



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

**Producción de lípidos por la microalga *Nannochloropsis* sp. en un  
fotobiorreactor tubular horizontal de 20 litros**

Tesis que presenta

**Alfredo de Jesús Martínez Roldán**

Para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA**

Director de la Tesis: **Dra. Rosa Olivia Cañizares Villanueva**

**México D.F.**

**28 de Junio de 2013**

## **Agradecimientos**

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca que me otorgó durante cuatro años para la realización de mis estudios de Doctorado. Además agradezco Beca Mixta que me brindó para la realización de una estancia de investigación de un año de duración con el Dr. Giuseppe Torzillo en el Istituto per lo Studio degli Ecosistemi – CNR, Florencia Italia

A la Dra. Rosa Olivia Cañizares le agradezco el haberme abierto las puertas de su laboratorio, pero sobre todo gracias por los consejos, las correcciones, las alegrías, las oportunidades, las horas plática y de trabajo extra pero sobre todo gracias por su amistad. Estos poco más de 7 años en su grupo de trabajo serán inolvidables.

A cada uno de los miembros de mi comité tutorial. Al Dr. Eliseo Cristiani por sus señalamientos puntales y su paciencia. Al Dr. Fernando Esparza gracias por siempre compartir una palabra de aliento. A la Dra. Teresa Ponce le agradezco su disposición para escucharme.

A todos y cada uno de los integrantes del Laboratorio de Biotecnología de Microalgas por su apoyo, compañía, consejo y tolerancia gracias Pancho, Orlando, Martha, Dulce, Gema, Cristóbal, Liliana, Javier, Miriam y todas demás personas que me encontrado en mi diario recorrer por el laboratorio.

A mis amigos, que aunque son pocos, siempre han estado ahí acompañándome y siempre dispuestos para escucharme y ayudarme

Al Dr. Hugo V. Perales Vela gracias por convercerme para que me embarcara en lo que hoy son un puñado de buenos recuerdos y experiencias enriquecedoras.

A mi familia gracias por creer siempre en mí y por estar seguros desde el principio que lo lograría.

Mientras el río corra, los montes hagan sombra y en el cielo haya estrellas, debe durar la memoria del beneficio recibido en la mente del hombre agradecido.

Virgilio

# Índice

Agradecimientos .....	I
Índice .....	III
Índice de Tablas y Figuras .....	II
Resumen .....	V
Abstract .....	VII
1. Introducción.....	1
1.1 Biocombustibles .....	1
1.1.1 El biodiesel.....	3
1.1.1.1 Biodiesel de microalgas .....	4
1.2 Algas .....	8
1.2.1 Eustigmatophyceae.....	12
1.2.1.1 <i>Nannochloropsis</i> .....	13
1.2.1.2 Nutrición y Metabolismo .....	13
1.2.1.3 Aplicaciones tecnológicas del género <i>Nannochloropsis</i> .....	14
1.2.2 Lípidos.....	16
1.2.2.1 Inducción.....	17
1.3 Fotobiorreactores .....	23
1.3.1 Sistemas Abiertos .....	24
1.3.2 Sistemas Cerrados.....	25
1.3.2.1 Tubulares .....	28
2. Justificación.....	31
3. Hipótesis de trabajo.....	33
4. Objetivo General .....	34
4.1 Objetivos Particulares .....	34
5. Materiales y métodos .....	35
5.1 Medio de cultivo y microorganismo .....	35

5.2	Medio de cultivo .....	35
5.3	Métodos analíticos .....	35
5.3.1	Peso Seco .....	35
5.3.2	Pigmentos fotosintéticos .....	36
5.3.3	Contenido específico de lípidos.....	36
5.3.3.1	A partir de biomasa fresca .....	36
5.3.3.2	A partir de biomasa liofilizada .....	37
5.3.4	Perfil de lípidos.....	38
5.3.5	Nitrógeno.....	39
5.3.6	Fósforo .....	39
5.3.7	Actividad fotosintética por emisión de fluorescencia de la clorofila a del fotosistema II (PSII).....	39
5.3.7.1	Prueba OJIP.....	39
5.3.7.2	Método de pulsos saturantes .....	40
5.3.8	Tasas de fotosíntesis y respiración .....	41
6.	Estrategia experimental.....	42
6.1	Comparación de cepas del género <i>Nannochloropsis</i> .....	42
6.2	Efecto de la adición de CO <sub>2</sub> y de la fuente de carbono sobre la fisiología, crecimiento y contenido de lípidos de <i>Nannochloropsis</i> sp. ....	42
6.3	Efecto de la cantidad de NaCl en el medio de cultivo sobre la fisiología de <i>Nannochloropsis</i> sp. ....	43
6.4	Efecto inmediato de la cantidad de NaCl en el medio de cultivo sobre la fisiología de <i>Nannochloropsis</i> sp. ....	43
6.5	Efecto de la concentración de NaCl en el medio de cultivo sobre el crecimiento y contenido de lípidos de <i>Nannochloropsis</i> sp., en cultivos de alta densidad celular .....	44

