



EFFECTO DEL ESTRES INDUCIDO POR DEFICIENCIA DE SALES NUTRITIVAS EN UN SISTEMA DE CULTIVO RACEWAY AWL DE LAS MICROALGAS *Chlorella vulgaris* Y *Scenedesmus dimorphus* EN LA OBTENCION DE ACEITE

Jorge Luis Rodriguez Manrique¹, Messe Elmer Torres da Silva¹, Daniel da Silva¹, José Villanueva Salas²

1 Aluno del Programa de Post-Gaduación en Biotecnología y Recursos Naturales de la Univerisdad del Estado de Amazonas/ Manaus – Brasil.

(jorge_luisroma@hotmail.com)

2 Profesor Doctor de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas Bioquímicas e Biotecnológicas de la Universidad Católica de Santa María/ Arequipa - Perú.

Recibido em: 30/09/2014 – Aprobado em: 15/11/2014 – Publicado em: 01/12/2014

RESUMEN

En el presente trabajo se cultivaron dos especies de microalgas chlorophytas, *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus dimorphus*, aisladas mediante técnicas de dilución seriada, rayado en agar y pipeteo capilar, a partir de muestras tomadas de una poza de oxidación en el distrito de “La Joya” en la ciudad de Arequipa - Perú. Se probaron diferentes concentraciones (50%, 25%, 15%, 10% y 5%) de medio de cultivo con el fin de determinar la mejor para su crecimiento. Con el objetivo de corroborar el efecto que causa la deficiencia de sales nutritivas en el contenido de aceite intracelular, las microalgas fueron sometidas a concentraciones cada vez menores de medio a la establecida como óptima, con periodos de cultivo de 7 a 9 días en cada etapa. El sistema de cultivo empleado fue el Raceway AWL, al cual se le realizaron algunas modificaciones adaptándolo a las medidas y objetivo de este trabajo. La extracción del aceite fue llevada a cabo usando una mezcla de solventes (Cloroformo – Alcohol isopropílico). La extracción mostró que los cultivos bajo condiciones de estrés muestran mayor rendimiento en la producción de aceite al cual finalmente se le realizaron pruebas fisicoquímicas de control de calidad, las cuales determinaron el buen estado del aceite obtenido.

PALABRAS-CLAVE: Microalgas, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus dimorphus*, aceite, sales nutritivas, Raceway.

EFFECT OF STRESS INDUCED BY NUTRITIVE SALTS DEFICIENCY IN A RACEWAY AWL GROWING SYSTEM IN THE *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus* MICROALGAE PRODUCING OIL

ABSTRACT

In the present work two species of chlorophytas microalgae were grown, *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*, isolated by serial dilution techniques, striped agar and capillary pipetting from samples taken from a pool of oxidation in the district

of "La Joya" in Arequipa - Peru. Different concentrations (50%, 25%, 15%, 10% and 5%) of the culture medium were tested in order to determine the best for microalgae growth. To corroborate the effect of the deficiency of nutrient salts in the intracellular oil content, microalgae were subjected gradually to lower concentration levels to the one established as optimal, with periods of cultivation of 7 to 9 days in each stage. The culture system used was the Raceway AWL, performed with some modifications to adapt the system to the objective of this work. The extraction showed that cultures under stress show higher performance in oil production which finally showed good parameters in the quality control tests.

KEYWORDS: Microalgae, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus dimorphus*, oil, Nutrient salts, Raceway.

INTRODUCCIÓN

En este siglo la humanidad afronta una grave problemática, como es la falta de fuentes alternas de aceites naturales que no comprometan cultivos que son normalmente destinados al consumo humano, como es el caso de la soja, colza, palma, maíz, cáñamo, etc. y que al mismo tiempo sean alternativas basadas en procesos sustentables, renovables y amigables con el ambiente, que además posibiliten la captura de CO₂ es así que el aceite a partir de microalgas se pinta como una opción promisoriosa (GARIBAY et al., 2009).

Las microalgas son organismos fotosintéticos capaces de asimilar energía solar y CO₂ para convertirlo en agua, O₂ y macromoléculas orgánicas tales como carbohidratos y lípidos. Algunas especies naturalmente o bajo condiciones de estrés tales como alta luz o deprivación de nutrientes acumulan cantidades significativas de lípidos como su principal fuente de almacenamiento de carbón. El contenido promedio de lípidos en microalgas varía entre 20 y 40 % del peso celular seco (MILTON et al., 2008 & PERALES et al., 2007).

Las principales aplicaciones de los lípidos (ácidos grasos) de microalgas son, enriquecimiento de alimento para peces, posibilidad de uso para producción de biodiesel y fuente de ácidos grasos esenciales en la dieta humana (GRECQUE DE MORAIS et al., 2007).

El uso de microalgas para producir biocombustible ya viene siendo aplicado en varios países de Europa y América, como alternativa ecológicamente viable, debido al aumento del precio del petróleo y los problemas ambientales generados por este tipo de combustible, es por eso que cada día se vienen realizando más investigaciones sobre cómo mejorar los cultivos, producción y eficiencias en este proceso cobrando más fuerza el uso de las microalgas como una alternativa para la obtención de biodiesel (GARIBAY et al., 2009).

En vista que está científicamente comprobado el gran porcentaje de aceite que poseen las microalgas en su estructura y que este aceite es usado como fuentes de reserva en casos de déficit de sales nutritivas, es de importancia, investigar la posibilidad de incrementar el contenido de aceite (ácidos grasos) encontrados en las microalgas, siendo que esta información podría ser de interés para las industrias que utilizan aceites vegetales en sus procesos.

