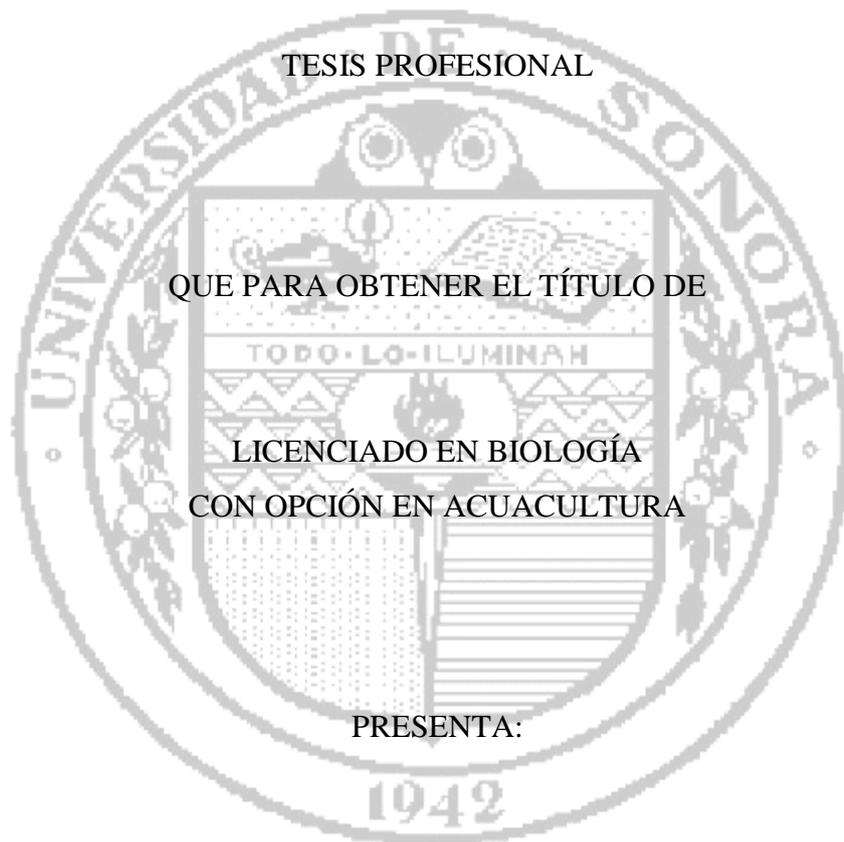


# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

AISLAMIENTO DE MICROALGAS DE LA COSTA DE SONORA PRODUCTORAS DE  
ACEITE EN DOS MEDIOS DE CULTIVO CON USO POTENCIAL DE BIODIESEL



TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

CON OPCIÓN EN ACUACULTURA

PRESENTA:

ESTHER CAROLINA ORTEGA MONTAÑO

Hermosillo, Sonora

Marzo de 2013.

# Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## FORMATO DE APROBACIÓN

Los miembros del Comité de Tesis designado para revisar la Tesis de **Esther Carolina Ortega Montaña** la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito para obtener el Título de Licenciado en Biología con Opción en Acuicultura.



---

Dr. José Antonio López Elías

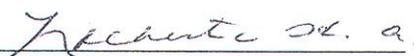
Director de Tesis



---

M.C. Fernando Enríquez Ocaña

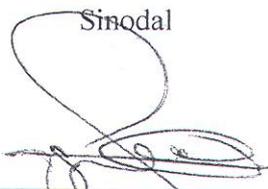
Sinodal Secretario



---

M.C. Nolberta Huerta Aldaz

Sinodal



---

Biol. Norberto Miguel Ángel Pastén Miranda

Suplente

## DEDICATORIA

A mi madre **Imelda** por ser mi ejemplo a seguir, todo logro sea grande o pequeño siempre va dedicado a ella.

A los dos hombres más importantes en mi vida, mi padre **Antonio**<sup>†</sup> y mi abuelo **Miguel Angel**.<sup>†</sup>

*“That is the essence of science: ask an impertinent question, and you are on the way to the pertinent answer”* **Jacob Bronowski: The Ascent of Man.**

## AGRADECIMIENTOS

Al **Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS)**, por la creación de la **Licenciatura en Biología**.

A mi director de tesis el **Dr. José Antonio López Elías** por la confianza depositada en mí, por permitirme aprender y trabajar a su lado, por las ideas compartidas y sus buenos consejos, por demostrarme que tanto en la ciencia como en la vida no siempre es necesario seguir un patrón de pensamiento preestablecido.

Agradezco enormemente a los miembros de mi comité. **MC. Fernando Enríquez Ocaña, MC. Nolberta Huerta Aldaz y Biol. Norberto Miguel Ángel Pastén Miranda**, por sus recomendaciones, correcciones y apreciable contribución con este trabajo.

A mi gran amiga, la **M.C Diana Fimbres**, por estar conmigo, brindarme siempre su apoyo y conocimientos cuando yo no tenía ni idea de lo que hacía. Muchas gracias por tu ayuda y tu paciencia, te admiro mucho dianita.

Gracias a los maestros del Laboratorio de acuicultura **Álvaro Murguía López y Lauro Mercado Castillo** por ayudarme y resolver mis dudas cada vez que lo necesité, por hacer más amenas esas horas de trabajo y por su agradable compañía en los momentos de relax.

A mi amiga y colega **Cristina Tejada**, quien me apoyó y acompañó en todo momento durante la carrera, gracias por compartir conmigo esos momentos de desesperación, aventuras y carcajadas.

A todos mis **amigos** y compañeros de la **Licenciatura en Biología**, especialmente a mis **biologuitos: Daniela y Sergio**.

Infinitas gracias a mi **madre** la persona más importante en mi vida, mi mejor amiga, consejera y confidente. Porque su fe en mi es incondicional y no tiene límites, gracias por ser el pilar fundamental en todo lo que soy.

A mi hermano **Miguel**, mi cuñada **Blanca** y a mis sobrinas **Giuliana y Valeria**, las dos grandes alegrías de mi vida.

A toda mi **familia** por haberme apoyado en todo momento, por sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada por su amor. Mi abuela **Gerónima**; mis tías **Josefina, Carmen y Margarita**; mis primos y primas. A mi tío **Guillermo** por su apoyo y confianza, por estar siempre ahí para mí.

A todas aquellas personas que hicieron posible la realización de este trabajo y que de alguna manera a lo largo de los años me pusieron en el camino correcto para dedicarme a lo que amo.

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMEN	ix
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES</b>	<b>3</b>
II.1. Características y aplicaciones de las microalgas	3
II.2. Diesel y biodiesel	4
II.3. Fuentes de biodiesel	5
II.4. Fitoplancton y lípidos	6
II.5. Fitoplancton para la producción de biodiesel	7
II.6. Sistemas de cultivo de las microalgas	8
II.7. Investigaciones realizadas con las microalgas para la producción de biodiesel	11
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>13</b>
<b>IV. HIPÓTESIS</b>	<b>14</b>
<b>V. OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
IV.1. Objetivo general	15
IV.1.1. Objetivos específicos	15
<b>VI. METODOLOGÍA</b>	<b>16</b>
VI.1. Aislamiento de microalgas	16
VI.2. Diseño experimental	16
VI.3. Monitoreo de variables fisicoquímicas	17
VI.4. Determinación de la concentración celular	18
VI.5. Determinación de biomasa	18
VI.6. Extracción de lípidos	19
VI.7. Determinación de lípidos	19
VI.8. Tratamiento estadístico	20
<b>VII. RESULTADOS</b>	<b>21</b>
VII.1. Parámetros fisicoquímicos	21
VII.2. Concentración celular	21
VII.3. Determinación de biomasa	24

VII.4. Contenido de lípidos totales	25
<b>VIII. DISCUSIÓN</b>	27
VIII.1. Variables fisicoquímicas	27
VIII.1.1. Temperatura	27
VIII.1.2. Salinidad	27
VIII.1.3. pH	28
VIII.2. Concentración celular	29
VIII.3. Biomasa seca	29
VII.4. Producción de lípidos	30
<b>IX. CONCLUSIONES</b>	31
<b>X. RECOMENDACIONES</b>	32
<b>XI. LITERATURA CITADA</b>	33
<b>XII. ANEXOS</b>	39

## LISTA DE TABLAS

		<b>Página</b>
Tabla I.	Contenido de lípidos de diversas especies de microalgas (Chisti, 2007).	7
Tabla II.	Soluciones madre para preparar el medio de cultivo f/2 (Guillard y Ryther, 1962).	17
Tabla III.	Concentración celular final promedio, tasa de crecimiento máxima promedio y acumulada de <i>Aphanocapsa</i> sp. en los medios de cultivo f/2 y f/2 modificado con urea.	23
Tabla IV.	Variación promedio del pH en los cultivos de las microalgas <i>Aphanocapsa</i> sp. (a) y <i>Oscillatoria</i> sp. (b).	25
Tabla V.	Contenido de lípidos totales en mg/L y porcentaje total de lípidos de <i>Aphanocapsa</i> sp. y <i>Oscillatoria</i> sp. en los medios de cultivo f/2 y f/2 modificado con urea.	26

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1. Cultivo estático a nivel matraz de 1 L de cianobacteria marina.	9
Figura 2. Sistema semi-continuo en garrafones de 20 L con diatomea marina.	10
Figura 3. Variación del pH promedio en los cultivos de las microalgas <i>Aphanocapsa</i> sp. (a) y <i>Oscillatoria</i> sp. (b) en los medios f/2 y f/2 modificado con urea.	22
Figura 4. Concentraciones celulares diarias de <i>Aphanocapsa</i> sp. en los medios de cultivo f/2 y f/2 modificado con urea.	23
Figura 5. Concentración de biomasa diaria de <i>Oscillatoria</i> sp. en los dos medios de cultivo.	24

## RESUMEN

El aumento de la demanda energética en el mundo y el acelerado agotamiento de los combustibles fósiles han hecho necesarias las investigaciones dedicadas al desarrollo de fuentes de energía renovables y amigables con el medio ambiente, la mejor alternativa hasta la fecha son los biocombustibles a partir del aceite de diversas materias primas.

Las microalgas son consideradas como una materia prima adecuada para la elaboración de biodiesel debido a varios factores entre ellos está su alto contenido lipídico, son capaces de fijar el CO<sub>2</sub> del medio ambiente, poseen una tasa de reproducción muy acelerada y que pueden crecer un amplio rango de temperatura, pH y disponibilidad de nutrientes, por lo que en esta investigación se aislaron dos especies de microalgas de la zona costera de Sonora, *Aphanocapsa* sp. y *Oscillatoria* sp. las cuales se cultivaron en dos medios de cultivo con diferente fuente de nitrógeno (urea y nitrato de sodio) para posteriormente determinar la cantidad de lípidos producido por estas microalgas y analizar su potencial uso para producción de biodiesel.

La concentración de biomasa más elevada para *Aphanocapsa* sp se registró en el medio con urea con 164.335 mg/L en promedio, mientras que en el caso de *Oscillatoria* sp. fue en el medio f/2 con 152.778 mg/L.