6.6	Proceso en dos etapas para la producción de lípidos en un FBR de 20 L, la primera de crecimiento celular y una posterior de inducción por estrés salino .....	44
7.	Resultados y Discusión .....	46
7.1	Comparación de cepas de <i>Nannochloropsis</i> .....	46
7.2	Efecto de la adición de CO <sub>2</sub> y de la fuente de nitrógeno sobre el crecimiento, fisiología y contenido específico de lípidos de <i>Nannochloropsis</i> sp. ....	53
7.2.1	Crecimiento .....	53
7.2.2	Mediciones de emisión de fluorescencia de la Ch1a del PSII .....	60
7.2.3	Contenido específico de lípidos totales .....	62
7.2.4	Perfil de ácidos grasos .....	66
7.3	Efecto del contenido de NaCl en el medio de cultivo sobre el crecimiento, fisiología y contenido específico de lípidos de <i>Nannochloropsis</i> sp. ....	69
7.3.1	Crecimiento .....	70
7.3.2	Tasa de Fotosíntesis y Tasa de Respiración .....	73
7.3.3	Mediciones de emisión de fluorescencia por la Ch1a del PSII .....	77
7.3.4	Contenido específico de lípidos .....	85
7.3.5	Perfil de ácidos grasos .....	87
7.3.6	Consumo de nutrientes .....	89
7.4	Efecto inmediato del contenido de NaCl en el medio de cultivo sobre el crecimiento, fisiología y contenido específico de lípidos de <i>Nannochloropsis</i> sp. ....	93
7.4.1	Tasa de Fotosíntesis y Tasa de Respiración .....	95
7.4.2	Mediciones de emisión de fluorescencia por la Ch1a del PSII .....	99
7.5	Efecto del contenido de NaCl en el medio de cultivo sobre el crecimiento y contenido específico de lípidos en cultivos de alta concentración celular de <i>Nannochloropsis</i> sp. ....	104

7.5.1	Crecimiento .....	104
7.5.2	Contenido específico de lípidos totales .....	107
7.6	Proceso en dos etapas para la producción de lípidos en un FBR de 20 L, la primera de crecimiento celular y una posterior de inducción por estrés salino .....	111
7.6.1	Crecimiento .....	111
7.6.2	Mediciones de emisión de fluorescencia por la Chla del PSII .....	115
7.6.3	Proceso de producción en dos etapas .....	119
8.	Conclusiones.....	123
9.	Recomendaciones.....	124
10.	Bibliografía .....	126
11.	Anexos .....	152
11.1	Trabajos presentados en Congresos Internacionales .....	152
11.2	Artículos publicados .....	154

## Índice de Tablas y Figuras

Figura 1.	Cinética de crecimiento de dos especies del género <i>Nannochloropsis</i> en base a PS.....	47
Figura 2.	Productividad volumétrica de biomasa de <i>Nannochloropsis</i> sp. ....	49
Figura 3.	Concentración de Chla de dos especies del género <i>Nannochloropsis</i> . ....	50
Figura 4.	Efecto del cambio de la fuente de nitrógeno sobre el crecimiento de <i>Nannochloropsis</i> sp. en diferentes fuentes de nitrógeno. ....	54
Figura 5.	Efecto del cambio de la fuente de nitrógeno sobre la productividad volumétrica de biomasa de <i>Nannochloropsis</i> sp. ....	57
Figura 6.	Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la concentración de Chla de <i>Nannochloropsis</i> sp. ....	59
Figura 7.	Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el $\Phi P0$ de <i>Nannochloropsis</i> sp. ....	61
Figura 8.	Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el contenido específico de lípidos en cultivos de <i>Nannochloropsis</i> sp. ....	63
Tabla 1	Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la productividad de lípidos en cultivos de <i>Nannochloropsis</i> sp. ....	64
Tabla 2.	Perfil de ácidos grasos para cultivos de <i>Nannochloropsis</i> sp. en diferentes fuentes de nitrógeno.....	67
Figura 9.	Efecto de la salinidad sobre el crecimiento de <i>Nannochloropsis</i> sp. creciendo a diferentes concentraciones de NaCl. ....	71
Tabla 3	Concentración final de biomasa y velocidad específica de crecimiento de <i>Nannochloropsis</i> sp. a diferentes concentraciones de NaCl.....	71
Figura 10.	Efecto del incremento de la salinidad sobre la concentración de Chla.....	72



