de mayor preferencia bajo condiciones normales es CO<sub>2</sub> gas. El transporte de CO<sub>2</sub> a través de la membrana celular es dependiente de la energía y su acumulación en las células se realiza en forma de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Más tarde el CO<sub>2</sub> es convertido por la anhidrasa carbónica localizada en los pirenoides presentes en el cloroplasto (Badger y Price, 1994).

Se ha demostrado que la anhidrasa carbónica es esencial para la utilización fotosintética de carbono orgánico en concentraciones bajas externas de CO<sub>2</sub> y pH alcalino. Esta actividad decrece o desaparece en microalgas eucarióticas bajo aire enriquecido de 1 a 5% CO<sub>2</sub>. Sin embargo, Xian y Gao reportaron que los niveles de susceptibilidad son dependientes de las especies (Moroney *et al.*, 1985; Xian y Gao, 2005).

Durante el crecimiento, es evidente que *C. vulgaris* mostró una mayor fase adaptación en aquellos cultivos con sales carbonatadas (0.1, 0.25 y 0.5%) con respecto al cultivo control; sin embargo, se observa que el cultivo con 0.1% de carbonato de sodio alcanzó una mayor productividad de 11.67 x

10<sup>6</sup> cel ml<sup>-1</sup>. A diferencia de *C. vulgaris*, la microalga *N. oleoabundans* no presentó fases de adaptación, de igual manera se obtuvo una mayor producción de biomasa a concentraciones de 0.1% de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Esto sugiere que la microalga *N. oleoabundans* presenta mayor capacidad de crecer en medios alcalinos a diferencia de *C. vulgaris*, lo cual resultó para *N. oleoabundans* en una ligera disminución en la densidad celular a altas concentraciones de sales carbonatadas en comparación con *C. vulgaris*. Li *et al.* (2008) reportaron para cultivos de *N. oleoabundans* en medios con bicarbonato de amonio como fuente de nitrógeno y de iones carbonato para el crecimiento observado la mitad de biomasa producida en comparación con lo obtenido al usar un medio de cultivo que contenía nitrato de sodio, sugiriendo que altas concentraciones de sales provocan estrés salino lo que produce una inhibición en el crecimiento celular. Por su parte, Serpa *et al.* (2005) reportaron que para diversas especies de *Dunaliella* salina hay una relación inversa entre la densidad celular promedio y el nivel de salinidad, la mínima densidad final promedio obtenida fue de 40.9 x 10<sup>3</sup> cel ml<sup>-1</sup> para dicha especie con 4.5 M de sal industrial (NaCl), equivalente a 261 gr l<sup>-1</sup>. Se sabe que el factor salinidad, disminuye los efectos metabólicos y la replicación celular, en general existe una correlación inversa entre la salinidad y la densidad celular.

El mayor contenido de lípidos para *C. vulgaris* se obtuvo en aquellos cultivos con solución de 0.1% en peso de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> de 69.5% con 30 mg l<sup>-1</sup> de N en 6 días de cultivo. Podemos concluir en base a los resultados, con respecto al contenido de lípidos de *C. vulgaris*; que con una mayor concentración

de sales  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  disminuye el contenido de lípidos esto debido a que pudo presentar procesos de inhibición al igual que *N. Oleoabundans* la cual alcanzó un máximo contenido de lípidos en el día 5 de cultivo de 57.7% con 0.1% en peso de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . En ambas microalgas se presentó una disminución en la acumulación de lípidos lo cual puede ser atribuido a los efectos causados por las sales tanto en el crecimiento y contenido de lípidos.

## CONCLUSIONES

Ambas microalgas mostraron un favorable crecimiento en cultivos libres a  $30 \text{ mg l}^{-1}$  de nitrógeno, obteniendo un alto contenido de lípidos a esa concentración. Por lo que se puede decir que la limitación de nutrientes es uno de los factores que favorece el incremento del contenido de lípidos.

Se obtienen altas concentraciones de aceite únicamente cuando las microalgas están sometidas a estrés, en particular dado a las restricciones de nutrientes. Cabe mencionar que aunque la concentración de lípidos puede llegar a incrementar en condiciones de limitación de nitrógeno, la tasa de crecimiento o producción de biomasa puede ser reducida.

*C. vulgaris* mostró un mejor crecimiento en de cultivo de células libres al cual se le adicionó 0.1% en peso de solución de sal carbonatada, en comparación con *N. oleoabundans* aunque estos resultados no fueron mayores a los obtenidos en el tratamiento sin sal de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

Se puede concluir en base a los resultados que a mayor concentración de sales  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , en las microalga *C. vulgaris* y *N. Oleoabundans* se pudo presentar proceso de inhibición dado que disminuyen los contenidos de lípidos. Para ambas microalgas se alcanzó un máximo contenido de lípidos en medios de cultivo que contenían 0.1% en peso de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . La disminución en la acumulación de lípidos, puede ser atribuida a los efectos causados por las sales.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Universidad Autónoma del Carmen por el fondo de apoyo a la investigación y al posgrado de Ciencias e Ingeniería Química de la Facultad de Química.