El principal objetivo en este trabajo fue comparar el efecto del estrés inducido por carencia de sales nutritivas sobre el contenido de lípidos presentes en las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus dimorphus* utilizando un sistema de cultivo Raceway AWL modificado.

MATERIALES Y MÉTODOS

La muestra fue tomada de una laguna de oxidación ubicada en el distrito de La Joya – Arequipa. Lo más importante fue tratar que la muestra de agua sea homogénea, representativa y por sobre todo que en la extracción no se modifiquen las propiedades del agua a analizar. Al tratarse de una fuente de agua estancada se sostuvo el envase por el fondo, a una profundidad de por lo menos 20 cm, con la boca hacia arriba, y ligeramente inclinado, apuntando hacia la corriente. Se tomaron aproximadamente 100 mL en envases de vidrio (borosilicato), se emplearon envases estériles y se enjuagaron varias veces con el agua a analizar procurando que la tapa no permita la salida del líquido, ni tampoco la entrada de elementos contaminantes. (GONZALES et al., 2006).

Aislamiento de Cepas

Para lograr aislar las cepas utilizadas, se emplearon dos técnicas de aislamiento: A) Diluciones seriadas, donde primero se homogenizó la muestra de agua y se tomó 1 mL para ser inoculado en un tubo conteniendo 9 mL de medio de cultivo siendo esta la primera dilución (1:10). A partir de aquí se tomó una alícuota de la dilución (1:10) y se traspasó para otro tubo conteniendo 9 mL de medio de cultivo obteniendo la dilución (1:100), el procedimiento fue repetido hasta obtener una dilución 1:10.000, siendo que de este último se subdividió en 10 tubos teniendo una dilución de 1:100.000. La segunda técnica fue B) Rayado en agar, para lo cual se prepararon palcas Petri de 100 x 15 mm, conteniendo fitagel al 2%, en ella se colocaron dos gotas de las diluciones cerca de la periferia en el medio solidificado y utilizando el asa de Kolle esterilizada a fuego directo, se rayó en paralelo a la muestra formando pequeñas estrías. Se cubrió la placa, se invirtió e incubó de 4 a 8 días a temperatura ambiente. Terminada la incubación, la placa se observó directamente en el estereoscopio y se seleccionaron las colonias deseadas que se encontraban libres de otros organismos removiendo las colonias con una pipeta Pasteur estirada y estéril y colocándolas en una gota de medio de cultivo estéril sobre un cubre-objeto. Usando un microscopio óptico se observaron las unidades de microalgas deseadas y que pertenecían a la misma especie. Por último se repitió el procedimiento de rayado en solo una zona, reduciendo de esta forma la contaminación por bacterias y asegurando las agrupaciones de unidades algales de la misma especie que posteriormente serán transferidas a un medio líquido (GONZALES et al., 2006).

Selección del Medio de Cultivo

El medio de cultivo a utilizar fue un medio hidropónico, elegido por su bajo costo y su buena eficiencia. La solución hidropónica fue adquirida de la Universidad Nacional Agraria La Molina (Lima – Perú). El kit incluyó dos frascos: Frasco A de macronutrientes (1 L.) y Frasco B de micronutrientes (0.4 L.) según las instrucciones proporcionadas por el fabricante para la elaboración de 1 L. de medio a una concentración del 100%, se debe mezclar 5 mL del frasco A y 2 mL del frasco B y completar con agua.

Se determinó la concentración óptima mediante una serie de pruebas a distintas concentraciones (50%, 25%, 15%, 5%). Para ello se preparó 5 mL de medio por cada concentración y se agregó 1 mL de inóculo por cada especie. Se realizó el conteo diario en cámara de Neubauer para analizar la cinética de crecimiento en

cada concentración y así determinar cuál de ellas es la óptima para el crecimiento de las microalgas (CONTRERAS ,1998).

Cultivo de Microalgas

El cultivo de microalgas fue realizado en 3 etapas antes de pasar al sistema de cultivo Raceway AWL modificado, siendo que la primera fue el Mantenimiento de cepa, en la cual se emplearon botellas de plástico transparentes de 100 mL de capacidad. Se tomaron 2 mL del cultivo a concentración óptima de medio hidropónico, conteniendo las microalgas en fase exponencial a una concentración de 6×10^7 cel/mL como inóculo y se traspasó a 20 mL del mismo medio (URIBE , 1994) Para realizar la cinética de crecimiento de las microalgas se utilizó una cámara de Neubauer, un microscopio óptico (100x) y una pipeta Pasteur. Se hicieron conteos diarios en microscopio óptico a 40X para determinar la densidad poblacional y evaluar su crecimiento. El cultivo se mantuvo bajo condiciones naturales (luz solar y Fotoperiodos) durante 6 días, agitándose periódicamente para evitar la sedimentación y fomentar el intercambio de gases (ARELLANO , 1994).

La segunda etapa en el cultivo de microalgas fue la del Cultivo Inicial que se llevó a cabo en matraces Erlenmayer de 500 mL de capacidad a los cuales se adicionaron 20 mL tomados del cultivo anterior a una concentración de $3,0 \times 10^7$ cel/mL en un volumen de 250 mL del mismo medio. Se realizaron conteos para ambas especies en la cámara de Neubauer para obtener la cinética de crecimiento de cada especie. El cultivo se mantuvo bajo condiciones naturales (luz solar y Fotoperiodos) y agitación periódica, controlando el pH en un rango de 7.5 y 8 utilizando para ello el pH-metro y regulándolo con carbonato de sodio. El cultivo inicial tuvo una duración de 6 días, para luego pasar a la etapa del cultivo intermedio.

