



**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE
TUXTLA GUTIERREZ**

RESIDENCIA PROFESIONAL

INGENIERIA BIOQUIMICA

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIERREZ

**“EFECTO DEL FOTOPERIODO EN LA MICROALGA
Chlorella Vulgaris USANDO DIFERENTES MEDIOS
DE CULTIVO MAS UN FERTILIZANTE COMERCIAL”**

PRESENTA:

DÍAZ GRAJALES WALTER

ASESOR INTERNO:

DR. ARNULFO ROSALES QUINTERO

TUXTLA GUTIERREZ, CHIAPAS A 20 DE DICIEMBRE DE 2012

| | |
|--|-----------|
| 7.5 Factores de desarrollo. | 19 |
| 7.5.1 Luz. | 19 |
| 7.5.2 Nutrientes. | 20 |
| 7.5.3 pH. | 21 |
| 7.5.4 Agitación. | 21 |
| 7.5.5 Temperatura. | 22 |
| 7.6 Fertilizante en microalgas. | 22 |
| | |
| CAPITULO VIII. PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCION DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS. | 23 |
| 8.1 Verificación e instalación del equipo y realización de prueba experimental. | 24 |
| 8.2 preparación de medios de cultivo e inoculación. | 25 |
| 8.3 Conteo celular. | 27 |
| 8.4 Determinación de peso seco. | 27 |
| 8.5 Determinación de pigmentos fotosintéticos. | 27 |
| 8.6 Determinación de lípidos. | 28 |
| CAPITULO. VIII RESULTADOS. | 30 |
| CONCLUSIONES. | 38 |
| BIBLIOGRAFIA. | 39 |

CAPITULO I INTRODUCCION.

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos generalmente autótrofos. Sin embargo hay algunas especies que pueden ser capaces de crecer empleando materia orgánica como una fuente de energía y carbono.

Actualmente una técnica económicamente viable es la producción fotótrofa de las microalgas y la composición de estas en su gran mayoría son proteínas, carbohidratos y lípidos, estos componentes son tanto variables como manipulables, dependiendo de las condiciones del ambiente y de su medio de cultivo.

En este trabajo de investigación se puso a prueba la versatilidad que tiene la microalga *Chlorella vulgaris* para su desarrollo en medios distintos como aguas residuales y en su exposición diversa a la luz, con el fin de monitorear algunos parámetros de importancia como clorofila, biomasa y lípidos.

El desarrollo experimental se realizó en Agua Residual Sintética (ARS) y en Agua Destilada (AD) con una aireación de .0.7 vvm en una cámara climática a 25°C , y a distintos fotoperiodos de luz-obscuridad de 20/4, 16/8 y 12/12 en 500ml de cultivo con una población inicial al inocular de 2.516×10^5 células/ml.

La variación de los fotoperiodos es con el fin de identificar en cuál de estos hay una mayor producción de biomasa y comprobar si está directamente relacionada con la producción de lípidos.

CAPITULO II. JUSTIFICACIÓN

Los combustibles fósiles son una de las principales fuentes de energía, pero debido a su uso desmedido implica altas tasas de contaminación, de ahí mismo la necesidad por la investigación de otros medios para la sustitución gradual de dichos hidrocarburos además de encontrar una disminución en las emisiones de CO₂ que impactan y deterioran de manera significativa al medio ambiente.

Una opción para la sustitución de los combustibles fósiles es el uso de biocombustible, llamado de esta forma por ser obtenido a partir de biomasa, referente a la materia prima proveniente de un proceso biológico de organismos vivos recientemente. Algunas de las fuentes más habituales de biomasa para la extracción de este biocarburante son el arroz, maíz, trigo, soya, girasol, cacahuate, entre otras.

Los biocombustibles de más uso a nivel mundial son el bioetanol que se produce por la fermentación de los azúcares contenidos en la biomasa, y el biodiesel es cual se obtiene del intercambio de del grupo alcoxi de un éster por otro alcohol, también llamada transesterificación y puede ser obtenido de aceites vegetales, animales, o de residuo.

Una buena iniciativa para dar origen a la producción de biodiesel es la utilización de los y biomasa provenientes del cultivo de microalgas, ya que a diferencia de los cultivos con cereales y semillas, ocupan una superficie considerablemente menor, con respecto a su producción de aceite vegetal.

Asociado a lo anterior, otras propiedades de las microalgas son su alta capacidad fotosintética, su capacidad de desarrollarse y adaptarse en aguas marinas, dulces y residuales, así como su velocidad de crecimiento relativamente alta.

Vamos a adaptar Agua Residual Sintética en particular jabonosa puesto que mucha del agua domestica contienen estos compuestos ricos en fosforo y nitrógeno para el uso de la micro alga como remediación.

Se utilizara Agua Destilada para tomarlo como control de crecimiento y además puesto que cuenta con mayor accesibilidad para el productor conseguir el fertilizante y aplicarlo.

El uso de los fotoperiodos y su variación es con el fin de fomentar el crecimiento de la microalga teniendo a la luz como sustrato.

Por lo tanto este trabajo de investigación aportará parámetros del comportamiento de *Chorella vulgaris* en diversos fotoperiodos y medios de cultivo de agua residual y agua destilada para su uso en la producción de lípidos los cuales serán útiles para la producción de biodiesel o bioetanol de la biomasa.

CAPITULO III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general.

Evaluar el efecto de la variación del fotoperiodo y el uso de medios sintéticos en el cultivos de la microalga *Chorella vulgaris*.

3.2 Objetivos específicos.

- Montar el equipo experimental y ajustar a las necesidades del proyecto.
- Evaluar los fotoperiodos de luz-obscuridad 20/4, 16/8 y 12/12 usando ARS y AD adicionada con un fertilizante comercial.
- Cuantificar peso seco, producción de lípidos y clorofila en los diferentes fotoperiodos.

CAPITULO IV. CARACTERIZACION DEL AREA DONDE SE DESARROLLO EL PROYECTO.

4.1 HISTORIA DEL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

El Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez nace a partir de un movimiento nacional de educación extensiva que fue bien recibido en el estado de Chiapas, con el apoyo del entonces Gobernador Institucional, Dr. Manuel Velasco Suarez, mismo que el día 23 de agosto de 1971 puso la primera piedra de la institución que al paso del tiempo es considerada una de las más importantes del estado.

Posteriormente cuando dentro de las instalaciones ya contaba con 2 edificios con 8 aulas, 2 laboratorios y 1 edificio para talleres, el Instituto Tecnológico Regional de Tuxtla Gutiérrez (ITRTG) abre sus puertas el día 22 de octubre de 1972 con las carreras de Técnico en Máquinas de Combustión Interna, Electricidad, Laboratorista Químico y Máquinas y Herramientas.

En el año 1974 las carreras técnicas dan paso al nivel superior, ofreciendo las carreras de Ingeniería Industrial en Producción y Bioquímica en Productos Naturales. Ya para el año de 1980 se amplió la oferta educativa al incorporarse las carreras de Ingeniería Industrial Eléctrica e Ingeniería Industrial Química.

Después 1987 se abre la carrera de Ingeniería en Electrónica y se liquidan en 1989 las carreras del sistema abierto del nivel medio superior y en el nivel superior se reorientó la oferta en la carrera de Ingeniería Industrial Eléctrica y se inicia también Ingeniería Mecánica.

En 1991 con el compromiso de mantenerse con fines tecnológicos surge la licenciatura en Ingeniería en Sistemas Computacionales y 1997 el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez ofrece la Especialización en Ingeniería Ambiental como primer programa de postgrado.

Se estableció el programa interinstitucional de postgrado con la Universidad Autónoma de Chiapas para impartir en el Instituto Tecnológico la Maestría en Biotecnología en 1998 y en el año 1999 se inició el programa de Maestría en Administración como respuesta a la demanda del sector industrial y de servicios de la región.

A partir de 2000 se abrió también la Especialización en Biotecnología Vegetal y un año después dio inicio el programa de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica y la Licenciatura en Informática.

Fue en el 2008 cuando a través del Consejo Nacional en Ciencia y Tecnología (Conacyt), el Tecnológico de Tuxtla participó en la convocatoria de proyectos estratégicos, la cual demandaba responder a la visión del Plan Estatal de Desarrollo de la entidad correspondiente.

Fue en noviembre del 2011 cuando este laboratorio se puso en marcha con la inauguración oficial del Polo Tecnológico Nacional para el Desarrollo de Investigación y Pruebas Analíticas en Biocombustible ubicado dentro de los terrenos del ITTG, mismo que alberga 11 laboratorios y un cuarto frío.

4.2 MISIÓN

La misión dentro del ITTG citándolo textualmente es el siguiente: “Formar de manera integral profesionales de excelencia en el campo de la ciencia y la tecnología con actitud empresarial, respeto al medio ambiente y apego a los valores éticos.”

4.3 VISIÓN

El enfoque de la visión del ITTG estaba basado en ser una Institución de excelencia en la educación superior tecnológica del Sureste, comprometida con el desarrollo socioeconómico sustentable de la región.

4.4 LABORATORIO DE TEJIDOS VEGETALES.

En el laboratorio de tejidos vegetales se realizan análisis para la determinación de la conducta de los tejidos vegetales a diferentes condiciones, para el ITTG es uno de los laboratorios más importantes dentro del centro de estudios ya que permite que sus alumnos de licenciatura y posgrado tengan un espacio para realizar los proyectos que requieran las condiciones que este laboratorio ofrece.

El laboratorio presenta 3 áreas principales:

1. El laboratorio básico:

Donde está las mesas de trabajo y la sección de gavetas para guardar el material con el que se necesite trabajar, también una sección, de lavado de material, cuenta con 2 refrigeradores para el resguardo de soluciones, reactivos o microorganismos que necesiten refrigeración, y un área de reactivos.