La mayor concentración de lípidos totales se encontraron en el medio modificado con urea para ambas especies de microalgas, con 19.81% para *Aphanocapsa* sp. y 22.73% para *Oscillatoria* sp.

En base a los resultados obtenidos en esta investigación se puede afirmar que para estas dos especies de microalgas, en el medio modificado con urea se genera la cantidad más elevada de lípidos totales, también es posible considerar a estas especies de cianobacterias con suficiente potencial para su uso como biocombustible.

## I. INTRODUCCIÓN

El cambio climático es una de las problemáticas más importantes a la que nos enfrentamos en la actualidad, debido principalmente a la sobreexplotación de los recursos naturales no renovables y al uso desmedido de combustibles fósiles. Entre los efectos más severos encontrados tenemos el continuo aumento de gases de efecto invernadero que provocan la elevación de la temperatura del aire y de los océanos, el deshielo de los glaciares, desestabilización de las precipitaciones pluviales, eventos climáticos extremos, entre otros (Loera-Quezada y Olgún, 2010).

Por lo tanto, desde hace varios años muchas de las investigaciones se han dedicado al desarrollo de fuentes de energía renovables y amigables con el medio ambiente que puedan remplazar el consumo parcial o total de petrodiesel, la mejor alternativa hasta la fecha son los biocombustibles (Stratta, 2000; Barraza et al., 2009). En la actualidad, los biocombustibles en los que se ha invertido más recursos y esfuerzo en su desarrollo son el etanol obtenido de la caña de azúcar y del maíz, así como el biodiesel a partir de oleaginosas como soya, canola, girasol, ajonjolí y palma (Calvo, 2006); sin embargo, la producción de biocombustibles en base a dichas materias primas no se considera sustentable a largo plazo, debido a que requieren enormes cantidades de agua dulce y de tierra fértil como cualquier cultivo agrícola. Al final la conversión de pastos y tierras de reserva para la producción de agrocombustibles liberará mucho más carbono del que se puede evitar con el uso de combustibles alternativos (Lobato, 2009).

Las microalgas, en cambio, son consideradas como una materia prima adecuada para la elaboración de biodiesel debido principalmente a su alto contenido lipídico superior al de muchas plantas oleaginosas (Chisti, 2007). Entre otras de las ventajas tenemos que estos microorganismos marinos no requieren de grandes volúmenes de agua dulce para su cultivo; pueden crecer en un amplio rango de temperaturas, pH y disponibilidad de nutrientes; contribuyen a la fijación del CO<sub>2</sub> del medio ambiente; su crecimiento es independiente de la estacionalidad y de la fertilidad del suelo; su biodiversidad es enorme y sus tasas de reproducción sumamente elevadas (Patil et al., 2008; Schenk et al., 2008).

Actualmente se cuentan con un sin número de investigaciones que se han realizado en todo el mundo relacionadas a la producción de biodiesel a partir de microalgas como *Dunaliella*, *Chlorella*, *Nannochloropsis*, *Nannochloris*, *Botryococcus*, entre otras (Arredondo y Vázquez-Duhalt, 1991) y diariamente se obtiene información nueva. En el

laboratorio muchas especies de microalgas son capaces de aumentar su velocidad de crecimiento y reproducción, así como producir altas cantidades de lípidos si son sometidas a condiciones de estrés tales como el aumento de la temperatura o la limitación y/o modificación de los nutrientes en su medio (Darley, 1987).

La elección de la especie es el paso más importante en la elaboración de biodiesel a partir de microalgas pues es el primer eslabón de la cadena en todo este proceso. México es un país con condiciones climáticas y ambientales muy variadas, por lo que es importante que las investigaciones actuales en este tema se dirijan hacia la selección de las mejores cepas capaces de desarrollarse en dichos ambientes y al establecimiento de estrategias de cultivo eficaces que hagan posible la obtención de una mayor biomasa con altas cantidades de lípidos por célula.

Por tal razón, esta investigación está enfocada al aislamiento de microalgas endémicas de la costa de Sonora y su posterior cultivo bajo condiciones de laboratorio, utilizando el medio f/2 (Guillard y Rhyter, 1962) y el medio f/2 modificado en el que se emplea la urea como fuente de nitrógeno, así como la determinación de su contenido oleaginoso con la finalidad de evaluar su potencial para la producción de biodiesel.

## II. ANTECEDENTES

### II.1. Características y Aplicaciones de las Microalgas

Las microalgas son organismos fotosintéticos no vasculares que contienen clorofila a y poseen estructuras reproductoras simples (Trainor, 1978). Son los organismos más diversos en cuanto a su tamaño, forma y función ecológica; pueden formar colonias o cadenas aunque por lo general se encuentran de manera unicelular. Forman parte de la cadena trófica como los productores primarios de los océanos y determinan la productividad para todas las comunidades (Andersen, 2005).

Existen en casi todos los hábitats pero la mayoría pertenecen a hábitats acuáticos (marinos y dulceacuícolas), aunque algunas crecen en superficies húmedas como suelo, rocas y en la corteza de los árboles (McClintock y Baker, 2001). Actualmente se conocen más de 40 000 especies descritas, aunque se estima que el número total de especies de microalgas existentes en el planeta debe superar las 300 000 (Dawes, 1991; Garibay-Hernández et al., 2009).

La composición química de las microalgas es muy variada, ya que depende de la especie, las condiciones ambientales y de cultivo, la fase de crecimiento, la calidad del agua, entre otros factores (Chisti, 2007; Khoeyi et al., 2011). La biomasa de una microalga promedio está constituida aproximadamente por 40-50% de proteínas, 20-30% de lípidos, y el resto dividido entre los carbohidratos y otros compuestos (Borowitzka, 1988).

Estos organismos contienen grandes cantidades de pigmentos esenciales que transforman en compuestos complejos mediante el proceso de fotosíntesis; al mismo tiempo regulan los niveles de CO<sub>2</sub> de la atmósfera produciendo aproximadamente el 40 al 50% del Oxígeno atmosférico y ayudando así a controlar los gases invernadero y el deterioro de la capa de ozono (Benneman, 1977; Chisti, 2007). Además se ha demostrado que son organismos muy útiles para la biorremediación de aguas contaminadas con metales pesados, cantidades elevadas de nitrógeno y otras partículas (Ferrera et al., 2006).

Es incuestionable la relevancia económica de las microalgas debido a la alta gama de componentes nutricionales que poseen, desde hace varias décadas se utilizan en la acuicultura como alimento vivo para especies de moluscos, peces y crustáceos de gran

interés comercial; también para la alimentación de especies como rotíferos, *Artemia* y copépodos (Castro-Barrera et al., 2003).

Recientemente la industria química ha demostrado gran interés en estos organismos para la producción de vitaminas, proteínas y suplementos nutricionales; además de la obtención de compuestos como polisacáridos, lípidos, pigmentos, esteroides, enzimas, antibióticos, entre otros (Olvera-Ramírez et al., 2000) y desde hace pocos años utiliza la biomasa microalgal rica en aceites para la elaboración de biocombustibles.

## **II.2. Diesel y Biodiesel**

La energía es un factor indispensable para el desarrollo de los países, sin embargo el sistema energético mundial está basado en el petróleo y sus derivados lo que no es sostenible a largo plazo debido principalmente a los impactos ambientales que genera, la desigualdad en su distribución y el alza de los precios.

Esta fuente de energía no renovable ya da señales de su agotamiento en gran parte de las reservas mundiales y su demanda va en aumento de forma acelerada al mismo tiempo que se incrementa la población y crecen las ciudades; se estima que la tasa de caída anual en cuanto a producción corresponde a un 5% lo que indica que a este paso terminaría por agotarse dentro de aproximadamente 60 años (Ballenilla, 2004; Chisti, 2007).

El biodiesel es un combustible renovable que se deriva de lípidos naturales como las grasas animales o los aceites vegetales a través de un proceso de transesterificación. Es una fuente de energía limpia, de calidad y económicamente viable, que además contribuye a la conservación del medio ambiente, por lo que representa una alternativa para sustituir parcial o totalmente al diesel fósil (Chisti, 2007).

El uso del biodiesel ofrece un gran número de ventajas tanto al medio ambiente como a los vehículos por ser biodegradable, menos inflamable en comparación al diesel y no posee partículas contaminantes como el azufre lo que disminuye las emisiones de gases de efecto invernadero a la atmósfera.

De igual manera existen inconvenientes ya que su poder calórico es menor al del petrodiesel lo que exige un mayor consumo y disminuye la potencia de los vehículos, presenta una mayor viscosidad que ocasiona que a temperaturas muy bajas se produzcan obstrucciones en los motores y si se utiliza en estado puro disuelve empaques de ciertas partes del motor por lo que se deben realizar modificaciones para evitar fugas (Barraza et

al., 2009; Toledo, 2009).

### **II.3. Fuentes de Biodiesel**

La primera fuente de aceite utilizada para elaborar biodiesel fue la grasa animal, especialmente la de animales de granja como la grasa de vaca, cerdo y gallina. Sin embargo, debido a la poca productividad, la purificación del aceite y la baja calidad del biodiesel obtenido es muy poco recomendable su uso.

Las materias primas más utilizadas para la producción de biodiesel han sido los aceites vegetales provenientes de los cultivos de plantas oleaginosas que son cultivadas para el consumo humano, la variedad de semillas que se pueden utilizar es enorme. La producción de biodiesel de la Unión Europea proviene casi en su totalidad del aceite de canola en los países del norte y del aceite de girasol en la zona del mediterráneo, mientras que en Estados Unidos su principal fuente es el aceite de Soya. En los países tropicales y subtropicales se obtiene del aceite de palma y semillas como el coco, maíz, cacahuete, entre otras (Lascarro, 2005).

Se ha puesto en duda la utilización de estas las plantas como materia prima principal para la producción de biodiesel debido a ciertos inconvenientes, entre los que destacan los largos períodos de producción que necesitan para alcanzar un tamaño apropiado de cosecha, además dependen bastante de las condiciones climáticas y la ubicación geográfica; a pesar de ser plantas oleaginosas el rendimiento lipídico de éstas oscila entre el 3 y 5 % del total pues por lo general sólo la semilla es la que contiene los aceites; requieren grandes terrenos fértiles para su cultivo y enormes cantidades de agua dulce para su riego, además de la utilización de fertilizantes.

El aceite de reuso tanto animal como vegetal es una de las alternativas más conocidas, es la materia prima más barata pues no se requiere un proceso de extracción de aceite, simplemente se utiliza un sistema de recolección, purificación y su transformación a biodiesel (Zhang et al., 2005). Por lo general los aceites residuales provenientes de las industrias, negocios de comida y de los hogares son vertidos directamente en los desagües contaminando el agua y causando problemas para su depuración, pero su utilización para elaborar biocombustibles resolvería ese problema. Aunque la calidad y cantidad del biodiesel que se obtiene de estos aceites varía mucho, es una excelente alternativa que se implementa desde hace algunos años en varios países (Hanna et al., 2005).