La tercera etapa es la del Cultivo Intermedio la cual fue realizada en matraces Erlenmayer de 1 Lt de volumen. En ellos Se adicionaron 200 mL del cultivo inicial a una concentración de 9.3×10^7 cel/mL en un volumen de 800 mL del mismo medio. Se realizó el conteo celular en cámara de Neubauer para ambas especies y así obtener la cinética de crecimiento de cada una. A partir del cultivo intermedio, las condiciones de crecimiento fueron controladas teniendo en cuenta las siguientes consideraciones: A) La intensidad luminosa se mantuvo en un rango de 2000 a 2500 lux para lo cual se utilizó un fluorescente de 25 watts, la intensidad luminosa fue monitoreada mediante un luxómetro. B) Se programaron Fotoperiodos de 18 horas de luz frente a 6 horas de oscuridad utilizando un temporizador marca Panasonic. C) El pH se mantuvo en un rango de 7.5 a 8 mediante la inyección de CO₂ que ayuda a detener el aumento del pH ocasionado por el metabolismo de las microalgas, los valores de pH fueron monitoreados utilizando un pH-metro marca JENWAY Model 3510. D) La temperatura fue controlada y mantenida en un rango de 16 a 18 °C utilizando un termómetro ambiental marca BOHECO. E) La agitación y aireación se realizó por medio de bombas de pecera marca HP-200 de dos salidas, las cuales proporcionaban la cantidad de aire y la turbulencia necesaria en el medio para evitar la sedimentación de las microalgas.

Cultivo en Sistema Raceway AWL Modificado

Se realizaron modificaciones al sistema de cultivo "Raceway" tradicional debido al volumen del cultivo y la agitación requerida. El sistema de cultivo Raceway AWL modificado tiene una capacidad útil de trabajo de 10 L en los cuales se inocularon 700 mL tomados del cultivo intermedio con una densidad celular de 1.25×10^8 cel/mL. Se realizó el conteo celular en cámara de Neubauer para obtener la

cinética de crecimiento de cada especie. Las condiciones del cultivo fueron las siguientes: A) La intensidad luminosa se mantuvo en un rango de 4000 a 5000 lux para lo cual se utilizaron dos fluorescentes de 25 watts, la intensidad luminosa fue monitoreada mediante un luxómetro. B) Se programaron fotoperiodos de 18 horas de luz frente a 6 horas de oscuridad, para lo cual se utilizó un temporizador Panasonic que reguló los fotoperiodos. B) El pH se mantuvo en un rango de 7.5 a 8 mediante la inyección de CO₂ que detiene el aumento de pH ocasionado por el metabolismo de las microalgas, los valores de pH fueron monitoreados con un pHmetro JENWAY Model 3510. La inyección de CO₂ fue a través de mangueras tipo ligadura a las cuales se les hizo agujeros para inyectar el CO₂ por burbujeo. C) La temperatura se mantuvo de 18 a 20 °C mediante un termostato y fue monitoreada utilizando un termómetro. D) La agitación y aireación utilizó 3 bombas de pecera HP-200 por cada sistema de cultivo, las cuales suministraron el aire mediante los conductos establecidos para la agitación (HUESEMANN et al., 2012).

Rediseño y Construcción del Sistema Raceway AWL Modificado

El sistema de cultivo Raceway AWL tradicional fue rediseñado con el fin de proveer condiciones más favorables para las especies empleadas. Tales como la reducción del número de canales para incrementar la velocidad del flujo en el cultivo, la aplicación de agitación neumática debido al material del sistema y el remplazo de la luz natural por artificial para tener un mayor control de la intensidad luminosa aportada

En la tabla 1 se mencionan las modificaciones que se llevaron a cabo en el sistema Raceway AWL para adaptar y mejorar las condiciones de este equipo a una escala de laboratorio, así como los parámetros considerados en la modificación del sistema Raceway y sus respectivas características.

TABLA 1. Cuadro comparativo de las modificaciones realizadas en el Sistema de Cultivo Raceway AWL

Parámetros	Raceway AWL Standard	Raceway AWL Modificado
Superficie y volumen de cultivo	Según requerimiento	Superficie: 0.29 m ² Volumen: 14.5 Lt
Agitación	Por paletas	Neumática (inyección de aire)
Iluminación	Luz natural (solar)	Luz artificial (fluorescentes 5000 lux)
Tipo de cultivo	Batch	Batch

Fuente: Elaboración propia

El equipo fue diseñado para contener adecuadamente 10 L de medio de cultivo, desarrollar una agitación con un flujo transicional y tener conductos por los cuales inyectar el CO₂ para la estabilización del pH y crecimiento de la microalga. El sistema Raceway original cuenta con 2 canales de transporte a diferencia del modificado que cuenta con 4 canales, se realizó esta modificación para reducir el volumen que posee cada canal para que pueda ser agitado con mayor vigorosidad. Se construyó el Sistema Raceway modificado con material de vidrio de 0.5 cm de espesor, lo más delgado posible para que deje pasar la mayor cantidad de luz posible y a la vez resista los 10 L que ocupará el medio de cultivo.