2. La cámara bioclimática:

Es un área sanitizada con mucha iluminación y climatizada para dar las condiciones óptimas para los tejidos vegetales que ahí se estén cultivando y un área de cultivo de fotoperiodos.

3. Campana de extracción:

Hay otra área que cuenta con una campaña de extracción con luz UV la que permite realizar de manera segura e inocua las actividades en las que se ponga en riesgo ya sea por contacto directo o por vapores de los medios, nuestra integridad.

4.5 LOCALIZACION DEL INSTITUTO TECNOLOGICO DE TUXTLA GUTIERREZ.

El ITTG se encuentra localizado en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Sobre la Carretera Panamericana Km 1080. C.P. 29050

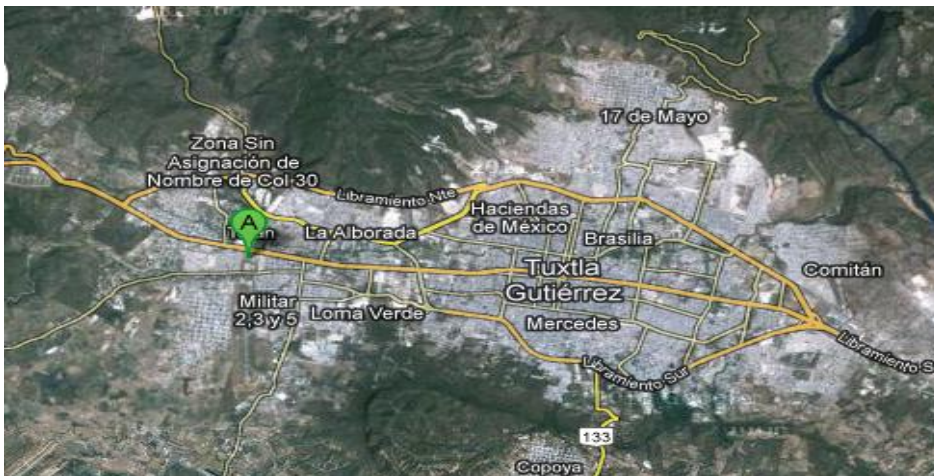


Figura. 3.1 Vista satelital de la ubicación del ITTG



Figura 3.2 Vista satelital de la ubicación del edificio Z.

Dentro de las instalaciones de ITTG está ubicado el edificio Z (marcado con el punto azul) que es donde se encuentra en la planta baja una sala audiovisual y en la planta alta el departamento de posgrado encuentra también se ubicado el laboratorio de tejidos vegetales donde se desarrolló la mayor parte del proyecto.

CAPITULO V. PROBLEMAS A RESOLVER

Uno de los problemas centrales a resolver es la adecuación de las microalgas a el agua residual y al agua desionizada, porque para *Chorella vulgaris* es necesario una serie de nutrientes para su desarrollo, de esta forma se puso a prueba la adaptabilidad de la cepa para su crecimiento y su producción de lípidos y clorofila en presencia de una solución de un fertilizante comercial (Bayfolan).

Debido al uso del agua destilada y fertilizante se verificara si hay incremento en capacidad fotosintética y si permitirá el análisis y la realización de pruebas para determinar los parámetros necesarios, ya sea lípidos o clorofila.

CAPITULO VI. ALCANCES Y LIMITACIONES

Uno de los alcances esperados ara el crecimiento de *Chorella vulgaris* es el que su cinética microbiana tenga una duración mínima de 4 días en sus tres fotoperiodos ya que se tiene un área designada con las condiciones favorables a el crecimiento de la cepa tanto de luz como de temperatura y un temporizador para regular las variación de la luz.

Por otro lado una de las limitantes son las condiciones nutrimentales de los medios que no son las óptimas para su crecimiento normal, pero se espera que con la adición del fertilizante tenga los nutrientes mínimos para su desarrollo ya que el análisis estará enfocado en biomasa, producción de lípidos y producción de clorofila.

CAPITULO VII. FUNDAMENTO TEÓRICO.

7.1 MICROALGAS.

En 1887 Víctor Hensen uso el término plancton que en griego significa errante, para referirse a todas aquellas partículas organogénicas, muertas o vivas que se mueven a merced de la aguas. Desde hace muchos años el plancton ha sido objeto de estudio. La comunidad plantónica se clasifica según sus componentes, en fitoplancton y zooplancton. El fitoplancton comprende un amplio grupo de organismos autótrofos mayoritariamente microscópicos que representan el primer eslabón de la cadena alimentaria (Gómez-Luna, 2007).

El termino microalgas aparece posteriormente al desarrollo biotecnológico; esto se refiere a aquellos microorganismos que contienen clorofila y otros pigmentos fotosintéticos, capaces de realizar fotosíntesis oxigénica. En este contexto, las cianobacterias o algas verde-azules, con estructura celular procariota, se han considerado tradicionalmente dentro del grupo (Comas, 1992).

Las microalgas son un recurso muy importante en la naturaleza pues constituyen los productores primarios más importantes de la biosfera. Se estima que solo las microalgas que componen el fitoplancton fijan varios miles de millones de toneladas de carbono al año en las masas de aguas continentales y oceánicas, lo cual implica que la generación de oxígeno que sustenta la vida se genera principalmente por estos microorganismos. Por otro lado, algunas especies de microalgas juega un papel fundamental en la fertilidad de los suelos, por ejemplo las cianófitas transforman el nitrógeno molecular en amonio de una forma similar a las bacterias; otras son útiles en la recuperación de suelo salino; otras son aprovechadas como alimento tanto para el humano como para el hombre en una diversidad de productos y suplementos alimenticios (Catzim, 2011).

Estos microorganismos unicelulares tienen un crecimiento rápido en relación con otros microorganismos ya que van de 2 a 20 días en completar su curva de crecimiento (Band, 2004).

7.2 *Chlorella*.

Chlorella una de los género de microalgas unicelulares que pueden poseer una forma globular, elipsoidal, o esférica, tiene un tamaño aproximado de 2-10um de diámetro y tiene la versatilidad de crecer en medios de agua dulce, estanques, lagunas y suelos (Richmond, 1990).

Chlorella está siendo investigada como un nuevo recurso alimenticio debido a que una célula de esta microalga contiene un promedio de 50% de proteína, 5% de clorofila y un gran número de vitaminas y carotenos (Lee, 1995).

Según se ha documentado, que posee beneficios terapéuticos como la capacidad de desintoxicar a los organismos de metales pesados como el mercurio (Hg), Cadmio (Cd) y plomo (Pb) entre otros elementos contaminantes agregados a insecticidas o plásticos. Además se piensa que posee la capacidad de prevenir el cáncer (Konishi, 1996).

Como en las plantas superiores, la composición química de las algas no es un factor constante. Muchos factores ambientales influyen la proporción de los diferentes constituyentes de la biomasa de las microalgas.

7.3 *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris es un alga unicelular de color verde, de forma esférica, con un diámetro que es entre 100 y 1000 veces menor a 1 mm. El color verde lo obtiene de los cloroplastos, que son las estructuras encargadas de realizar la fotosíntesis. Esta característica le da nombre *Chlorella* al género, que significa pequeña verde.

Debido a la fotosíntesis, que es el proceso por el que adquiere carbono de la atmósfera (como elemento vital para su crecimiento y desarrollo) forma parte de la base de la cadena alimenticia.

Se reproduce muy rápidamente y de forma asexual. Para eso precisa el carbono que obtiene de la fotosíntesis, agua, luz y pequeñas cantidades de minerales. Debido a su rápido crecimiento, se estudia la posibilidad de que sea utilizada para producir biodiesel. Contiene grandes cantidades de proteínas, vitamina C, beta caroteno y vitaminas B (B1, B2, B6 y B12). Es utilizada para fabricar suplementos alimenticios, productos cosméticos contra el envejecimiento, para estimular el sistema inmune y para la desintoxicación de metales pesados.

Esta especie tiene una composición química aproximada de 51-58% en proteína, 12-17% carbohidratos, 14-22% lípidos, y 4-5% ácidos nucleídos, la cual supera su porcentaje de algunos alimentos, incluso por encima de la carne (Becker, 1994).

Actualmente de 70.000 especies de microalgas han sido identificadas y muchas de ellas no son aptas para el consumo humano. Afortunadamente, la investigación ha demostrado que *Chlorella* es la mejor para el consumo humano, y estas cepas se cultivaron y cultivan ahora en todo el mundo (Claessens, 2007)

7.3.1 Taxonomía de *Chlorella vulgaris*

| |
|---|
| Taxonomía de <i>Chlorella vulgaris</i> |
|---|

| | |
|----------|------------------|
| Reino | Protoctista |
| División | Chlorophyta |
| Clase | Chlorophyceae |
| Orden | Chlorococcales |
| Familia | Oocystaceae |
| Género | <i>Chlorella</i> |
| Especie | <i>vulgaris</i> |

7.3.2 Morfología.

Células solitarias o en grupos irregulares, generalmente esféricas, mas raramente, ovales y ovadas, con pared celular lisa de color verde. Un cloroplasto parietal, bandiforme o acupado, con o sin perenoide. La reproducción de estos microorganismos es exclusivamente por auto esporas que se liberan por una abertura de la pared celular materna (Fanés-Treviño, 2008).



Figura 7.1 *Chlorella vulgaris* (Loera, 2010)

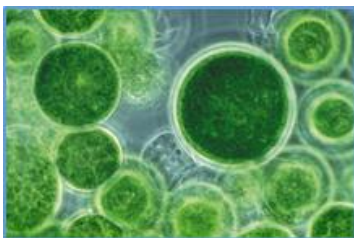


Figura 7.2 microalgas (Acuña, 2011).

