



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Biología

Aplicación de un diseño de Plackett y Burman en la
obtención de lípidos transesterificables para su
potencial transformación en biodiesel a partir de la
microalga *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae).

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

Luhma Emmanuel Castillo Ramírez

DIRECTORA DE TESIS

DRA. ROSA OLIVIA CAÑIZARES VILLANUEVA

ASESORA INTERNA

BIÓL. ANGÉLICA ELAINE GONZÁLEZ SCHAFF

México D.F. 28 de mayo 2013





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice general.

Agradecimientos.	1
1. Introducción.	2
1.1. La problemática de los combustibles fósiles.	2
1.2. Energías renovables.	3
1.3. Bioenergía.	3
2. Antecedentes.	5
2.1. Los biocombustibles.	5
2.2. Biocombustibles de 3º Generación.	8
2.3. Las algas, ¿qué son y para qué sirven?	8
2.4. Producción de lípidos en las microalgas.	10
2.5. Biodiesel de microalgas.	12
2.6. El género <i>Scenedesmus</i>	14
3. Justificación.	17
4. Hipótesis.	18
5. Objetivos.	19
6. Materiales y Métodos.	20
6.1. Microorganismo.	20
6.2. Diseño experimental.	20
6.3. Determinaciones analíticas.	22
6.3.1. Recuento celular directo.	22
6.3.2. Peso seco.	22
6.3.3. Pigmentos fotosintéticos: clorofilas (<i>a</i> y <i>b</i>) y carotenoides totales.	22

6.3.4.	Actividad fotosintética por emisión de fluorescencia de la clorofila a del fotosistema II (PSII).	23
6.3.5.	Lípidos totales.	23
6.3.6.	Perfil de ácidos grasos.	24
6.4.	Estimación de los parámetros de calidad del biodiesel.	24
7.	Resultados y Discusión.	26
7.1.	Exploración de las variables con mayor influencia en el crecimiento y la acumulación de lípidos. Diseño de Plackett y Burman (PB).	26
7.1.1.	Efecto de las condiciones de cultivo sobre la densidad celular, el peso seco y la productividad de biomasa.	26
7.1.2.	Efecto de las condiciones de cultivo sobre el contenido de pigmentos.	30
7.1.3.	Efecto de las condiciones de cultivo sobre el rendimiento cuántico operacional (F_v/F_m)	34
7.1.4.	Efecto de las condiciones de cultivo sobre el contenido y la productividad de lípidos en <i>S. incrassatulus</i>	37
7.2.	Perfil de ácidos grasos de <i>S. incrassatulus</i> y estimación de las propiedades del biodiesel.	40
8.	Conclusiones.	43
	Referencias.	52

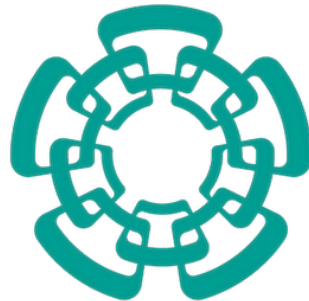
Índice de figuras

1.	Energías renovables.	3
2.	Ciclo de los biocombustibles.	5
3.	Un ejemplo de B1G, bioetanol de maíz.	6
4.	Ejemplos de materias primas para la elaboración de los B2G, <i>Jatropha</i> y residuos sólidos urbanos.	6
5.	Cultivo de algas.	9
6.	Tipos de lípidos presentes en las microalgas.	11
7.	Reacción de transesterificación.	12
8.	Células de <i>Scenedesmus incrassatulus</i>	14
9.	Formación de autocolonias en <i>Scenedesmus</i>	15
10.	Ciclo reproductivo sexual de <i>Scenedesmus</i>	16
11.	Comportamiento de la proliferación celular en <i>S. incrassatulus</i>	27
12.	Contenido de biomasa.	28
13.	Productividad de biomasa.	29
14.	Coloración de los cultivos de <i>S. incrassatulus</i>	30
15.	Contenido de clorofila <i>a</i> y <i>b</i> , clorofila y carotenoides totales.	32
16.	Evolución del F_v/F_m	35
17.	Porcentaje de lípidos por unidad de biomasa.	37
18.	Productividad de lípidos.	38

Índice de tablas

1.	VARIABLES EVALUADAS EN EL DISEÑO DE PLACKETT Y BURMAN	20
2.	MATRIZ DE VARIABLES DEL DISEÑO DE PLACKETT Y BURMAN PARA 11 FACTORES	21
3.	PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DEL ACEITE DE <i>Scenedesmus incrassatulus</i>	40
4.	CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD PARA LOS PRINCIPALES COMPONENTES DEL BIODIESEL.	41
5.	ESTIMACIÓN DE LAS PROPIEDADES DEL BIODIESEL.	42

Agradecimientos.



Cinvestav

A la Dra. Rosa Olivia Cañizares Villanueva.

Por permitirme formar parte de su grupo de trabajo en el
Laboratorio de Biotecnología de Microalgas.

Gracias por todo.

Al Dr. Alfredo de Jesús Martínez Roldán.

A la Dra. Martha Trinidad Arias Peñaranda.

Sin su apoyo, la culminación de este trabajo no habría sido posible.

Gracias Mil!!!

A los miembros del Jurado:

Biól. Angélica Elaine González Schaff.

Dr. Antonio Valencia Hernández.

Biól Aída Zapata Cruz.

Q. Encarnación María Estela Jiménez.

Por las correcciones y sugerencias realizadas a lo largo de esta Tesis.

Muchas gracias.

A mis Padres.

Juan Felipe Castillo Veloz y Luciana Cecilia Ramírez Pacheco.

Que con cariño y mano de hierro me han guiado por la senda de la Victoria.

A mi hermano.

Marco Antonio Castillo Ramírez.

Por acompañarme tanto en los buenos como en los malos momentos.

A mis amigos:

Alejandro Rodríguez Ochoa, Anayelli Chávez Ortiz, Harold Eduardo Marroquín Cruz, Paulina Figueroa Chávez, Victor Alfonso López Buendía, José García Alonso, Valentín Tejeda Díaz, Gerardo Uriostegui Uriostegui, Yuvani Hernández Zarco, Marco Antonio Rojas García, Gonzalo Adrián Vargas Muñoz, Ramón Oswaldo Rodríguez Calderón, Edgardo Germán Venegas, Blanca Estela Sandoval Miranda, Elizabeth Bonilla Ramírez, Rogelio García Cristino, Nancy Martínez Montiel, Sara Vega García, Jazmín de Jesús Santillán Manjarrez, Karina Escalante Velez, Alejandra Cortés Zamora, Jazmín Gabriela Gutiérrez Pescador, Tania González Vargas, Janelle Sacnité Chávez, Mariana Zamudio Guevara, Jesús Salgado Vazquez, Esmeralda Pérez Cervantes, Sandra López Martínez, Jaqueline Torres Zepeda, Lourdes Santos Guevara, Arisbeth Rosales Hortiales, Hector Guadalupe Carapia Estrada, Josué Barranco Rojas, Verónica Flores López, Francisco Hernández Ramírez.

Introducción.

1.1 La problemática de los combustibles fósiles.

El incremento de la industrialización en el mundo ha traído consigo un aumento en la demanda de los combustibles fósiles. Actualmente, más del 80 % de las necesidades energéticas a nivel mundial son cubiertas a través del consumo de estos energéticos (Nigam y Singh, 2011); en México, el 96 % de las necesidades energéticas son satisfechas mediante el uso de hidrocarburos (Maser y Sheinbaum, 2004). La quema de combustibles fósiles, derivada principalmente de la actividad industrial, ha provocado el incremento en la concentración atmosférica de CO₂ y otros gases de efecto invernadero (Garduño, 2004). Las emisiones globales de estos gases se incrementaron en un 70 % entre 1970 y 2004 (Koh y Ghazoul, 2008), siendo Estados Unidos responsable del 25.7 % de las emisiones totales, mientras que América Latina contribuyó con 5 %. Dentro de esta última región, México aportó el 27.2 %, lo que representó aproximadamente el 1.5 % mundial de emisiones de CO₂ (Arvizu, 2004).

La búsqueda y desarrollo de fuentes alternativas de energía con bajo impacto ambiental ha estado motivada por los cambios ambientales derivados del uso de combustibles fósiles, la condición de estos como recursos no renovables, su agotamiento acelerado, la incertidumbre política en Medio Oriente, la devaluación del dólar y la escalada en los precios del crudo (Puyana, 2008; Cortés, 2009). Lo anterior representa un gran reto para la humanidad, pues no se debe comprometer el bienestar de las nuevas generaciones en aras de mantener el crecimiento y desarrollo económico y tecnológico; pero, también se tiene que mejorar la calidad de vida de los países en vías de desarrollo sin alterar la que gozan las naciones industrializadas. En otras palabras, se debe promover el desarrollo sostenible. La solución de esta problemática se encuentra en cómo desarrollar e implementar tecnologías basadas en el uso de energía renovable y asegurar la disponibilidad de cantidades suficientes de recursos necesarios para su generación. A lo anterior se suma el desarrollo de tecnología para la reducción de la contaminación ambiental y las emisiones de CO₂ (Cardona *et al.*, 2010).

1.2 Energías renovables.

De acuerdo con Dincer (2000), las tecnologías de energía renovable convierten los fenómenos naturales en formas de energía útiles al emplear la energía inherente a la luz solar y sus consecuencias directas e indirectas sobre la Tierra (viento, crecimiento vegetal), las fuerzas gravitacionales (mareas), y el calor interno terrestre (geotérmica) (Fig. 1). El empleo de estas tecnologías no implica la generación de emisiones contaminantes que contribuyan al incremento de los gases de efecto invernadero o la destrucción de la capa de ozono (Cardona *et al.*, 2010); por lo tanto, ayudan a la preservación de los ecosistemas al disminuir la dependencia de los combustibles fósiles y reducir las emisiones contaminantes a nivel local y global (Omer, 2009). Sin embargo, el uso de las energías renovables está limitado por la distribución geográfica de sus fuentes y por motivos sociales, económicos y políticos (Wohlgemuth y Missfeldt, 2000).



Figura 1: Ejemplos de energías renovables: *Bioenergía*, eólica, solar e hidroeléctrica.

1.3 Bioenergía.

La biomasa es una de las fuentes de energía renovable que ha sido utilizada desde los albores de la humanidad. Este recurso constituye la cuarta fuente de energía más grande después del petróleo, el carbón y el gas natural, pues comprende el 14 % de la demanda energética mundial. Los países en vías de desarrollo cubren aproximadamente del 35 % hasta el 90 % de sus necesidades energéticas mediante el consumo de biomasa (Demirbas y Demirbas, 2007), mientras que en los países industrializados comprende del 3 % al 20 % (George y Cowie, 2011).

La energía obtenida a partir de la biomasa, conocida como *bioenergía*, es utilizada mayoritariamente con fines de supervivencia. A esto se le conoce como *uso tradicional de la biomasa* y se le asocia comúnmente con la pobreza y la obsolescencia, recibiendo el calificativo de poco eficiente, dañina a la salud y al medio ambiente (Kuchler, 2010). A esto hay que agregar que debido a la amplia terminología utilizada en el campo de la industria bioenergética, la población en general no tiene una idea clara del uso de la bioenergía con respecto a otros tipos de energías renovables como la solar o la eólica (McCormick, 2010).

Hoy en día la biomasa es considerada como un recurso con alto potencial para satisfacer las necesidades energéticas del mundo moderno (Demirbas *et al.*, 2009). Debido a su amplia disponibilidad, la biomasa promueve la diversificación y seguridad energéticas; y con programas cuidadosamente planeados, contribuye al crecimiento económico y social de los países en desarrollo, además de contar con una alternativa a los cada vez más escasos combustibles fósiles y mitigar parte de los efectos del cambio climático (Demirbas y Demirbas, 2007; Angelis-Dimakis *et al.*, 2011).

Mediante el empleo de tecnologías modernas para la conversión de la biomasa en formas de energía más eficientes y comercialmente competitivas, los *biocombustibles* pueden aportar los beneficios antes mencionados (Demirbas y Demirbas, 2007). Sin embargo, si se busca que los biocombustibles formen parte de la solución a la problemática de la sustentabilidad, deben someterse a un escrutinio estricto a fin de asegurar el bienestar del planeta, economía y sociedad (Sheehan, 2009). El Protocolo de Kyoto (en vigor desde 2005) no considera a los biocombustibles como principal estrategia para enfrentar el problema del cambio climático, sino más bien hace un llamado para esclarecer el papel que tendrán dentro del mismo (Matsumoto *et al.*, 2009).

Antecedentes.

2.1 Los biocombustibles.

Los biocombustibles son productos energéticos originados a partir de la fotosíntesis y el metabolismo heterotrófico (Salinas y Gasca, 2009). En el proceso de combustión, el carbono asimilado en el crecimiento es oxidado a CO_2 y agua que estarán disponibles para producir nueva biomasa, por lo que no contribuirán a la acumulación de CO_2 hacia la atmósfera (Coello y Castro, 2008) (Fig. 2).

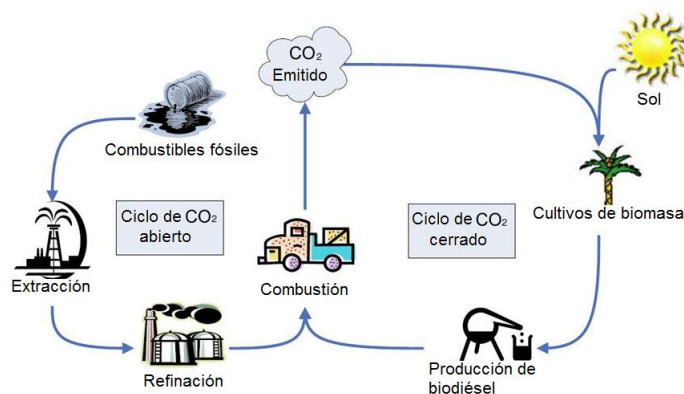


Figura 2: Ciclo de los biocombustibles.

De forma general, los biocombustibles pueden clasificarse en dos categorías. Los *biocombustibles primarios*, que comprenden toda la biomasa que no ha sido sometida a modificaciones químicas y que se utilizan en la cocción de alimentos, calefacción y generación de energía eléctrica mediante combustión directa. Ejemplos de este tipo son la leña, briquetas, *pellets* o lignogranos y estiércol. Los *biocombustibles secundarios* son biocombustibles primarios modificados mediante diferentes procesos de conversión (termoquímicos, biológicos y químicos) y son utilizados en vehículos y procesos industriales a gran escala. De acuerdo a la materia prima y a la tecnología de conversión, los biocombustibles secundarios se clasifican en biocombustibles de *primera, segunda, tercera e inclusive cuarta generación*. Ejemplos de ellos son el carbón vegetal, bioetanol, biodiesel, biogás e hidrógeno (Demirbas, 2011; Nigam y Singh, 2011).

Los biocombustibles de primera generación (B1G) utilizan azúcares, almidón y aceites vegetales provenientes de cultivos como caña de azúcar, remolacha, maíz, trigo, colza, girasol y soya para la obtención de bioetanol o biodiesel mediante procesos de transesterificación, fermentación, craqueo o hidrólisis (Nigam y Singh, 2011) (Fig. 3).



Figura 3: Un ejemplo de B1G, bioetanol de maíz.

Por otra parte, los biocombustibles de segunda generación (B2G) emplean biomasa no comestible que incluye materiales lignocelulósicos como residuos agrícolas y silvícolas, componentes orgánicos de los residuos sólidos urbanos, y cultivos no alimenticios destinados a tal fin, que mediante procesos de hidrólisis, pirólisis, gasificación, fermentación o digestión anaerobia se emplean para producir etanol, mezclas o sustitutos de diesel, biocarbón y gas sintético (Demirbas, 2011; Nigam y Singh, 2011) (Fig. 4).



Figura 4: Ejemplos de materias primas para la elaboración de los B2G, *Jatropha* y residuos sólidos urbanos.