Figura 11. Efecto del incremento de la salinidad sobre la Tasa Total de Fotosíntesis.....	74
Figura 12. Efecto del incremento de la salinidad sobre la Tasa de Respiración .....	76
Figura 13. Efecto del incremento de la salinidad sobre el $\Phi P0$ .....	78
Figura 14. Efecto del incremento de la salinidad sobre el $\Phi PSII$ . ....	80
Figura 15. Efecto del incremento de la salinidad sobre el NPQ. ....	82
Figura 16. Efecto del incremento de la salinidad sobre el $\Delta Vt$ . ....	84
Figura 17. Efecto del incremento de la salinidad sobre el contenido específico de lípidos totales .....	85
Tabla 4 Perfil de ácidos grasos en cultivos de <i>Nannochloropsis</i> sp. a diferentes salinidades .....	88
Figura 18. Concentración de N-NO <sub>3</sub> en cultivos de <i>Nannochloropsis</i> sp. a diferentes concentraciones de NaCl .....	90
Figura 19. Concentración de P-PO <sub>4</sub> en cultivos de <i>Nannochloropsis</i> sp. a diferentes concentraciones de NaCl .....	92
Figura 20. Efecto inmediato del incremento de la salinidad sobre la concentración de Chla .....	94
Figura 21. Efecto inmediato del incremento de la salinidad sobre la Tasa Total de Fotosíntesis.....	96
Figura 22. Efecto inmediato del incremento de la salinidad sobre la Tasa de Respiración .....	97
Figura 23. Efecto inmediato del incremento de la salinidad sobre el $\Phi P0$ .....	99
Figura 24. Efecto inmediato del incremento de la salinidad sobre el $\Phi PSII$ .....	101
Figura 25. Efecto inmediato del incremento de la salinidad sobre el NPQ.....	102
Figura 26. Efecto del incremento de la salinidad sobre el crecimiento de <i>Nannochloropsis</i> . sp. en cultivos de alta concentración celular .....	105

Figura 27. Efecto del incremento de la salinidad sobre la concentración de Chla en <i>Nannochloropsis</i> . sp. en cultivos de alta concentración celular .....	107
Figura 28. Contenido específico de lípidos en base a peso seco y productividad de lípidos de <i>Nannochloropsis</i> . sp. a diferentes niveles de salinidad.....	108
Figura 29. Cinética de crecimiento de <i>Nannochloropsis</i> sp. en base a Peso Seco en diferentes flujos de CO <sub>2</sub> .....	112
Tabla 5. Valores de productividad volumétrica y velocidad máxima de crecimiento de <i>Nannochloropsis</i> sp. a diferentes flujos de CO <sub>2</sub> .....	113
Figura 30. Cinética de crecimiento en base a Chl a de <i>Nannochloropsis</i> sp. a diferentes flujos de CO <sub>2</sub> .....	115
Figura 31. Rendimiento cuántico máximo teórico de <i>Nannochloropsis</i> sp. a diferentes flujos de CO <sub>2</sub> .....	116
Figura 32. Rendimiento máximo operacional de <i>Nannochloropsis</i> sp. a diferentes flujos de CO <sub>2</sub> .....	118
Figura 33. Proceso de producción en dos etapas de <i>Nannochloropsis</i> sp. en un FBR de 20L para la producción de lípidos .....	120
Figura 34 Productividad de un proceso de producción de lípidos de <i>Nannochloropsis</i> sp. en dos etapas en un FBR de 20L .....	122

## Resumen

La escasez de energéticos, principalmente derivados del petróleo, hace necesaria la búsqueda de fuentes alternas de energía, siendo el biodiesel de las más prometedoras. Debido a sus ventajas, se ha propuesto a las microalgas como fuente sostenible de biodiesel, ya que sus lípidos pueden ser empleados como materia prima en su producción. Dentro de los géneros que han despertado interés para la producción de lípidos transesterificables se encuentra *Nannochloropsis*; sin embargo, aún no se han encontrado las condiciones de operación (estrategia de cultivo, medio de cultivo óptimo, configuración del fotobiorreactor, etc.) como para proponer un proceso tecnológico completo.

En el presente trabajo se estudió el efecto del cambio de la fuente de nitrógeno, la adición de CO<sub>2</sub> e incrementos en la concentración de NaCl sobre la fisiología, crecimiento y productividad de lípidos, con el fin de encontrar condiciones que favorezcan la acumulación de lípidos, para su empleo posterior a nivel de FBR. El valor máximo de productividad de lípidos fue de 28.6 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> y se alcanzó empleando nitrato de potasio como fuente de nitrógeno y enriqueciendo la corriente gaseosa con un 3% de CO<sub>2</sub>.