Además de los cultivos vegetales convencionales actualmente se investiga bastante sobre la utilización de cultivos marginales para la extracción de aceites. Son plantas que no se consumen como alimento y se caracterizan por tener semillas con altas cantidades de lípidos, son pluri-anales con períodos de cosecha relativamente cortos, no requieren grandes cantidades de agua dulce, crecen en terrenos poco fértiles en los que no crece prácticamente ninguna otra planta y son resistentes a variaciones climáticas. Entre las especies más conocidas se encuentran *Jatropha curcas*, *Vernicia fordii*, *Ricinus communis*, *Calophyllum inophyllum*, entre otras (Berchmans y Shizuko, 2008).

Sin embargo, todas estas fuentes de aceite no son suficientes para satisfacer la demanda mundial de combustible por lo que se siguen buscando nuevas alternativas, entre las más prometedoras se encuentran las algas, bacterias y en especial las microalgas (Knothe et al., 1997).

#### **II.4. Fitoplancton y Lípidos**

El contenido lipídico en las microalgas varía bastante entre las distintas especies (Tabla I), por lo general se mantiene entre el 20-50% del total de la biomasa seca aunque existen microalgas oleaginosas en las que se ha encontrado hasta un 80% de aceite (Chisti, 2007).

Los triglicéridos son los lípidos más abundantes en la microalga llegando a constituir hasta el 80% del total de la fracción lipídica total pues actúan como fuente y reserva de energía en la división celular, mantenimiento de la membrana y otras funciones fisiológicas importantes; se acumulan principalmente durante la fase estacionaria en forma de gotitas de aceite en el citoplasma. La otra clase de lípidos presentes en las microalgas son en su mayoría fosfolípidos que forman parte de la membrana celular y son acumulados durante la fase exponencial del crecimiento microalgal (Darley, 1987; Hu et al., 2008).

La cantidad total de ácidos grasos en la microalga es específica para cada especie, y también está ligada a ciertas condiciones como la intensidad de la luz, la salinidad, el pH, la temperatura, la concentración de nitrógeno y otros nutrientes en el medio de cultivo (Darley, 1987; Álvarez y Lechado, 1989). Sin embargo, si se modifica o limita alguno de estos parámetros el alga reacciona al estrés acumulando grandes cantidades de compuestos que necesite (Odum, 1971; Rodolfi et al., 2009).

Un ejemplo de esto, ocurre al disminuir las cantidades de nutrientes como el nitrógeno en el medio de cultivo lo que limita la capacidad de crecimiento de las microalgas e imposibilita la síntesis de proteínas, pero en algunas especies provoca que se produzca un aumento del contenido lipídico en poco tiempo para evitar el estrés oxidativo (Schneider y Roessler, 1994).

**Tabla I.** Contenido de lípidos de diversas especies de microalgas (Chisti, 2007).

Especies	Contenido de aceite (%)
<i>Botryococcus braunii</i>	25–75
<i>Chlorella</i> sp.	28–32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca</i> sp.	16–37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis</i> sp.	25–33
<i>Monallanthus salina</i>	20
<i>Nannochloris</i> sp.	20–35
<i>Nannochloropsis</i> sp.	31–68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35–54
<i>Nitzschia</i> sp.	45–47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20–30
<i>Schizochytrium</i> sp.	50–77
<i>Tetraselmis suecica</i>	15-23

## II.5. Fitoplancton para la Producción de Biodiesel

Fue a principios de los 70's cuando la crisis del petróleo se hizo evidente y se elevaron los costos de la energía, se comenzó a desarrollar una tecnología para la obtención de combustibles a partir de fuentes biológicas renovables. A mediados de esa década los

investigadores demostraron interés en el fitoplancton como una posible materia prima de buena calidad y una posible solución a la crisis energética a futuro; lamentablemente los altos costos de los procesos para transformar la biomasa microalgal en biocombustibles y las limitaciones de las investigaciones de esa época desalentaron el desarrollo comercial de esta alternativa. Sin embargo los estudios continuaron durante la década de los 80 hasta la actualidad y los resultados obtenidos han permitido contemplar esta materia prima como algo factible a gran escala superando a los cultivos tradicionales (Li, 2008).

A diferencia de los cultivos de plantas tradicionales, los cultivos microalgales a gran escala son más simples y baratos, se usan microalgas marinas que no requieren agua dulce y pueden cultivarse todo el año, con cosechas constantes en cuestión de días debido a su crecimiento exponencial. No necesitan grandes terrenos fértiles porque son fácilmente cultivables en estanques, fotobiorreactores y tanques que se pueden adecuar en zonas no utilizadas. Sólo requieren de una fuente de luz ya sea natural o artificial, nutrientes de fácil disponibilidad y una fuente de carbono como el CO<sub>2</sub>, no necesitan de herbicidas ni pesticidas; se pueden cultivar en ambientes diversos porque son capaces de sintetizar gran variedad de compuestos y toleran bastantes cambios en sus parámetros fisicoquímicos. Muchas de las especies tienen un contenido lipídico muy elevado superando con creces el de las plantas oleaginosas y mediante ciertos cambios en las concentraciones de los nutrientes del medio se puede aumentar la cantidad de aceites que generan (Arredondo y Vázquez-Duhalt, 1991; Barraza *et al.*, 2009; Deng *et al.*, 2009; Garibay-Hernández *et al.*, 2009).

## **II.6. Sistemas de Cultivo de las Microalgas**

Los sistemas de cultivo para microalgas son muy diversos y de éstos depende en gran parte la calidad del cultivo que se obtiene. Los recipientes de cultivo se han diversificado con el tiempo, son usados tubos y matraces de distintos volúmenes o garrafones para cultivos pequeños; para cultivos a gran escala se utilizan estanques, bolsas, tanques, raceways, fotobiorreactores, tanto al interior como al exterior. Las características de la especie y los resultados que se desean obtener son factores a considerar para seleccionar el sistema de cultivo apropiado (López-Elías *et al.*, 1993).

De acuerdo a la forma de cosechar los cultivos, éstos pueden ser sistemas batch, semicontinuos y continuos (Vonshak, 1988), de los cuales el sistema batch es el más

utilizado para los cultivos de microalgas. Los cultivos batch o estáticos son intermitentes, se cosechan en su totalidad una sola vez cuando las microalgas entran a la fase exponencial y la concentración celular alcance el nivel apropiado (Figura 1). Los cultivos semicontinuos son aquellos es los que se realizan cosechas parciales del total del volumen cada cierto tiempo y se renueva el equivalente cosechado con medio de cultivo fresco (Figura 2) (Richmond, 2004).

En 1970 Kubitschek definió al cultivo continuo como un sistema de flujo en el cual las células individuales están suspendidas en un volumen constante en un estado de equilibrio dinámico, establecido por una remoción de cultivo y adición de medio nutritivo por unidad de tiempo con tendencia al infinito. El cultivo continuo y el semicontinuo son prácticamente iguales, la diferencia estriba en que el primero presenta una mayor cantidad y constancia de los períodos de cosechas parciales de cultivo y adición del nuevo medio enriquecido, lo que asegura una producción constante de microalgas por más tiempo y una mejor calidad (Andersen, 2005).



**Figura 1.** Cultivo estático a nivel matraz de 1 L de cianobacteria marina



**Figura 2.** Sistema semi-continuo en garrafones de 20 L con diatomea marina.

## II.7. Investigaciones Realizadas con Microalgas para Producción de Biodiesel

Con la necesidad inmediata de implementar nuevas fuentes de energía renovables, cada día se obtiene nueva información acerca de potenciales especies de microalgas que sirven como fuente de biomasa para la elaboración de combustibles, los sistemas de cultivo y técnicas que generan mayor rendimiento lipídico.

Estudios previos afirman que la luz, la salinidad, la fuente y concentración de nutrientes son en gran parte los que determinan la cantidad de aceites producidos por algunas microalgas. Herrera-Valencia et al. (2011) reportaron con su investigación que para *Chlorella saccharophila* la concentración de lípidos aumentó al disminuir los niveles de nitrógeno y la salinidad del cultivo.

En otra investigación se evaluó el efecto de la intensidad luminosa en el contenido de lípidos del cultivo de la microalga *Dunaliella tertiolecta* (Tang et al., 2010), y se encontró que el aumento de la intensidad y período de luz tienen un efecto significativo en esta especie elevando la concentración de lípidos.

Por otro lado, Lee et al. (2010) llevaron a cabo un experimental en el que utilizaron cinco especies de microalgas marinas para evaluarlas como recursos en la producción de combustibles. Las especies utilizadas fueron *Tetraselmis suecica*, *Phaeodactylum tricorutum*, *Chaetoceros calcitrans*, *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oculata*; todos los cultivos se realizaron en fotobioreactores cilíndricos con capacidad de 15 L, el medio utilizado fue el f/2, la intensidad luminosa fue de  $36.3 \text{ } \mu\text{mol/m}^2/\text{segundo}$  y la temperatura se mantuvo a 20 °C. Los resultados mostraron que *T. suecica*, *I. galbana* y *N. oculata* obtuvieron los pesos más altos (peso seco) con 0.58, 0.57 y 0.57 g/L, respectivamente. El período de cultivo más corto fue el de *T. suecica* que alcanzó la fase estacionaria en 9 días, mientras que el período más largo fue el de *N. oculata* con 28 días. El contenido más alto de aceite se observó en *P. tricorutum* con 25.31% en el total de peso seco, seguido de *I. galbana* con 23.51%. Los resultados encontrados indican que las cepas con más potencial fueron *T. suecica* e *I. galbana*.

Pérsico et al. (2011) realizaron cultivos masivos de *Nannochloropsis oculata* en un módulo de producción sencillo al exterior y en invernadero, utilizaron tanques circulares y rectangulares de 1500 L, con luz solar y temperaturas impuestas por el ambiente durante las cuatro estaciones del año, además de salinidad y pH controlado adecuado para la especie. El experimental tuvo como finalidad el establecer un procedimiento básico de cultivo masivo con esta microalga que permitiera una productividad alta y usar la biomasa

para biocombustibles. Mediante monitoreos diarios y determinación de la densidad celular durante un año concluyeron que es en primavera donde se consigue la máxima productividad tanto al exterior como al interior, mientras que en verano las densidades son muy bajas. Además se evidenció que los tanques rectangulares produjeron densidades celulares de entre 15 y 20 % más que la de los tanques circulares.

Con el fin de evaluar la producción de lípidos Weldy y Hesmann (2007) trabajaron con la especie halófila *Dunaliella salina*, cultivaron a la microalga en fotobioreactores a alta y baja intensidad luminosa, así como niveles suficientes y deficientes de nitrógeno en el medio. Los resultados obtenidos mostraron que *D. salina* es capaz de producir una gran cantidad de aceite, pues se encontró que el contenido de éstos en las células estuvo entre el 16 a 44%, la concentración máxima de lípidos en el cultivo fue de 450 mg/L lo que corresponde a una producción de 46 mg/L de lípidos al día.