Los B1G son conocidos por el abanico de problemas que presenta su uso, los cuales se traducen en un balance energético desfavorable si se toma en cuenta la cadena de producción completa en lugar de sólo el producto final. Para mantener a los B1G, es necesario disponer de grandes cantidades de agua, tierras de alta calidad para su crecimiento e insumos provenientes de hidrocarburos como los fertilizantes, fumigantes y el combustible para la maquinaria agrícola y el transporte, tanto de la materia prima como del producto terminado (Salinas y Gasca, 2009). Del total de la superficie global cultivable (5 Gigahectáreas) se requerirían aproximadamente de 30 % hasta 54 % para la producción de biocombustibles, en comparación con el 10 % destinado actualmente a la producción de alimentos (Laine, 2008; Stephens *et al.*, 2010), lo que acarrearía presiones inflacionarias y desabasto en los alimentos, hambruna, deforestación, degradación del suelo y de la calidad del agua, y pérdida de la diversidad biológica y cultural; volviéndose un problema socialmente inaceptable (Salinas C. and Gasca Q., 2009; Zidansek *et al.*, 2009).

Cabe destacar que si el 25 % del combustible empleado para el transporte fuera proporcionado por los B1G, habría un aumento del 40 % en el uso de fertilizantes, los cuales por acción microbiana edáfica generan óxido nitroso que se libera a la atmósfera, que si bien solo representa el 6 % de los gases de efecto invernadero, su potencial de calentamiento es hasta 300 veces mayor al del CO₂ (Chauvet y González, 2008; Escudero *et al.*, 2009). Considerando lo anterior, los biocombustibles producidos con métodos tradicionales no mitigarían los efectos del cambio climático (Delucchi, 2010).

Las limitaciones de los B1G han propiciado que la atención se dirija hacia los B2G. Sin embargo, los altos costos en infraestructura y tecnología para la generación de los B2G han impedido su uso a escala comercial a pesar de que la materia prima es abundante, barata y poco aprovechada (Naik *et al.*, 2010). Aunque los B2G no compiten con la producción de alimentos, es necesario disponer también de suelo y agua para el cultivo de las fuentes de B2G, que pueden entrar en competencia con los desarrollos forestales y urbanos (Hackenberg, 2008) o alterar el equilibrio del ecosistema al manejar especies introducidas y/o genéticamente modificadas como materia prima (Salinas y Gasca, 2009; Elshahed, 2010).

2.2 Biocombustibles de 3° Generación.

Con el fin de evitar las desventajas inherentes a los biocombustibles de las dos primeras generaciones, los *biocombustibles de tercera generación* (B3G) se consideran como una alternativa viable, ya que hacen uso de bacterias para producir metano, hidrógeno o electricidad; o de levaduras y microalgas, que en condiciones adecuadas, pueden producir aceite para biodiesel con rendimientos hasta cien veces mayores a los generados con sistemas vegetales (Rittmann, 2008; Nigam y Singh, 2011). No obstante, los B3G se encuentran aún en fase de investigación y desarrollo (McCormick, 2010).

La ventaja de las microalgas como materia prima para la producción de B3G es que su productividad es independiente de la fertilidad del suelo, contrario a lo que sucede con los B1G y B2G. Por lo anterior, las microalgas no ejercerán presión sobre el uso del suelo en caso de que se requiriera escalar el proceso a fin de satisfacer la demanda. Para cubrir las necesidades de energía a nivel mundial con B3G, únicamente se requeriría, como mínimo, el 0.38 % de la superficie terrestre (~ 1.92 millones de km^2) (Stephens *et al.*, 2010), área equivalente al territorio de los Estados Unidos Mexicanos (~ 1.96 millones de km^2 ; INEGI, 2012). Así mismo, las microalgas pueden tolerar concentraciones altas de CO_2 y no son exigentes en cuanto a la calidad del agua, por lo que pueden utilizarse en la captura de CO_2 y el tratamiento de agua a la vez que se produce biocombustible (Demirbas, 2010).

2.3 Las algas, ¿qué son y para qué sirven?

Las algas constituyen una de las formas de vida más antiguas sobre la Tierra, siendo las cianobacterias las que cuentan con un registro fósil de aproximadamente 3500 millones de años, y de 2200 millones de años en el caso de las algas eucariotas (Seckbach y Oren, 2007). Son organismos enormemente diversos que se presentan en multitud de ambientes como el océano, agua dulce, suelo, tundra, desiertos, pantanos, aguas termales, plantas y animales; y con tamaños que van desde la escala microscópica ($0.2\text{-}2 \mu\text{m}$), hasta cuerpos parenquimatosos de 60 m de longitud. Se estima que existen de un millón a diez millones de especies de algas, siendo las microalgas las más abundantes y diversas (Barsanti y Gualtieri, 2006).

Desde el punto de vista taxonómico, el término *alga* no cuenta con bases formales, sino que es utilizado para designar a un grupo de organismos procariotas y eucariotas fotosintéticos, polifiléticos y no cohesivos. Su clasificación, por motivos históricos, se basa en divisiones de acuerdo al tipo de pigmentos fotosintéticos, la naturaleza química de sus fotosintatos, estructuras tilacoidales, composición y estructura de la pared celular, número, arreglo y ultraestructura de los flagelos (si están presentes) y ciclo reproductivo. Actualmente las algas son representadas

en once divisiones: Cyanophyta, Prochlorophyta, Glaucophyta, Rhodophyta, Heterokontophyta, Haptophyta, Cryptophyta, Dinophyta, Euglenophyta, Chlorarachniophyta y Chlorophyta (Barsanti y Gualtieri, 2006).

Este amplio mosaico filogenético se refleja en un gran espectro de compuestos bioquímicos como: pigmentos (clorofilas, carotenoides), sustancias de reserva (almidones, fructanos, ácidos grasos, esteroides, hidrocarburos), polímeros (peptidoglicano, celulosa, mucílagos) y metabolitos secundarios (antibióticos, neurotoxinas), a fin de sobrevivir en un ambiente altamente competitivo (Cardozo *et al.*, 2007; Graham *et al.*, 2009). Esta enorme diversidad hace de las microalgas una gran fuente de productos químicos como: nutracéuticos, sustancias activas de uso industrial, agentes terapéuticos, fertilizantes, plásticos y combustibles (Gómez, 2007; Abed *et al.*, 2009) (Fig. 5).

La biotecnología de microalgas se basa en el cultivo masivo de estos organismos y la recuperación de productos de alto valor a partir de la biomasa generada, identificando la cepa de interés, el metabolito que produce y bajo qué condiciones de intensidad luminosa, fotoperiodo, temperatura, pH, agitación y composición del medio de cultivo lo acumula (Olaiola, 2003; Bertoldi *et al.*, 2008). Uno de los procesos que resultan atractivos para la investigación e industria es el cultivo de algas para la extracción de ácidos grasos y su posterior transformación en biodiesel (Vieira y de Moraes, 2011).

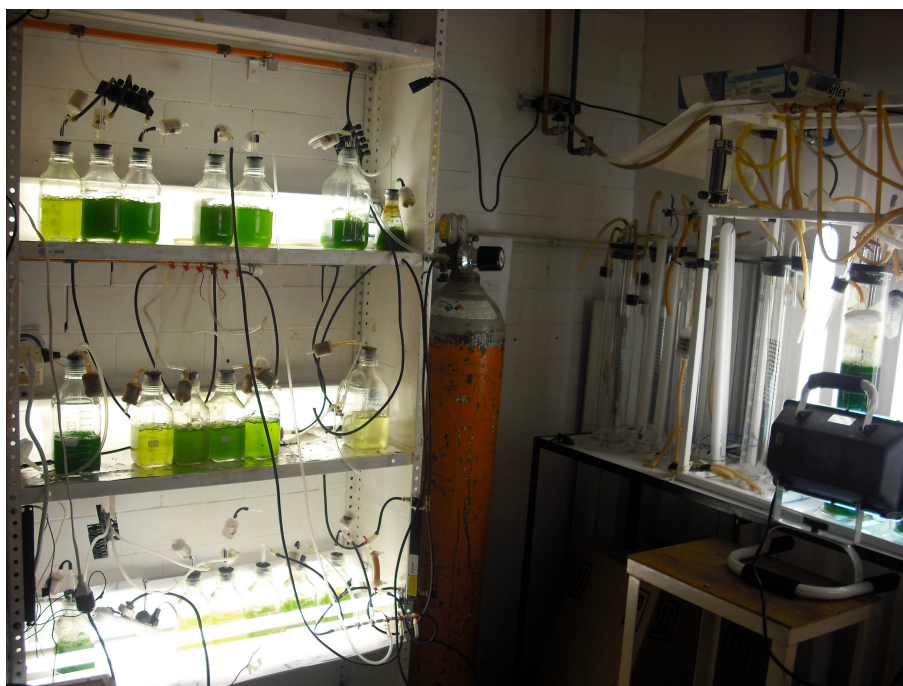


Figura 5: Cuarto de cultivo del Laboratorio de Microalgas del Departamento de Biotecnología, CINVESTAV-IPN Zacatenco. Las microalgas se utilizan con diferentes propósitos, incluida la producción de biodiesel, biofertilizantes y suplementos alimentarios, así como en la remoción de contaminantes.

2.4 Producción de lípidos en las microalgas.

Los lípidos son un conjunto de biomoléculas estructural y funcionalmente diversas que se caracterizan por su insolubilidad en agua y su afinidad a solventes orgánicos. Químicamente, los lípidos son moléculas hidrofóbicas o anfipáticas originadas a partir de la condensación nucleofílica de cetoacil tioesteres (ácidos grasos, glicerolípidos, glicerofosfolípidos, sacarolípidos, esfingolípidos y policétidos), o la condensación electrofílica de unidades de isopreno (esteroles y prenoles) (Fahy *et al.*, 2005) (Fig. 6).

Las microalgas crecen abundantemente en ambientes ricos en nutrientes. En estas condiciones, las células se reproducen con rapidez y sintetizan principalmente lípidos de membrana, especialmente del cloroplasto. Cuando los nutrientes se agotan, la división celular se detiene y comienza la acumulación de triacilglicéridos bajo la condición de que la fotosíntesis aún sea posible; esto permite a las microalgas fijar el CO₂ necesario para la síntesis de materiales de reserva con el fin de sobrevivir a la escasez de nutrientes, anaerobiosis, concentraciones bajas de oxígeno y variaciones en la intensidad luminosa, humedad y temperatura (Schenk *et al.*, 2008; Solovchenko, 2012).

Es posible modificar la concentración y composición de lípidos mediante la optimización de parámetros de crecimiento como nivel de nitrógeno, intensidad luminosa, temperatura, salinidad, concentración de CO₂ y método de cosecha (Brennan and Owende, 2010). La exposición de las microalgas a temperaturas e intensidades luminosas elevadas reduce el grado de insaturación de los ácidos grasos e incrementa la concentración de triacilglicerolos (Guschina and Harwood, 2009). El estrés salino ejerce modificaciones en los fosfolípidos, esteroles y ácidos grasos insaturados que componen a la membrana celular (Erdmann and Hagemann, 2001).

Sin embargo, el incremento en el contenido específico de lípidos no resulta necesariamente en un aumento de la productividad; esta última considera tanto la concentración intracelular de lípidos como la biomasa producida (Brennan and Owende, 2010). La acumulación intracelular de lípidos por sí misma no es buena indicadora de la factibilidad en la producción de biodiesel. Especies con una productividad de biomasa mayor a 60 mg L⁻¹ d⁻¹ presentan un contenido de lípidos de entre 11 % a 51 %, mientras que especies cuyo contenido de lípidos por unidad de masa seca rebasa el 40 % presentan productividades de 17 a 160 mg L⁻¹ d⁻¹ (Griffiths and Harrison, 2009).

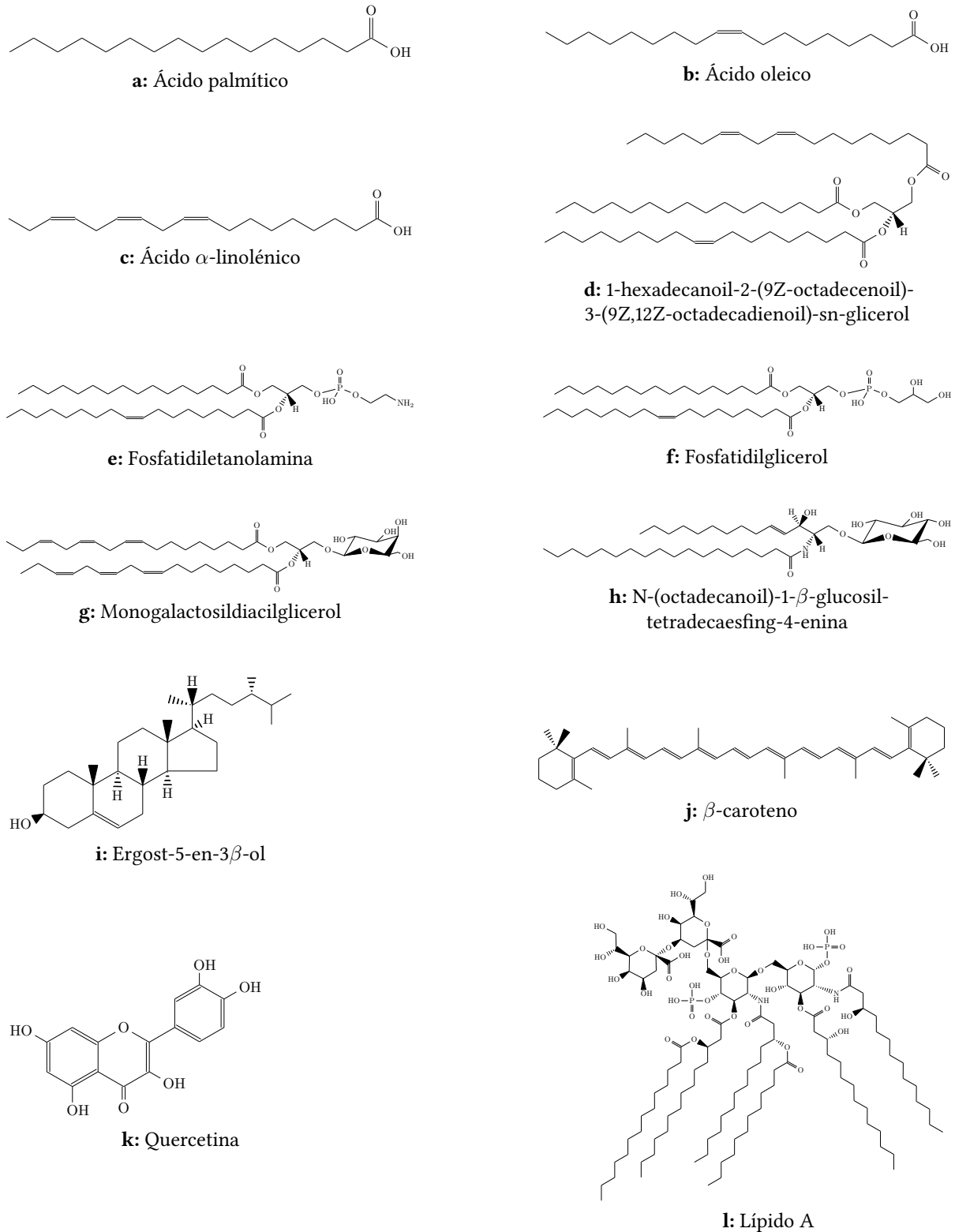


Figura 6: Tipos de lípidos presentes en las microalgas: ácidos grasos (**a**, **b** y **c**), triacylglicérido (**d**), glicerofosfolípidos (**e** y **f**), diacylglicerolglucano (**g**), esfingolípido (**h**), esteroi (**i**), tetraterpeno (prenol; **j**), flavonoide (polícétido; **k**), sacarolípidos (**l**). Estructuras obtenidas de http://www.lipidmaps.org/data/classification/LM_classification_exp.php

2.5 Biodiesel de microalgas.

El biodiesel es un combustible renovable que sirve como alternativa al diesel de petróleo en los motores de compresión-ignición (motor de diesel) y compatible con la tecnología motriz actual. Este biocombustible se produce mediante la transesterificación de los triglicéridos presentes en aceites vegetales, grasas animales o aceite de microalgas, con un alcohol monohídrico de bajo peso molecular y en presencia de un catalizador alcalino para obtener ésteres monoalquílicos de ácidos grasos (Fig. 7). Esto hace del biodiesel un energético no tóxico, pues no contiene los compuestos aromáticos característicos del petrodiesel, cuenta con un contenido muy bajo de azufre y materia particulada (ambos son los componentes responsables de la contaminación del aire a través del “smog”) y es altamente biodegradable (hasta cuatro veces más rápido que el diesel) (Moser, 2009; Gallagher, 2011).