Dado que los valores alcanzados de productividad de lípidos fueron bajos en comparación con los reportados en otros trabajos para *Nannochloropsis*, se ensayó el aumento de la salinidad del medio de cultivo como estrategia para incrementar el contenido de lípidos, encontrándose que al duplicar el contenido de NaCl del medio

(54 g L<sup>-1</sup>) se promueve un incremento del 50% respecto al cultivo control. Al emplear un proceso en dos etapas, la primera de crecimiento celular seguido de una inducción por salinidad, se alcanzó una productividad de lípidos de 235.61 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>; lo que hace posible el proponer un proceso en dos etapas aplicando un estrés salino para la producción masiva de lípidos empleando *Nannochloropsis* sp.

Las condiciones de operación fijadas en las fases experimentales anteriores fueron empleadas en un FBR tubular horizontal de 20 L y la tendencia se mantuvo, ya que incrementos en la salinidad ocasionaron incrementos en el contenido específico de lípidos. Sin embargo, los valores de productividad de lípidos no fueron tan elevados, debido principalmente a los bajos valores en la producción de biomasa obtenidos. Por lo anterior podría proponerse el empleo de una configuración diferente de FBR que favorezca altas productividades de biomasa con el fin de elevar los valores de productividad de lípidos obtenida.

## Abstract

The energetics shortage, principally the petroleum has done necessary the research of alternative sources of energy; one of the most promising ones is the biodiesel. The microalgae have been proposed as a sustainable reservoir for biodiesel because the microalgae lipids can be employed to produce it. One of the genera in which the interest has focused for lipids production is *Nannochloropsis*; furthermore, the operational conditions (culturing strategy, photobioreactor configuration, etc.) to propose a complete technological process have not been found yet.

In the present study, the effect of the modification of the nitrogen source and the addition of CO<sub>2</sub> on the physiology, growth, and lipid's productivity was investigated. The scope was to find good conditions (that favor the lipids production) and after, use it in a FBR. The maximum value of lipid productivity reached was 28.6 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> using nitrate and an air input enriched with 3% of CO<sub>2</sub>.

Given that the productivity values were low compared with those reported in the literature, an increase in the salinity of the culture medium was assayed, as a strategy to increase the lipids content; it was found that doubling the NaCl amount in the medium (54 g L<sup>-1</sup>) promoted a 50% increase in the lipids content respect with the control culture. The employ of a two steps process growth-induction caused an increase in the lipid productivity reaching 235.61 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, this make possible to propose a two stages process using the saline stress for the massive production of lipids with *Nannochloropsis* sp.

The operational conditions fixed in the previous experimental phases were used in a FBR with an operation volume of 20 L and the tendency was similar, increments in the salinity caused increases in the specific lipid content. However, the values of lipids productivity were not superior, because the low biomass productivity values reached.

By the above, could be propose the use of a different FBR configuration, wich promotes reach high biomass productivity in order to elevate the values of lipid productivities achieved in this study.

# **1. Introducción**

## **1.1 Biocombustibles**

Los combustibles obtenidos a partir del petróleo constituyen reservas limitadas y concentradas en ciertas regiones del mundo, por lo tanto, los países carentes de estos recursos están enfrentando una crisis, debido a la importación de petróleo crudo a precios cada vez más elevados (Demirbas, 2007). Las reservas mundiales de combustibles fósiles confirmadas en 2009, ascienden a  $1.2 \times 10^{12}$  barriles de petróleo,  $1.7 \times 10^{20}$  metros cúbicos de gas natural y  $8.5 \times 10^{11}$  toneladas de carbón, las cuales resultan suficientes aproximadamente para cubrir 200 años de consumo (Atabani *et al.*, 2012).

El consumo de combustibles fósiles aumenta año con año y si la tendencia se mantiene, el suministro mundial de energía demandará una gran cantidad de recursos naturales y combustibles que resultará en emisiones elevadas de Gases de Efecto Invernadero (GEI) (Demirbas, 2007; de Paula Gomes y Muylaert de Araújo, 2009).

La preocupación por el ambiente y la disminución de las reservas mundiales de petróleo han resultado en acciones gubernamentales e incentivos, promoviendo la investigación en biocombustibles ambientalmente amigables y sustentables (Fukuda *et al.*, 2009).

La mitigación del efecto invernadero es posible a través del uso sustentable de biomasa como combustible y/o el secuestro de CO<sub>2</sub> atmosférico por los bosques. La

sustitución directa de los combustibles fósiles por biocombustibles, ocasionará una reducción considerable en las emisiones de óxidos de azufre y de nitrógeno (Knothe *et al.*, 2006; Demirbas, 2007; Lora y Andrade, 2008).

Los biocombustibles líquidos son considerados como la opción más prometedora a corto plazo, debido a que su mercado ha madurado más que los de otras opciones como el hidrógeno, ya que combinan las ventajas de la disponibilidad de materia prima y la compatibilidad con motores convencionales con mínimas o nulas modificaciones (Demirbas, 2007; Wiesenthal *et al.*, 2009).