### III. JUSTIFICACIÓN

Una alternativa necesaria dentro de la producción de combustibles es la de los biocombustibles, dado que el consumo ha ido aumentando a nivel internacional y se prevee un desabasto de los combustibles fósiles, como lo es el diesel. Es por ello que se tienen contempladas otras opciones, como son los biocombustibles de biomasa vegetal o biomasa no convencional como las microalgas. En el ámbito del cultivo de las microalgas con fines industriales se tienen algunas especies que se están empleando para producir compuestos bioactivos (proteínas, aceites, pigmentos y otros), así como el biodiesel.

A partir del 2000 se inician los trabajos con microalgas de uso rutinario, como fuentes productoras de aceites para elaboración de biodiesel (Hu et al., 2008; Deng et al., 2009; Garibay-Hernández et al., 2009; Tange et al., 2010), sin embargo para que esta fuente de biocombustible sea viable en nuestra región es necesario trabajar con especies de microalgas que estén adaptadas a las condiciones climáticas de nuestra región principalmente a las elevadas temperaturas, es por ello que es importante detectar especies productoras de lípidos que sean obtenidas en las costas de Sonora.

#### **IV. HIPÓTESIS**

Las condiciones climáticas, disponibilidad de nutrientes y biodiversidad en las aguas del Mar de Cortés, tienen un efecto en la proliferación de especies microalgales resistentes y diferentes a las de otras regiones. Por lo tanto, es posible encontrar y aislar especies de microalgas en las aguas de las Costas de Sonora que sean capaces de generar altas cantidades de lípidos con potencial uso para la elaboración de biodiesel, si se cultivan en medios con diferentes fuentes de nitrógeno bajo condiciones de laboratorio.

## **V. OBJETIVOS**

### **V.1. Objetivo General**

Aislar especies de microalgas marinas y evaluar el crecimiento, biomasa y producción de lípidos en condiciones controladas de laboratorio en dos medios de cultivo.

### **V.2. Objetivos Específicos**

- Aislar especies de microalgas de la región.
- Evaluar el crecimiento y producción de biomasa de las microalgas a nivel de laboratorio en dos medios de cultivo (f/2 y f/2 modificado con urea).
- Determinar la producción de lípidos de las microalgas en un sistema estático en los dos medios de cultivo (f/2 y f/2 modificado con urea).

## **VI. METODOLOGÍA**

### **VI.1. Aislamiento de Microalgas Marinas**

En esta investigación se aislaron 4 especies de microalgas, dos especies de *Nitzschia* y dos especies diferentes de cianobacterias. Sin embargo, se eligió trabajar con las especies de cianobacterias marinas pues se consideró que debido a sus características fisiológicas se podrían obtener producciones de biomasa elevadas. La primera, una cepa de *Oscillatoria* sp. que fue aislada por investigadores del CESUES Unidad Navojoa en el municipio de Huatabampito y donada al cepario del Departamento de Investigaciones científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora. La segunda cianobacteria *Aphanocapsa* sp. fue aislada mediante los métodos de pipeta capilar y de dilución seriada (Andersen, 2005) a partir de una muestra de agua tomada en Bahía de Kino, Sonora.

### **VI.2. Diseño Experimental**

Las microalgas *Aphanocapsa* sp. y *Oscillatoria* sp. se cultivaron en dos medios de cultivo con diferente fuente de nitrógeno: el f/2 de Guillard y Ryther (1962) que contiene nitrato de sodio (Tabla II) y el f/2 modificado en el que se remplazaron los nitratos por urea (26.4 g/L).

Fueron cultivadas por cuadruplicado en cada medio, durante 10 días, en matraces Erlenmeyer de 1 L de capacidad con 800 mL de medio de cultivo. Los cultivos se realizaron en laboratorio, con un sistema de cultivo estático escalonado que inició en tubos con 15 mL de medio, posteriormente en matraces de 250 mL y finalmente en matraces de 1 L.

**Tabla II.** Soluciones madre para preparar el medio de cultivo f/2 (Guillard y Ryther, 1962).

Constituyentes	Cantidad
Nutrientes mayores	g/L de agua destilada
Nitrato de sodio, granulado y refinado	75
Fosfato de sodio monobásico	5
Silicato de sodio metasoluble	30
Metales traza	g/100 mL de agua destilada
<u>Solución primaria</u>	
Sulfato cúprico, cristales finos	0.98
Sulfato de zinc, cristales finos	2.2
Cloruro de cobalto, cristales finos	1.0
Cloruro manganoso, cristales finos	18.0
Molibdato de sodio, cristales finos	0.63
<u>Solución secundaria</u>	g/L de agua destilada
Cloruro férrico	3.15
EDTA disódico	4.36
Metales traza o alternativamente	1 mL de c/u de las sol. 2.1.1. a 2.1.5.
EDTA férrico	5.0
Metales traza	1 mL de c/u de las sol. 2.1.1. a 2.1.5.
Vitaminas	
<u>Solución primaria</u>	g/L de agua destilada
Biotina cristalizada	0.1
Cianocobalamina	1.0
<u>Solución secundaria</u>	Cantidad en 100 mL de agua destilada
Biotina	1 mL de la sol. 3.1.1
Cianocobalamina (B12)	1 mL de la sol. 3.1.2
Tiamina clorhídrica (B1)	20 mg

### VI.3. Monitoreo de las Variables Físicoquímicas

Los cultivos microalgales fueron expuestos a una temperatura controlada que fue medida con un termómetro de mercurio convencional Marca Brannan (-20 a 110 °C), mientras que la salinidad fue tomada con un refractómetro. No se les suministró aireación adicional a los cultivos. La iluminación fue constante con lámparas comerciales de 4 pies a 75 WATTS.

El monitoreo del pH fue diario con ayuda de un potenciómetro portátil Marca Hanna Instruments pHep, calibrado con amortiguadores de 7.0 y 10.0.

#### **VI.4. Determinación de la Concentración Celular**

La concentración celular de *Aphanocapsa* sp. se determinó mediante conteos celulares diarios, para ello se fijó 1 mL de cultivo de cada uno de los matraces y con una gota de lugol al 1% (Andersen, 2005). Para los conteos celulares se empleó un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad y un microscopio compuesto Carl Zeiss Axiostar Plus. Para determinar el número de células por mililitro se usó la siguiente fórmula:

$$\text{No. de células/mL} = \frac{\text{No. células totales}}{\text{No. cuadros contados}} \times 10,000$$

El crecimiento poblacional de *Oscillatoria* sp. fue seguido cada dos días hasta la cosecha al día 10. Debido a que las características morfológicas de esta microalga no permitieron determinar su concentración mediante conteos celulares esta microalga se analizó a través de la determinación de la biomasa seca en mg/L, para lo cual se tomaron dos matraces de cada medio con 800 ml de cultivo, la biomasa fresca fue filtrada en filtros GFC previamente pesados, se procedió a lavarlos con formiato de amonio al 0.9 % para eliminar restos de sales y se colocaron en charolas de aluminio en una estufa de laboratorio Marca THELCO® Precision Scientific Modelo 130 a una temperatura de 60 °C. Una vez secos los filtros, fueron pesados diariamente, hasta obtener su peso constante. La masa seca se determinó por diferencia de peso.

#### **VI.5. Determinación de Biomasa**

Para la determinación de la biomasa se prepararon filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C de 25 mm de diámetro y poro de 2.5 µm lavados con agua destilada y secados en una estufa por 20 minutos a 100 °C, después se quemaron en una mufla Marca Felisa® Modelo 360 D a 480 °C por 4 horas. Todo lo anterior para eliminar residuos de materia orgánica que pudiera quedar en los filtros, cada filtro fue pesado 3 veces en una balanza

analítica Marca Oahus Modelo 200, para obtener un peso constante (López- Elías *et al.*, 1995).

Con una bomba de vacío GE Motors Modelo 5KH36KN90GX se filtraron 150 mL de cultivo de cada matraz, los filtros con la muestra fueron brevemente lavados con una solución de formiato de amonio al 5% con el fin de eliminar las sales que pudieran contener y se llevaron a la estufa de laboratorio Marca THELCO® Precision Scientific Modelo 130 a una temperatura de 60 °C por 6-8 horas. Por último, se pesaron los filtros con la muestra microalgal seca y se determinó la biomasa mediante la diferencia de peso (Sorokin, 1973).

## **VI.6. Extracción de Lípidos**

La obtención de la muestra se obtuvo filtrando 10 mL del cultivo de cada matraz (por duplicado) utilizando filtros GF/C de 25 mm de diámetro y poro de 2.5 µm. Para llevar a cabo la extracción de lípidos de los filtros, se utilizó el método descrito por Bligh y Dyer (1959), modificado por López-Elías *et al.* (1995).

Para ello los filtros se depositaron en un tubo de ensaye de 15 mL para centrífuga y se agregó 2 mL de cloroformo, 4 mL de metanol y 0.8 mL de agua destilada. La muestra se trituró con ayuda de una varilla de vidrio y se centrifugó a 400 rpm en una centrífuga analítica HERAEUS MULTIFUGE X1R durante 15 minutos. El sobrenadante se retiró con ayuda de una pipeta y se vació en un tubo de ensaye limpio, posteriormente se añadió 2 mL de cloroformo y 2 mL de agua para separar la fase polar de la apolar. La fase superior fue retirada con ayuda de una pipeta y los tubos fueron llevados a secar en la estufa de convección a 45 °C durante de 3 días.

## **VI.7. Determinación de Lípidos**

La cuantificación de los lípidos se realizó siguiendo la técnica descrita por Pande *et al.* (1963), que consiste en agregar a la muestra 3 mL de una solución de dicromato de potasio que al entrar en contacto con los lípidos los oxida (Solución al 2% de dicromato de potasio en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 98%). Los tubos se calentaron durante 15 minutos en un baño de agua hirviendo y después pasaron a un baño de agua fría. Posteriormente se agregaron 4.5 mL

de agua destilada a cada tubo con ayuda de una pipeta y se mezcló hasta homogenizar el color. Paralelamente, se preparó una solución patrón utilizando Tripalmitina como estándar (0.1 mg de Tripalmitina en 100 mL de Cloroformo) para realizar una curva de calibración.

La absorbancia de cada una de las muestras y de la solución patrón se midieron con un espectrofotómetro Milton Roy SPECTRONIC 20D a una longitud de onda de 590 nm.

### **VI.8. Tratamiento Estadístico**

Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo con el programa Statistica para Windows versión 10.0 usando un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías (especie y medio de cultivo) y la prueba de Sheffé (Sokal & Rohlf, 1979) para examinar las diferencias entre los tratamientos.

## VII. RESULTADOS

### VII.1. Parámetros Fisicoquímicos

La temperatura promedio se mantuvo en  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  y la salinidad registrada en el agua de mar fue de 35 UPS. La iluminación promedio fue de 10133 lux.