En la producción asexual las células maduras se dividen en porciones cada vez menores, hasta que se obtiene fragmentos de uninucleados, cada uno de los cuales actúa como una zoospora (Dillard, 1989).

7.3.3 Composición bioquímica.

Las micro algas representan una fuentes proteica con posibles aplicaciones en la nutrición humana además de ser un complemento de la alimentación animal, esto debido a sus contenido de proteínas, de igual forma potenciados por el hecho de poseer un buen balance de aminoácidos y bajos valores de ácidos nucleídos en comparación con otras fuentes (Morris, 1999).

| Componentes | Porcentaje |
|--------------------------|------------|
| Pérdidas por desecación | 7,18 |
| Nitrógeno total | 7,13 |
| Proteína bruta | 44,56 |
| Proteína verdadera | 32,25 |
| Carbohidratos | 16,00 |
| Fibra cruda | 8,20 |
| Lípidos | 0,29 |
| Cenizas | 8,90 |
| Ácidos nucleicos totales | 5,69 |

Tabla 7.1 Composición bioquímica (%) de la biomasa de *Chlorella vulgaris* (Morris, 1999)

Tabla 7.2 Contenido de aminoácidos de *Chlorella vulgaris*. (WHO/FAO/UNU, 1985)

| Aminoácidos esenciales | (g 100g ⁻¹ de Proteína) |
|------------------------|------------------------------------|
| Isoleucina | 4,82 |
| Leucina | 10,78 |
| Lisina | 7,70 |
| Treonina | 5,60 |
| Triptófano | 1,12 |
| Valina | n.r |

Al analizar estas cifras en comparación con algunos otros alimentos podemos observar la superioridad de la microalga sobre estos en su contenido bioquímico.

7.3.4 Cinética de crecimiento.

En promedio, las microalgas doblan su biomasa en 24 horas. Sin embargo, en fase exponencial algunas algas pueden doblar su biomasa en tiempos tan cortos como 3,5 horas (Brennan 2010).

La cinética de crecimiento de *Chlorella vulgaris* varía de 7 a 8 días como se puede observar en lo siguiente gráfica donde se genera 3 lecturas de crecimiento a partir de la variación del porcentaje de CO₂ (Anjos, 2011).

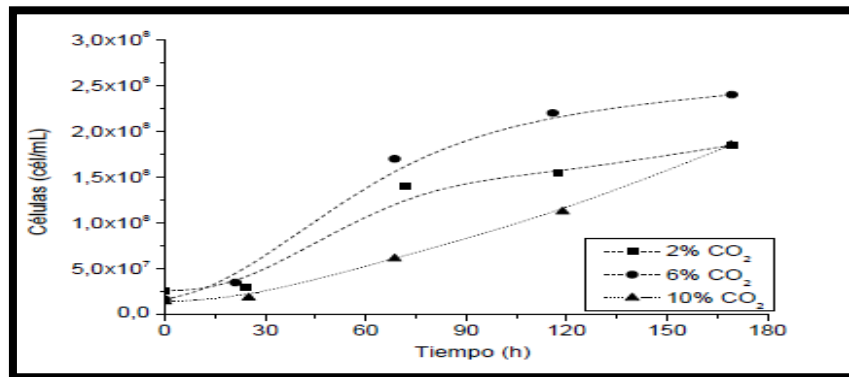


Figura 6.3 Curva de crecimiento de *Chlorella vulgaris* (Anjos, 2011).

Las microalgas responden rápidamente a cambios ambientales, debido a sus cortos tiempos de generación y a su papel como principales productores primarios en los ecosistemas acuáticos. Sin embargo existen limitaciones que se debe superar para la producción de biomasa tales como: densidad celular de inoculación, cantidad y calidad de la luz, temperatura, nivel de agitación, pH, fuente de carbono, concentración y composición de nutrientes y condiciones estériles de la solución nutritiva (Rodas-Gaitán, 2012).

7.4 Medio de cultivo

Las investigaciones sobre el cultivo de microalgas revisten gran importancia dada su amplia aplicación biotecnológica y comercial. En tal sentido, se han utilizado cultivos discontinuos por su relativo fácil manejo para la determinación de la cinética de crecimiento y los parámetros que influyen en el desarrollo poblacional de las microalgas (Abalde, 1995).

Sin embargo el uso de medios de cultivo sintéticos ha incrementado sustancialmente el valor económico para la producción de la biomasa de estos microorganismos (Gonzales, 1999)

Tanto la composición del medio como la productividad de las microalgas están determinadas principalmente, por la alcalinidad del medio, el pH, la temperatura, la disponibilidad y concentración de nutrientes, la intensidad y tipo de luz, la densidad celular del cultivo y la contaminación o depredación por otros organismos.

7.4.1 Agua residual.

Las aguas residuales artificiales permiten un primer estudio simplificado a escala de laboratorio, mediante el cual el análisis de los principales componentes puede hacerse sin necesidad de tener en cuenta variables desconocidas como factores bióticos, la mayoría de medios contiene elevadas concentraciones de determinados nutrientes y no presentan materia orgánica u otras sustancias que puedan llegar a ser potencialmente tóxicas.

Es por ello que los estudios que comparan el crecimiento de microalgas en aguas residuales y artificiales obtienen valores mayores para las aguas artificiales, aunque la eliminación de nutrientes sea similar (Ruiz, 2011).

7.4.2 Agua destilada.

La utilidad del agua destilada para el cultivo de micro algas es importante ya que es tomada como un control para la relación con otros medios y denotar la similitud o diferencia en cuanto al comportamiento de las microalgas.

Una razón más para utilizar agua destilada es para fomentar el crecimiento de *Chlorella* con la ayuda del CO₂ ambiental, la temperatura y la luz proporcionada, ya que no estarán presentes los nutrientes que existen en otros medio sintéticos para su cinética de crecimiento.

7.5 Factores de desarrollo.

Cada microorganismo necesita diversos factores que limitan su crecimiento, para *chlorella vulgaris* los físico-químicos y los nutritivos.

Entre los primeros, se destacan la luz, temperatura, salinidad, pH, CO₂ y fotoperiodo (Becker, 2004; Tzovenis y col. 2003).

Dentro de los segundos son relevantes los macro nutrientes, que son utilizados para sintetizar compuestos orgánicos, y los micro nutrientes usados como catalizadores (Becker, 2004).

7.5.1 Luz.

Los microorganismos con actividad fotosintética emplean la fracción del espectro de luz solar que es fotosintéticamente activa, es decir entre 350 y 700 nm. Esta fracción de luz representa un 40% de la radiación total del sol. La mayor parte de los ecosistemas naturales vegetales presentan una eficiencia de alrededor del 1%

en lo que a conversión de energía se refiere. Se han demostrado, para las microalgas, la eficiencias de conversión luz-biomasa entre el 1 y 4% en sistemas abiertos y aún mayores en fotobiorreactores cerrados (Stephens, 2010).

La luz es generalmente uno de los factores limitantes en la producción de microalgas. El aprovechamiento parcial de la radiación fotosintéticamente activa es atribuido a fenómenos diversos, principalmente a la disipación de energía en los aparatos fotosintéticos en manera de calor o fluorescencia con la intención de evitar el daño de éstos por radiación excesiva (Pulz, 1998).

Una contribución para la producción continua de cultivo es la iluminación artificial, aunque genere un coste mayor a deferencia de la luz solar, pero debido a la necesidad de hacer cultivos de microalgas en mejor tiempo, es importante conocer la cantidad de luz que absorben las microalgas. Las lámparas LEDs son la fuente más eficiente y económica ya que emiten más del 98% de su capacidad radiante entre 600 y 700 nm.

En la fase oscura del metabolismo fotosintético se da paso a la fijación del CO_2 y su reducción a moléculas glúcidas a través de reacciones reductivas fuertemente endergónicas. Según el mecanismo de fijación del CO_2 se establecen tres modelos fotosintéticos, C3, C4 y CAM (*Crassulecean Acid Metabolism*). Las más abundantes son las plantas C3, es decir las que solo presentan un ciclo C3 o ciclo de Calvin que es el que permite la conversión del CO_2 en glúcidos (Monza, 2010)

7.5.2 Nutrientes.

Las microalgas poseen la versatilidad de ser autótrofas, heterótrofas y mixotróficas. Algunos nutrientes importantes son: **carbono, nitrógeno y fosforo**, nombrados como los principales en el cultivo de estos microorganismos.

Las microalgas pueden emplear el CO_2 que se encuentra presente en el medio ambiente, aunque no se podría generalizar el consumo de CO_2 porque eso varía

dependiendo de las especies, teniendo como resultado a gran escala, la reducción del impacto del efecto invernadero.

En la biomasa puede encontrarse un 1 hasta el 10% de nitrógeno, todo esto dependiendo de la fuente de nitrógeno. Las microalgas generalmente tienen acceso al nitrógeno en forma de urea, amonio, nitrato, nitrógeno gas y óxidos de nitrógeno, dependiendo de la cuestión.

Diversos autores han concluido que la relación Nitrógeno-Fósforo en el medio de cultivo influye en la toma de nutrientes, de modo que cuanto más próxima este a la composición de los microorganismos, mayor crecimiento y toma de nutrientes tendrá lugar. Por ejemplo, *Chlorella* tiene una relación óptima de 8:1 (Aslan y Kapdan, 2008)

Es necesario resaltar la importancia de lo que provoca una falta de nutrientes, las microalgas sufren una acumulación de lípidos siempre que haya luz y CO₂ disponibles (Rodolfi, 2009).

7.5.3 pH.

El pH para la gran mayoría de los cultivos de microalgas va de 7 a 9, teniendo una lectura óptima entre 8.2 – 8.7.