Mientras que biocombustibles como biodiesel y bioetanol tienen la ventaja de contar con una tecnología madura que es viable a escala industrial, tienen la desventaja de depender de cultivos comestibles. Además la disminución de GEI puede ser limitada cuando se reemplaza combustible fósil, y en algunos casos incluso negativa, dependiendo del proceso de producción del biocombustible empleado (Demirbas, 2007; Fukuda *et al.*, 2009).

La mayoría de los cálculos de la huella de carbono (o los análisis de ciclo de vida), presume que los biocombustibles son carbono neutrales, es decir, que el carbono que se emite de su combustión fue fijado de la atmósfera y no proviene de los reservorios de carbono, como el petróleo o el carbón mineral, así que el balance sería cero (neutral). Sin embargo, cada vez aumenta el reconocimiento de que esto es incorrecto: los biocombustibles no siempre son carbono neutral, y en algunos casos pueden tener una huella de carbono mayor que los combustibles fósiles (Amaro *et al.*, 2011).



Las reservas mundiales de bosques están disminuyendo, y una razón importante para ello es que los árboles se talan para usarse como combustibles o para dar paso a cultivos para la producción de biocombustibles (Johnson 2007).

Con la gran cantidad de materia prima necesaria para abastecer la demanda creciente de biocombustibles, la sustentabilidad ambiental en la producción de las materias primas será una condición clave. Los biocombustibles con altas emisiones de gases de efecto invernadero, y/o elevados impactos negativos en la agricultura, biodiversidad, suelo y agua, serán menos atractivos que los biocombustibles sustentables (Wiesenthal *et al.*, 2009).

### **1.1.1 El biodiesel**

El biodiesel es un combustible líquido obtenido a partir de aceites vegetales o grasas animales que presenta características similares al diesel obtenido del petróleo. Su proceso de producción consiste en hacer reaccionar triacilgliceroles con algún alcohol de bajo peso molecular en condiciones ácidas o básicas produciéndose alquil ésteres y glicerina (Chisti, 2007).

El principal objetivo de la transesterificación es la disminución de la viscosidad del combustible y es por esto que los alcoholes más empleados son metanol, etanol, propanol y butanol, aunque los que le dan al biodiesel las características ideales para su uso en motores son los dos primeros (Atabani *et al.*, 2012).

La reacción de transesterificación tiene como objetivo mejorar ciertas características fisicoquímicas del aceite con el fin de mejorar su desempeño como combustible.

Entre los aspectos que se busca modificar se encuentran principalmente:

- Disminuir el punto de fusión de algunos de los componentes principalmente los ácidos mirístico, palmítico, oleico linoleico y esteárico.
- Disminuir la viscosidad.
- Adicionar oxígeno para mejorar su combustión (Refaat, 2009; Vyas *et al.*, 2010; Hoekman *et al.*, 2012).

Se plantea el uso de biodiesel, como una de las opciones para mitigar el efecto de las emisiones contaminantes generadas por la quema de combustibles fósiles. Sin embargo, su producción actual compromete el uso de tierras de cultivo dirigidas a la producción de alimentos, ya que la investigación se ha centrado en cultivos de oleaginosas.

#### **1.1.1.1 Biodiesel de microalgas**

Las microalgas parecen ser la única fuente de biodiesel que tiene el potencial para desplazar por completo al diesel obtenido de combustibles fósiles, porque a diferencia de las semillas de plantas terrestres, las microalgas crecen más rápido y son más ricas en lípidos (aceites) (Hoekman *et al.*, 2012). Para la producción de biodiesel se prefiere utilizar cepas de microalgas con altas productividades de lípidos por lo que su uso no compromete la producción de alimentos ni de otros productos

derivados de semillas (Chisti, 2007; Balat y Balat, 2010; Vyas *et al.*, 2010; Hoekman *et al.*, 2012).

Varios autores han realizado cálculos de la productividad de aceite que pueden alcanzar diversos géneros de microalgas, comparando los valores obtenidos por diversas semillas oleaginosas, obteniendo productividades de entre 10 y 15 veces mayores, lo que disminuiría de manera considerable el espacio y la infraestructura a emplear para la producción de biodiesel (Chisti, 2007; Balat y Balat, 2010; Hoekman *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012).

La idea de utilizar microalgas como fuente de combustibles no es nueva, pero actualmente está siendo tomada en cuenta de manera importante, debido al aumento en los precios del petróleo, y de modo más significativo, por la preocupación reciente sobre el calentamiento global que está asociado con la quema de combustibles fósiles (Chisti, 2007; Wu *et al.*, 2012).

La captura por medio de cultivos de algas de CO<sub>2</sub>, proveniente de fuentes industriales como las plantas eléctricas que emplean combustibles fósiles, representa una forma de reciclaje de carbono (Demirbas, 2011; Wu *et al.*, 2012). Esto resulta en un uso más eficiente de los recursos fósiles y en un avance hacia la mitigación de la emisión de CO<sub>2</sub> (Packer, 2009).