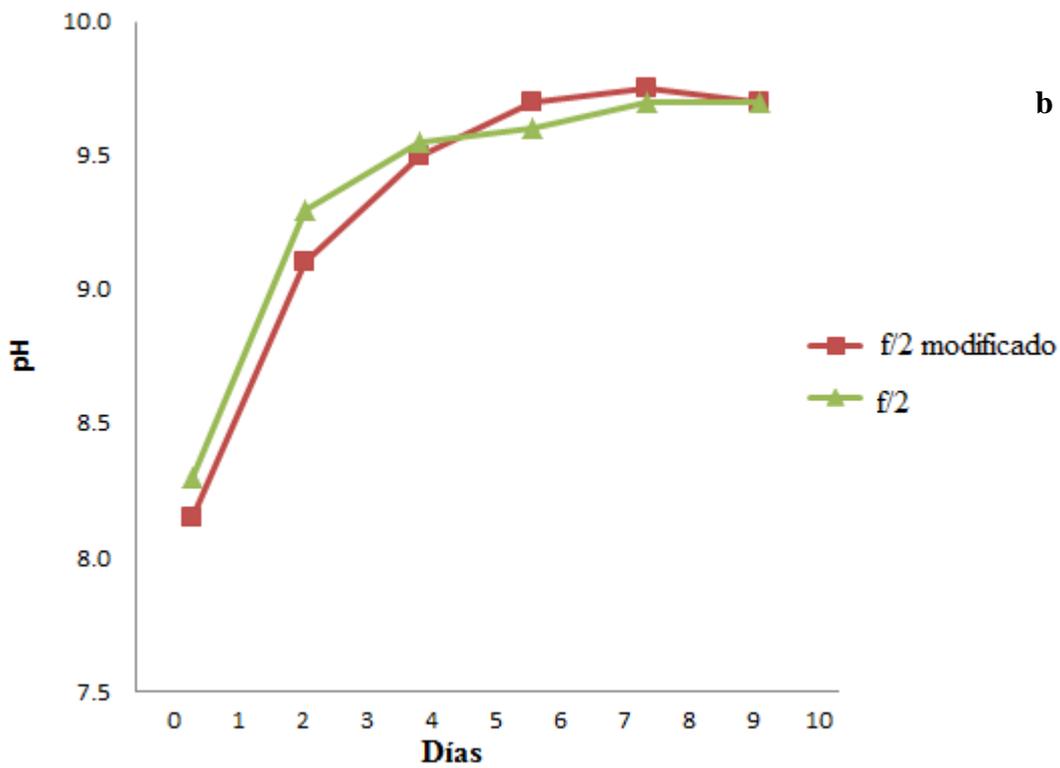
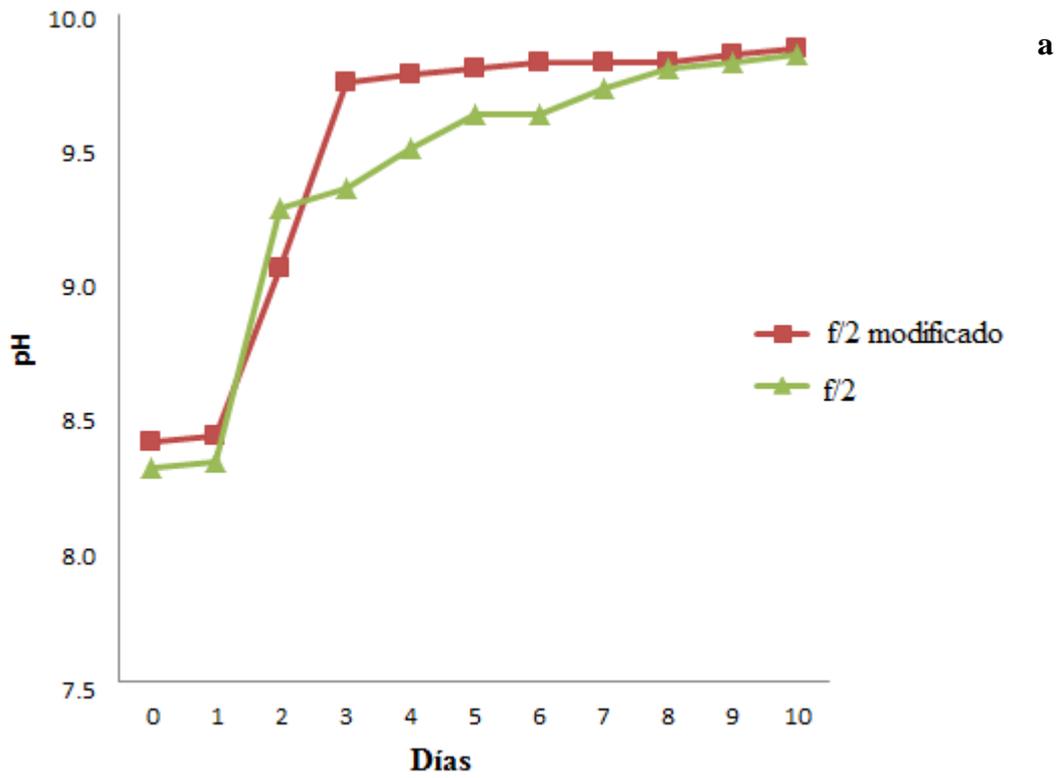
El pH tuvo un notorio aumento entre el día 0 y el día 2 para ambas especies en los dos medios de cultivo, y se mantuvo casi constante a partir del día 3 al 10. *Aphanocapsa* sp. presentó valores iniciales de 8.4 en el medio con urea y 8.3 en f/2, mientras que el pH final alcanzó un valor de 9.9 en ambos medios. *Oscillatoria* sp. promedió valores iniciales de 8.2 y 8.3 en el medio con urea y f/2 respectivamente, mientras que al final del experimental el promedio de pH de esta microalga en los dos medios fue de 9.7 (Figura 3).

### VII.2. Concentración Celular

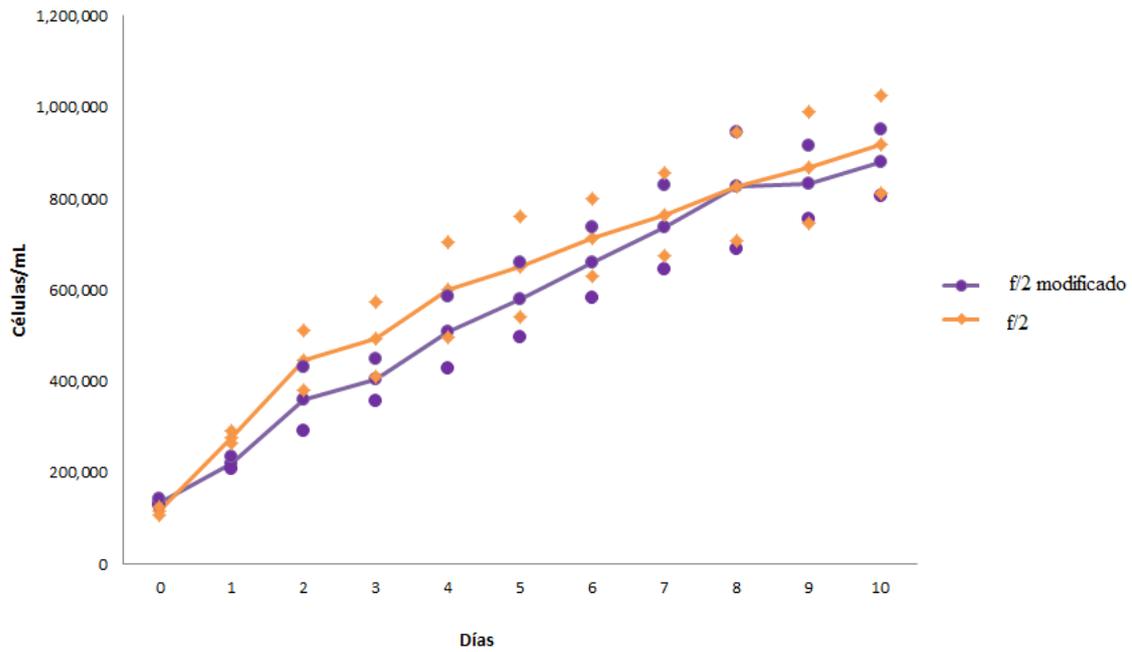
En la figura 4 se observa el crecimiento celular de los cultivos de *Aphanocapsa* sp. en los dos medios. En general se apreció que el crecimiento de esta cianobacteria en ambos tratamientos fue constante y ascendente hasta el momento de la cosecha al día décimo.

*Aphanocapsa* sp. mostró un crecimiento promedio muy similar en los medios utilizados. La concentración inicial fue de  $0.13 \times 10^6$  cél/mL y la final de  $0.87 \times 10^6$  cél/mL en f/2 con urea, mientras que en los cultivos en f/2 inició con una concentración de  $0.11 \times 10^6$  cél/mL y al final alcanzó una concentración de  $0.91 \times 10^6$  cél/mL.

Al comparar el crecimiento en ambos medios, se observó un crecimiento ligeramente mayor con esta cianobacteria al utilizar el medio f/2 con nitrato de sodio como fuente de nitrógeno en comparación con los cultivos con urea (Figura 4).



**Figura 3.** Variación del pH promedio en los cultivos de las microalgas *Aphanocapsa* sp. (a) y *Oscillatoria* sp. (b) en los medios f/2 y f/2 modificado con urea.



**Figura 4.** Concentraciones celulares diarias de *Aphanocapsa* sp. en los medios de cultivo f/2 y f/2 modificado con urea.

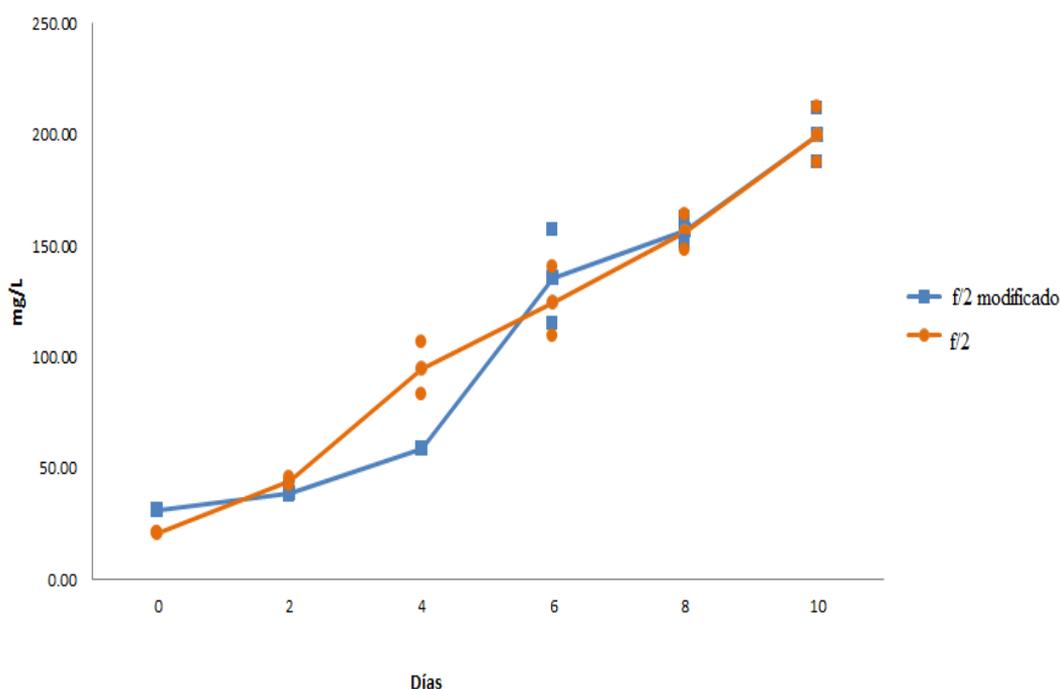
La tasa promedio máxima obtenida para *Aphanocapsa* sp. fue mayor en el medio f/2 con 1.26 en comparación al medio con urea que fue de 0.71, encontrándose también que la  $\mu$  promedio y la  $\mu$  acumulada es mayor en el medio con urea con valores promedio de 0.30 y 2.97 respectivamente a diferencia del medio con nitratos que presentó una  $\mu$  promedio de 0.28 y  $\mu$  acumulada de 2.82 (Tabla III).