El control del pH en el cultivo es proporcionado por la aireación esto es debido al proceso fotosintético, que fija el CO₂ el cual provoca el aumento de los grupos OH y aumenta el potencial de Hidrógeno.

7.5.4 Agitación.

La agitación hace una labor de mucha importancia dentro del crecimiento celular, ya que de inicio impide la precipitación de microorganismos así como la adherencia de estos en las paredes del reactor, homogenizar tanto el pH, los gases y la

transferencia superficial de luz. Con una adecuada agitación logramos ciclos rápidos de mezclados y hacer un transporte de la zona iluminada a la zona oscura en fracción de segundos.

7.5.5 Temperatura.

Existen una amplia variedad de microalgas a pesar de eso con capaces de desarrollarse en un amplio rango de temperaturas, tal como Chlorella ya que su rango de crecimiento entre 5 y 42°C. Aunque en algunos casos ha sido demostrado que cuando el dióxido de carbono y la luz son limitantes en el cultivo, la temperatura no tiene una influencia significativa.

7.6 Fertilizante en microalgas.

La utilización de fertilizantes agrícolas se ha considerado como una alternativa económica para reducir los altos costos en la producción de microalgas en laboratorios comerciales, sin embargo para volúmenes iniciales, es recomendable utilizar el medio f Guillard con el fin de obtener una micro alga de buena calidad, ya que el uso de medios simplificados y de menos costo, ppude afectar el crecimiento y composiciones de las microalgas en lo referente a su contenido de las fracciones orgánicas. (Peraza-Díaz, 1997)

Diversos investigadores han demostrado que el fitoplancton producido con fertilizantes agrícolas es adecuado para la alimentación de lavar, algunos resultados indican que fertilizantes como la urea y el sulfato de amonio pueden ser buenos sustitutos en laboratorios de producción alga y que con su uso se reducen notablemente los costos económicos de producción (Iriarte y Buitrago, 1992).

Uno de los fertilizantes agrícolas que se han estado probando actualmente, es el Bayfolan, que gracias a su composición nutrimental, sirve como fuente de alimentación a las microalgas para darle las condiciones nutricionales necesarias para su desarrollo y un incremento en su producción de biomasa.

Esta nutrición estimula los procesos metabólicos del microorganismo fotosintético, ayudando a la absorción de nutrientes que necesite. El incremento en el rendimiento logrado con la nutrición foliar no es solo atribuible a los nutrientes suministrado en esta vía, es consecuencia además de un incremento en la absorción de nutrientes del medio.

CAPITULO VIII. PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCION DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS.

Para la realización del proyecto se realizaron se llevaron a cabo las siguientes actividades y determinaciones:

- **Verificación e instalación del equipo y realización de prueba experimental:** Esto se realizó con el fin de asegurarnos que tanto el material como el equipo estén en condiciones óptimas para su uso y no alteren el curso del bioproceso.
- **Preparación de medios de cultivo e inoculación:** Se adecuaron y se adaptaron los medios a los recipientes que tendrían la función de fotobiorreactores. Tomando de la cepa cuantificada ***Chlorella vulgaris***.

- **Conteo celular:** se determina la densidad celular con la ayuda de la cámara de Neubauer.
- **Determinación de biomasa:** usando el método de peso seco con filtros milipore.
- **Determinación de pigmentos fotosintéticos:** determinado por la absorbancia con ayuda de un espectrofotómetro.
- **Determinación de lípidos:** auxiliados por el método de Soxhlet.

8.1 Verificación e instalación del equipo y realización de prueba experimental.

Tanto para el manejo como el monitoreo del desarrollo del cultivo de *Chlorella vulgaris* es necesario contar con un foto biorreactor, a nivel laboratorio se adecuaron matraces Erlenmeyer de 1 litro con tapones de gomas horadados, barrillas de vidrio, mangueras de plástico, algodón, microfilm, una bomba de aire y lámparas LED; con el fin de mantener lo mayormente posible en control algunas variables que apoyan a la cinética de crecimiento del microorganismo.

La parte que tomara el papel de contenedor del fotobiorreactor será el matraz, el tapón horadado será de utilidad para dejar un sistema semiabierto, ya en los orificios serán colocadas las barrillas de vidrio huecas con el fin de dejar pasar el aire de la bomba por as mangueras plásticas y proveer al sistema aireación y agitación, evitando la sedimentación de la microalga.

Además se siente contemplado dentro delas varillas secciones de algodón q funcionaran como filtro permitiendo el paso del aire y protegiendo en una mayor

proporción al medio de contaminantes, ya sea microorganismos de gran tamaño o materia orgánica no deseada.



También se inspecciono las lámparas que proporcionaran los fotoperiodos necesarios para el sistema fotosintético de *Chlorella*, de igual forma fue sincronizándose con un temporizador a 12/12, 16/8 y 20/4 que son los periodos de luz a manejar. Se realizó una prueba con agua, para ajustar la intensidad de la aireación y posteriormente, el material fu esterilizado para su uso.

Figura 8.1 Esquema del sistema experimental

8.2 PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO E INOCULACION.

Para la cinética *Chlorella vulgaris* serán manejados dos medios de cultivo más un porcentaje de fertilizante para incrementar el desarrollo de su biomasa y poder comprobar la producción de lípidos.

Los medios que utilizaremos tiene una elaboración cómoda en comparación con otros medio de cultivo, son accesibles en cuanto razones económicas se refiere. Ya que utilizaremos 2 soluciones acuosas, Agua Destilada (AD) y Agua Residual Sintética (ARS), las dos con una concentración de fertilizante.

El fertilizante que utilizaremos es **Bayfolan sólido** de **Bayer**, para su preparación en solución se agregan 1 gramo de fertilizante en polvo por cada 100ml de agua destilada e incorporarlo bien y subsiguientemente se autoclava para su adición a los medios.

El medio de **Agua Destilada (AD)** fue manejado por autoclave, en los matraces de un litro se vaciaron 450ml de agua destilada y se empaquetaron para su esterilización, al igual que sus respectivos tapones con las varillas. Teniendo las mínimas dificultades para su elaboración.

Para el medio de **Agua Residual Sintética (ARS)** fue utilizado un jabón de tocador neutro, ya que al no tener una composición definida de las aguas residuales regionales es un tanto difícil conocer las variaciones de esta.

Por esa razón y con el cuidado de mantener el pH se determina el uso de jabón neutro en concentraciones de 0.5g en un litro de agua potable.

En este medio se utilizó el agua potable sin esterilizar con la finalidad de proveer de flora de competencia al medio y de esa manera poner a prueba la superioridad en cuanto a competencia por el sustrato de *Chlorella* se refiere.

De forma similar en un matraz Erlenmeyer de un litro se vaciaron 450 ml de ARS tapado y etiquetado para la inoculación.

Se inoculo con una cepa de *Chlorella vulgaris* que tenía como densidad microbiana 4.575×10^6 células por cada mililitro, previamente cuantificada.

A cada uno de los matraces se le añadieron 50 ml de cepa, 1 ml de la solución fertilizante, se taparon, se llevaron al contenedor con las lámparas, se le adecuo la aireación mediante la bomba previamente calibrada y se inició el monitoreo de su cinética de crecimiento sumando 1 ml de fertilizante cada 2 días.

8.3 Conteo celular.

El conteo celular fue realizado en cámara de Neubauer con un objetivo de 40x, las muestras fueron de 1ml con un monitoreo diario para llevar el control al esquematizar su desarrollo en un curva de crecimiento para comparar los resultados entre los medios y cada uno de los foto periodos. (ver anexo método Neubauer)

8.4 Determinación de peso seco.

Para esta determinación, con ayuda de una bomba de vacío, se utiliza un filtro milipore de nitrocelulosa de .45µm de diámetro previamente a peso constante lo q nos ayudara a tener una diferencia de pesos más acertada. Después de haber filtrado 10 ml de muestras de cada uno delos tofo periodos se introdujo a un horno con una temperatura de 80°C hasta alcanzar su peso seco.

La biomasa fue calculada mediante la fórmula:

$$\frac{(Peso\ final\ del\ filtro\ +\ biomasa) - (Peso\ inicial\ dela\ filtro)}{voluen\ de\ muestra}$$

8.5 Determinación de pigmentos fotosintéticos.

Las muestras igualmente tomadas a diario fueron de un volumen de 5ml de cultivo los cuales fueron centrifugados a 3,500 rpm con una duración de 15 minutos. Con 5 mililitros de metanol al 90% fue resuspendida la pastilla resultante de la centrifugación y posteriormente fue calentada a 60°C con una duración de 10minutos.

Una vez calentadas las muestras fueron cubiertas y almacenadas a 4° de refrigeración durante 24 horas, después de este periodo de almacenaje en frío fueron centrifugadas nuevamente a 3,500 rpm por 10 minutos.

El sobrenadante fue retirado y aforado a 5ml y llevado al espectrofotómetro para realizar lecturas a 653 y 666nm para la cuantificación de pigmentos fotosintéticos (clorofila A y B).

El cálculo fue realizado con el apoyo de las siguientes formulas:

$$\text{Clorofila A} = 15.65 (A_{666}) - 7.34 (A_{653})$$

$$\text{Clorofila B} = 27.05 (A_{653}) - 11.21 (A_{666})$$

8.6 Determinación de lípidos.

Una vez instalado el equipo Soxhlet, es colocado el cartucho con una cama de algodón al interior y una porción adicional de algodón para cubrir la muestra evitando así la pérdida por arrastre de vapores y taparla.

Dicho cartucho se lleva al interior de un horno que tiene una temperatura de 100°C hasta su peso constante.