El biodiesel es un combustible limpio que actualmente se produce a partir de grasa animal, aceites vegetales vírgenes y usados, y más recientemente a partir de aceites contenidos en las microalgas. Su estructura química es la de ésteres metílicos de

ácidos grasos (EMAG) (Minami y Saka, 2006; Demirbas, 2011; Hoekman *et al.*, 2012). La transesterificación y esterificación son las reacciones que se llevan a cabo en la producción de biodiesel. La transesterificación es la reacción de un lípido con un alcohol para formar ésteres y un subproducto que es el glicerol (glicerina), en ella, un ácido graso libre (AGL) reacciona con un alcohol formando un éster y agua. Estas reacciones son reversibles, por lo que se agrega un exceso de alcohol para forzar el equilibrio hacia el lado de los productos (Khan *et al.*, 2009; Dermibas, 2011; Atadashi *et al.*, 2012).

El contenido energético del biodiesel producido a partir de aceites vegetales y grasas y sus propiedades físicas y químicas son similares al diesel convencional (Hoekman *et al.*, 2012; Kannan y Anand, 2012), lo que permite su uso ya sea sólo o en mezcla en cualquier motor, sin necesidad de grandes modificaciones (Kannan y Anand, 2012). Se puede decir que el biodiesel es el único combustible alternativo que puede ser usado directamente en los motores diesel existentes.

Además, el biodiesel posee mejores propiedades lubricantes, lo cual aumenta el rendimiento del motor así como su vida útil (Chisti y Yan, 2011). El biodiesel puede ser manejado y almacenado usando la misma infraestructura, dispositivos y procedimientos empleados para el diesel convencional; de hecho, como el biodiesel no produce vapores explosivos y tiene un punto de inflamabilidad relativamente alto (150 °C), su transporte, manejo y almacenaje son más seguros que para el diesel convencional (Demirbas, 2009; Chisti y Yan, 2011).

El biodiesel presenta ventajas comparativas sobre el petrodiesel, dentro de las cuales cabe destacar:

- Menor impacto al ambiente.
- Mayor y mejor lubricación de las partes móviles de los motores.
- Mayor índice de cetano.
- No contiene hidrocarburos policíclicos aromáticos dañinos.
- No produce óxidos de azufre.
- Menor emisión de partículas al ambiente (Chisti y Yan, 2011; Hoekman *et al.*, 2012).

Una de las principales razones de que el biodiesel sea de uso restringido a pesar de sus beneficios, es que actualmente el proceso para su producción resulta más costoso que el del diesel de petróleo, por lo que hoy en día, su precio en las estaciones de abastecimiento sólo puede ser competitivo por medio de incentivos en impuestos. Este problema está asociado tanto con las materias primas como con la tecnología empleada, por lo que es necesaria la generación de tecnología para la producción a bajo costo, de biomasa rica en lípidos transesterificables (D'Ippolito *et al.*, 2007; Juan *et al.*, 2011; Bankovic-Ilic *et al.*, 2012).

## 1.2 Algas

Las algas son morfológicamente similares a las plantas y producen los mismos compuestos de reserva y emplean las mismas estrategias de defensa contra depredadores y parásitos. El término algas se usa comúnmente para indicar un grupo de organismos fotosintéticos oxigénicos y polifiléticos.

Las algas no tienen raíces, tallos, hojas ni tejidos vasculares bien definidos; además, presentan diferentes formas, ya sea microscópicas unicelulares, conglomerados multicelulares, colonias ramificadas o formas más complejas.

El tamaño de las algas varía desde el plancton con 0.2 – 2.0  $\mu\text{m}$  de diámetro a los sargazos gigantes de longitudes mayores a 60 m. Las algas pueden ser acuáticas o parcialmente aéreas cuando están expuestas a la atmósfera y no sumergidas en el agua. Las algas acuáticas se encuentran casi en todos los sistemas acuáticos, desde agua dulce hasta lagos salados, por lo que tienen una amplia tolerancia a cambios de pH, temperatura, turbidez, y concentraciones de  $\text{O}_2$  y  $\text{CO}_2$ .

El término algas incluye a las macroalgas y a un grupo altamente diversificado de microorganismos conocidos como microalgas. Se estima que existen entre uno y 30 000 especies de algas y que la mayoría de ellas son microscópicas (Barsanti y Gualtieri, 2006; Barsanti *et al.*, 2008).