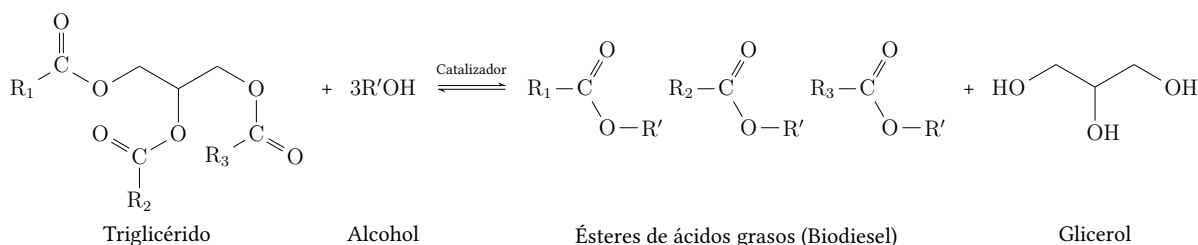


Figura 7: Reacción de transesterificación. R₁₋₃ son cadenas de ácidos grasos, R' es un alcohol de uno hasta cuatro carbonos y el catalizador puede ser hidróxido o metóxido de sodio o potasio.

El biodiesel presenta una composición de ácidos grasos idéntica a la de la materia prima de origen. Los ésteres de ácidos grasos más comunes en el biodiesel son los de palmítico (hexadecanoico), estearico (octadecanoico), oleico (9(Z)-octadecenoico), linoleico (9(Z)-12(Z)-octadecadienoico) y linolénico (9(Z)-12(Z)-15(Z)-octadecatrienoico), presentes en los aceites de soya, girasol, canola, palma y cacahuete. El aceite de microalgas contiene principalmente ácido palmítico (hasta un 50.57 %) así como ácidos grasos insaturados cuya composición varía de acuerdo al grupo taxonómico al que pertenezca la microalga; las algas verdes (*Chlorophyceae*), contienen ácidos grasos de 16 y 18 átomos de carbono con uno hasta tres dobles enlaces, mientras que en microalgas marinas como *Nannochloropsis* (*Eustigmatophyceae*), la composición de los ácidos grasos es de 16 a 20 átomos de carbono y con uno hasta cinco dobles enlaces (Hu *et al.*, 2008; Knothe, 2011).

Esta diversidad en la composición de ácidos grasos implica que las propiedades del combustible variarán considerablemente. Los ácidos grasos saturados otorgan una buena calidad de ignición y un calor de combustión alto, pero no son adecuados para su uso en climas fríos. Los ácidos grasos insaturados reducen la viscosidad y mejoran la utilidad del combustible en climas fríos, mas no cuentan con buena estabilidad ante la oxidación. La presencia de componentes menores en la materia prima (tocoferoles, fosfolípidos, fitosteroles, clorofilas, carotenos, vitaminas liposolubles) y de contaminantes en el producto de reacción (ácidos grasos libres, tri, di y monoglicéridos, alcohol, glicerol, metales, jabones y agua) también influirán en las propiedades del biodiesel (Moser, 2009).

Para garantizar el éxito comercial del biodiesel, es necesario implementar estándares que garanticen la calidad del producto y no ocasionen daños a los motores ni al ambiente. Las normas de calidad para el biodiesel con mayor difusión en el mundo son la ASTM D6751 de la *American Society for Testing and Materials* (ASTM International) y la EN14214 del *Comité Europeo de Normalisation* (CEN) (Benjumea *et al.*, 2009). La mayoría de los aceites de microalgas no cumplen con los estándares europeos; sin embargo, es posible reducir el grado de insaturación de los ácidos grasos mediante la hidrogenación parcial catalítica del aceite, proceso utilizado en la elaboración de la margarina (Chisti, 2007).

Una de las razones que impide la implementación comercial del biodiesel de microalgas es el costo de producción, que suele ser alto en comparación con los B1G (Demirbas, 2010). Independientemente de establecer un cultivo de microalgas a cielo abierto o en fotobiorreactores, el costo de cosecha de la biomasa de microalgas contribuye con el 50 % del costo final del aceite extraído, que es de aproximadamente 2.80 USD L^{-1} , asumiendo que la biomasa contiene un 30 % de aceite. En comparación, el aceite de palma tiene un costo de 0.52 USD L^{-1} (Chisti, 2007).

Entonces, si se pretende que el biocombustible de algas sea competitivo con respecto al diesel, su costo de producción debe reducirse de 2.80 USD L^{-1} a 0.48 USD L^{-1} ya que la producción de diesel tiene un precio de 0.49 USD L^{-1} libres de impuestos (Chisti, 2007). La conversión del aceite de microalgas a biodiesel y los costos de post-producción (mercadotecnia, venta y distribución) agregan 0.25 USD L^{-1} a los costos de producción (Gallagher, 2011).

2.6 El género *Scenedesmus*.

La clasificación del género *Scenedesmus* se ubica de la siguiente forma (Guiry y Guiry, 2013):

- * **Reino:** Plantae
- * **División:** Chlorophyta
- * **Clase:** Chlorophyceae
- * **Orden:** Sphaeropleales
- * **Familia:** Scenedesmaceae
- * **Género:** *Scenedesmus*

El género *Scenedesmus* está compuesto de algas coloniales de amplia distribución, encontrándose tanto en ambientes naturales como en artificiales. Son organismos que rara vez se presentan como dominantes en ambientes oligotróficos; sin embargo, en cuerpos acuáticos en proceso de eutroficación o altamente eutrofizados, *Scenedesmus* constituye el género dominante, exhibiendo una gran plasticidad fenotípica conforme el organismo se adapta a las condiciones ambientales (Trainor, 1998).

Las algas del género *Scenedesmus* presentan células de forma elipsoidal, fusiforme o, con menor frecuencia, esférica. Se disponen de forma que sus ejes mayores queden paralelos entre sí, congregándose en colonias planas o *cenobios* en múltiplos de dos, siendo las de cuatro y ocho células las más comunes (Fig. 8). Las especies se diferencian por la presencia, tipo y número de espinas así como en la textura de la pared celular. Las células son uninucleadas y cuentan con un cloroplasto de gran tamaño, de tipo laminado o parietal. De acuerdo al medio de crecimiento, la morfología de la colonia varía de forma considerable, por lo que no se considera un carácter taxonómico (Bourrelly, 1972; Trainor, 1998; Lee, 2008).

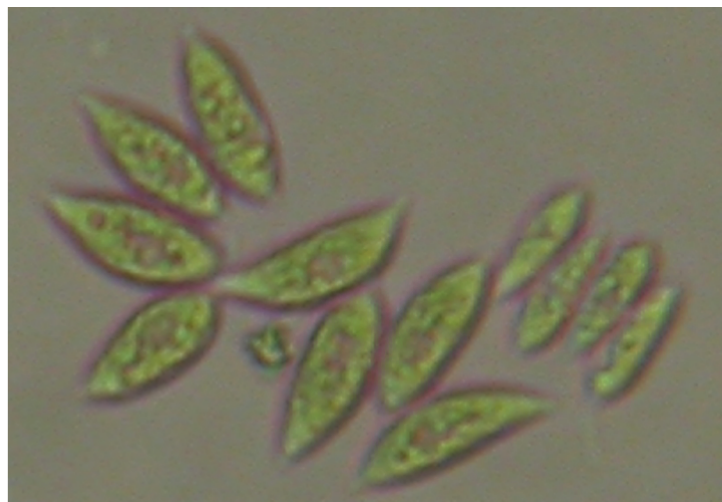


Figura 8: Células de *Scenedesmus incrassatulus* vistas al microscopio óptico con 400x de amplificación.

Las colonias de *Scenedesmus*, así como otras formas coloniales del orden de las Chlorococcales (nombre anterior de las Sphaeropleales), carecen de división celular vegetativa. El crecimiento de la colonia no se produce con la división ni adición de individuos, sino que una de las células de la colonia experimenta de una a cuatro divisiones del protoplasto, las cuales se reagrupan para formar una colonia hija o *autocolonia* (Fig. 9). Este tipo de reproducción se encuentra también en organismos como *Pediastrum* y *Volvox* (Trainor, 1998).

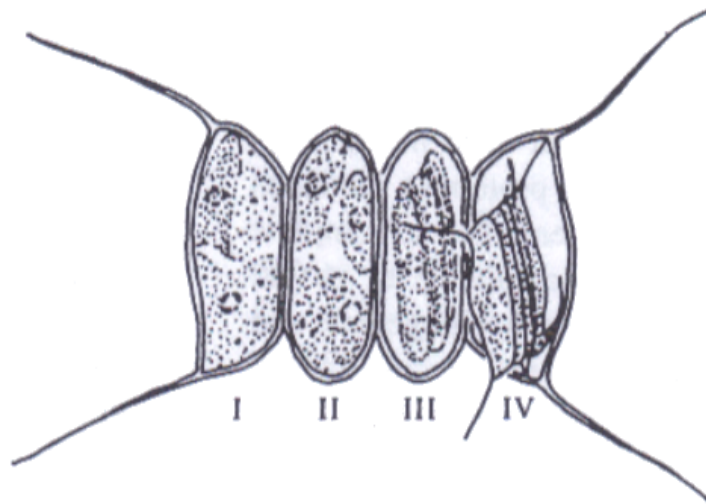


Figura 9: Formación de autocolonias en *Scenedesmus*. Los números romanos indican la secuencia de las divisiones.

En medios con bajo contenido de fósforo y sales, *Scenedesmus* tiende a no formar colonias, mientras que en presencia de consumidores primarios (como *Daphnia*), *Scenedesmus* forma colonias masivas a fin de no resentir los efectos de la herbivoría (Lee, 2008), esto gracias a la acción lipofílica ejercida por los exudados de *Daphnia* que inducen la formación de cenobios (Lurling y von Elert, 2001).

En condiciones de temperatura baja, escasez de nitrógeno y densidad celular elevada, *Scenedesmus* pone en marcha un ciclo reproductivo sexual haploide, caracterizado por la formación de isogametos biflagelados, carentes de pared celular y de vida muy corta. La unión de los isogametos dará origen a una zoospora tetraflagelada y luego a una zigospora de gran tamaño que liberará células individuales haploides, que formarán posteriormente cenobios (Fig. 10) (Trainor, 1998).

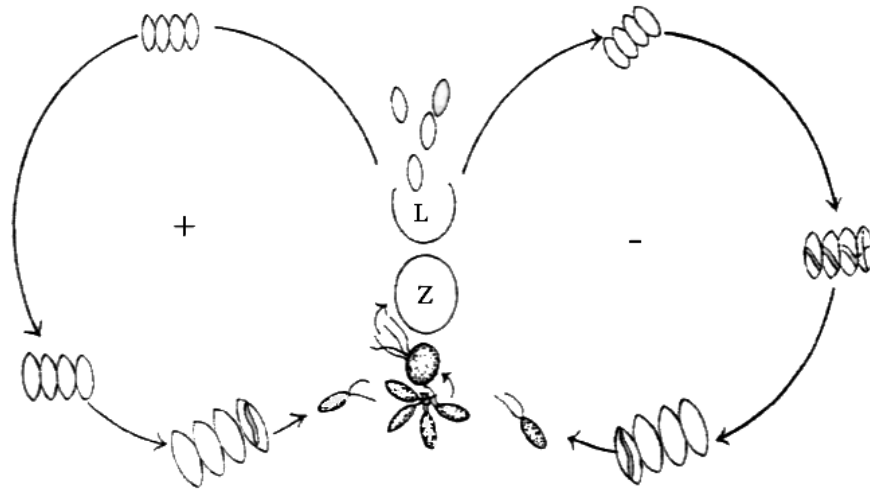


Figura 10: Ciclo reproductivo sexual de *Scenedesmus*. Z representa la formación de la zigospora y L la liberación de células haploides.

Justificación.

La producción de biocombustibles es impulsada por el impacto ambiental provocado por el uso indiscriminado de los combustibles fósiles. Sin embargo, los biocombustibles de primera (B1G) y segunda generación (B2G) constituyen un problema ambiental y social de grandes proporciones si se toma en cuenta el proceso global de producción y no sólo el producto terminado. Se pretende que el biocombustible obtenido a partir del aceite de microalgas sea una solución viable para ambas problemáticas, pues se puede aprovechar la capacidad que estos organismos tienen para adaptarse a condiciones ambientales adversas y obtener productos de interés comercial empleando pocos recursos.

Hipótesis.

Las condiciones ambientales adversas promueven la formación de lípidos de reserva en *Scenedesmus incrassatulus*. La selección y el control de las condiciones en las que se cultive esta microalga permitirá identificar los factores con mayor influencia en su crecimiento y obtener un mayor rendimiento en la formación de lípidos para la producción de biodiesel.

Objetivos.

General.

- * Aumentar la producción de lípidos en *Scenedesmus incrassatulus* a través de diferentes condiciones de cultivo, mediante la selección adecuada de los parámetros de crecimiento y obtener biodiesel a partir de la transesterificación de los lípidos resultantes.

Específicos.

- * Identificar los parámetros con mayor influencia sobre el crecimiento y productividad de biomasa y lípidos de *S. incrassatulus* mediante un diseño de Plackett y Burman.
- * Estimar la calidad del biodiesel a partir del perfil de ácidos grasos presentes en el aceite de *S. incrassatulus* y compararla con las propiedades del biodiesel producido con aceite de palma o soya.

Materiales y Métodos.

6.1 Microorganismo.

Se empleó la cepa de *Scenedesmus incrassatulus* CLHE-Si01, donada por el Dr. Fernando Martínez Jerónimo del Laboratorio de Hidrobiología Experimental de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Para la preparación del inóculo, la microalga fue cultivada en botellas de vidrio de cara plana (Schott Duran®) de 0.5 L de capacidad, utilizando un medio de cultivo con alto contenido de nitratos denominado PCG (Perales, 2008), con fotoperiodo de 12h/12h y una intensidad luminosa de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante cuatro días, resembrando una vez a fin de sincronizar su crecimiento. El inóculo se estandarizó a una absorbancia de 0.4 a 680 nm. Los ensayos se realizaron con un volumen de trabajo de 400 mL.

6.2 Diseño experimental.

Con el fin de identificar los factores con efecto significativo sobre la productividad de lípidos, se utilizó un diseño de Plackett y Burman (PB). Los niveles bajos en el medio de cultivo corresponden a la composición del medio PCG enriquecido con 1 g L^{-1} de glucosa (Arias *et al.*, 2011a). Las variables se enlistan en la Tabla 1.

Tabla 1: Variables evaluadas en el diseño de Plackett y Burman

Factor	Niveles	
	Bajo (-)	Alto (+)
1. Luz	$100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	$400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
2. CO ₂	Aire, 0.03 %	3 %
3. Fuente de C	Glucosa, 1 g L^{-1}	NaHCO ₃ , 2.8 g L^{-1}
4. Fuente de N	NaNO ₃ , 250 mg L^{-1}	Urea, 88.3 mg L^{-1}
5. NaCl	25 mg L^{-1}	100 mg L^{-1}
6. MgSO ₄	30 mg L^{-1}	120 mg L^{-1}
7. Ca(NO ₃) ₂	30 mg L^{-1}	120 mg L^{-1}
8. K ₂ HPO ₄	40 mg L^{-1}	160 mg L^{-1}
9. Inóculo	10 % v/v	20 % v/v
10. MnSO ₄	0.118 mg L^{-1}	0.472 mg L^{-1}
11. FeSO ₄ · 7 H ₂ O	4 mg L^{-1}	16 mg L^{-1}

La matriz de diseño para 11 factores se presenta en la Tabla 2, construida de acuerdo a Plackett y Burman (1946).

Tabla 2: Matriz de variables del diseño de Plackett y Burman para 11 factores

Experimento	Factores										
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11
1	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
2	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
3	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
4	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
5	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+
6	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+
7	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+
8	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
9	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-
10	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
11	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Para calcular el efecto de cada factor se tiene la siguiente expresión:

$$E_{(x_i)} = \frac{2 [\sum R_i^+ - \sum R_i^-]}{N}$$

donde $E_{(x_i)}$ es el efecto de la variable probada, R_i^+ denota las respuestas de los factores en el nivel alto, R_i^- representa las respuestas de los factores en el nivel bajo y N es el número de experimentos.