**Tabla III.** Concentración celular final promedio, tasa de crecimiento máxima promedio y acumulada de *Aphanocapsa* sp. en los medios de cultivo f/2 y f/2 modificado con urea.

Medio	Concentración celular	$\mu$ máxima	$\mu$ promedio	$\mu$ acumulada
f/2	918,125 ( $\pm$ 107,454)	1.26 ( $\pm$ 0.055)	0.30 ( $\pm$ 0.010)	2.97 ( $\pm$ 0.10)
f/2 modificado	879,062 ( $\pm$ 72,732)	0.71 ( $\pm$ 0.09)	0.28 ( $\pm$ 0.03)	2.82 ( $\pm$ 0.26)

En el caso del crecimiento poblacional de *Oscillatoria* sp., medido como masa seca (mg/L), se pudo apreciar un ligero ajuste durante los primeros cuatro días por parte de la cianobacteria en el medio modificado con urea, para después elevar su concentración y mantenerse similar con el crecimiento de la misma en f/2 (Figura 5).

En promedio la concentración inicial de biomasa para esta cianobacteria fue inicialmente de 31.24 mg/L y 199.65 mg/L al día 10 en el medio con urea; para los cultivos realizados en f/2 se obtuvieron concentraciones iniciales y finales de 20.40 mg/L y 199.85 mg/L respectivamente.



**Figura 5.** Concentración de biomasa diaria de *Oscillatoria* sp. en los dos medios de cultivo

### VII.3. Determinación de Biomasa

La biomasa seca obtenida de las dos especies de cianobacterias en ambos medios de cultivo son extremadamente similares como se puede observar en la tabla IV, en donde se indican los promedios de peso seco y la desviación estándar para las especies de microalgas utilizadas en los medios de cultivo.

Al realizar la comparación del peso alcanzado por *Aphanocapsa* sp. en f/2 modificado con urea (164.335 mg/L) y en f/2 (148.593 mg/L) no se encontró diferencias significativas de biomasa seca ( $F= 0.0001$ ,  $P \geq 0.05$ ) entre ambos medios. De igual forma no

se encontró diferencia significativa ( $F= 4.090, P \geq 0.05$ ) entre el peso seco de *Oscillatoria* sp. en el medio f/2 y en el medio con urea (152.778 mg/L y 136.778 mg/L respectivamente).

Tampoco se pudo observar diferencias significativas entre el peso seco promedio de las dos especies cultivadas en los medios con las mismas fuentes de nitrógeno ( $F= 2.217, P \geq 0.05$ ).

**Tabla IV.** Peso seco de los cultivo de *Aphanocapsa* sp. y *Oscillatoria* sp. en los medios f/2 modificado con urea y f/2.

Especie	mg/L	
	f/2 modificado	f/2
<i>Aphanocapsa</i> sp.	164.335 <sup>a</sup> (± 12.386)	148.593 <sup>a</sup> (± 8.826)
<i>Oscillatoria</i> sp.	136.778 <sup>a</sup> (± 23.817)	152.778 <sup>a</sup> (± 7.818)

Contenido promedio ± desviación estándar. Letras iguales indican similitudes estadísticas ( $P \geq 0.05$ ).

#### VII.4. Contenido de Lípidos Totales

En cuanto a la concentración de lípidos totales para *Oscillatoria* sp. se encontró que en el cultivo con urea (0.302068 mg/mL) se obtuvo valores más elevados que en f/2 (0.251129 mg/mL), mostrando diferencias significativas entre si ( $F= 11.72, P < 0.05$ ). De igual manera, el análisis comparativo de *Aphanocapsa* sp. en el medio con urea (0.323576 mg/mL) y en f/2 (0.264336 mg/mL) determinó que la mayor concentración de lípidos se encontró nuevamente en el primer medio.

Así mismo, al analizar los datos obtenidos sobre el porcentaje de lípidos observamos que *Oscillatoria* sp. cultivada en el medio f/2 modificado con urea (22.73 %) presenta diferencia significativa ( $F= 10.09, P < 0.05$ ) con la que fue cultivada en f/2 (16.41 %), siendo la primera la de mayor porcentaje (Tabla V).

Los porcentajes promedio de lípidos para *Aphanocapsa* sp. en f/2 y f/2 modificado con urea (16.69 % y 19.81 % respectivamente) mostraron una diferencia significativa ( F= 10.09, P < 0.05), siendo superior el de la cianobacteria cultivada con urea como fuente de nitrógeno. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas con respecto a la concentración y al porcentaje de lípidos entre las dos especies cultivadas en el mismo medio (F= 1.15, P ≥ 0.05).

**Tabla V.** Contenido de lípidos totales en mg/L y porcentaje total de lípidos de *Aphanocapsa* sp. y *Oscillatoria* sp. en los medios de cultivo f/2 modificado con urea y f/2.

Especie	Concentración lípidos mg/mL		% Lípidos	
	f/2 modificado	f/2	f/2 modificado	f/2
<i>Aphanocapsa</i> sp.	0.323 <sup>b</sup> (±0.046)	0.264 <sup>ab</sup> (±0.088)	19.81 <sup>ab</sup> (±3.50)	16.69 <sup>ab</sup> (± 2.81)
<i>Oscillatoria</i> sp.	0.302 <sup>ab</sup> (± 0.061)	0.251 <sup>a</sup> (±0.038)	22.73 <sup>b</sup> (± 6.79)	16.41 <sup>a</sup> (±2.11)

Contenido promedio ± desviación estándar. Letras distintas indican diferencias significativas (P < 0.05).

## VIII. DISCUSIÓN

### VIII. 1. Variables Fisicoquímicas

#### VIII.1.1. Temperatura

La temperatura en ambos medios tuvo una variación mínima de  $30 \pm 1$  °C en promedio lo cual no afectó la supervivencia de ninguna de las dos especies en los diferentes medios de cultivo. Según Darley (1987), la temperatura promedio de los grandes cuerpos naturales de agua es relativamente constante y por lo general inferior a 30° C, mientras que los óptimos de temperatura para el crecimiento de muchas especies de fitoplancton marino y de agua dulce están dentro del límite de 18-25° C lo que es un rango inferior a la temperatura para las cianobacterias utilizadas en esta investigación.

No obstante, estudios realizados por Kratz y Myers (1955) y por Fogg (1956) sugieren que las cianobacterias generalmente presentan un rango de temperatura significativamente más alto que el del resto de las algas. Allen y Strainer (1968) encontraron que las cepas de *Chroococcaceae*, *Oscillatoriaceae*, y *Nostocaceae* pueden crecer óptimamente hasta 35 °C. Moronta et al. (2006) evaluaron el crecimiento de *Chlorella vulgaris* a diferentes temperaturas y encontró que a 32.4 °C se presentó el mayor crecimiento. Otros autores han reportado que *Spirulina maxima* y *Arthrospira* sp. presentan un crecimiento óptimo a 35 y 30 °C respectivamente (Pedraza, 1989; Oliveira et al., 1999).

Se ha reportado que el rango de temperatura para el crecimiento de varias especies de *Oscillatoria* va de 25 a 30 °C o más (Robarts y Zohary, 1987), lo que concuerda con la temperatura empleada en este trabajo.

#### VIII.1.2. Salinidad

La salinidad tiene gran importancia en el crecimiento poblacional de las microalgas, la mayoría de las microalgas marinas presentan un crecimiento óptimo a 35 UPS (Bermúdez et al., 2002). Por lo general, un incremento en la salinidad activa un mecanismo de osmoprotección que da como resultado que las células tiendan a poseer un mayor tamaño, y una mayor producción y acumulación de sustancias de reserva como los lípidos, aunque

en consecuencia de esto, su tasa de crecimiento se vuelve más lenta (Arredondo y Vázquez-Duhalt, 1991; Rosales et al., 2004).

Sin embargo, estudios previos con cepas de cianobacterias como *Synechoccus* sp., *Aphanothece* sp., *Nostoc* sp., entre otras, muestran el efecto contrario al aumento de la salinidad en el medio de cultivo provocando una disminución de la producción de lípidos (Blumwald y Tel-Or, 1984; Berland et al., 1989; Singh et al., 2002). Es por esto que la salinidad empleada en este experimental se mantuvo a 35 UPS para las dos especies cultivadas.

### VIII.1.3. pH

En general, el pH no parece ser uno de los factores primordiales que estimulan la producción de metabolitos secundarios de interés biotecnológico en las cianobacterias, pero desempeña un papel importante en la división celular determinada por la capacidad de las células de realizar la fotosíntesis (Dorling et al., 1997).

En aislados de diversas cianobacterias se ha observado la inhibición de la fotosíntesis de hasta 60% a pH por debajo de 6, posiblemente debido a su incapacidad de mantener un pH intracelular constante en relación al pH externo, con lo cual se induce un desequilibrio de las actividades metabólicas relacionado con la división celular (Reddy, 1984).

Las cianofitas son únicas dentro del grupo de procariotas debido a su incapacidad de crecer a valores bajos de pH. Su crecimiento parece ser inhibido en hábitats con valores de pH por debajo de 5, con óptimos entre 7,5 y cerca de 10, por lo que son consideradas como alcalófilos (Reddy, 1984).

En 2009, Fuenmayor *et al.* evaluaron el crecimiento y la producción de metabolitos secundarios en la cepa MOF-06 de *Oscillatoria* sp. en cultivos con distintos valores de pH que iban entre 6 y 11, encontrando que el mayor incremento de la biomasa se obtuvo a pH 9. Así mismo, observaron que esta cianobacteria logró estabilizarse y continuar creciendo a un pH 11 aunque de forma más lenta.

Resultados similares han sido reportados en estudios realizados con otras cianobacterias como *Synechocystis minúscula* (Jonte, 2003) donde el mayor crecimiento se obtuvo a pH 9. En el estudio realizado por Giráldez-Ruiz et al. (1997), se observó que *Anabaena* sp. PCC 7120 incrementó su crecimiento al elevarse el pH, con un óptimo a pH 8 y aumentó la concentración de masa seca en un rango de pH de 5.4 a 7.5.