Los diferentes grupos de algas y su perfil de ácidos grasos:

1. *Bacillariophyceae* (Diatomeas). Los ácidos grasos saturados característicos son mirístico (14:0) y palmítico (16:0), mientras que los insaturados son de 16 y 20 carbonos, las cantidades de moléculas con 18 carbonos son mínimas.
2. *Chrysophyceae* (Doradas). El perfil es similar al presentado por las diatomeas (16:0, 16:1 y 18:1 principalmente), sólo algunos de los miembros de este grupo son capaces de producir ácidos grasos de cadena más larga (22 átomos de carbono).
3. *Dinophyceae* (Dinoflagelados). Los miembros de este grupo producen, dentro de los ácidos grasos saturados, principalmente ácido palmítico (16:0), y en cantidades mínimas producen moléculas de 18, 20 y 22 carbonos, siendo en su mayoría ácidos grasos poliinsaturados.
4. *Rhodophyceae* (Rojas). En su perfil de ácidos grasos saturados se encuentra presente en mayor cantidad el ácido palmítico (16:0), además producen esteárico (18:0) y moléculas de 20 carbonos, aunque la mayoría presentan más de un doble enlace.
5. *Chlorophyceae* (Verdes). Los lípidos de las algas pertenecientes a este grupo presentan gran similitud con los de las plantas superiores, siendo ricos en ácido palmítico (16:0) y esteárico (18:0), principalmente.

6. *Euglenophyceae* (Euglenoides). La composición lipídica de los miembros de este grupo es muy diversa ya que cambia si el cultivo se encuentra en mixotrofia o heterotrofia, pero principalmente se encuentran ácidos grasos de entre 14 y 22 carbonos dominando el ácido palmítico.
7. *Cryptophyceae* (Criptomonadales). Este grupo se caracteriza por presentar cantidades muy bajas de lípidos (16:0 y 20:1 principalmente). Además algunos de sus miembros tienen la particularidad de acumular lípidos de 12 carbonos.
8. *Cyanophyceae* (Cianobacterias). Este grupo se caracteriza por no producir lípidos como material de reserva, sino que en su mayoría forman parte de membranas, además de que las cantidades producidas no son importantes. Las cianobacterias principalmente presentan ácidos grasos 16:0, 16:1 18:1 (Behrens y Kyle, 1996; Hu *et al.*, 2008; Harwood y Guschina, 2009).

Las algas autotróficas obtienen su energía a través de la absorción de luz, la reducción del CO<sub>2</sub> y la oxidación de sustratos. Aunque el mecanismo de fotosíntesis en microalgas es similar al de las plantas, generalmente son más eficientes al momento de convertir la energía solar, debido a que su estructura celular es más simple. Además, como las algas crecen en suspensiones acuosas, tienen un acceso más eficiente al agua, CO<sub>2</sub> y otros nutrientes (Barsanti *et al.*, 2008; Amaro *et al.*, 2012).



Las microalgas han sido ampliamente utilizadas en diversas partes del mundo desde tiempos remotos, pero su cultivo con fines precisos es relativamente reciente y fue durante el siglo XX que comenzó la generación de tecnología específica. La dirección de la investigación y el desarrollo tecnológico en la biotecnología microalgal, se ha dividido en tres líneas principales: lagunas abiertas (Doucha y Livansky, 2006; Moheimani y Borowitzka, 2007), fotobiorreactores (Richmond y Cheng – Wu, 2001; Chisti, 2007; Sierra *et al.*, 2008) y fermentadores (Wu *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2010).

La cantidad de productos que pueden obtenerse de los diferentes grupos de microalgas es muy variado, entre los cuales se encuentran: proteína de origen unicelular (Kiron *et al.*, 2012; Reddy *et al.*, 2012), polisacáridos (Karmakar *et al.*, 2010; Mishra *et al.*, 2011), pigmentos (Zhang, 2009; Kim *et al.*, 2012), triacilgliceroles (Wang *et al.*, 2010; Shunni *et al.*, 2011; Gardner *et al.*, 2012) y diversas sustancias de interés farmacéutico, como agentes antibacterianos, agentes antifúngicos, toxinas, entre muchos otros (Smyrniotopoulos *et al.*, 2010; Plaza *et al.*, 2010).

Algunas especies han generado interés comercial debido a las características de su biomasa; lo que ha favorecido el cultivo a gran escala de diversas microalgas, dentro de las cuales destacan los géneros *Spirulina*, *Chlorella*, *Dunaliella* y *Haematococcus* (Damiani *et al.*, 2010; Fu *et al.*, 2012; Mixson y Burkholder, 2012; Reddy *et al.*, 2012). Las primeras dos fueron empleadas como fuente de proteína para la nutrición tanto animal como humana (Reddy *et al.*, 2012), mientras que como fuentes de diversos carotenoides se han cultivado *Dunaliella* (Jiang y Zhu, 2010) y *Haematococcus* (Masojidek *et al.*, 2009).