Si el efecto de la variable probada es mayor que la doble desviación estándar de la respuesta ($E_{(x_i)} > 2\bar{s}$), entonces la variable tiene efecto significativo sobre dicha respuesta.

La construcción del diseño experimental y el análisis estadístico correspondiente se llevaron a cabo utilizando los programas Design Expert v8.0.6.1 (Stat-Ease, Inc.®) y R-project v2.13.1 (The R Foundation for Statistical Computing).

6.3 Determinaciones analíticas.

6.3.1 Recuento celular directo.

El conteo celular se realizó en una cámara de Neubauer, contando las células presentes en los 25 cuadrantes centrales. El valor obtenido fue multiplicado por un factor de 10^4 y un factor de dilución adecuado en caso de exceder las 300 células por cámara. El conteo fue expresado en número de células por mililitro de cultivo (Castelblanco Matiz, 2007).

6.3.2 Peso seco.

Se filtraron por vacío alícuotas de 5 mL de cultivo a través de membranas Millipore® de 5.0 μm de tamaño de poro, previamente secadas hasta alcanzar peso constante. Las membranas con muestra se colocaron en un horno a 70 °C por 24 horas. El peso seco se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{PS} = \left(\frac{P - P_0}{V} \right) \cdot 1000 \quad (6.1)$$

Donde PS es el peso seco (medido en gramos por litro), P es el peso del cultivo filtrado y la membrana, P_0 es el peso de la membrana (ambas medidas en gramos), y V es el volumen de la alícuota (medido en litros).

6.3.3 Pigmentos fotosintéticos: clorofilas (a y b) y carotenoides totales.

Se centrifugaron 2 mL de cultivo a 3500 rpm por cinco minutos. Al paquete celular se le agregaron 4 mL de metanol y se mantuvo en baño maría a 60 °C por 15 min. Posteriormente el extracto metanólico fue centrifugado por cinco minutos a 3500 rpm. Se determinó la absorbancia del extracto metanólico tomando lecturas a 666, 653 y 470 nm en un espectrofotómetro Genesis-UV-US (Thermo Electron Scientific Instruments LLC®, Madison, WI, USA). La concentración de clorofilas *a* y *b* y carotenoides totales se calcularon en base a las ecuaciones propuestas por Wellburn (1994):

$$\text{Chl}a = (15.65 \cdot A_{666}) - (7.34 \cdot A_{653}) \quad (6.2)$$

$$\text{Chl}b = (27.05 \cdot A_{653}) - (11.21 \cdot A_{666}) \quad (6.3)$$

$$\text{Car}_{\text{Tot}} = \frac{(1000 \cdot A_{470}) - (2.86 \cdot \text{Chl}a - 129.2 \cdot \text{Chl}b)}{221} \quad (6.4)$$

Donde A indica la absorbancia medida a la longitud de onda que señala el subíndice, los subíndices *a* ó *b* se refieren al tipo de clorofila (Chl) y Car_{Tot} a los carotenoides totales.

6.3.4 Actividad fotosintética por emisión de fluorescencia de la clorofila a del fotosistema II (PSII).

El análisis del decaimiento de la fluorescencia o la disipación de la energía, se realizó por la técnica de pulsos saturantes utilizando un equipo de fluorescencia FMS (Fluorescence Monitoring System, Hansatech®, U.K). La medición se hizo directamente en el cultivo colocando la fibra óptica en posición perpendicular a la cara externa de la botella y en diferentes posiciones de la misma.

El valor de la fluorescencia mínima (F_0) a temperatura ambiente se obtiene irradiando la muestra con una luz modulada de baja intensidad ($0.1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), después de 60 ms se sobrepone un pulso saturante de luz blanca de $10,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 0.8 s para cerrar todos los centros de reacción y obtener el valor máximo de fluorescencia (F_m). Utilizando estos valores se calculó el rendimiento cuántico operacional empleando la ecuación descrita por Maxwell y Johnson (2000):

$$\varphi_{\text{PSII}} = \frac{F_v}{F_m} = \frac{F_m - F_0}{F_m} \quad (6.5)$$

6.3.5 Lípidos totales.

La extracción de lípidos fue realizada mediante el método de Bligh y Dyer modificado por Arias *et al.* (2011b), utilizando una mezcla de metanol:cloroformo:agua en proporción 1:0.5:0.4 .

Se pesó aproximadamente 0.1 g de biomasa liofilizada en tubos de ensayo y se agregaron en el siguiente orden 2 mL de metanol, 1 mL de cloroformo y 0.8 mL de agua destilada, agitando en vórtex por 30 s entre cada solvente. La biomasa se maceró con la mezcla de solventes por 24 h para asegurar la completa extracción de los lípidos. Al día siguiente, las muestras se centrifugaron por 10 min a 3500 rpm; el sobrenadante se colectó en tubos de ensayo previamente secados y pesados. Al paquete celular se le agregó 1 mL de metanol, 0.5 mL de cloroformo y 0.4 mL de agua destilada, para posteriormente agitar toda la mezcla por 30 s. Se centrifugó por 10 min a 3500 rpm y el sobrenadante se mezcló con los obtenidos anteriormente. A la mezcla de solventes que contenía los lípidos se le adicionaron 1.5 mL de cloroformo y 1.5 mL de agua destilada para separar la fase hidroalcohólica y la fase orgánica. Se desechó la fase hidroalcohólica (que contiene proteínas y restos celulares) y la fase orgánica se lavó con 3 mL de solución salina al 3 %, se centrifugó a 3500 rpm por 15 min y se desechó la fase acuosa. A la fase orgánica se le evaporó el solvente en estufa a 60 °C por 24 h y posteriormente se pesó, calculando el porcentaje de lípidos totales mediante la fórmula:

$$\%LT = \left(\frac{M - M_0}{M_B} \right) \cdot 100 \quad (6.6)$$

Donde %LT es el porcentaje de lípidos totales, M es el peso del extracto, la mezcla de solventes y el tubo de ensayo; M_0 es el peso del tubo de ensayo y M_B es el peso de la biomasa liofilizada.

6.3.6 Perfil de ácidos grasos.

El extracto obtenido en la determinación de lípidos totales fue utilizado para la determinación del perfil de ácidos grasos. Dicho extracto fue metilado con 1 mL de trifluoruro de boro (BF_3) al 12 % en metanol, manteniéndolo a 70 °C por 30 min. Después se adicionaron 0.5 mL de hexano y 0.5 mL de agua destilada y posteriormente se separó la fracción superior resultante, que contiene los metil ésteres.

Se inyectaron 2 μL del extracto de metil ésteres de ácidos grasos (FAME) en hexano en un cromatógrafo Perkin–Elmer Autosystem, con una columna HP-INNOWAX 30 m x 0.320 mm x 0.50 μm , utilizando hidrógeno como gas acarreador. La temperatura se varió de la siguiente manera: inició en 150 °C manteniéndose durante 2 min, después se inició una rampa a 5 °C por min hasta alcanzar 200 °C, inmediatamente después se inició otra rampa a 2 °C por min hasta alcanzar 250 °C y se mantuvo constante en este valor durante 16 min. El inyector y el detector se mantuvieron a 150 °C y 250 °C respectivamente. Se compararon los tiempos de retención contra un estándar de ácidos grasos de 12 a 24 carbonos (FAME Mix C4-C24, Supelco Analytical®, PA, USA).

6.4 Estimación de los parámetros de calidad del biodiesel.

Se realizó una estimación teórica de la calidad del biodiesel, mediante ecuaciones empíricas, a partir del perfil de ácidos grasos obtenido bajo las condiciones de mayor productividad y se compararon con las propiedades del biodiesel producido a partir del aceite de palma y de soya (Arias *et al.*, 2011a). Las ecuaciones para estimar la densidad (ρ), viscosidad cinemática (η), número de cetanos (φ) y valor calorífico superior (δ) de los metil ésteres presentes en el biodiesel son las siguientes (proporcionadas por Ramírez-Verduzco *et al.*, 2012):

$$\rho_i = 0.8463 + \frac{4.9}{M_i} + 0.0118 \cdot N$$

$$\ln(\eta_i) = -12.503 + 2.496 \cdot \ln(M_i) - 0.178 \cdot N$$

$$\varphi_i = 7.8 + 0.302 \cdot M_i - 20 \cdot N$$

$$\delta_i = 46.19 - \frac{1794}{M_i} - 0.021 \cdot N$$

Donde M_i representa la masa molar de los ésteres presentes en el perfil lipídico y N es el número de dobles enlaces en cada uno de los ésteres.

Para las propiedades del biodiesel se tiene la siguiente ecuación:

$$f_b = \sum_{i=1}^n w_i \cdot f_i$$

Donde f_b se reemplazó por las variables ρ , $\ln(\eta)$, φ y δ para identificar las propiedades del biodiesel; w_i representa la fracción peso de los ésteres metílicos y f_i identifica a las propiedades de los ésteres individuales calculadas anteriormente.

Resultados y Discusión.

7.1 Exploración de las variables con mayor influencia en el crecimiento y la acumulación de lípidos. Diseño de Plackett y Burman (PB).

7.1.1 Efecto de las condiciones de cultivo sobre la densidad celular, el peso seco y la productividad de biomasa.

Mediante el diseño de PB se identificó que el aire enriquecido con 3 % de CO_2 , una concentración alta de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y el suministro de glucosa ejercieron un efecto positivo y significativo ($p < 0.05$) sobre la proliferación celular de *S. incrasatulus*. Los Cultivos 9 y 6, establecidos con el nivel alto de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y cuya fuente de carbono fue glucosa, mostraron un incremento en la densidad celular de 43 % y 74 % respectivamente en comparación con el Cultivo 12. Los Cultivos 9 y 6 contaron con una concentración alta de NaCl y K_2HPO_4 ; sin embargo, estos factores no tuvieron un efecto significativo ($p > 0.05$) sobre la densidad celular.

Los Cultivos 2, 8 y 10 presentaron un crecimiento más lento y densidades celulares en promedio 62 % más bajas con respecto al Cultivo 12. Estos cultivos fueron establecidos con el nivel bajo de CO_2 y suministrados con NaHCO_3 , así como el nivel bajo de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (excepto el Cultivo 10). Sin embargo, los Cultivos 2, 8 y 10 mostraron una tendencia de continuar con su crecimiento hasta el final del periodo experimental, contrario al resto de los cultivos que, luego de 10 días de ensayo, entraron en su fase estacionaria (Fig. 11).

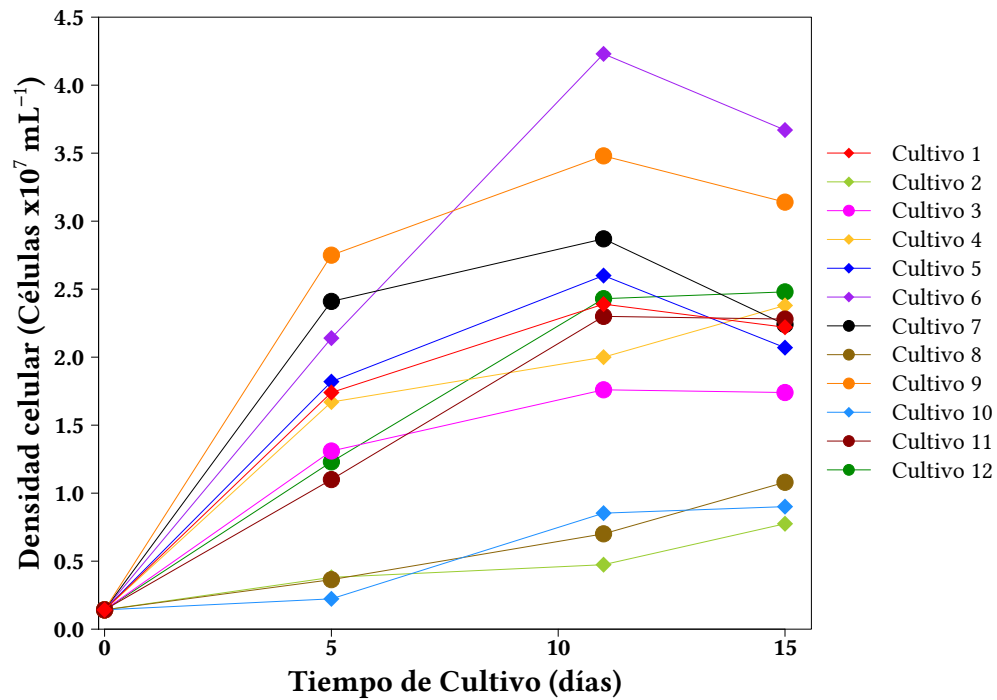


Figura 11: Comportamiento de la proliferación celular en *S. incrassatulus*. Los puntos señalados con círculos indican una intensidad luminosa de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y los que se muestran con rombos, de $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Cada punto es el promedio de seis mediciones.

El aire enriquecido con 3 % de CO_2 , el suministro de glucosa y una concentración alta de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ presentaron efectos significativos ($p < 0.05$) y favorables a la producción de biomasa en *S. incrassatulus*, registrándose un aumento de 68.2 % (Cultivo 9) con respecto al Cultivo 12. Por otra parte, los Cultivos 2, 8 y 10, suministrados con NaHCO_3 y el nivel bajo de CO_2 , exhibieron una biomasa seca en promedio 75 % inferior a la del Cultivo 12 a los 10 días de crecimiento. Cinco días después, los Cultivos 2 y 8 incrementaron su masa en promedio 93 %, mientras que el Cultivo 10, que se estableció con el nivel alto de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, lo hizo en 137 %. No obstante, la biomasa de los Cultivos 2, 8 y 10 permaneció por debajo del Cultivo 12 (Fig. 12).

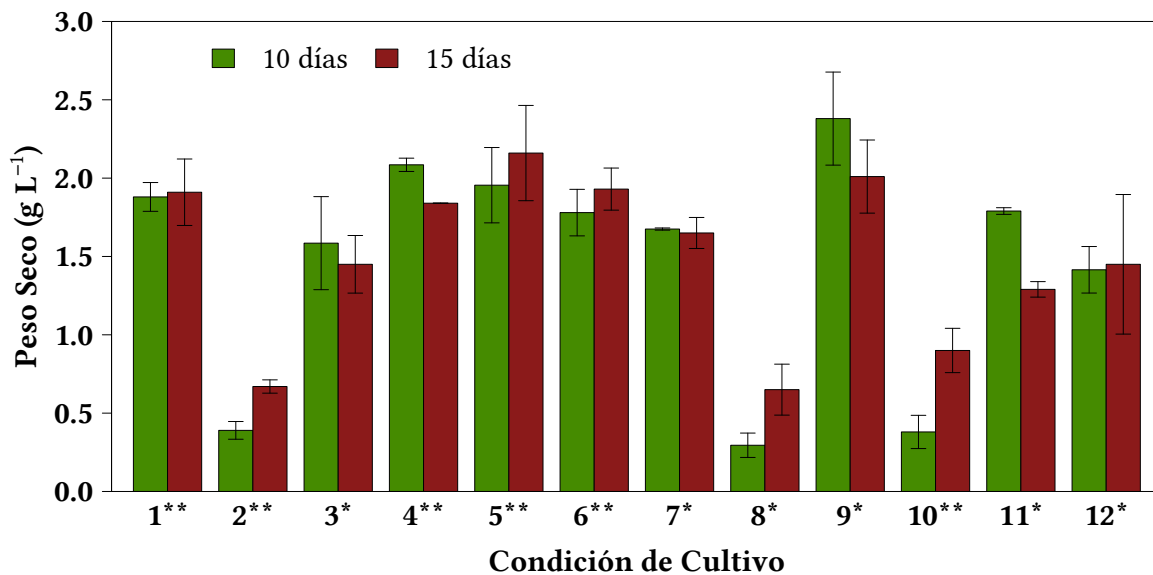


Figura 12: Contenido de biomasa de *S. incrassatulus* después de 10 y 15 días de cultivo de acuerdo al diseño de PB. Los resultados se muestran como el promedio de cuatro mediciones y las barras de error como la desviación estándar. * = $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. ** = $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Las microalgas obtienen CO_2 a partir de la atmósfera, de las emisiones industriales o mediante la conversión enzimática de carbonatos solubles como el NaHCO_3 (Devgoswami *et al.*, 2011). Sin embargo, los niveles atmosféricos de CO_2 (0.03 %) no son suficientes para promover un crecimiento rápido y una productividad alta, mientras que una concentración elevada de NaHCO_3 inhibe el crecimiento (Kumar *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2012). Devgoswami *et al.* (2011) reportaron que cultivos de *Scenedesmus* sp. mostraron un mejor crecimiento en medios enriquecidos con 0.47 % de CO_2 comparado con medios alimentados con 45 mg L^{-1} de NaHCO_3 . Así mismo, Zhao *et al.* (2012) mostraron que cultivos de *S. quadricauda* alimentados con CO_2 atmosférico tuvieron un crecimiento y productividad de biomasa mayor en ausencia de NaHCO_3 que en cultivos con 840 mg L^{-1} de esta fuente de carbono.