Inducción del Estrés por Deficiencia de Sales Nutritivas

Para lograr el estrés celular en las microalgas se redujo la concentración del medio de cultivo en tres oportunidades, la concentración óptima para el crecimiento de las microalgas fue al 15% del cual se tomaron alícuotas para inocular los medios de cultivo al 10%, 5% y 0% para evaluar el efecto causado por la disminución de sales nutritivas.

Para determinar el momento en el cual las microalgas consumen todo el nitrógeno e ingresan al estrés celular se realizaron análisis de nitrógeno total al medio de cultivo cada 4 días, las muestras de medio fueron enviadas al laboratorio de control de calidad de la Universidad Católica para ser analizadas.

Separación Y Cosecha De Las Microalgas

Antes de iniciar la separación y cosecha de las microalgas se tuvo que desaguar el Sistema de cultivo Raceway, esto se logró utilizando el conducto de desagüe del equipo.

La separación y cosecha es una de las etapas más difíciles del proceso, ya que se busca la mayor eficiencia de este. Una de las técnicas más utilizadas es la floculación, para la recolección de microalgas los productos químicos más utilizados son: Sulfato de aluminio, cal o quitosano. Cuando se añade a la solución de microalgas una cantidad adecuada de floculante provoca la neutralización de las cargas de las algas, lo que hace que se peguen unas a otras según David Sieg. Making Algae Biodiesel at Home (LOERA 2010).

Para determinar la cantidad adecuada de Sulfato de aluminio $Al_2(SO_4)_3$ fue necesario realizar pruebas preliminares, tratando de utilizar la menor cantidad posible para no alterar el peso seco a obtener. Se probó con 5 mL de Sulfato de Aluminio a concentraciones de 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm y 200 ppm, para 1 Lt de muestra de microalgas, se mezcló y agito vigorosamente y se dejó en reposo para facilitar la formación de flocs.

Luego de formar el precipitado de microalgas se extrajo el sobrenadante mediante sifoneado utilizando una manguera. Después finalizadas las pruebas se pudo determinar que la concentración más adecuada para flocular las microalgas fue de 100 ppm (CHUN-YEN et al., 2011).

Secado

El proceso de secado se realizó en una estufa P. Selecta en recipientes de acero inoxidable a 75 °C por 5 hrs (BARAJAS et al., 2008).

Extracción del Aceite por Solventes

La extracción se llevó a cabo en un equipo Soxhlet de 200 mL de capacidad y utilizando como solventes 150 mL de cloroformo y 50 mL de alcohol isopropílico. Se llevó la mezcla hasta ebullición a 85 °C. El proceso de extracción del aceite se llevó a cabo durante 3 hrs, pasando luego a una destilación para separar la mezcla. La destilación se realizó a 85 °C de temperatura en la cual la mezcla cloroformo - alcohol se encuentra en ebullición quedando como remanente el aceite de microalgas (BIENG-CHUNG et al., 2010 & BARAJAS et al., 2008).

Caracterización Del Aceite

El aceite para ser considerado como tal, debe cumplir con una serie de parámetros de calidad. Para su caracterización se emplearon diferentes análisis de

requerimiento para así confirmar la identidad de este. Entre los análisis realizados tenemos:

A) Peso Específico: El peso específico se expresó como la relación del peso del aceite con respecto al agua (g de aceite/g agua).

B) Índice de refracción: Se obtuvo midiendo directamente en un refractómetro a 20-25°C para la muestra de aceite obtenida.

C) Índice de Saponificación: El índice de saponificación que denota el peso de hidróxido potásico en mg que se requieren para saponificar un gramo del aceite.

D) Determinación del índice de yodo: El índice de yodo es una medida del grado de insaturación (números de dobles enlaces) de las grasas.

E) Índice de Peróxidos: Son los miliequivalentes (mEq) de peróxido por kilogramo de aceite. Es una determinación volumétrica que indica la cantidad de grupos peróxidos e hidroperóxidos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Normalmente las microalgas habitan lugares húmedos en la tierra, aire, mar, lagunas, hielo y hasta nieve. Ellas pueden crecer en cualquier tipo de ambientes ocupando las capas más superficiales hasta los niveles donde hay incidencia de luz solar. Presentan una reproducción bastante acelerada y pueden crecer en diversos tipos de foto biorreactores (HUANG et al., 2010 & PINZI et al., 2009). En el presente estudio, se consiguió el aislamiento, purificación y cultivo de dos tipos de microalgas clorophytas (*Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus dimorphus*).

Los resultados obtenidos durante la etapa de experimentación para la selección de la concentración de solución hidropónica adecuada para el cultivo de *Chlorella vulgaris* indican que a una concentración del 15% se presentó la mayor densidad poblacional (5.55×10^5 Microalgas/mL), en comparación con las otras tres concentraciones (10, 25 y 50%). Como se muestra en la Figura 1.