## VIII.2. Concentración celular

Las concentraciones celulares reportadas con cianobacterias fluctúan alrededor de 271 y  $607 \times 10^6$  cél/mL, que en comparación con este trabajo son mayores (Jonte et al., 2003; Rosales et al., 2005), debido a que en esta investigación con *Aphanocapsa* sp. se llegó a obtener  $0.91 \times 10^6$  cél/mL.

## VIII.3. Biomasa seca

El nitrógeno es el elemento que después del carbono contribuye con la producción de biomasa y composición bioquímica de las células microalgales. Varios autores afirman que se produce gran variabilidad en el crecimiento y en la composición bioquímica, debido a las variaciones en las concentraciones y en las fuentes de nitrógeno (Boussiba y Richmond, 1980; Cohen, 1986).

El uso de urea y otras fuentes alternativas de nitrógeno en los medios de cultivo, en sustitución al nitrato de sodio, han sido sugeridos por numerosos investigadores como una manera de disminuir los costos de producción de biomasa (Boussiba 1989); sin embargo, estos compuestos no han logrado superar los rendimientos obtenidos por el medio f/2 tradicional.

Vieira et al. (2001), cultivaron la cianobacteria *Spirulina platensis* en medios con diferentes fuentes de nitrógeno, entre ellos nitrato de sodio y evidenciaron que los mayores contenidos de biomasa en un cultivo con más de 20 días (1,992 mg/L) se obtuvieron en los cultivos suplementados con nitrato de sodio. Esto se complementa con el trabajo realizado por Sassano et al. (2004), que al utilizar urea como fuente de nitrógeno en el cultivo de *S. platensis*, obtuvo una máxima concentración de biomasa de 725 mg/L a los 12 días de cultivo.

En esta investigación la producción de biomasa cosechada al día 7 fue en promedio de 150.620 mg/L independientemente del medio de cultivo, lo que es similar a lo reportado por Campaña-Torres y col. (2012) y Piña y col. (2007) éstos reportaron que los medios alternativos como la urea, producen cantidades iguales de biomasa microalgal en comparación con el medio tradicional.

#### VIII.4. Producción de Lípidos

El contenido lipídico de las cianobacterias según diversas fuentes es bajo (5 – 13 %) en comparación con las especies eucariontes, sin embargo su aplicación en la producción de biodiesel ha sido sugerida a causa de la producción de lípidos paralela al crecimiento y la sencillez para la manipulación genética que ofrecen. (Hu et al., 2008; Rittmann, 2008).

Tras analizar los resultados de la presente investigación, se puede deducir que si bien los dos tipo de fuentes nitrogenadas que se usaron produjeron cultivos con altos porcentajes de lípidos en *Oscillatoria* sp. y *Aphanocapsa* sp., el uso de urea como fuente de nitrógeno en los medios de cultivo ha promovido un incremento en la producción de lípidos que superaron los porcentajes encontrados en f/2 para ambas especies.

Una investigación realizada con *Arthrospira platensis* (Del Valle y Andradez, 2008) en cultivos con diferentes fuentes nitrogenadas revela que esta microalga alcanza una concentración aproximadamente de 8.51% al utilizar nitrato de sodio y de 6.78 % al utilizar urea.

Los resultados encontrados en esta investigación fueron similares a lo encontrado por Danesi et al. (2002) a pesar de que utilizaron una especie diferente de cianobacteria se encontró que el porcentaje de lípidos en *Spirulina platensis* con diferentes fuentes nitrogenadas es similar al reportado en esta investigación, además encontraron que la urea propició la mayor acumulación de lípidos con 20.7%. En una investigación realizada por Olguín et al. (2001) con *Spirulina* sp. se aprecia que las mayores concentraciones lipídicas (28.6%) se obtuvieron a salinidades altas en un medio con urea.

## IX. CONCLUSIONES

En esta investigación se lograron aislar cuatro especies de microalgas de la región central de sonora y de la región sur. Las especies aisladas utilizadas en el experimental fueron las cianobacterias *Aphanocapsa* sp. y *Oscillatoria* sp.

Las concentraciones celulares mayores para *Aphanocapsa* sp. se encontraron en los cultivos realizados en el medio f/2. De igual forma las concentraciones para *Oscillatoria* sp. en peso seco se encontraron en los cultivos del medio en el mismo medio de cultivo.

La variación del pH en los cultivos tendió a ser mayor conforme éstos avanzaban debido al consumo de los bicarbonatos en el agua de mar.

Las tasas de crecimiento promedio, acumulada y máxima de *Aphanocapsa* sp. fueron más elevadas en el medio f/2.

Al comparar la producción de biomasa de *Aphanocapsa* sp. entre ambos medios de cultivo se encontró que el medio con urea fue superior al medio f/2, mientras que para *Oscillatoria* sp. la mayor concentración de biomasa se obtuvo en f/2.

La mayor concentración de lípidos totales en mg/mL y de forma porcentual se encontró en el medio modificado con urea para las dos especies de microalgas.

En base a estos resultados se concluye que para estas dos especies de microalgas la cantidad de lípidos totales es mayor en los cultivos en los que se utiliza el medio modificado con urea, en comparación con aquellos en los que se utiliza el medio f/2 tradicional.

En general se apreció que estas especies de cianobacterias producen la cantidad suficiente de lípidos para su potencial uso como biocombustible.

## X. RECOMENDACIONES

Es recomendable tener en consideración a las microalgas *Oscillatoria* sp. y *Aphanocapsa* sp. como materia prima aceptable en la producción de biodiesel, debido a los porcentajes de lípidos obtenidos en esta investigación.

Se recomienda evaluar la producción de aceites de *Oscillatoria* sp. y *Aphanocapsa* sp. utilizando medios de cultivo con distintas fuentes de nitrógeno a las empleadas en esta investigación.

Es conveniente realizar el mismo experimental con diferentes intensidades de luz y fotoperíodos, variaciones en la temperatura, distintas salinidades e incluso limitando las concentraciones de nitrógeno en los medios para evaluar en cuál de ellas se obtienen mejores resultados en cuanto a la producción de aceites.

Es importante repetir el experimental con cultivos al exterior, en distintas estaciones del año para evaluar los resultados en la producción de lípidos. A su vez se recomienda llevar a cabo un análisis de ácidos grasos de estas microalgas y así poder determinar el tipo y la abundancia de los mismos.

Se recomienda aislar y evaluar más especies de microalgas de nuestra región para conocer su producción de lípidos y analizar su potencial como materia prima en la producción de biodiesel.

## XI. LITERATURA CITADA

- Álvarez Cobelas, M. y Zarco Lechado, J. 1989. Lipids in Microalgae. A review I. *Biochemistry*. 40: 118-145.
- Andersen, R. A. 2005. *Algal culturing techniques*. Elsevier Academic Press. USA. 578 p.
- Arredondo, B.O. y Vásquez-Duhalt, R. 1991. Aplicaciones biotecnológicas en el cultivo de microalgas. *Ciencia y desarrollo*. 17: 99-111
- Barraza, C., Collao, V., Espinoza, C., Moya, F., Thun, G. y Torres, M. 2009. Producción de biodiesel a partir de microalgas. Tesis. Santiago, Chile.
- Ballenilla, F. 2004. El final del petróleo barato. *El Ecologista*. 40: 20-23.
- Benemann, J. R., Weissman, J. C., Koopman, B. L y Oswald, W. J. 1977. Energy production by microbial photosynthesis. *Nature*. 268: 19-23.
- Berchmans, H. J. y Shizuko, H. 2008. Biodiesel production from crude *Jatropha Curcas* seed oil with a high content of free fatty acids. *Bioresource Technology*. 99: 1716-1721.
- Berland, B., Le Campion, T. and Campos, H. 1989. Interaction de la salinité et de la température sur la morphologie, la croissance et la composition cellulaire d' une cyanobactérie halotolerante (*Aphanotece* sp.). *Bot. Mar.* 32: 317-329.
- Bermúdez, J., Lodeiros, C. y Morales, E. 2002. Producción de biomasa de la microalga marina *Chroomonas* sp., en función del pH, intensidad luminosa y salinidad. *Bol. Inv. Mar. Cos.* 31: 167-185.
- Bligh, E. G. y Dyer, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can.J. Biochem Physiol.*, 37: 911-917.
- Blumwald, E. and Tel-Or, E. 1984. Salt adaptation of the cyanobacterium *Synechococcus* 6311 growing in continuous culture (Turbidostat). *Plant Physiol.*, 74: 183-185.
- Borowitzka M. A. 1988. *Fats, Oils and Hydrocarbons. Micro-Algal Biotecnology*. Cambridge University Press, Cambridge,UK.p.257-287
- Borowitzka, M. A., Borowitzka, L. J. 1990. Algal biotechnology. In *Biology of marine plants*. Ed. by M. Clayton and R.J. King. 386 p.
- Boussiba, S. 1989. Amonnia uptake in the alkalophilic cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Plant and Cell Physiology*. 30: 303-308.
- Boussiba, S. and Richmond, A. E. 1980. C- phycocyanin as a storage protein in the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Archives of Microbiology*. 125: 143-147.

- Calvo, B. E., 2006. Biocombustibles de plantas para producción de biodiesel. Revista de la sociedad química del Perú. 1: 44-48
- Campaña-Torres, A., Martínez-Córdova, L. R., Martínez- Porchas, M. and López-Elías, J. A. 2012. Effect of alternative mediums on production and proximate composition of the microalgae *Chaetoceros muelleri* fed to *Acartia* sp. copepods. Latinamerican Journal of Aquatic Research.40 (1): 169-176.
- Castro-Barrera, T., R. De Lara-Andrade, G., Castro, J. Castro-Mejía, A. Malpica-Sánchez. 2003. Alimento vivo en la acuicultura. Contactos, 48:27-33.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from Microalgae. Biotechnology Advances. 25: 294-306.
- Cohen, Z. 1986. Products from microalgae. In Handbook of Microalgal Mass Culture. Richmond (Ed.), CRC Press, Boca Raton. 421-454 pp.
- Darley, W. M. 1987. Biología de las algas, enfoque fisiológico. LIMUSA. México, D. F. 326 p.
- Dawes, C. J. 1991. Botánica marina. LIMUSA. México, D. F. 673 p.
- Del Valle, B. y Andradez, L. 2008. Cultivo de *Athrospira platensis* (División cyanophita) a diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno como estrategia para modificar su composición bioquímica. Tesis de Maestría. Cumaná, Venezuela.
- Deng, X., Li, Y. y Fei, X. 2009. Microalgae: a promising feedstock for biodiesel. African Journal of Microbiology Research. 3:1008-1014.
- Dorling, M., McAuley, P. and Hodge, H. 1997. Effect of pH on growth and carbon metabolism of maltose-releasing *Chlorella*. Eur J Phycol. 32: 19-24.
- Ferrera, R., Rojas, N. G., Poggi, H. M., Alarcón, A. y Cañizares, O. 2006. Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. Revista latinoamericana de microbiología. 48: 179-187.
- Fuenmayor, G., Jonte, L., Rosales, N. y Morales, E. 2009. Crecimiento de la cianobacteria marina *Oscillatoria* sp. MOF-06 en relación al pH en cultivos discontinuos . Rev. Soc. Ven. Microb. 29:21-25
- Garibay-Hernández, A., Vázquez-Duhalt, R., Sánchez-Saavedra, M. P., Serrano-Carreón, L. y Martinez-Jimenez, A. 2009. Biodiesel a partir de microalgas. BioTecnología. 13: 38-61.
- Giráldez-Ruiz, N., Mateo, P., Bonilla, I., Fernández-Piñas, F. The relationship between intracellular pH, growth characteristics and calcium in the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120 exposed to low pH. New Phytol. 1997; 137: 599-605.