La glucosa es una fuente de carbono que se caracteriza por su contenido energético alto y por promover modificaciones fisiológicas que se reflejan en el tamaño celular y en el aumento en la producción de materiales de reserva (almidón o lípidos), así como en el incremento en el contenido de proteínas y pigmentos fotosintéticos (Perez-Garcia *et al.*, 2011). En cultivos mixotróficos de *S. quadricauda*, enriquecidos con 2 % CO₂ y 5 g L⁻¹ de glucosa, se obtuvo una productividad de biomasa 3.5 veces mayor con respecto a la de un cultivo autotrófico; con la misma concentración de glucosa, pero bajo un régimen de cultivo heterotrófico, la productividad se incrementó hasta 7 veces (Zhao *et al.*, 2012).

La disponibilidad de nitratos en el medio de cultivo influye considerablemente en el crecimiento y la división celular de las microalgas (Přibyl *et al.*, 2012), pues se requieren de grandes cantidades de esta forma de nitrógeno para sintetizar proteínas, enzimas, acarreadores energéticos y material genético (Barsanti y Gualtieri, 2006). A su vez, la asimilación de nitrato requiere de grandes cantidades de ATP y carbono (Perez-Garcia *et al.*, 2011). Castelblanco Matiz (2007) reportó que *S. acutus* consumió el 97 % del nitrato disponible en el medio luego de 11 días de crecimiento, lo que llevó a una disminución en la proliferación celular y la productividad de biomasa. Las respuestas de *S. incrassatulus* mostradas en la Fig. 11 y Fig. 13 son acordes con lo anterior.

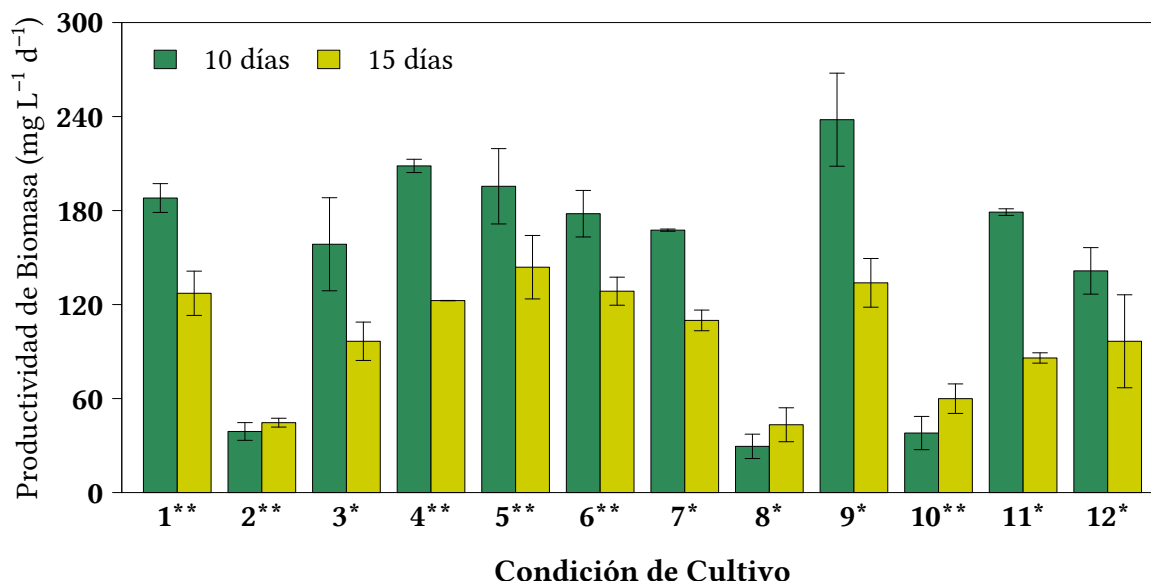


Figura 13: Productividad de biomasa de *S. incrassatulus* de acuerdo a las condiciones de crecimiento y al tiempo de cultivo. Los resultados se muestran como el promedio de cuatro mediciones y las barras de error como la desviación estándar. * = 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. ** = 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

7.1.2 Efecto de las condiciones de cultivo sobre el contenido de pigmentos.

La intensidad luminosa fue el factor con mayor efecto negativo y significativo ($p < 0.0001$) sobre la producción de pigmentos fotosintéticos. Esto fue evidente a través del cambio de color de los cultivos de acuerdo al nivel de iluminación y al tiempo de exposición. Los cultivos sujetos a un flujo luminoso de $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ presentaron un color verde olivo y marrón amarillento a los 10 y 15 días de crecimiento respectivamente (Fig. 14a, b), mientras que los cultivos iluminados a $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no mostraron cambio en su coloración durante todo el periodo experimental (Fig. 14c, d).

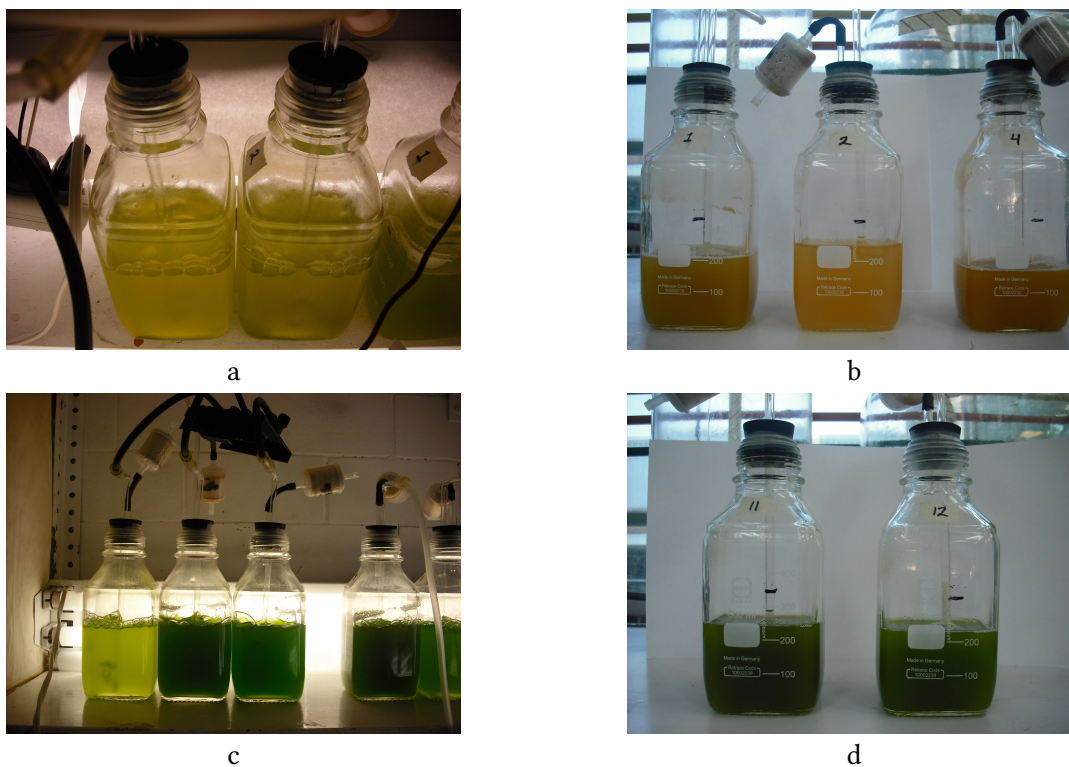
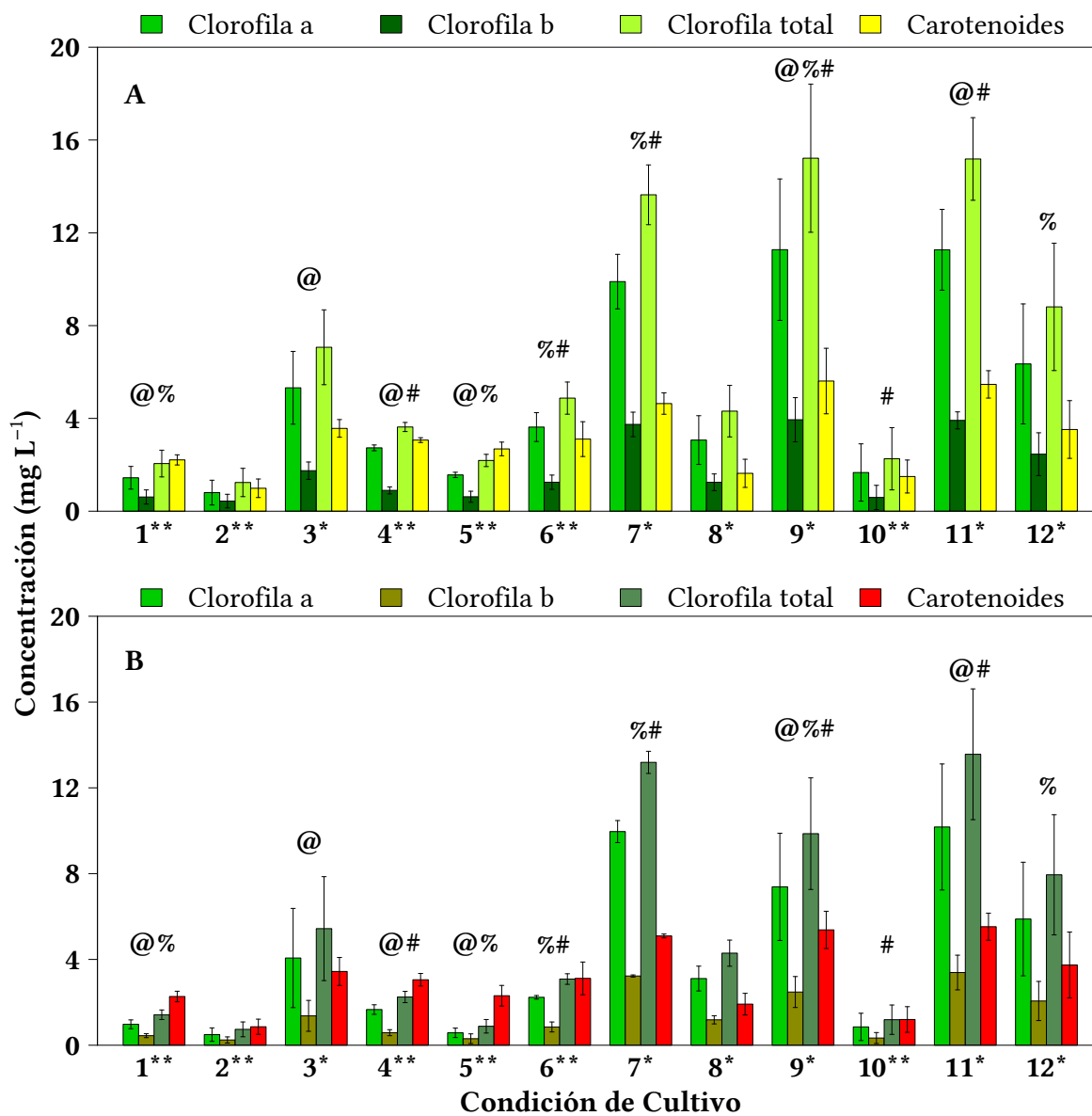


Figura 14: Coloración de los cultivos de *S. incrassatus* después de: **a)** 10 días de crecimiento, $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; **b)** 15 días de crecimiento, $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; **c)** 10 días de crecimiento, $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y **d)** 15 días de crecimiento, $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Después de 10 días de crecimiento y bajo una intensidad luminosa de $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, se registró un descenso de hasta 87 % en el contenido de clorofila *a*, 82 % en el de clorofila *b* y 72 % en el de carotenoides totales en comparación con el Cultivo 12 (Fig. 15a). La relación entre carotenoides y clorofilas (Car/Chl) fue de 0.66 a 1.22. Al final del periodo experimental, los niveles de clorofila *a* cayeron hasta 92 %, los de clorofila *b* hasta 88 % y los de carotenoides un 77 % con respecto al Cultivo 12 (Fig. 15b); estos cultivos exhibieron una Car/Chl promedio de 1.45. En contraste, los cultivos sujetos al nivel bajo de iluminación presentaron una Car/Chl en promedio de 0.39 a 0.48 a los 10 y 15 días de crecimiento respectivamente (Fig. 15a, b).

El $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ejerció un efecto positivo y significativo ($p < 0.05$) sobre la producción de pigmentos fotosintéticos durante todo el periodo experimental. Los cultivos de *S. incrassatulus* sujetos al nivel bajo de iluminación y una concentración alta de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (Cultivos 7, 9 y 11) exhibieron un incremento promedio de 73 % en el contenido de clorofila *a*, 57 % en el de clorofila *b* y de 49 % con respecto a los carotenoides en comparación con el Cultivo 12. Así mismo, los tratamientos sometidos a los niveles altos de luminosidad y $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (Cultivos 4 y 6) mostraron una concentración de clorofila total y carotenoides en promedio 130 % y 212 % mayores a las registradas en el Cultivo 2, establecido con el nivel bajo de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. No obstante, los cultivos con el nivel bajo de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ presentaron una Car/Chl promedio de 1.22, mientras que en los cultivos con una concentración alta de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ fue en promedio de 0.66 (Fig. 15a, b).

El aire enriquecido con 3 % de CO_2 y el suministro de glucosa presentaron un efecto positivo y significativo ($p < 0.05$) sobre la producción de carotenoides en *S. incrassatulus*. A los 10 días de crecimiento y bajo una iluminación de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se registró un incremento en la producción de carotenoides de 59.3 % (Cultivo 9) con respecto al Cultivo 12, mientras que a los 15 días de crecimiento fue 43.7 % mayor. En el caso de los cultivos iluminados a $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y alimentados con 3 % de CO_2 y 1 g L^{-1} de glucosa (Cultivos 1 y 5), la producción de carotenoides fue en promedio 97 % y 122 % mayor a los 10 y 15 días de crecimiento respectivamente en comparación con los Cultivos 2 y 10 (Fig. 15a, b).



Una de las consecuencias más notables en el proceso de adaptación de las microalgas a intensidades luminosas elevadas es la marcada disminución en el contenido de clorofila y un aumento en la concentración de carotenoides. Esto se manifiesta mediante el rápido incremento en la Car/Chl con el fin de atenuar los efectos de la clorofila triplete y el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) (Solovchenko *et al.*, 2008; Allahverdiyeva y Aro, 2012). Sin embargo, cuando la intensidad luminosa asciende a $280 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la fotooxidación de los carotenoides supera a su síntesis (Stange y Flores, 2012). No obstante, las células “marrón”, cuya Car/Chl es de aproximadamente 1.05, son más resistentes a la fotodestrucción de sus pigmentos que las células “verdes”, con una Car/Chl de 0.45 (Solovchenko *et al.*, 2011).