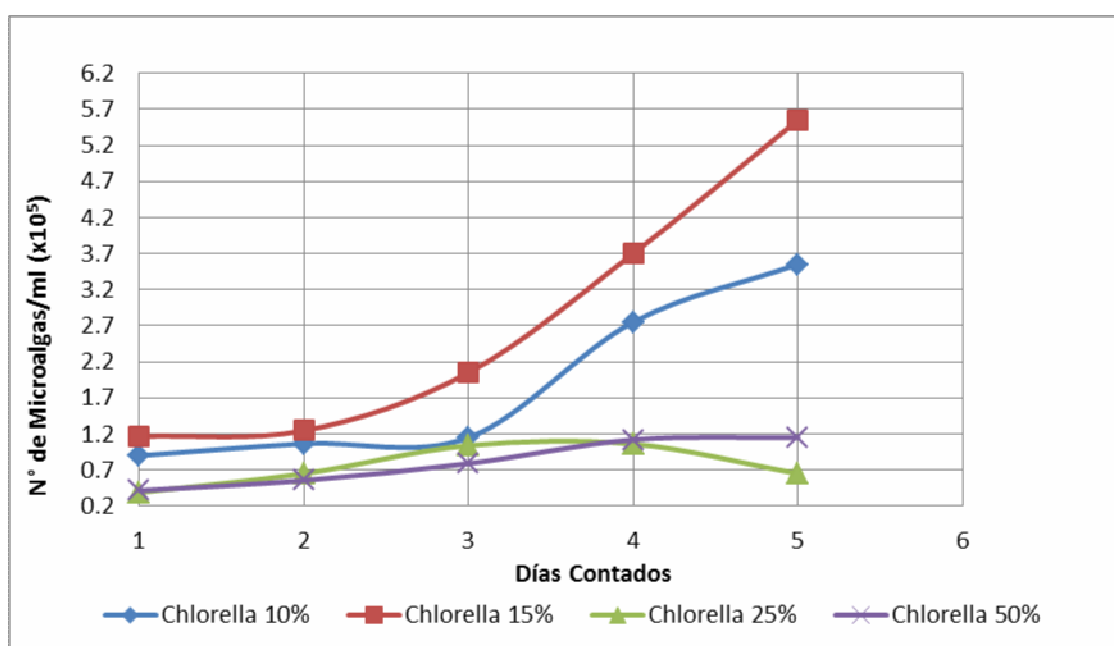


FIGURA 1. Curvas de crecimiento para *Chlorella vulgaris* a diferentes concentraciones de medio de cultivo.

De la misma forma en los resultados obtenidos para *Scenedesmus dimorphus*, muestran una notable diferencia en cuanto a densidad poblacional, mostrando un mejor desarrollo a la concentración del 15% en comparación de los otros medios de cultivo (10, 25 y 50%) como se puede apreciar en la figura 2.

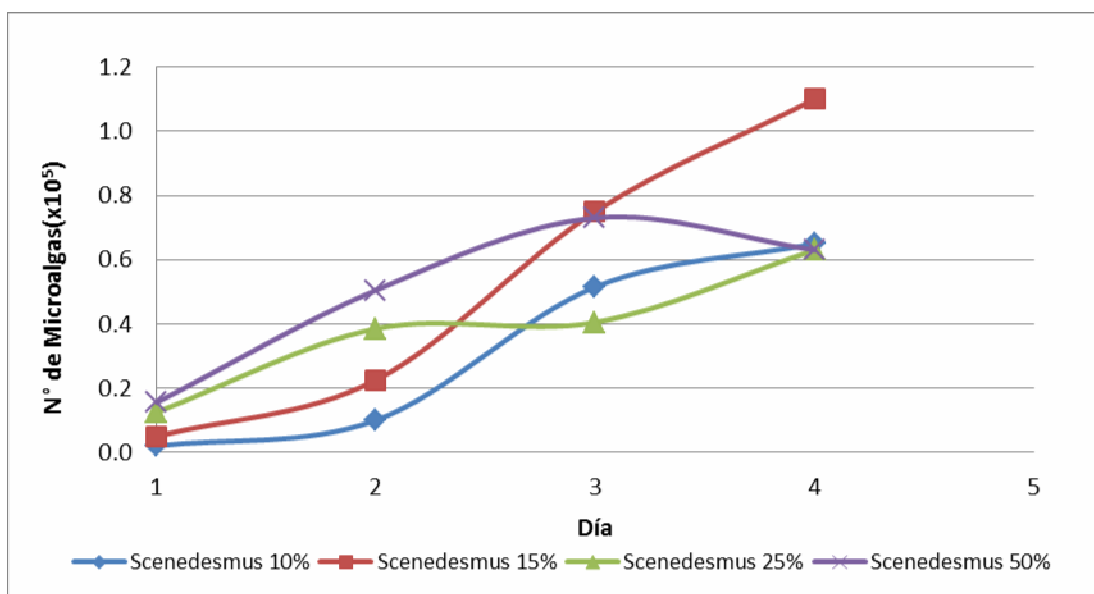


FIGURA 2. Curvas de crecimiento para *Scenedesmus dimorphus* a diferentes concentraciones de medio de cultivo.

Se observa que los valores a una concentración del 15% presentaron mejores resultados en comparación a las demás concentraciones, presentando densidades poblacionales bastante favorables lo cual indicaría que esta sería es mejor concentración de medio de cultivo hidropónico para realizar la reproducción de las microalgas y continuar con el escalamiento.

Los cultivos llevados a cabo en el sistema Raceway AWL modificado, en el cual fue realizada la deficiencia de sales nutritivas, primeramente se tomó 1 L de cepas que venían reproduciéndose a una concentración de 15% de solución hidropónica y se inoculó en otro Sistema Raceway – AWL Modificado con solución hidropónica a una concentración de 10% bajo condiciones controladas, el pH se mantuvo en un rango de 6 a 7, la temperatura en un margen de 18 – 19°C y una constante agitación provocada por cuatro bombas de aire apoyada por la inyección de CO².

El mismo procedimiento se llevó a cabo inoculando otro sistema Raceway AWL – Modificado a una concentración del 5%, es importante mencionar que con el fin de comprobar el efecto de la deficiencia de sales en el tiempo de duplicación y tasa de crecimiento de las microalgas, también se realizaron cultivos al 100%, y 0%, todos bajo la misma modalidad de los ya descritos anteriormente. Para comprobar la veracidad de los resultados obtenidos en los cultivos bajo estrés se realizaron tres repeticiones para cada uno de ellos.