- Guillard, R. L. y Ryther, J. H. 1962. Studies on marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* Husted and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. Canadian Journal of Microbiology, 8:229-239.
- Hanna, M. A., Isom, L. and Campbell, J. 2005. Biodiesel: Current perspectives and future. Journal of Scientific and Industrial Research. 64: 854-857.
- Herrera- Valencia, V. A., Contreras-Pool, P. Y., López-Adrián, J., Peraza- Echeverría, S y Barahona-Pérez, L.F. 2011. The green microalga *Chlorella saccharophila* as a suitable source of oil for biodiesel production. Current microbiology. 63: 151-157.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M. y Darzin, A. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstock for biofuel production: perspectives and advances. The Plant Journal. 54: 621-639.
- Jonte, L. 2003. Crecimiento de la cianobacteria *Synechocystis minuscula* en respuesta a diversos parámetros de cultivos. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad del Zulia. Caracas, Venezuela. 156 pp.
- Jonte, L., Rosales, N., Briceño, B. y Morales, E. 2003. La salinidad y la irradiancia modulan el crecimiento de la cianobacteria *Synechocystis minuscula* en cultivos discontinuos. Multiciencias. 3:1
- Khoeyi, Z.A., Seyfabadi, J. and Ramezanpour, Z. 2011. Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae *Chlorella vulgaris*. Aquaculture International (Online DOI 10.1007/s10499-011-9440-1)
- Knothe, G., Dunn, R. O. and Bagby, M. O. 1997. Biodiesel: the use of vegetable oils and their derivatives as alternative diesel fuels. ACS Symp Ser .666: 172–208.
- Kubitschek, H. E. 1970. Introduction to research with continuous cultures. Prentice Hall. Englewood, N.J. 195 p.
- Lascarro, J. F. 2005. Potencial del proceso y de la tecnología de biodiesel con oleaginosas. Asociación Interamericana de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente. Asunción, Paraguay. 7 p.
- Lobato, V. 2009. Sustentabilidad y certificación de biocombustibles de segunda generación. Reporte de la reunión regional de expertos: tecnología y biocombustibles de segunda generación. Montevideo, Uruguay. 131-137.
- Lee, S., Go, S., Jeong, G. and Kim, S. 2010. Oil production from microalgae for the production of biodiesel. Biotechnology and bioprocess engineering. 16: 561-566.
- Li, Y. 2008. Biofuels from Microalgae. Biotechnol Prog. 24: 815-820.

- Loera-Quezada, M. y Olgún, E. J. 2010. Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel: retos y oportunidades. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*. 1: 91-116
- López-Elías, J. A. y Voltolina, D. 1993. Cultivos semicontinuos de cuatro especies de microalgas con un medio no convencional. *Ciencias Marinas* 19: 169-180.
- López-Elías, J. A., Báez-Dueñas M. del C. y Huerta-Aldaz, N. 1995. Manual de técnicas analíticas aplicadas al cultivo de microalgas. DICTUS. México. 47p
- Mc Clintock, J. B. y Baker, B. J. 2001. *Marine Chemical Ecology*. CRC Press. Boca Raton, Florida. 610 p.
- Moronta, R., Mora, R. y Morales, E. 2006. Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas. *Rev. Fac. Agron.* 23:1
- Odum, E. 1971. *Fundamentals of ecology*. Saunders. Philadelphia, USA. 574 p.
- Oliveira, M., Monteiro, M., Robbs, P. and Leite, S. 1999. Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures. *Aquaculture International*. 7:261-275.
- Olvera-Ramírez, R., Cañizares-Villanueva, R. O., Ríos-Leal, E. 2000. Extracción de pigmentos naturales a partir de microalgas y cianobacterias y su posible aplicación industrial. *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*. 46 p.
- Pande, S. V., Khan R. P. y Venkitasubramanian T. A. 1963. Microdetermination of lipids and serum total fatty acid. *Analyt. Biochem.*, 6:415-423.
- Patil, V., Tran, K. Q. y Giselrod, H. R. 2008. Towards sustainable production of biofuels from microalgae. *International Journal of molecular science*. 9: 1188-1195.
- Pedraza, G. 1989. Cultivo de *Spirulina maxima* para suplementación protéica. *Livestock Reesearch for Rural Development*. Vol.1 No. 1
- Pérsico, M. M., Moris, M., Tranier, E. D., Zanazzi, A. N., Saubidet, A. A. y Beligni, M. V. 2011. Evaluación de un sistema exterior de cultivo masivo de la microalga marina *Nannochloropsis oculata*, en una zona templada oceánica de Argentina. *Revista latinoamericana de biotecnología ambiental algal*. 1: 30-48.
- Piña, P. Medina A. M., Nieves, M., Leal, S., López-Elías, J. A. y M. A., Guerrero. 2007. Cultivo de cuatro especies de microalgas con diferentes fertilizantes utilizados en acuicultura. *Rev. Invest. Mar.* 28 (3): 225-236.
- Reddy, P. 1984. Influence of pH on sporulation, spore germination and germling survival in blue-green algae. *Acta Hydrochim Hydrobiol.* 12: 411-9.

- Richmond, A. 2004. Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology. Ed. Blackwell Publishing. 566 p.
- Robarts, D. R and Zohary, T. 1987. Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration, and growth rates of bloom-forming cyanobacteria. Zealand Journal of Marine and Freshwater Research. 21:3, 391-399.
- Rodolfi, L., Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M. 2009. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. Biotechnology and Bioengineering 102: 100-112.
- Rosales, N., Loreto, C., Bermúdez, J. and Morales, E. 2004. Intermediate renewal rates enhance the productivity of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. in semicontinuous cultures. Cryptogamie: Algol., 25 (2): 207-216.
- Rosales, N., Orteha, J., Mora, R. y Morales, E. 2005. Influencia de la salinidad sobre el crecimiento y composición bioquímica de la cianobacteria *synechococcus* sp. Ciencias Marinas. 31: 349-355.
- Sassano, C., Carvalho, J., Gioielli, L., and Converti, A. 2004. Kinetics and bioenergetics of *Spirulina platensis* cultivation by fed-batch addition of urea as nitrogen source. Applied Biochemical and Biotechnology. 112: 143-150.
- 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: 20-43.
- Schneider, J. C. y Roessler, P. 1994. Radiolabelling studies of lipids and fatty acids in *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae), oleaginous marine algae. J. Phycol. 30: 594-598.
- Singh, S., Sinha, R. and Hader, D. 2002. Role of lipids and fatty acids in stress tolerance in cyanobacteria. Acta Protozool., 41: 297-308.
- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed volume and optical density. In: J. R. Stein (Ed) Handbook of Physiological Methods. Culture Methods and Growth Measurement. Cambridge University, Press. Cambridge. 448 p.
- Stratta, J. 2000. Biocombustibles: los aceites vegetales como constituyentes principales del biodiesel. Bolsa de comercio de Rosario. Argentina
- Tang, H., Abunasser, N., García, M. F. D., Chen, M., Simon, K.Y., O'Salley, S. 2010. Potential of microalgae oil from *Dunaliella tertiolecta* as a feedstock for biodiesel. Applied Energy. 88: 3324-3330.

- Trainor, F. R. 1978. Introductory Phycology. John Wiley & Sons. New York. 525 p.
- Vieira, J., Cozza, k., Oliveira, L. and Magagnin, G. 2001. Different nitrogen sources and growth responses of *Spirulina platensis* in microenvironments. World journal of Microbiology and Biotechnology. 17: 439-442.
- Vonshak, A. 1988. Microalgas: técnicas de cultivo en laboratorio y para producción de biomasa a la intemperie. p. 155- 165. In: Coombs, J., May, D. O., Long, S. P. y Scurlock, J. M. (eds.) Técnicas en Fotosíntesis y Bioproduktividad. Colegio de Graduados, Chapingo, Estado de México, México. p: 258.
- Weldy, C. S. y Hesmann, M. H. 2007. Lipid production by *Dunaliella salina* in Batch culture: Effects of Nitrogen Limitation and Light Intensity. Journal of Undergraduate Research. 7: 115-122.
- Zar, J. H. 1999. Bioestadistical Analysis, 4th ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. 663 p.
- Zhang, Y., Dube, M.A., McLean, M. and Kates, M. 2005. Biodiesel production from waste cooking oil. Bioresource Technology. 89: 1-16.

## XII. ANEXOS

Análisis de varianza de la concentración de lípidos (mg/L) de las cianobacterias *Aphanocapsa* sp. y *Oscillatoria* sp. en dos medios de cultivo con diferentes fuentes de nitrógeno.

<b>Efectos</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grado de libertad</b>	<b>Error Estándar</b>	<b>Radio F</b>	<b>Valor P</b>
<b>Especie</b>	0.002	1	0.002	<b>1.16</b>	<b>0.29</b>
<b>Medio</b>	0.024	1	0.024	11.72	0.002
<b>Especie*medio</b>	0	1	0	<b>0.07</b>	<b>0.798</b>

Análisis de varianza de la concentración de lípidos (%) de las cianobacterias *Aphanocapsa* sp. y *Oscillatoria* sp. en dos medios de cultivo con diferentes fuentes de nitrógeno.

<b>Efectos</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grado de libertad</b>	<b>Error Estándar</b>	<b>Radio F</b>	<b>Valor P</b>
<b>Especie</b>	13.9	1	13.9	0.79	0.383
<b>Medio</b>	178.4	1	178.4	10.09	0.004
<b>Especie*medio</b>	20.4	1	20.4	1.15	0.292

Análisis de varianza de la concentración de biomasa en peso seco de las cianobacterias *Aphanocapsa* sp. y *Oscillatoria* sp. en dos medios de cultivo con diferentes fuentes de nitrógeno.

<b>Efectos</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grado de libertad</b>	<b>Error Estándar</b>	<b>Radio F</b>	<b>Valor P</b>
<b>Especie</b>	504.2	1	504.2	2.217	0.164559
<b>Medio</b>	0.1	1	0.1	0.000	0.987177
<b>Especie*medio</b>	930.0	1	930.0	4.090	0.068132