Ya con el cartucho a peso constante, añadir una porción de muestra deshidratada y situarlo al interior del



cartucho, sobre la cama de algodón y tapar con el algodón extra. Después se adopta al equipo de reflujo, colocando en el matraz del equipo 150 ml de éter de petróleo que estará sobre una parrilla eléctrica.

Después de cuatro horas del reflujo el cartucho es retirado al aire libre con el fin de que pierda al solvente hasta que quede sin el olor a éter, una vez ocurrido esto es necesario llevarlo a peso constante para la determinación de porcentaje de extracto etéreo, que cual es determinado por las siguiente formula:

$$= \frac{(\text{Peso del cartucho con muestra} - \text{Peso del cartucho vacío})}{\text{peso de la muestra seca (g)}} \times 100$$

CAPITULO. IX RESULTADOS.

En cuanto a concreción celular se refiere las lecturas obtenidas diariamente nos permiten visualizar el crecimiento celular en ambos medios en los 3 fotoperiodos, apreciándose mejor en los siguientes gráficos.

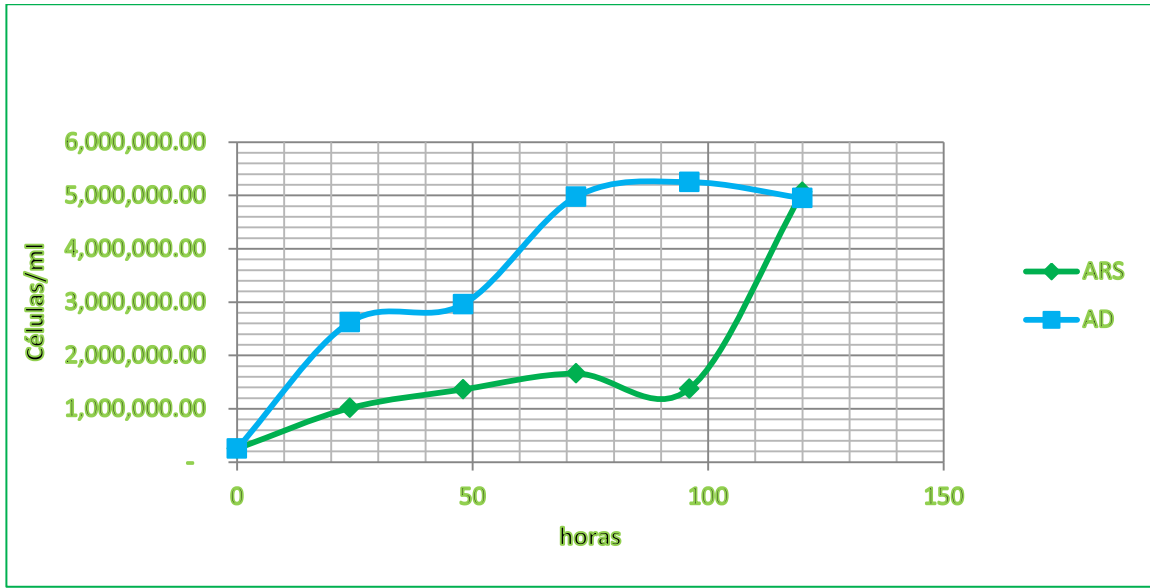


Figura 9.1 densidad celular de *Chlorella vulgaris* en fotoperiodo 20/4.

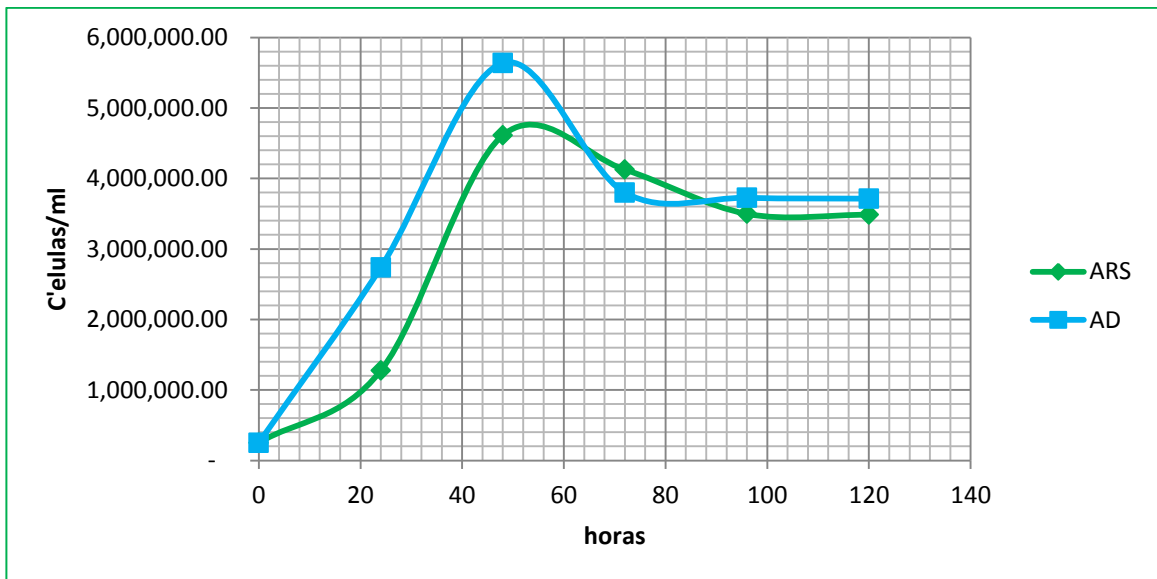


Figura 9.2 densidad celular de *Chlorella vulgaris* en fotoperiodo 16/8.

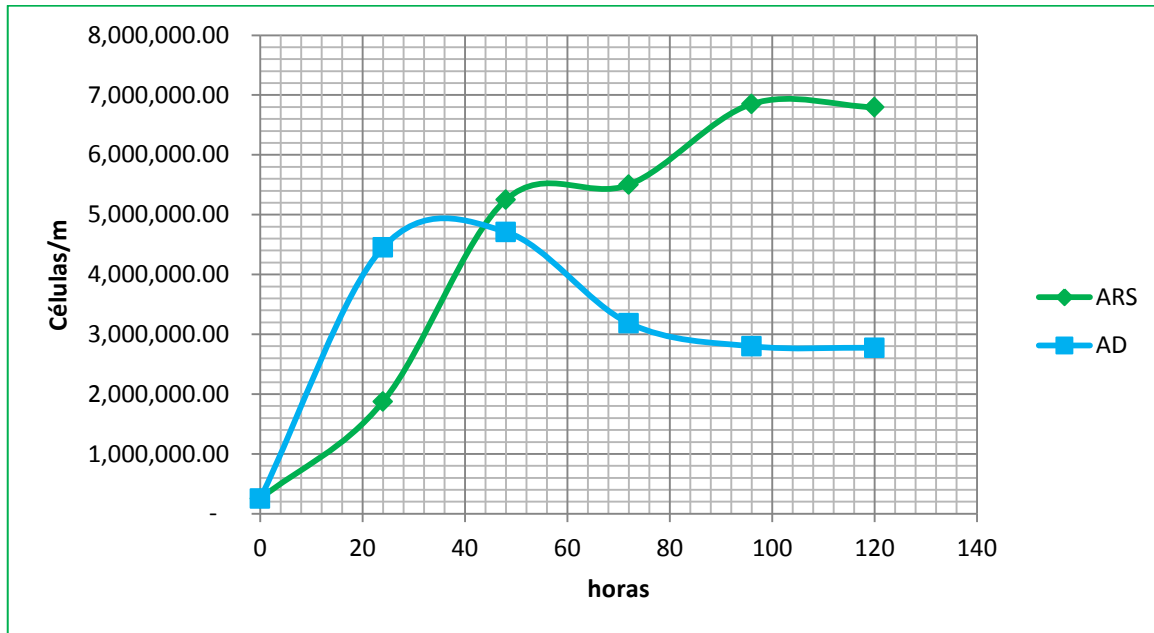


Figura 9.3 Densidad celular de *Chlorella vulgaris* en foto periodo 12/12.

En los tres fotoperiodos es crecimiento de *Chlorella vulgaris* observo la fase de adaptación más rápida en AD que en ARS, pero se obtuvo mayor carga de biomasa en ARS al término de cada periodo, siendo el fotoperiodo 12/12 el de más producción para *Chlorella* con una población final de 6.975 millones de celular por cada mililitro de medio de ARS, para el crecimiento de *Chlorella* en AD el periodo más apto para su desarrollo fue el 20/4 con una densidad poblacional de 4.95 millones de células por mililitro de medio.

Dando este resultado tenemos que el crecimiento de *Chlorella* se vio favorecido por la fuente de carbono proporcionada por ARS y la condiciones de luz-obscuridad del fotoperiodo 12/12.

Posterior a las determinaciones de peso seco, obtuvimos resultados para cada uno de los fotoperiodos expresados en las gráficas siguientes:

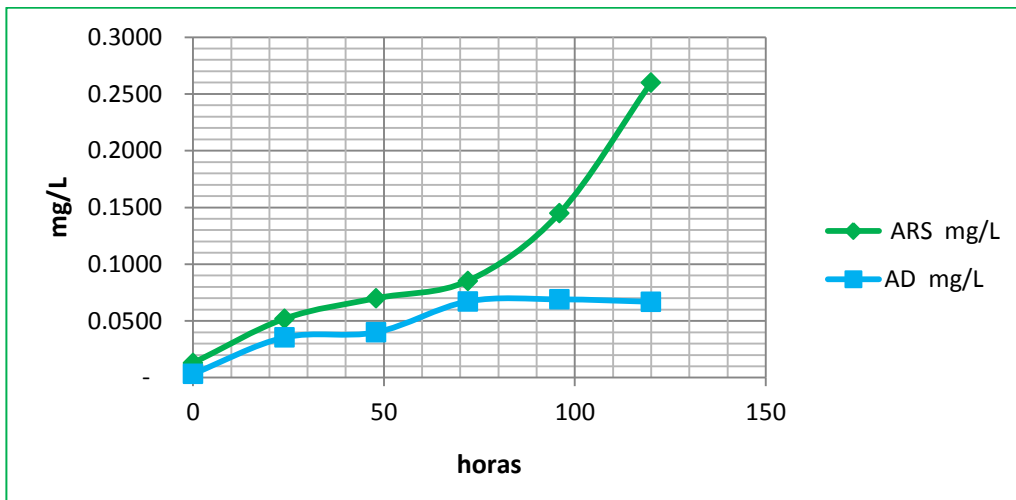


Figura 9.4 Peso seco de *Chlorella vulgaris* en fotoperiodo 20/4.