En la tabla 2 se muestran los valores obtenidos para los dos tipos de microalgas estudiadas, realizados a diferentes concentraciones de medio hidropónico (100, 15, 10, 5 y 0%), en ella se puede ver la diferencia entre las tasas

de crecimiento (μ) y los tiempos de duplicación (td) para cada caso. Los resultados indican que el cultivo con mayor densidad celular fue el realizado en medio hidropónico al 15% de concentración, obteniendo la más alta tasa de crecimiento y por lo tanto el menor tiempo de duplicación.

Los cultivos realizados en los medios a concentraciones de 100% y 0% no mostraron buenos resultados como era de esperarse, al final de los 9 días de cultivo mostraron una pobre densidad celular con tasas de crecimiento demasiado altas por lo que se descarta por completo su posibilidad como medio de crecimiento.

TABLA 2. Concentración inicial, final (cel/mL) y cinética de crecimiento en diferentes concentraciones de medio (100, 15, 10, 5 y 0%) en nueve días de desarrollo.

<i>Chlorella vulgaris</i>	Concentración de Medio de Cultivo				
	100%	15%	10%	5%	0%
Conc. Inicial (Cel/mL)	6.5×10^5	2.6×10^6	2.0×10^6	2.2×10^6	6.7×10^7
Conc. Final (Cel/mL)	1.2×10^6	7.8×10^7	5.7×10^7	4.6×10^7	3.3×10^5
Días de cultivo	9	9	9	9	9
μ (hrs ⁻¹)	0.003	0.016	0.015	0.014	0.007
Td (hrs)	262.42	43.84	44.75	49.46	93.03

<i>Scenedesmus dimorphus</i>	Concentración de Medio de Cultivo				
	100%	15%	10%	5%	0%
Conc. Inicial (Cel/mL)	7.5×10^5	2.1×10^6	2.1×10^6	2.1×10^6	1.1×10^5
Conc. Final (Cel/mL)	1.1×10^6	7.6×10^7	5.6×10^7	4.6×10^7	3.1×10^5
Días de cultivo	9	9	9	9	9
μ (hrs ⁻¹)	0.002	0.017	0.015	0.014	0.005
Td (hrs)	390.92	41.82	45.87	48.91	149.94

* μ : Velocidad específica de crecimiento.

* Td: Tiempo de duplicación.

HUESEMANN et al. (2012) y COLLET et al. (2010) en estudios realizados sobre los rendimientos en relación a la biomasa obtenida por volumen de cultivo indican concentraciones aproximadas entre 0.05 a 0.2 gr/L. En el presente estudio, de las tres concentraciones de medio de cultivo utilizadas (15%, 10% y 5%) se pudo determinar que la mayor cantidad de biomasa obtenida fue en los cultivo al 15% con un peso de biomasa seca de 8.9903 gr para *Chlorella vulgaris* y 10.0599 gr para *Scenedesmus dimorphus*. A pesar de que *Chlorella vulgaris* posee mayor cantidad de microalgas que *Scenedesmus dimorphus*, esta última reportó una mayor peso, siendo que el volumen utilizado en el Sistema Raceway AWL modificado fue de 10 L, dejando concentraciones de 0.8 y 0.1 gr/L para *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus dimorphus* respectivamente.

MATA et al., (2010); CHUN-YEN et al., (2011) e GARIBAY et al., (2009) en sus estudios sobre la producción de biodiesel a partir de microalgas, muestran que las

especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus dimorphus* son buenas productoras de aceite, 14-22% y 16-40% respectivamente (en base al peso seco), pudiendo ser utilizadas como materia prima para la obtención de aceites destinados a diferentes tipos de procesos industriales como por ejemplo la producción de biodiesel.

Los resultados para la extracción de aceite se muestran en la tabla 3, donde se puede observar que la cantidad de biomasa seca obtenida para *Chlorella vulgaris* por triplicado fue alrededor de 8,9 gr. en 10 L. y de lípidos disponibles en un promedio de 1,9 g lo que corresponde a un 21% en base al peso seco cuando sus valores normales se encuentran entre 14 - 22%. Por otro lado para *Scenedesmus dimorphus* al 15% en el que se obtuvo alrededor de 10 g. por 10 L. de cultivo se observó una cantidad de 3 g. de lípidos, lo que correspondería a un 31% del peso seco de ésta encontrándose sus valores normales entre 16 – 40%.

En la misma tabla se presentan los resultados obtenidos para los cultivos realizados a un 10%, en los que se puede apreciar que la cantidad de biomasa recuperada para ambas especies es mayor a la obtenida trabajando al 15% así como presentar un mayor porcentaje de lípidos en base a su peso seco, sin embargo los resultados para los cultivos a un 5% se puede ver claramente que tanto los valores para biomasa recuperada como para lípidos extraídos (% peso seco) se acercan mucho a los obtenidos a un 10% pero mostrando una cantidad de biomasa recuperada muy baja para 10 L de medio de cultivo lo que indicaría que al disminuir la cantidad de sales nutritivas previsto efectivamente repercute en la cantidad de lípidos obtenidos.

TABLA 3. Parámetros Evaluados y Resultados Obtenidos a lo Largo del Cultivo de las Microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus dimorphus* Bajo Distintas Concentraciones de Sales Nutritivas.