El contenido de pigmentos también está determinado por la disponibilidad de nutrientes, particularmente de nitrógeno (Castelblanco Matiz, 2007; Solovchenko *et al.*, 2008), pues forma parte de las clorofilas y de las enzimas que participan en la síntesis tanto de clorofilas como de carotenoides (Morales *et al.*, 2006). Sin embargo, las clorofilas (sobre todo la clorofila *b*) son más susceptibles a la deficiencia de nitrógeno que los carotenoides. Con el fin de economizar el nitrógeno, y debido a que los metabolitos de las clorofilas no pueden reciclarse, la síntesis de carotenoides (especialmente de α y β carotenos) será más persistente (Young y Beardall, 2003; Taiz y Zeiger, 2010). Masojídek *et al.* (2000) reportaron que tras dos días de crecimiento y bajo una intensidad luminosa de 800 a $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la Car/Chl se incrementó en 116 % en cultivos de *Chlorococcum* sp. deficientes en nitrógeno, comparado con sólo 4 % cuando existió un aporte suficiente de dicho nutriente.

El calcio es un nutriente esencial en los primeros pasos de la síntesis de clorofila, puesto que es requerido en el funcionamiento de la glutamil-*t*RNA reductasa, enzima responsable de la conversión de *t*RNA-glutamilo en glutamato-1-semialdehído (Beale, 1999; Tripathy y Pattanayak, 2012). Adam e Issa (2000) reportaron que en cultivos de *S. intermedius* con una semana de crecimiento, deficientes en Ca^{2+} y bajo una intensidad luminosa de $23 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, el contenido de clorofila total disminuyó un 7 %. Liang *et al.* (2009) encontraron que la adición de CaCl_2 incrementó el contenido de clorofila en brotes de *Cucumis sativa* sujetos a una densidad de flujo de fotones de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Yao y Wang (2012) hallaron que dosis moderadas de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ incrementaron la concentración de clorofila en brotes de *Cyclocarya paliurus* sometidos a estrés salino.

7.1.3 Efecto de las condiciones de cultivo sobre el rendimiento cuántico operacional (F_v/F_m)

La intensidad luminosa elevada afectó en forma significativa ($p < 0.0001$) al F_v/F_m de *S. incrassatulus*. Los cultivos que crecieron bajo un flujo luminoso de $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ experimentaron una caída en el F_v/F_m de hasta 73 % durante el primer día de crecimiento. Posteriormente, en un periodo de 4 a 6 días, el F_v/F_m registró una recuperación de hasta 433 % con respecto al primer día de ensayo para luego descender gradualmente hasta el final del periodo experimental. En algunos casos los cultivos mostraron signos de recuperación en el F_v/F_m , sin alcanzar su valor máximo nuevamente. A los 15 días de crecimiento, el F_v/F_m fue de 40 % a 60 % menor con respecto al Cultivo 12 (Fig. 16a). Por otra parte, los cultivos que crecieron bajo una intensidad luminosa de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ registraron una caída de hasta 64 % en el F_v/F_m durante el primer día de prueba, para luego recuperarse hasta en un 311 % en el cuarto día, registrando una evolución constante en el F_v/F_m el resto del periodo de ensayo (Fig. 16b).

Una concentración alta de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ en el medio de cultivo tuvo un efecto positivo y significativo ($p < 0.05$) sobre el F_v/F_m . En el caso de los cultivos establecidos con el nivel alto de luminosidad, aquellos que contenían una concentración alta de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (Cultivos 4, 6 y 10) mostraron a los 11 días de crecimiento un F_v/F_m de 89 % a 173 % mayor que los cultivos con el nivel bajo de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (Cultivos 2 y 5) (Fig. 16a). Los tratamientos establecidos con el nivel bajo de iluminación y el nivel alto de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (Cultivos 7, 9 y 11) registraron a los 15 días de crecimiento un F_v/F_m de 8 % a 17 % mayor que el Cultivo 12. Cuando el aporte de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ fue insuficiente en condiciones de iluminación baja (Cultivo 8), el F_v/F_m descendió un 24 % con respecto al Cultivo 12 (Fig. 16b).

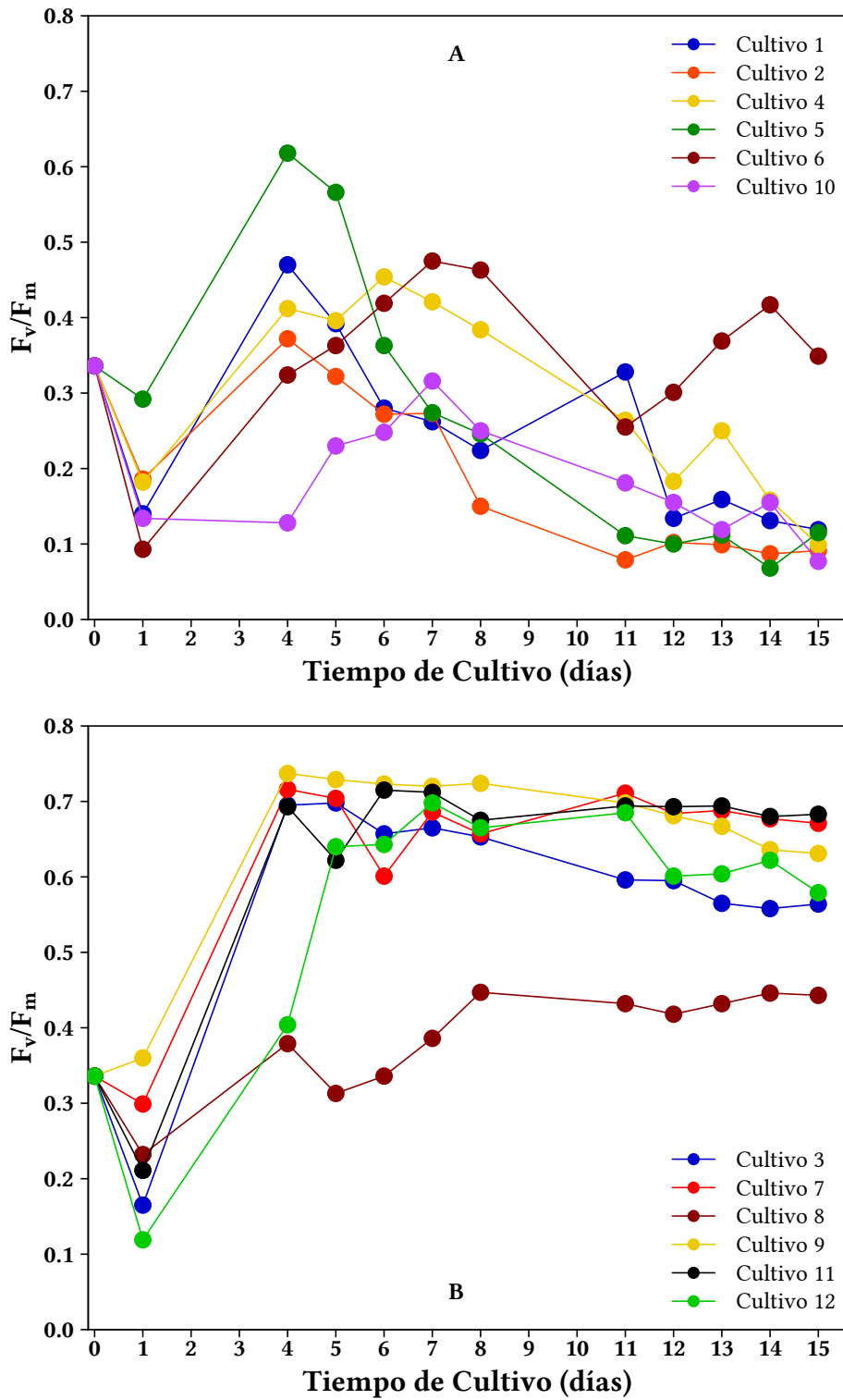


Figura 16: Evolución del F_v/F_m en cultivos de *S. incrassatus* de acuerdo a la intensidad luminosa a la que fueron expuestos (A = $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; B = $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Los resultados se muestran como el promedio de ocho mediciones

La emisión de fluorescencia está determinada, entre otros factores, por la intensidad luminosa, la naturaleza y el contenido de pigmentos fotosintéticos y el estado de oxidación de los aceptores y dadores de electrones del fotosistema II (PSII) (González *et al.*, 2008). Si bien la emisión de fluorescencia comprende sólo el 2 % del total de la energía luminosa absorbida (Maxwell y Johnson, 2000), diversos factores de estrés pueden elevar esta emisión hasta en un 5 %, a expensas del trabajo fotoquímico (González *et al.*, 2008; White *et al.*, 2011). El F_v/F_m es una medida de la eficiencia máxima del PSII y provee información acerca de los procesos que afectan el desempeño del aparato fotosintético (Maxwell y Johnson, 2000).

Cuando las microalgas no se encuentran sometidas a estrés por falta de nutrientes, el F_v/F_m comprende valores de 0.6 a 0.7 (Kromkamp y Peene, 1999); 0.710 en el caso de *S. incrassatus* (González *et al.*, 2008). En cultivos donde se limita el aporte de nitrógeno, el F_v/F_m disminuye al menos un 30 % de sus valores normales (Masojídek *et al.*, 2000), mientras que un cultivo sometido a estrés completo (agua destilada sin nutrientes), presenta una disminución del F_v/F_m de 20 % (White *et al.*, 2011). La recuperación en el F_v/F_m requiere de la síntesis de proteínas que se encargan de reparar el aparato fotosintético, lo cual es posible con un aporte extra en el contenido de nitrógeno (Young y Beardall, 2003).

El Ca^{2+} es un cofactor indispensable en el proceso de oxidación catalítica del agua, reacción conocida como *ciclo de Kok* y llevada a cabo en el sitio activo del PSII, denominado complejo liberador de oxígeno (CLO), el cual cuenta con un compuesto de coordinación formado por un átomo de calcio y cuatro de manganeso (Najafpour, 2011). La luz acelera el desprendimiento del calcio debido a que existe una menor afinidad entre éste y el manganeso cuando las moléculas de agua se unen al sitio activo. La ausencia de calcio conduce a la pérdida de estructura y función del CLO, responsable de la formación del enlace oxígeno-oxígeno, y promueve la fotoacumulación de radicales de tirosina y clorofila $P680^+$, las cuales dañan la estructura proteica del PSII e inducen la formación de especies reactivas de oxígeno como la clorofila triplete y el oxígeno singulete (Yocum, 2008; Vass, 2012). Estas especies químicas inhiben la síntesis de proteínas necesarias para la reparación del aparato fotosintético (Murata *et al.*, 2007), provocando una caída más pronunciada en el F_v/F_m cuando no exista un aporte de nitrógeno extra (Young y Beardall, 2003).

7.1.4 Efecto de las condiciones de cultivo sobre el contenido y la productividad de lípidos en *S. incrassatus*.

Después de 10 días de crecimiento, los mayores porcentajes de lípidos por unidad de masa seca de *S. incrassatus* fueron 27.5 % (Cultivo 8), 25.3 % (Cultivo 1), 16.9 % (Cultivo 3) y 16.2 % (Cultivo 12), mientras que el resto de las muestras se mantuvo por debajo del 10 %. Cabe destacar que luego de 15 días de cultivo, el contenido de lípidos en *S. incrassatus* no supera el 10 % en ninguno de los tratamientos (Fig. 17). Los factores con efecto significativo ($p < 0.05$) y favorable en la acumulación y productividad de lípidos durante todo el periodo de crecimiento fueron el aire enriquecido con 3 % de CO_2 , la adición de glucosa y una concentración alta de MnSO_4 .

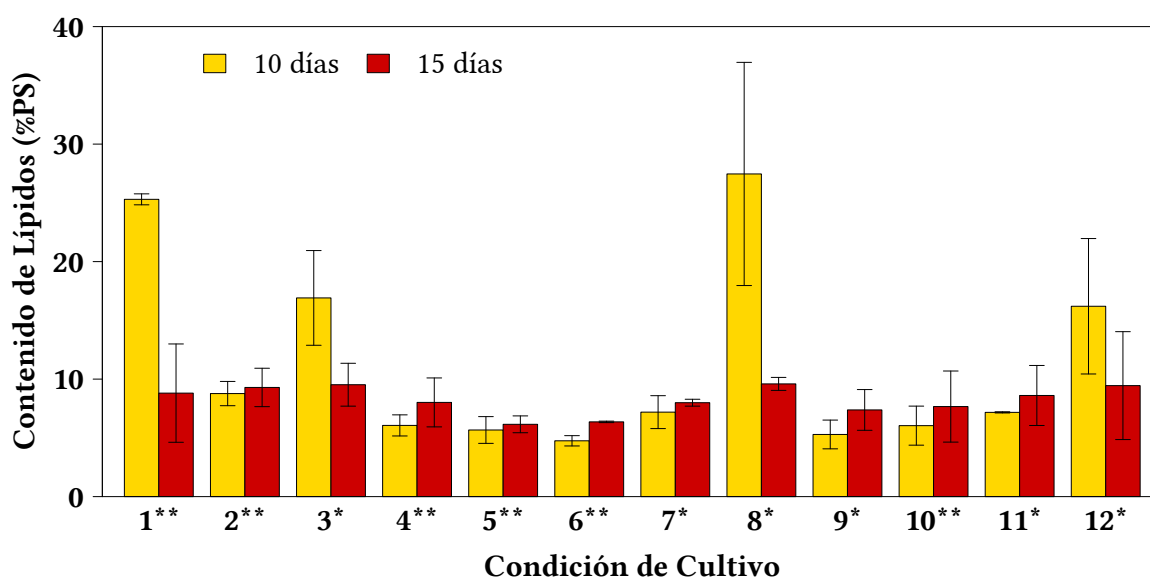


Figura 17: Porcentaje de lípidos por unidad de biomasa en *S. incrassatus* de acuerdo a la condición de cultivo y al tiempo de crecimiento. * = $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. ** = $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

El contenido de aceite en las microalgas comprende de 15 % hasta 80 % de su masa seca (Chisti, 2007); su composición y productividad dependen, entre otros factores, de la composición del medio y de la intensidad luminosa (Huerlimann *et al.*, 2010). En el caso de *S. incrassatus* cultivado por 8 días en medio PCG y expuesto a una intensidad luminosa de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, el contenido de lípidos fue del 10.5 % (datos no mostrados). Arias *et al.* (2011a) reportaron que para esta misma especie, cultivada por 11 días en medio PCG enriquecido con 1 g L^{-1} de glucosa y bajo un flujo de fotones de $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, el contenido de lípidos ascendió a 18.6 %.

Como se mencionó anteriormente, el incremento en el contenido específico de lípidos no resulta necesariamente en un aumento de la productividad; esta última considera tanto la concentración intracelular de lípidos como la biomasa producida (Brennan y Owende, 2010). La acumulación intracelular de lípidos por sí misma no es buena indicadora de la factibilidad en la producción de biodiesel. Especies con una productividad de biomasa mayor a $60 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ presentan un contenido de lípidos de entre 11 % a 51 %, mientras que especies cuyo contenido de lípidos por unidad de masa seca rebasa el 40 % presentan productividades de 17 a $160 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Griffiths y Harrison, 2009).

De acuerdo con lo anterior, las condiciones del Cultivo 8 no resultaron apropiadas para la producción de biodiesel, pues a pesar de que contó con el mayor porcentaje de lípidos (27.5 %), su productividad fue baja ($8.1 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). Por lo tanto, la mayor productividad de lípidos obtenida fue de $47.56 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Cultivo 1) dentro del periodo de 10 días de crecimiento, bajo una intensidad luminosa de $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y suministrada con aire enriquecido con 3 % de CO_2 y 1 g L^{-1} de glucosa. Esto representó un incremento del 107.5 % con respecto al Cultivo 12, y una productividad superior a las obtenidas por Rodolfi *et al.* (2009), Huerlimann *et al.* (2010), Lee *et al.* (2010) y Arias *et al.* (2011a). La productividad máxima a los 15 días de cultivo se reportó en $11.20 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Cultivo 1) (Fig. 18).