## BIBLIOGRAFÍA

- AWWA-APHA-WPCF. (1995) Standar Methods for the examination of water and wastewater. 19th Edn, 1105.
- Aguilar, B. 2002. Remoción de nutrientes con microalgas marinas en un medio equivalente al efluente tipo promedio de una granja camaronícola. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Ensenada, Baja California. 1-88.
- Badger, M.R. y Price, G.D. 1994. The CO<sub>2</sub> concentrating mechanism in cyanobacteria and green algae. *Physiol. Plant* 84:606-615.
- De la Noüe, J. y De Pauw, N. 1988. The potencial of microalgal biotechnology: A review of production and uses of microalgae. *Biotech. Adv.* 6:725-770.
- Ginzburg, B.Z. 1993. Liquid fuel (oil) from halophilic algae: a renewable source of non-polluting energy. *Renew Energy*. 3: 249-252.
- Huertas, E. I.; Colman, B.; Espie G.S. y Lubian L.M. 2000. Active transport of CO<sub>2</sub> by three species of marine microalgae. *J. Phycol.* 36:314-320.
- Huntley, ME. y Redalje, DG. 2007. CO<sub>2</sub> mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal. *Mitig Adapt Strategies Glob Chang*. 12:573-608.
- Illman, AM. y Scragg, AH. 2000. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme Microb Technol.* 27; 631-635.
- Jeanfil, J.; Canisius, M. F. y Burlion, N. 1993. Effect of high nitrate concentration on growth and nitrate uptake by free - living and immobilized *Chlorella vulgaris* cells. *Journal of applied phycology*. 5:369-374
- Kapdan, IK. y Kargi, F. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme Microb Technol* 2006;38;569-82.
- Lau, P. S.; Tam, N. F. Y. y Wong, Y. S. 1995. Effect of algal density on nutrient removal from primary settled wastewater. *Environmental Pollution*. 89:59-66.
- Lau, P. S.; Tam, N. F. Y. y Wong, Y. S. 1994. Effect of organic-N sources on algal wastewater treatment system. *Resour. Conser. Recyc.* 11:197-208.
- Lau, P. S.; Tam, N. F. Y. y Wong, Y. S. 1997. Wastewater nutrients (N and P) removal by carrageenan and alginate immobilized *Chlorella vulgaris*. *Environmental Technology*. 18:945-951.
- Li, Q.; Du, W. y Liu, D. 2008. Perspectives of microbial Oilz for biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol*.
- Maeda, K., M.; Owada; Kimura, N.; Omata, K. y Karube, I. 1995. CO<sub>2</sub> fixation from the flue gas on coal-fired thermal power plant by microalgae. *Energy Convers Manag.* 36:717-720.
- Merrett M.J.; Nimer, N.A. y Dong, L.F. 1996. The utilization of bicarbonate ions by the marine microalga *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd. *Plant Cell Environ.* 19:478-484.
- Mccarthy, J. J.; Taylor, W. R. y Taft, J. L. 1977. Nitrogenous nutrition of the plankton in the Chesapeake Bay. L. Nutrient availability and phytoplankton preferences. *Limnology and oceanography*. 22:996-1011.
- Metting, F. 1996. Biodiversity and application of microalgae. *J Indust Microbiol Biotechnol* 17:477-489.
- Moroney, J.V.; Husic, H.D. y Tolbert, N.E. 1985. Effects of carbonic anhydrase inhibitors on inorganic carbon accumulation by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 9:819-827.
- Oh-Hama, T. y MiYachi, S. 1988. *Chlorella*, In *Micro - Algal Biotechnology*. Ed. Michael A. Borowitzka, Lesley J. Borowitzka. Cambridge University Press, Cambridge, UK: 3-26.
- Papanikolaou, S.; Komaitis, M. y Aggelis, G. 2002. Single cell oil (ACO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. *Bioresour Technol* 2004; 95:287-91.
- Ragauskas, A.J.; Williams, C.K.; Davison, B.H.; Britovsek, G.; Cairney, J.; Eckert, C.A.; Frederick, W.J. Jr.; Hallett J.P.; Leak, D.J. y Liotta C.L. 2006. The path forward for biofuels and biomaterials. *Science*. 311(5760):484-489.

Ratledge, C. 1989. Biotechnology of oils and fats. In: Ratledge C, Wilkinson SG (eds) Microbial lipids vol 2. Academic, London, pp. 567-668.

Richardson, B.; Orcutt, D. M.; Schwertner, H. A.; Martinez, C. L.; y Wickline, H. E. 1969. Effects of nitrogen limitation on the growth and composition of unicellular algae in continuous culture. *American Society for Microbiology*. 18:245-250.

Ruiz, M. y Mendoza-Espinosa; Stephenson, T. G. 2010. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technology*. Volume 101. 58-64.

Scragg, A.H.; Illman A.M. y Carden, A. 2002. Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular bioreactor. *Biomass Bioprocess*. 29:67-73.

Syrett, P.J. 1981. Nitrogen metabolism of microalgae. *Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Sciences*. 210:181-210.

Tornabene, TG.; Holzer, G.; Lien, S. y Burris N. 1983. Lipid composition of the nitrogen starved green alga *Neochloris oleoabundans*. *Enzyme Microb Technol*. 5:435-440.

Xia, J.R. y Gao, K.S. 2005. Impacts of elevated CO<sub>2</sub> concentration on biochemical composition, carbonic anhydrase and nitrate reductase activity of freshwater green algae. *J. Intergr. Plant Biol*. 47:668-675.