		<i>Chlorella vulgaris</i>			<i>Scenedesmus dimorphus</i>		
Parámetros	Rep.	Concentración de medio de cultivo			Concentración de medio de cultivo		
		15%	10%	5%	15%	10%	5%
Biomasa (gr)	1	9.3563	8.0024	6.2896	10.2569	8.5687	7.3415
	2	8.8790	7.8552	6.0357	10.0254	8.2546	7.0511
	3	8.7355	7.9729	6.1544	9.8974	8.8074	7.1977
	Media	8.9903	7.9435	6.1599	10.0599	8.5436	7.1968
Lípidos (gr)	1	1.8237	2.2256	1.8742	3.1402	3.3008	2.8983
	2	1.9924	2.0305	1.6997	3.1275	3.2419	2.7015
	3	1.9574	2.1301	1.7009	3.1032	3.3512	2.8153
	Media	1.9245	2.1287	1.7583	3.1236	3.2980	2.8050
Lípidos (mL)	1	1.9953	2.4350	2.0505	3.4357	3.6114	3.1710
	2	2.1799	2.2216	1.8596	3.4218	3.5469	2.9557
	3	2.1416	2.3305	1.8609	3.3952	3.6665	3.0802
	Media	2.1056	2.3290	1.9237	3.4175	3.6083	3.0690
% Recuperado	1	19.4900	27.8100	29.8000	30.6200	38.5200	39.4800
	2	22.4400	25.8500	28.1600	31.2000	39.2700	38.3100
	3	22.4100	26.7100	27.6400	31.3500	38.0500	39.1100
	Media	21.4467	26.7900	28.5333	31.0567	38.6133	38.9667
Aceite Recuperado(mL/gr)		0,23421	0,29320	0,31229	0,33972	0,42234	0,42644

El CODEX STAN 210-1999 proporciona la información que es requerida para que un aceite pueda ser considerado como tal, según este Codex, una serie de pruebas fisicoquímicas son necesarias para determinar si un aceite es de calidad y puede ser llamado como tal. En la presente investigación fueron realizadas las pruebas de control de calidad necesarias para corroborar la buena condición del aceite obtenido teniendo los siguientes resultados: A) Peso específico, 0.916 gr de aceite/ gr de agua. B) Índice de refracción, 1.466 a 20°C. C) Índice de saponificación, 192.4 mg de KOH/gr de muestra. D) Índice de Yodo, 145.2 valor que indica una cantidad moderada de ácidos grasos insaturados. E) Índice de Peróxido, 14.38 meq de oxígeno activo/kg de aceite.

Los resultados obtenidos de las pruebas anteriormente desarrolladas, nos indican que el aceite de microalgas obtenido presenta un bajo índice de saponificación, valor que es muy útil en el momento de la refinación del aceite o para una neutralización posterior, un bajo índice de saponificación indicaría que el aceite es de buena calidad. De la misma forma y confirmando lo anteriormente dicho sobre el índice de saponificación, el índice de Yodo obtenido indica que el aceite posee un número moderado de ácidos grasos insaturados, el cual es un dato importante al momento de calificar un aceite. Se considera que un aceite es de mejor calidad cuando posee mayor cantidad de ácidos grasos insaturados y poliinsaturados.

Los valores obtenidos en el análisis del Índice de Peróxido nos revelan que el aceite obtenido no posee una muy buena resistencia a la oxidación, esto se debe a la cantidad de ácidos grasos insaturados que posee, por lo que debe tener un buen cuidado al almacenarse para evitar su oxidación. Por otro lado, las pruebas realizadas dan como conclusión que el aceite de microalgas obtenido es de buena calidad, fácilmente aprovechable para la conversión a biodiesel.

CONCLUSIONES

Se logró determinar la concentración óptima de medio de cultivo para los dos tipos de microalgas. Los conteos realizados en diferentes concentraciones de medio de cultivo Hidropónico (50%, 25%, 15% y 5%) demostraron que la concentración óptima para el crecimiento de estas microalgas fue al 15% obteniéndose una densidad poblacional de 2.74×10^5 cel/mL para *Chlorella vulgaris* y 5.32×10^4 cel/mL para *Scenedesmus dimorphus*, mientras que para las demás concentraciones se reportaron valores inferiores, por lo que se utilizó esta concentración de medio para cultivar las microalgas hasta llegar a la etapa en la que se aplicaría el estrés (Cultivo en Sistema Raceway AWL).

Se logró modificar con éxito el Sistema Raceway tradicional, realizando modificaciones en cuanto su agitación, número de canales, iluminación y adición de CO_2 , obteniendo buenos resultados en cuanto al crecimiento y cinética de las microalgas.

Ambas especies de microalgas presentan una disminución en su cinética de crecimiento al ser cultivadas en una solución con bajas concentraciones de sales nutritivas (15%), debido al estrés ocasionado las células redireccionan toda la energía que normalmente usan para dividirse al almacenaje de lípidos en forma de aceite lo que da como resultado el incremento del volumen final extraído.

Según los resultados reportados en los análisis de caracterización del aceite, se pudo constatar frente a la NORMA DEL CODEX PARA ACEITES VEGETALES ESPECIFICADOS CODEX STAN 210-1999 que el aceite obtenido de ambas especies cumple con los estándares de calidad requeridos para ser aceptado como un aceite de buena calidad y en cuanto a la cantidad de aceite extraído se concluyó

que en el caso de *Chlorella vulgaris* el mayor volumen se reportó a una concentración de 10% obteniéndose 0.29 mL/gr de biomasa mientras que para *Scenedesmus dimorphus* se obtuvieron 0.42 mL/gr de biomasa.