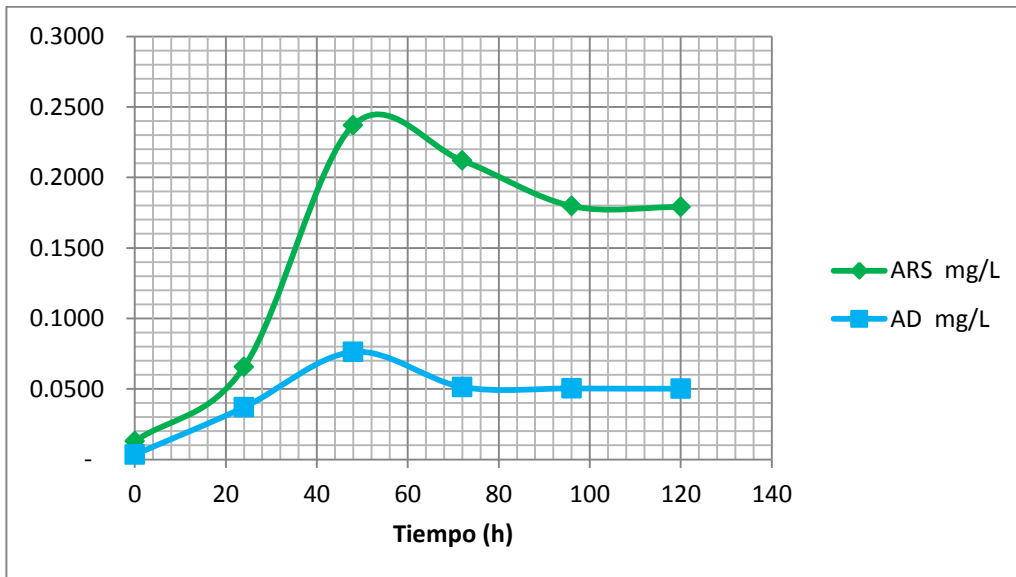


Figura 9.5 Peso seco de *Chlorella vulgaris* en foto periodo 16/8.

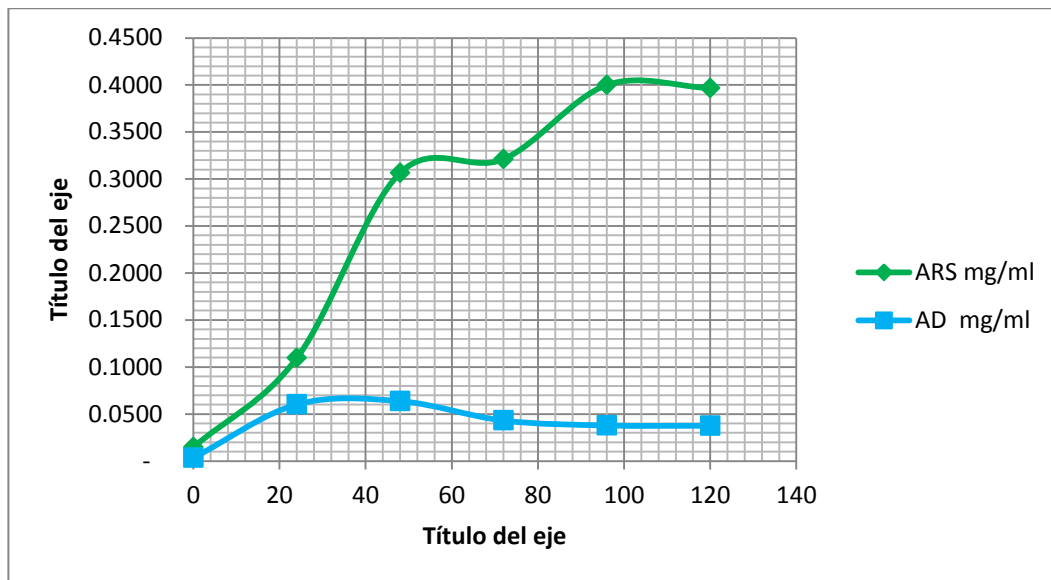


Figura 9.6 Peso seco de *Chlorella vulgaris* en fotoperiodo 12/12.

Para efectos de producción de biomasa los resultados del peso seco tienen estrecha relación con la densidad poblacional, pero la diferencia en el peso de las células denota una mayor peso en las células de ARS, en este caso podemos determinar que las células del medio ARS son más grandes y con un peso mayor con respecto a las células de AD en el foto periodo 12/12 en el cual tuvo su mayor producción de biomasa.

En todos los fotoperiodos la densidad celular tuvo una relación similar en cuanto a desarrollo, pero en la determinación de biomasa hay una diferencia muy marcada teniendo las lecturas de AD por debajo de las de ARS.

En cuanto a la determinación de pigmentos fotosintéticos, se realizaron lecturas en el espectro fotómetro 653 y 666nm de Absorbancia para medir la producción de clorofila A y clorofila B, los resultados se expresaron en graficas de los dos medios y de la producción de un tipo de clorofila en cada fotoperiodo.

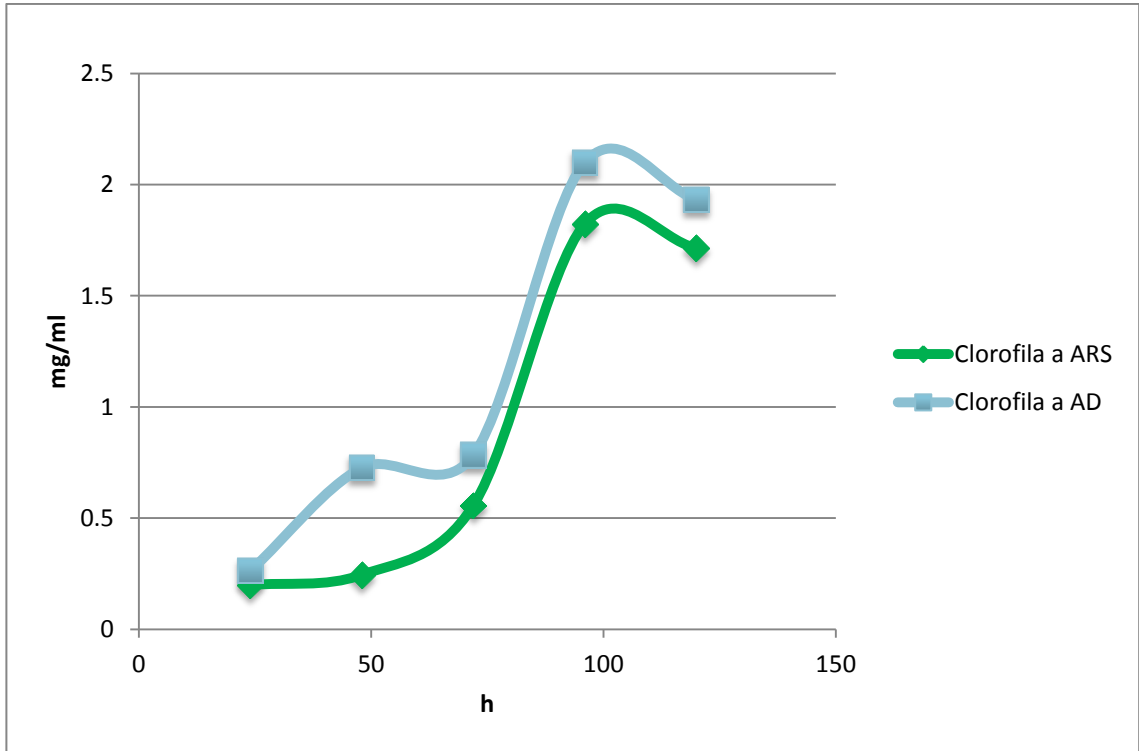


Figura 9.7 Producción de clorofila A en fotoperiodo 20/4.