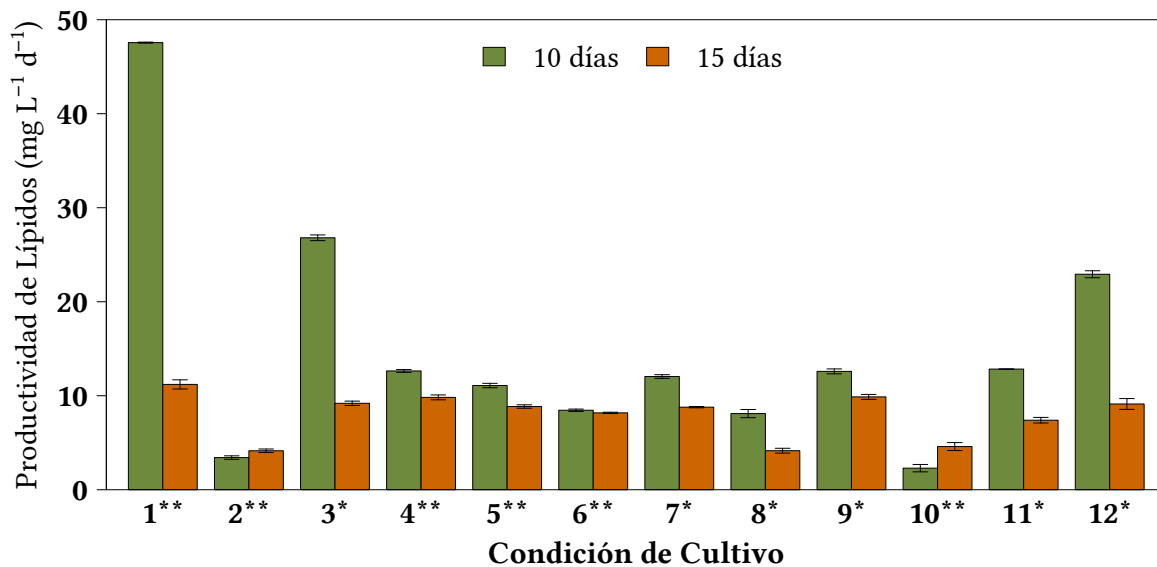


Figura 18: Productividad de lípidos en *S. incrassatus* de acuerdo a las condiciones de cultivo y tiempo de crecimiento. * = $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. ** = $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

La acumulación de lípidos en las microalgas depende de diversos factores, entre ellos, el régimen de cultivo (Perez-García *et al.*, 2011). En cultivos mixotróficos de *S. quadricauda*, alimentados con 2 % de CO₂ y 5 g L⁻¹ de glucosa, el contenido de lípidos fue de 33.1 %, mientras que en cultivos autotróficos o heterotróficos fue de 14 % a 28 %. Por otra parte, cuando la fuente de carbono fue el NaHCO₃ el contenido de lípidos comprendió de 13.9 % a 17.1 % (Zhao *et al.*, 2012).

Una fuerte intensidad luminosa puede influenciar de forma indirecta la acumulación de lípidos si se combina con diversos tipos de estrés o con un exceso de CO₂ (Simionato *et al.*, 2011); sin embargo, niveles extremos de luminosidad (400 μmol m⁻² s⁻¹ o superiores) combinado con otros tipos de estrés pueden suprimir la acumulación de triacilglicéridos (Solovchenko, 2012). Liu *et al.* (2012) reportaron que en cultivos de *Scenedesmus* sp. 11-1 limitados en nitrógeno y sometidos a un flujo de fotones comprendido entre 250 y 400 μmol m⁻² s⁻¹ fueron condiciones óptimas para el crecimiento y la acumulación de lípidos. En este trabajo la luz ejerció un efecto negativo no significativo ($p > 0.05$) en la productividad de *S. incrassatus*, aunque la mayor productividad se obtuvo con el nivel alto de iluminación (Cultivo 1).

A fin de adaptarse a las condiciones ambientales, las microalgas comienzan a producir triacilglicéridos para proporcionar los ácidos grasos necesarios en la reconstrucción del PSII, en la síntesis de carotenoides secundarios y en la disipación del exceso de energía captada por el aparato fotosintético, previniendo el daño fotoquímico. Los esfuerzos de adaptación a ambientes altamente iluminados conducen a una reducción del tamaño y a una modificación en la estructura del cloroplasto (Solovchenko, 2012), lo que afecta la estabilidad del aparato fotosintético e induce la emisión de fluorescencia (Dayan y Zaccaro, 2012).

La deficiencia de manganeso trae consigo una disminución de hasta 40 % en el contenido de galactosildiglicéridos en cultivos autotróficos de *Euglena gracilis* (Constantopoulos, 1970). Lidon *et al.* (2004) registraron un aumento en el contenido de fosfolípidos por encima de los galactolípidos en hojas de arroz bajo dosis crecientes de manganeso (ambos tipos de lípidos son componentes característicos de la membrana tilacoide).

7.2 Perfil de ácidos grasos de *S. incrassatus* y estimación de las propiedades del biodiesel.

La Tabla 3 muestra el perfil de ácidos grasos obtenidos mediante el diseño de PB. No se observan diferencias notables en el contenido de ácidos grasos obtenidos en cada una de las condiciones y periodos de crecimiento. Los ácidos grasos más abundantes a los 10 y 15 días de crecimiento fueron el oleico (41 % y 38 %) y el palmítico (27 % y 23 %), mientras que los menos abundantes fueron el ácido linolénico (8.2 % y 8.9 %), linoleico (7.3 %) y estearico (3.6 % y 2.8 %).

El biodiesel presenta una composición de ácidos grasos idéntica a la de la materia prima de origen. Los ésteres de ácidos grasos más comunes en el biodiesel son los de palmítico (hexadecanoico), estearico (octadecanoico), oleico (9(Z)-octadecenoico), linoleico (9(Z)-12(Z)-octadecadienoico) y linolénico (9(Z)-12(Z)-15(Z)-octadecatrienoico), presentes en los aceites de soya, girasol, canola, palma y cacahuete. El aceite de microalgas contiene principalmente ácido palmítico (hasta un 50.57 %) así como ácidos grasos insaturados cuya composición varía de acuerdo al grupo taxonómico al que pertenezca la microalga; las algas verdes (Chlorophyceae), contienen ácidos grasos de 16 y 18 átomos de carbono con uno hasta tres dobles enlaces, mientras que en microalgas marinas como *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae), la composición de los ácidos grasos es de 16 a 20 átomos de carbono y con uno hasta cinco dobles enlaces (Hu *et al.*, 2008; Knothe, 2011).

Tabla 3: Perfil de ácidos grasos del aceite de *Scenedesmus incrassatus* obtenido mediante el diseño de Plackett y Burman de acuerdo al tiempo de cultivo. ND = no detectado.

Cultivo	Ácidos grasos (% peso seco)									
	10 días					15 días				
	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
1	22.16	3.81	47.09	6.77	6.95	25.14	3.46	45.06	6.68	7.44
2	26.01	ND	37.86	5.49	4.20	24.95	3.12	47.89	9.65	16.77
3	20.62	2.90	32.25	7.58	9.43	22.45	1.03	24.67	3.31	3.54
4	24.22	2.80	44.03	8.40	9.78	22.82	3.15	42.50	8.73	13.00
5	23.75	3.55	46.50	6.92	7.34	24.66	3.79	43.99	7.49	8.64
6	29.70	3.06	48.79	6.46	6.59	22.34	3.83	49.81	5.41	8.08
7	35.42	3.14	36.01	8.99	8.36	18.48	1.58	22.58	4.52	4.81
8	38.11	ND	43.77	4.41	11.11	23.88	ND	48.94	5.83	5.89
9	26.86	3.55	36.62	7.78	9.42	26.07	3.03	35.72	7.64	2.49
10	22.42	2.82	49.26	4.47	11.80	16.86	3.14	31.07	3.10	9.77
11	25.57	5.92	23.39	13.82	6.20	23.42	ND	31.25	18.59	16.86
12	25.35	3.92	47.49	6.63	7.65	21.63	2.56	34.00	7.53	9.53

Para definir la calidad del biodiesel se utilizan principalmente tres propiedades: número de cetanos, viscosidad cinemática y densidad (Ramírez-Verduzco *et al.*, 2012). El número de cetanos (concepto análogo al octanaje en la gasolina) es un parámetro adimensional que describe la calidad de la ignición del combustible de diesel en un motor. Entre más larga sea la cadena de hidrocarburo, el número de cetanos aumentará; sin embargo, conforme los dobles enlaces y ramificaciones aumenten, el número de cetanos disminuirá. El metil palmitato y el metil estearato presentan números de cetano altos en comparación con el metil linolenato. La viscosidad cinemática aumenta con el crecimiento de las cadenas de hidrocarburos y disminuye con la presencia de dobles enlaces tipo *cis* (tipo Z) (Knothe, 2008). Los combustibles viscosos dañarán al motor debido al desgaste y a la formación de depósitos en el sistema de inyección (Ramírez-Verduzco *et al.*, 2012). En la Tabla 4 se muestran los parámetros de calidad calculados para los ésteres metílicos presentes en el aceite de *S. incrassatulus*.

Tabla 4: Cálculo de los parámetros de calidad para los principales componentes del biodiesel.

Metil éster	Propiedad			
	Número de cetanos (φ)	Viscosidad cinemática (η , $\text{mm}^2 \text{s}^{-1}$)	Densidad (ρ , g cm^{-3})	Valor calorífico superior (δ , MJ kg^{-1})
C16:0	73.87	4.37	0.8644	39.56
C18:0	82.34	5.59	0.8627	40.18
C18:1	61.73	4.60	0.8746	39.93
C18:2	41.13	3.78	0.8865	39.68
C18:3	20.52	3.11	0.8984	39.43

Comparando los parámetros calculados con los proporcionados por Knothe (2008), el Cultivo 1 cumplió con las especificaciones para el número de cetanos y la viscosidad exigidas por la ASTM y son cercanas al biodiesel de aceite de palma. En cuanto a la densidad, el aceite del Cultivo 1 presentó un valor 12 % por debajo del límite inferior exigido por el Comité Europeo de Normalisation (EN14214) (Mallick *et al.*, 2012).

Tabla 5: Estimación de las propiedades del biodiesel para las condiciones en donde se obtuvo la mayor productividad de lípidos, comparadas con las de aceites vegetales recopilados por Knothe (2008). NP = no proporcionado.

Aceite	Propiedad			
	Número de cetanos (φ)	Viscosidad cinemática (η , $\text{mm}^2 \text{s}^{-1}$)	Densidad (ρ , g cm^{-3})	Valor calorífico superior (δ , MJ kg^{-1})
Cultivo 1	52.78	3.81	758.7	39.75
Aceite de soya	48–56	4.0–4.3	NP	39.61
Aceite de canola	48–56	4.53	NP	NP
Aceite de palma	56.2	4.5	NP	NP
ASTM D6751	≥ 47	1.9–6.0	NP	NP
EN14214	≥ 51	3.5–5.0	860–900	NP

Conclusiones.

- * El suministro de 1 g L^{-1} de glucosa y de aire enriquecido con 3 % de CO_2 influyeron de forma positiva en la división celular y en la productividad de biomasa de *Scenedesmus incrassatulus*, incrementando ambos parámetros en 74 % y 46 % respectivamente.
- * Una concentración alta de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ tuvo efectos favorables en la producción de clorofilas y carotenoides así como en el F_v/F_m tanto a $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ como a $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.
- * El aire enriquecido con CO_2 , el suministro de 1 g L^{-1} de glucosa y una concentración alta de MnSO_4 tuvieron un efecto positivo sobre la productividad de lípidos, promoviendo un incremento de hasta 107.5 %.
- * El perfil de ácidos grasos más adecuado para la producción de biodiesel se obtuvo con Cultivo 1 del diseño de Plackett y Burman. Las propiedades del aceite de *S. incrassatulus* son semejantes a las del aceite de soya y cumple en general con los requerimientos exigidos por la ASTM. La densidad del aceite de *S. incrassatulus* estuvo 12 % por debajo de lo estipulado por las normas europeas.

Referencias.

- Abed, R., Dobretsov, S., and Sudesh, K. (2009). Applications of cyanobacteria in biotechnology. *J. Appl. Microbiol.*, **106**(1): 1–12.
- Adam, M. and Issa, A. (2000). Effect of manganese and calcium deficiency on the growth and oxygen exchange of *Scenedesmus intermedius* cultured for successive generations. *Folia Microbiol.*, 45(4): 353–358.
- Allahverdiyeva, Y. and Aro, E.-M. (2012). Photosynthetic responses of plants to excess light: Mechanisms and conditions for photoinhibition, excess energy dissipation and repair. In Eaton-Rye, J. J., Tripathy, B. C., and Sharkey, T. D., editors, *Photosynthesis*, volume 34 of *Advances in Photosynthesis and Respiration*, pages 275–297. Springer Netherlands.
- Angelis-Dimakis, A., Biberacher, M., Dominguez, J., Fiorese, G., Gadocha, S., Gnansounou, E., Guariso, G., Kartalidis, A., Panichelli, L., Pinedo, I., and Robba, M. (2011). Methods and tools to evaluate the availability of renewable energy sources. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 15(2): 1182–1200.
- Arias, M., Cristiani, E., Montes, M., and Cañizares, R. (2011a). Efecto de la edad del cultivo sobre el contenido de lípidos y el perfil de ácidos grasos de *Scenedesmus incrassatulus* y su influencia en la producción de biodiesel de calidad. *Bol. Soc. Argent. Bot.*, 46(S2): 34.
- Arias, M., Cristiani, E., Torzillo, G., Esparza, F., and Cañizares, R. (2011b). Comparación de métodos para la extracción de lípidos totales en la microalga *Scenedesmus incrassatulus*. *Bol. Soc. Argent. Bot.*, 46(S2): 34.
- Arvizu Fernández, J. L. (2004). Registro histórico de los principales países emisores. In Martínez, J. and Fernández Bremauntz, A., editors, *Cambio climático: una visión desde México.*, pages 99–108. INE-SEMARNAT, México, D.F.
- Barsanti, L. and Gualtieri, P. (2006). *Algae: anatomy, biochemistry and biotechnology*. CRC Press., Boca Raton, FL, USA.

- Beale, S. (1999). Enzymes of chlorophyll biosynthesis. *Photosynth. Res.*, 60(1): 43–73.
- Benjumea Hernández, P., Agudelo Santamaría, J., and Ríos, L. (2009). *Biodiésel: Producción, calidad y caracterización*. Universidad de Antioquía. Grupo de Manejo Eficiente de la Energía.
- Bertoldi, F. C., Sant’Anna, E., and Barcelos Oliveira, J. L. (2008). Revisão: Biotecnologia de microalgas. *B. CEPPA*, 26(1): 9–20.
- Bourelly, P. (1972). *Les algues d’eau douce*, volume Tome I. N. Boubée, Paris.
- Brennan, L. and Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 14(2): 557–577.
- Cardona, C., Sánchez, O., and Gutiérrez, L. (2010). *Process synthesis for fuel ethanol production*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Cardozo, K. H. M., Guaratini, T., Barros, M. P., Falcao, V. R., Tonon, A. P., Lopes, N. P., Campos, S., Torres, M. A., Souza, A. O., Colepicolo, P., and Pinto, E. (2007). Metabolites from algae with economical impact. *Comp. Biochem. Phys. C.*, 146(1-2): 60–78.
- Castelblanco Matiz, L. M. (2007). Carotenogénesis en *Scenedesmus acutus*. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Javeriana (Sustentada en CINVESTAV-IPN, México, D.F.), Bogotá, D.C.
- Chauvet, M. and González, R. L. (2008). Biocombustibles y cultivos biofarmacéuticos: ¿oportunidades o amenazas? *El Cotidiano*, 23(147): 51–61.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.*, 25(3): 294 – 306.
- Coello Guevara, J. and Castro Pareja, P. (2008). Biocombustibles, agua y agricultura en los andes. *Revista Virtual REDESMA*, 2(2): 117–132.
- Constantopoulos, G. (1970). LIPID METABOLISM OF MANGANESE-DEFICIENT ALGAE .1. EFFECT OF MANGANESE DEFICIENCY ON GREENING AND LIPID COMPOSITION OF EUGLENA-GRACILIS Z. *Plant Physiol.*, 45(1): 76–80.
- Cortés Marín, E., Suárez Mahecha, H., and Pardo Carrasco, S. (2009). Biocombustibles y autosuficiencia energética. *Dyna*, 76(158): 101–110.
- Dayan, F. E. and Zaccaro, M. L. M. (2012). Chlorophyll fluorescence as a marker for herbicide mechanisms of action. *Pestic. Biochem. Phys.*, 102(3): 189–197.