El hecho que se haya obtenido mayor cantidad de aceite en cultivos realizados a una concentración inferior (10%) a la concentración definida como óptima (15%) confirma que las microalgas producen mayor cantidad de aceite cuando se encuentran bajo estrés celular.

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Dr. Jose Villanueva Salas por la ayuda y orientación durante el trabajo, a los miembros del laboratorio de la Universidad Católica de Santa María por facilitar las condiciones en la realización del trabajo.

REFERENCIAS

ABALDE, J. **Microalgas: Cultivos y Aplicaciones**. Universidad de Coruña. 1995; 1-210.

AHMAD, A.; MAT YASIN, N.; DEREK, C.; LIM, J. **Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review**. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2011. p. 584-593.

ARELLANO, A. H. **Escuela Superior Politécnica de litoral: Folleto de Algas**. 1994. Ecuador.

BARAJAS, A.; GARZÓN, L.; GONZALES, A.; GUZMÁN, A.; KAFAROV, V.; MORENO, N.; NUÑEZ, M.; PLATA, V.; VELASQUEZ, G. **Bioprospección de microalgas colombianas para la producción de biodiesel**. Universidad Industrial de Santander – UIS. 2011. 59 p. Ecuador.

CHEN C.; YEH K.; AISYAH R.; LEE D.; CHANG J. **Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review**. Bioresource Technology. 2011. p. 71 – 81.

COLLET, P.; HÉLIAS, A.; LARDON, L.; RAS, M.; GOY, R.; STEYER, J. **Life-cycle assessment of microalgae culture coupled to biogas production**. Bioresource Technology. 2011. p. 207 – 214.

CONTRERAS, R. C. **“Evaluación de la producción de *Spirulina platensis* utilizando como medio de cultivo la solución hidropónica La Molina”**. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias – Escuela Profesional y Académica de Ingeniería Pesquera, 1998.

ETHIER, S.; WOISARD, K.; VAUGHAN D.; WEN Z. **Continuous culture of the microalgae *Schizochytrium limacinum* on biodiesel-derived crude glycerol for producing docosahexaenoic acid**. Biosource Technology. 2011. p 88 – 93.

GARIBAY A.; VÁZQUEZ-DUHALT, R.; SÁNCHEZ, M.; SERRANO, L.; MARTÍNEZ, A. **“Biodiesel a Partir de Microalgas: Instituto de Biotecnología”**. En: *Principios y Aplicaciones de Biotecnología Microalgal*, Universidad Nacional Autónoma de México. 2009

GONZALES, B. J. **Especificaciones para muestras de agua**. Bolsa de Cereales de Córdoba y Cámara de Cereales y Afines de Córdoba: Gestión Ambiental. vol. 4(40). 2006. p. 7-14.

HALIM R.; DANQUAH M.; WEBLEY P. **Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review**. *Biotechnology Advances*. 2012. p. 709 – 732.

HERNANDEZ, M. **Microbiología**. Editorial Paraninfo. 1997. Madrid.

HO, S.; CHEN, C.; LEE, D.; CHANG, JO. **Perspectives on microalgal CO₂-emission mitigation systems — A review**. *Biotechnology Advances*. 2011. p. 189-198.

HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS A. **Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances**. *Plant Journal*. Department of Chemistry and Geochemistry. 2008. 19p. USA.

HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X.; CHEN, G. **Biodiesel production by microalgal biotechnology**. *Appl Energy* 2010; 87:38–46.

HUESEMANN, M.; WAGENEN, J.; MILLER, T.; CHAVIS, A.; HOBBS, S.; CROWE, B. **A Screening Model to Predict Microalgae Biomass Growth in Photobioreactors and Raceway Ponds**. *Biotechnology and Bioengineering*. 2012.

KRUEGER, R.; GILLHAM N.; COGGIN, J. **Introduction to microbiology**. Macmillan.1973. 815 p.

LOERA-QUEZADA, M. & OLGUÍN, E. **Las microalgas oleoginosas como fuente de biodiesel: retos y oportunidades**. *Revista latinoamericana de biotecnología ambiental algal*. 2010. 116 p.

MATA, T.; MARTINS, A.; CAETANO, N. **Microalgae for biodiesel production and other applications: A review**. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2010. p. 217 – 232.

MORAIS, M. & COSTA, J. **Perfil de Ácidos Grasos de microalgas cultivadas con dióxido de carbono**. *Ciências Agrotecnicas Lavras*, v.32 2007.

PERALES H.; MORENO, S.; MONTES, C.; CAÑIZARES, R. **Growth photosynthetic and respiratory responses to sublethal copper concentrations in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae)**. *Chemosphere*. 2007. China

PINZI, S.; GARCIA, I.; LOPEZ-GIMENEZ, F.; LUQUE DE CASTRO, M; DORADO, G; DORADO, M. **The ideal vegetable oil-based biodiesel composition: a review of social, economical and technical implications.** Energy Fuels 2009. p. 25–41.

TRUJILLO, V. M. **Manual de Técnicas de Aislamiento de cepas de microalgas. Informe Técnico.** Comunicaciones Académicas, Serie Acuicultura, 29. CTACT9701. 1997.

URIBE, E. **Tecnología de Cultivo de microalga.** 7º Curso Internacional Cultivo de Moluscos. 1994. Conquimbo – Chile.