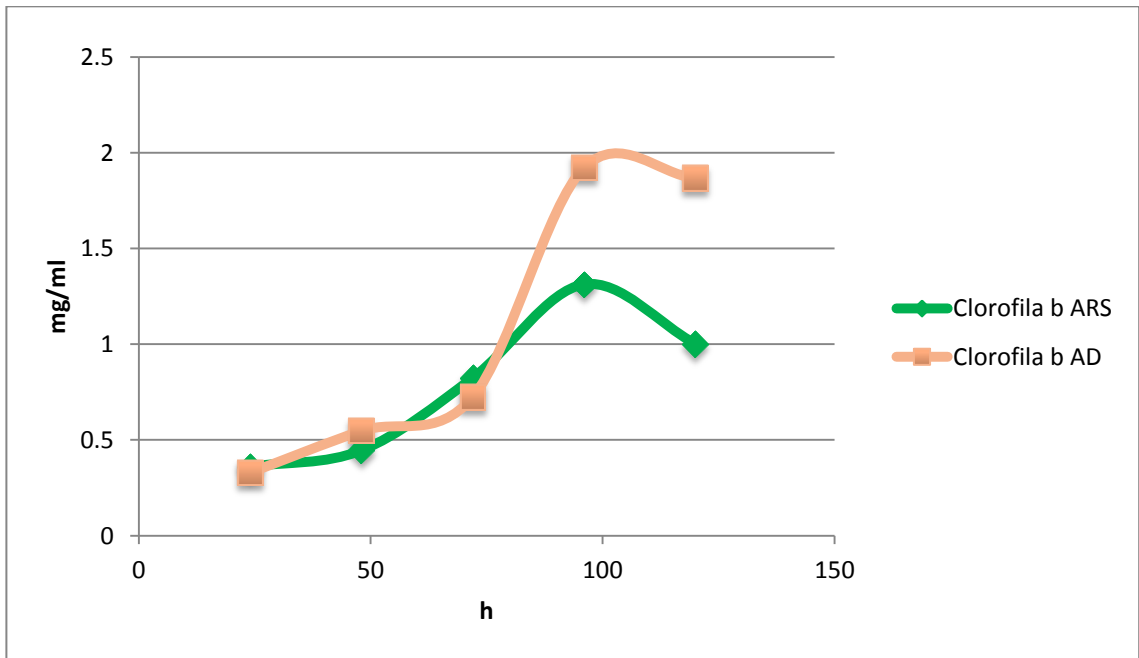


Figura 9.8 Producción de clorofila B en fotoperiodo 20/4.

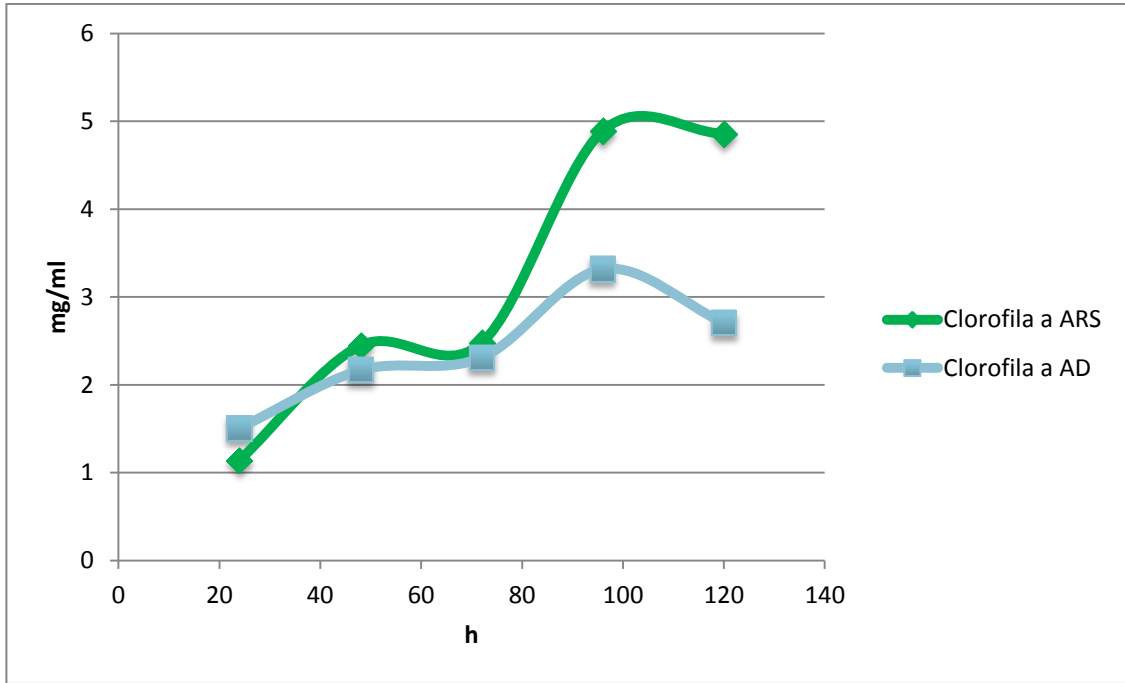


Figura 9.9 producción de clorofila A en fotoperiodo 16/8.

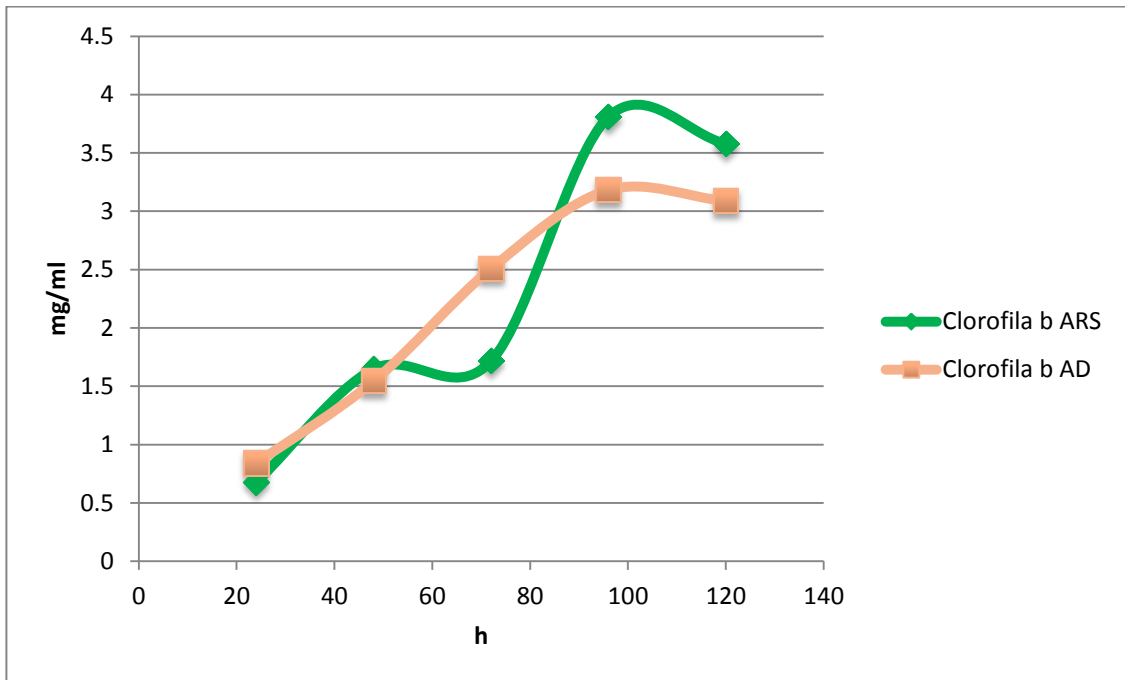


Figura 9.10 Producción de clorofila B en fotoperiodo 16/8.

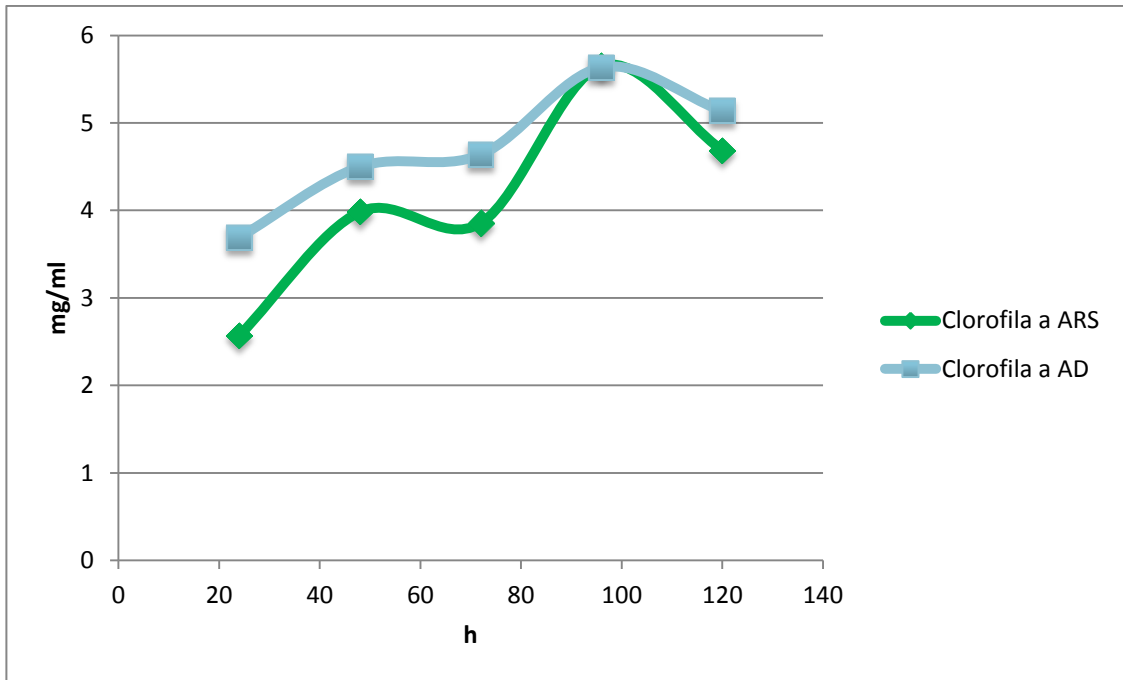


Figura 9.11 Producción de clorofila A en fotoperiodo 12/12.