- Delucchi, M. A. (2010). Impacts of biofuels on climate change, water use, and land use. In Ostfeld, RS and Schlesinger, WH, editor, *YEAR IN ECOLOGY AND CONSERVATION BIOLOGY 2010*, volume 1195 of *Annals of the New York Academy of Sciences*, pages 28–45.
- Demirbas, A. (2010). Use of algae as biofuel sources. *Energ. Convers. Manage.*, 51(12): 2738–2749.
- Demirbas, A. (2011). Competitive liquid biofuels from biomass. *Appl. Energ.*, 88(1): 17–28.
- Demirbas, A. H. and Demirbas, I. (2007). Importance of rural bioenergy for developing countries. *Energ. Convers. Manage.*, 48(8): 2386–2398.
- Demirbas, M. F., Balat, M., and Balat, H. (2009). Potential contribution of biomass to the sustainable energy development. *Energ. Convers. Manage.*, 50(7): 1746–1760.
- Devgoswami, C. R., Kalita, M. C., Talukdar, J., Bora, R., and Sharma, P. (2011). Studies on the growth behavior of *Chlorella*, *Haematococcus* and *Scenedesmus* sp in culture media with different concentrations of sodium bicarbonate and carbon dioxide gas. *Afr. J. Biotechnol.*, 10(61): 13128–13138.
- Dincer, I. (2000). Renewable energy and sustainable development: a crucial review. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 4(2): 157–175.
- Elshahed, M. S. (2010). Microbiological aspects of biofuel production: Current status and future directions. *Journal of Advanced Research*, 1(2): 103 – 111.
- Erdmann, N. and Hagemann, M. (2001). Salt acclimation of algae and cyanobacteria: a comparison. In Rai, L. and Gaur, J., editors, *Algal adaptation to environmental stresses. Physiological, biochemical and molecular mechanisms.*, pages 323–362. Springer-Verlag, Berlin.
- Escudero, M., Cid, C., and Escudero, R. (2009). La controversia de los agrocombustibles, una propuesta didáctica para las ciencias para el mundo contemporáneo. *Rev. Eureka Enseñ. Divul. Cien.*, 6(1): 131–139.
- Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H., Glass, C., Merrill, A., Murphy, R., Raetz, C., Russell, D., Seyama, Y., Shaw, W., Shimizu, T., Spener, F., van Meer, G., VanNieuwenhze, M., White, S., Witztum, J., and Dennis, E. (2005). A comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.*, 46(5): 839–861.
- Gallagher, B. J. (2011). The economics of producing biodiesel from algae. *Renew. Energ.*, 36(1): 158–162.

- Garduño, R. (2004). ¿Qué es el efecto invernadero? In Martínez, J. and Fernández Bremauntz, A., editors, *Cambio climático: una visión desde México.*, pages 29–40. INE-SEMARNAT, México, D.F.
- George, B. H. and Cowie, A. L. (2011). Bioenergy systems, soil health and climate change. In Singh, B. P., Cowie, A. L., and Chan, K. Y., editors, *Soil Health and Climate Change*, volume 29 of *Soil Biology*, pages 369–397. Springer Berlin Heidelberg.
- Gómez Luna, L. M. (2007). Microalgas: aspectos ecológicos y biotecnológicos. *Revista Cub. Quím.*, 19(2): 3–20.
- González Moreno, S., Perales Vela, H., and Salcedo Álvarez, M. O. (2008). La fluorescencia de la clorofila *a* como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Rev. Educ. Bioquím.*, 27(4): 119–129.
- Graham, L., Graham, J., and Wilcox, L. (2009). *Algae*. Pearson., San Francisco, CA, USA., 2nd edition.
- Griffiths, M. and Harrison, S. (2009). Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J. Appl. Phycol.*, 21: 493–507. 10.1007/s10811-008-9392-7.
- Guiry, M. and Guiry, G. (2013). Algaebase. world-wide electronic publication. http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=36404.
- Guschina, I. A. and Harwood, J. L. (2009). Algal lipids and effect of the environment on their biochemistry. In Kainz, M., Brett, M. T., and Arts, M. T., editors, *Lipids in Aquatic Ecosystems*, pages 1–24. Springer New York. 10.1007/978-0-387-89366-2_1.
- Hackenberg, N. (2008). Biocombustibles de segunda generación. *Revista Virtual REDESMA*, 2(2): 49–61.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., and Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.*, 54(4): 621–639.
- Huerlimann, R., de Nys, R., and Heimann, K. (2010). Growth, Lipid Content, Productivity, and Fatty Acid Composition of Tropical Microalgae for Scale-Up Production. *Biotechnol. Bioeng.*, 107(2): 245–257.
- INEGI (2012). Extensión de México. <http://cuentame.inegi.org.mx/territorio/extension/default.aspx?tema=T>.

- Knothe, G. (2008). "Designer" biodiesel: Optimizing fatty ester composition to improve fuel properties. *Energ. Fuel.*, 22(2): 1358–1364.
- Knothe, G. (2011). A technical evaluation of biodiesel from vegetable oils vs. algae. Will algae-derived biodiesel perform? *Green Chem.*, 13(11): 3048–3065.
- Koh, L. P. and Ghazoul, J. (2008). Biofuels, biodiversity, and people: Understanding the conflicts and finding opportunities. *Biol. Conserv.*, 141(10): 2450–2460.
- Kromkamp, J. and Peene, J. (1999). Estimation of phytoplankton photosynthesis and nutrient limitation in the eastern scheldt estuary using variable fluorescence. *Aquatic Ecology*, 33: 101–104. 10.1023/A:1009900124650.
- Kuchler, M. (2010). Unravelling the argument for bioenergy production in developing countries: A world-economy perspective. *Ecol. Econ.*, 69(6): 1336–1343.
- Kumar, A., Ergas, S., Yuan, X., Sahu, A., Zhang, Q., Dewulf, J., Malcata, F. X., and van Langenhove, H. (2010). Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. *Trends Biotechnol.*, 28(7): 371–380.
- Laine, J. (2008). Los bio-combustibles y la alimentación humana. *Interciencia*, 33(1): 71–73.
- Lee, J.-Y., Yoo, C., Jun, S.-Y., Ahn, C.-Y., and Oh, H.-M. (2010). Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technol.*, 101: S75–S77.
- Lee, R. (2008). *Phycology*. Cambridge University Press, 4th edition.
- Liang, W., Wang, M., and Ai, X. (2009). The role of calcium in regulating photosynthesis and related physiological indexes of cucumber seedlings under low light intensity and suboptimal temperature stress. *Sci. Hortic-Amsterdam.*, 123(1): 34–38.
- Lidon, F. C., Barreiro, M. G., and Ramalho, J. C. (2004). Manganese accumulation in rice: implications for photosynthetic functioning. *Journal of Plant Physiology*, 161(11): 1235 – 1244.
- Liu, J., Yuan, C., Hu, G., and Li, F. (2012). Effects of light intensity on the growth and lipid accumulation of microalga *Scenedesmus* sp. 11-1 under nitrogen limitation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166: 2127–2137. 10.1007/s12010-012-9639-2.
- Lurling, A. and Von Elert, E. (2001). Colony formation in *Scenedesmus*: No contribution of urea in induction by a lipophilic *Daphnia* exudate. *Limnol. Oceanogr.*, 46(7): 1809–1813.
- Mallick, N., Mandal, S., Singh, A. K., Bishai, M., and Dash, A. (2012). Green microalga *Chlorella vulgaris* as a potential feedstock for biodiesel. *J. Chem. Technol. Biot.*, 87(1): 137–145.

- Masera, O. and Sheinbaum, C. (2004). Mitigación de emisiones de carbono y prioridades de desarrollo nacional. In Martínez, J. and Fernández Bremauntz, A., editors, *Cambio climático: una visión desde México.*, pages 355–368. INE-SEMARNAT, México, D.F.
- Masojídek, J., Torzillo, G., Kopecký, J., Koblížek, M., Nidiaci, L., Komenda, J., Lukavská, A., and Sacchi, A. (2000). Changes in chlorophyll fluorescence quenching and pigment composition in the green alga *Chlorococcum* sp grown under nitrogen deficiency and salinity stress. *J. Appl. Phycol.*, 12(3-5): 417–426. 8th Tri Annual International Conference on Applied Algology (8th ICAA), MONTECATINI TERME, ITALY, SEP 26-OCT 01, 1999.
- Matsumoto, N., Sano, D., and Elder, M. (2009). Biofuel initiatives in Japan: Strategies, policies, and future potential. *Appl. Energ.*, 86: S69–S76.
- Maxwell, K. and Johnson, G. (2000). Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *J. Exp. Bot.*, 51(345): 659–668.
- McCormick, K. (2010). Communicating bioenergy: a growing challenge. *Biofuels Bioprod. Bioref.*, 4(5): 494–502.
- Morales, F., Abadía, A., and Abadía, J. (2006). Photoinhibition and photoprotection under nutrient deficiencies, drought and salinity. In Demmig-Adams, B., Adams, W. W., and Mattoo, A. K., editors, *Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation, and Environment*, volume 21 of *Advances in Photosynthesis and Respiration*, pages 65–85. Springer Netherlands.
- Moser, B. (2009). Biodiesel production, properties, and feedstocks. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 45: 229–266. 10.1007/s11627-009-9204-z.
- Murata, N., Takahashi, S., Nishiyama, Y., and Allakhverdiev, S. I. (2007). Photoinhibition of photosystem ii under environmental stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1767(6): 414 – 421. <ce:title>Structure and Function of Photosystems</ce:title>.
- Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K., and Dalai, A. K. (2010). Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 14(2): 578–597.
- Najafpour, M. M. (2011). Calcium-manganese oxides as structural and functional models for active site in oxygen evolving complex in photosystem ii: Lessons from simple models. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 104(1–2): 111 – 117. <ce:title>Special Issue on Recent Progress in the Studies of Structure and Function of Photosystem II</ce:title>.
- Nigam, P. S. and Singh, A. (2011). Production of liquid biofuels from renewable resources. *Prog. Energ. Combust.*, 37(1): 52–68.

- Olaizola, M. (2003). Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomol. Eng.*, 20(4–6): 459 – 466. <ce:title>Marine Biotechnology: Basics and Applications</ce:title>.
- Omer, A. M. (2009). Energy use and environmental impacts: A general review. *J. Renewable Sustainable Energy*, 1(5).
- Perales Vela, H. V. (2008). *Caracterización fotosintética y respiratoria de Scenedesmus incrassatulus durante la biorremoción de Cu²⁺*. Tesis doctoral, CINVESTAV-IPN, México, D.F.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., de Bashan, L. E., and Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Res.*, 45(1): 11–36.
- Plackett, R. and Burman, J. (1946). The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 33(Part 4): 305–325.
- Puyana Mutis, A. (2008). El manejo del petróleo mexicano: ¿política o economía? *Perf. Latinoam.*, 16(32): 67–102.
- Příbýl, P., Cepák, V., and Zachleder, V. (2012). Production of lipids in 10 strains of *Chlorella* and *Parachlorella*, and enhanced lipid productivity in *Chlorella vulgaris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 94(2): 549–561.
- Ramírez-Verduzco, L. F., Rodríguez-Rodríguez, J. E., and del Rayo Jaramillo-Jacob, A. (2012). Predicting cetane number, kinematic viscosity, density and higher heating value of biodiesel from its fatty acid methyl ester composition. *Fuel*, 91(1): 102 – 111.
- Rittmann, B. E. (2008). Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering*, 100(2): 203–212.
- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., and Tredici, M. R. (2009). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(1): 100–112.
- Salinas C., E. and Gasca Q., V. (2009). Los biocombustibles. *El Cotidiano*, 24(157): 75–82.
- Schenk, P. M., Thomas-Hall, S. R., Stephens, E., Marx, U. C., Mussgnug, J. H., Posten, C., Kruse, O., and Hankamer, B. (2008). Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *Bioenerg. Res.*, 1(1): 20–43.
- Seckbach, J. and Oren, A. (2007). Oxygenic photosynthetic microorganisms in extreme environments. In Seckbach, J., editor, *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments*, volume 11 of *Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*, pages 3–25. Springer Netherlands.

- Sheehan, J. J. (2009). Biofuels and the conundrum of sustainability. *Curr. Opin. Biotech.*, 20(3): 318–324.
- Simionato, D., Sforza, E., Carpinelli, E. C., Bertucco, A., Giacometti, G. M., and Morosinotto, T. (2011). Acclimation of *Nannochloropsis gaditana* to different illumination regimes: Effects on lipids accumulation. *Bioresource Technol.*, 102(10): 6026–6032.
- Solovchenko, A. (2012). Physiological role of neutral lipid accumulation in eukaryotic microalgae under stresses. *Russ. J. Plant. Physiol.*, 59: 167–176. 10.1134/S1021443712020161.
- Solovchenko, A. E., Chivkunova, O. B., and Maslova, I. P. (2011). Pigment composition, optical properties, and resistance to photodamage of the microalga *Haematococcus pluvialis* cultivated under high light. *Russ. J. Plant. Physiol.*, 58(1): 9–17.
- Solovchenko, A. E., Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Cohen, Z., and Merzlyak, M. N. (2008). Effects of light and nitrogen starvation on the content and composition of carotenoids of the green microalga *Parietochloris incisa*. *Russ. J. Plant. Physiol.*, 55(4): 455–462.
- Stange, C. and Flores, C. (2012). Carotenoids and photosynthesis - regulation of carotenoid biosynthesis by photoreceptors. In Najafpour, M. M., editor, *Advances in Photosynthesis: Fundamental aspects*, pages 77–96. InTech, Croatia.
- Stephens, E., Ross, I. L., Mussgnug, J. H., Wagner, L. D., Borowitzka, M. A., Posten, C., Kruse, O., and Hankamer, B. (2010). Future prospects of microalgal biofuel production systems. *Trends Plant Sci.*, 15(10): 554 – 564.
- Taiz, L. and Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 5 edition.
- Trainor, F. R. (1998). *Biological aspects of Scenedesmus (Chlorophyceae) - phenotypic plasticity*, volume 117 of *Nova Hedwigia*. J. Cramer, Berlin.
- Tripathy, B. C. and Pattanayak, G. K. (2012). Chlorophyll biosynthesis in higher plants. In Eaton-Rye, J. J., Tripathy, B. C., and Sharkey, T. D., editors, *Photosynthesis*, volume 34 of *Advances in Photosynthesis and Respiration*, pages 63–94. Springer Netherlands.
- Vass, I. (2012). Molecular mechanisms of photodamage in the photosystem ii complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1817(1): 209 – 217. <ce:title>Photosystem II</ce:title>.
- Vieira Costa, J. A. and de Moraes, M. G. (2011). The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. *Bioresource Technol.*, 102(1, SI): 2–9.

- Wellburn, A. (1994). The spectral determination of chlorophyll *a* and chlorophyll *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.*, 144(3): 307–313.
- White, S., Anandraj, A., and Bux, F. (2011). PAM fluorometry as a tool to assess microalgal nutrient stress and monitor cellular neutral lipids. *Bioresource Technol.*, 102(2): 1675 – 1682.
- Wohlgemuth, N. and Missfeldt, F. (2000). The Kyoto mechanisms and the prospects for renewable energy technologies. *Sol. Energy*, 69(4): 305–314.
- Yao, R. L. and Wang, Y. (2012). Optimum $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ supply develops salt tolerance in NaCl-stressed *Cyclocarya paliurus* seedlings. *Hort. Environ. Biotechnol.*, 53(1): 20–23.
- Yocum, C. F. (2008). The calcium and chloride requirements of the O-2 evolving complex. *Coordin. Chem. Rev.*, 252(3-4): 296–305.
- Young, E. and Beardall, J. (2003). Photosynthetic function in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyta) during a nitrogen starvation and recovery cycle. *J. Phycol.*, 39(5): 897–905.
- Zhao, G., Yu, J., Jiang, F., Zhang, X., and Tan, T. (2012). The effect of different trophic modes on lipid accumulation of *scenedesmus quadricauda*. *Bioresource Technol.*, 114: 466 – 471.
- Zidansek, A., Blinc, R., Jeglic, A., Kabashi, S., Bekteshi, S., and Slaus, I. (2009). Climate changes, biofuels and the sustainable future. *Int. J. Hydrogen Energ.*, 34(16): 6980–6995. 4th Dubrovnik Conference on Sustainable Development of Energy, Water and Environment Systems, Dubrovnik, CROATIA, APR, 2007.