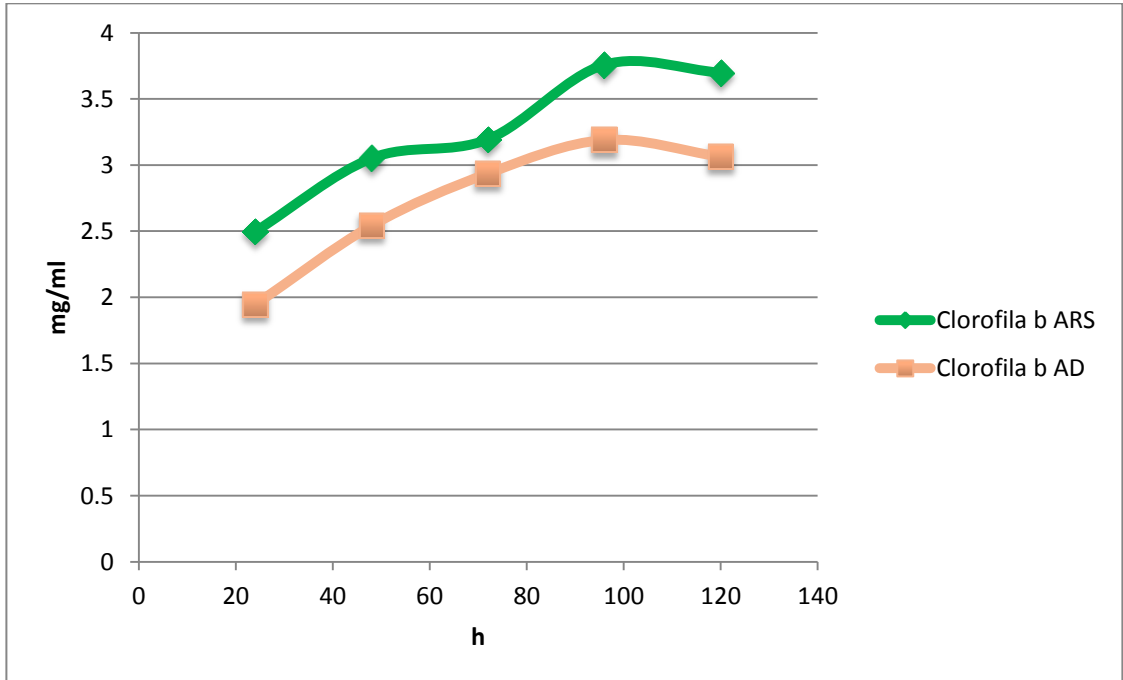


Figura 9.12 Producción de clorofila B en foto periodo 12/12.

Con la ayuda de las tablas para interpretar los resultados, es evidente el incremento de pigmentos fotosintéticos en el periodo 12/12 y de los medios el de mayor producción de los 2 tipos de clorofila fue para clorofila A en el medio AD y para clorofila B en el medio ARS.

Para la determinación y cuantificación de lípidos fueron expresados los resultados en la siguiente tabla.

Tabla 9.1 resultados de la determinación de lípidos por fotoperiodos en cada medio.

| MEDIO DE CULTIVO | FOTOPERIODO | %EXTRACTO ETereo |
|------------------|-------------|------------------|
| ARS | 20/4 | 0.2752 |
| AD | 20/4 | 0.2343 |
| ARS | 16/8 | 0.1835 |
| AD | 16/8 | 0.3617 |
| ARS | 12/12 | 0.2768 |
| AD | 12/12 | 0.3765 |

Donde el fotoperiodo que tuvo una producción mayor de lípidos fue el 12/12. Durante las determinaciones se puntualizaron que el medio ARS a este mismo fotoperiodo fue el más adecuado para el desarrollo de densidad celular con una lectura final de 6.975 millones de células por cada mililitro de medio.

También para la producción de biomasa el medio ARS fue el de mejor rendimiento ya que tuvo un 0.3967 mg/ml de medio y a diferencia de todas las determinaciones anteriores, el de mayor producción fue el medio de Agua Destilada con un porcentaje de extracto etéreo de .3765%.

CAPITULO X. CONCLUSIONES.

Después del desarrollo experimental se concluye que en el crecimiento de las microalgas los factores de mayor importancia para su desarrollo son la temperatura y cantidad de la luz.

Conjuntamente resaltando que el aumento de lípidos producidos por microalgas depende de la cantidad de nutrientes como nitrógeno, carbono, y fosforo.

La relación entre los nutrientes y los factores de crecimiento, son esenciales para la producción de lípidos, ya que el metabolismo de las microalgas se ve afectado al no tener nutriente y eso lo limita a dejar de sintetizar proteínas y da lugar a síntesis de lípidos.

Además el uso de Aguas Residuales es una buena opción para el cultivo de microalgas para su uso en la elaboración de biocombustibles, al mismo tiempo que se aprovecha las condiciones de esa agua para su remediación.

BIBLIOGRAFIA.

GÓMEZ LUNA, LILIANA M. MICROALGAS: ASPECTOS ECOLÓGICOS Y BIOTECNOLÓGICOS. *LABORATORIO DE ECOTOXICOLOGÍA MARINA, CENTRO NACIONAL DE ELECTROMAGNETISMO APLICADO, UNIVERSIDAD DE ORIENTE, 2007.*

COMAS, AUGUSTO, CONFERENCIA SOBRE ECOLOGÍA DE LAS ALGAS DE AGUA DULCE, CIENFUEGOS, 1992 (MATERIAL DE DOCENCIA.)

RICHMOND, A., OUTDOOR MASS CULTURES OF MICROALGAE. BIOLOGICAL PRINCIPLES. EN: HANDBOOK OF MICROALGAL MASS CULTURE. RICHMOND, A. (DE.). CRC PRESS. BOCA RATON, FLORIDA, 1986, PP: 285330.

BECKER, W. 2004. MICROALGAE FOR AQUACULTURE: THE NUTRITIONAL VALUE OF MICROALGAE FOR AQUACULTURE. EN RICHMOND A. HANDBOOK OF MICROALGAL CULTURE: BIOTECHNOLOGY AND APPLIED PHYCOLOGY. BLACKWELL PUBLISHING.

NELSON Y COX, LENHINGER PRINCIPIOS DE BIOQUIMICA. EDITORIAL OMEGA. EDICIONES VARIAS.

KARP, C. BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR. EDITORIAL MCGRAW-HILL INTERMERICANA. 1996.

LEE, A.K, LEWIS, D.M., ASHMAN, P.J. 2009. MICROBIAL FLOCCULATION, A POTENTIALLY LOW-COST HARVESTING TECHNIQUE FOR MARINE MICROALGAE FOR THE PRODUCTION OF BIODIESEL. *J APPL PHYCOL* 21:559-567.

GONZÁLEZ, C., MARCINIAK, J., VILLAVERDE, S., GARCÍA-ENCINA, P.A., MUÑOZ, R. 2008. MICROALGAE-BASED PROCESSES FOR THE BIODEGRADATION OF PRETREATED PIGGERY WASTEWATERS. *APPL MICROBIOL BIOTECHNOL* 80(5):891-898.

ALGAL CULTURE - FROM LABORATORY TO PILOT PLANT. JOHN S. BURLEW. CARNEGIE INSTITUTION OF WASHINGTON. PUBLICATION N° 600. WASHIGTON, D. C.. 1993.

LEE, Y.K. (1997) COMMERCIAL PRODUCTION OF MICROALGAE IN THE ASIA-PACIFIC RIM. *J. APPL. PHYCOL.*, 9, 403-411.

LEE R. E. (1995) PHYCOLOGY. CAMBRIDGE, UNIVERSITY PRESS, USA.

KONISHI, F. *ET AL.*, (1996). PROTECTIVE EFFECT OF AN ACIDIC GLYCOPROTEIN OBTAINED FORM CULTURE OF *CHLORELLA VULGARIS* SP AGAINST MYELO-SUPPRESSION BY 5-FLUOROURACIL CANCER INMUNOL INMUNOLOTHER, 46:268-274.

BECKER, E.W. (1994) *MICROALGAE: BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY*. CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS. REINO UNIDO.

CLAESSENS MICHEL, .RESEARCHEU REVISTA DEL ESPACIO EUROPEO DE LA INVESTIGACIÓN, 2007.

FANÉS TREVIÑO, ÍNGRID . GRANADA 2008. ESTUDIOS TAXONÓMICOS EN ALGAS VERDES COCALES DEL SUR DE ESPAÑA. UNIVERSIDAD DE GRANADA. FACULDADE CIENCIAS. DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA.

DILLARD, G. E. 1989. FRESHWATER ALGAE OF THE SOUTHEASTERN UNITED STATES. PART. 1. CHLOROPHYCEAE: VOLVOCALES, TETRASPORALES AND CHLOROCOCCALES, /N: KIES, L., GIESSEN, R. S., EDS., BIBLIOTHECA PHYCOLOGIA, BD. 81. J. CRAMER, BERLIN.

MORRIS, H.; QUINTANA, M.; ALMARALES, A. Y HERNÁNDEZ, L. 1999. COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA Y EVALUACIÓN DE LA CALIDAD PROTEICA DE LA BIOMASA AUTOTRÓFICA DE *CHLORELLA VULGARIS*. REVISTA CUBANA DE ALIMENTACIÓN Y NUTRICIÓN 13(2):123-128

BRENAN, M., OWENDE, P. (2010) BIOFUELS FROM MICROALGAE – A REVIEW OF TECHNOLOGIES FOR PRODUCTION, PROCESSING, AND EXTRACTION OF BIOFUELS AND CO-PRODUCTS. RENEWABLE AND SUSTAINABLE ENERGY REVIEWS 14, 557-577.

ANJOS , MARIANA . 2011. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE CO2 EN EL CRECIMIENTO DE MICROALGAS *CHLORELLA VULGARIS*.

RODAS-GAITÁN, HEBERTO A., EFECTO DE LA DENSIDAD CELULAR DE INOCULACIÓN EN EL CRECIMIENTO DE *CHLORELLA VULGARIS* CLV2 CULTIVADA BAJO CONDICIONES MIXOTRÓFICAS.2012.