El consumo de la biomasa microalgal es tan importante que se estima que en 2010 sólo para acuicultura se emplearon poco más de 5000 toneladas, principalmente para alimentar moluscos y crustáceos. Los géneros microalgales que se emplean en la alimentación de animales en acuicultura dependen mucho de sus características nutricionales, siendo frecuentemente utilizadas diferentes especies de los géneros *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Phaeodactylum*, *Chaetoceros* y *Nannochloropsis* (Hemaiswarya *et al.*, 2011). Este último género es importante debido a que es una importante fuente de xantófilas, carotenoides y ácidos grasos poliinsaturados (Guedes *et al.*, 2011; Khozin-Goldberg *et al.*, 2011).

### **1.2.1 Eustigmatophyceae**

La clase Eustigmatophyceae surgió gracias al estudio cuidadoso de diversos organismos que se encontraban anteriormente en la clase Xantophyceae, pero que presentaban ultraestructura, y pigmentos fotosintéticos diferentes. Finalmente se decidió separar a algunos de ellos y reunirlos en la clase Eustigmatophyceae (Hibberd, 1981; Lubián, 1982; Fawley *et al.*, 2011).

Algunos organismos pertenecientes a esta clase se han encontrado en ambientes acuáticos dulces, salobres y marinos, incluso algunos organismos se han aislado de muestras de suelo (Hibberd, 1990). Al microscopio las eustigmatofitas se presentan como una microalga en forma de coco de color verde – amarillo y debido a que morfológicamente son similares a organismos de otras clases, su clasificación mediante observaciones al microscopio es muy difícil. En la mayoría de los géneros la forma es esférica aunque algunas especies presentan células ligeramente

elipsoidales con dimensiones que van de los 2 a los 8  $\mu\text{m}$  de diámetro (Andersen *et al.*, 1998; Fietz *et al.*, 2005; Fawley y Fawley, 2007).

#### **1.2.1.1 *Nannochloropsis***

Actualmente se acepta que el género *Nannochloropsis* se encuentra conformado por seis especies. Los organismos que pertenecen a este género son células aisladas con un cloroplasto parietal y un pirenoide siempre visible al microscopio óptico. Las células vegetativas tienen un cuerpo coloreado de rojo, característica que aumenta de tamaño al envejecer los cultivos. La forma de las células cambia dependiendo del estadio fisiológico, aunque es ligeramente elipsoidal con dimensiones de 3 x 4  $\mu\text{m}$ , aunque en cultivos viejos en ocasiones se presentan células “gigantes”.

Los organismos de este género tienen una distribución particular de pigmentos fotosintéticos, sólo poseen clorofila *a*, un alto contenido de violaxantina y una relación menor entre la vaucheraxantina y la violaxantina que en los pertenecientes a la clase Xanthophyceae y algunas especies sólo contienen  $\alpha$ -caroteno (Lubián, 1982; Andersen *et al.*, 1998; Fietz *et al.*, 2005).

#### **1.2.1.2 Nutrición y Metabolismo**

La mayoría de los organismos que forman parte del género *Nannochloropsis* pertenecen a aguas salobres o marinas, por lo que los medios artificiales empleados para su cultivo tienen salinidades de entre 28 y 44‰. Utilizan como fuente de nitrógeno el nitrato, nitrito, amonio o urea, en la mayoría de los casos en el

crecimiento no presentan diferencias entre las tres primeras fuentes de nitrógeno, mientras que en urea el crecimiento es menor.

Como fuente de fósforo emplean el fosfato, pudiendo ser inorgánico (principalmente sales de sodio o de potasio) u orgánico (Lourenco *et al.*, 2002; Hu y Zhou, 2010). El intervalo de pH que no afecta el crecimiento es entre 7.0 y 8.5 (Sukenik *et al.*, 1997; Huertas *et al.*, 2000; Rocha *et al.*, 2003; Rodolfi *et al.*, 2009).

La absorción de carbono por estos organismos se da mediante transportadores activos, ya que no cuentan con anhidrasa carbónica extracelular. Existe un mecanismo de absorción de  $\text{HCO}_3^-$  dependiente de la luz, que puede mantenerse por un breve periodo de tiempo en la oscuridad. *Nannochloropsis* posee un sistema de transporte de bicarbonato que incrementa la concentración de carbono inorgánico al interior de la célula y cuenta además con una anhidrasa carbónica interna que mantiene el equilibrio entre las concentraciones de  $\text{CO}_2$  y  $\text{HCO}_3^-$  (Huertas *et al.*, 2000; Huertas *et al.*, 2002; Hu y Zhou, 2010).

### **1.2.1.3 Aplicaciones tecnológicas del género *Nannochloropsis***

Debido a las cualidades nutricionales y a su tamaño, los organismos del género *Nannochloropsis* se emplean en acuicultura como alimento vivo para larvas de peces, rotíferos y bivalvos (Lubzens *et al.*, 1995; Ferreira *et al.*, 2011).

En las tres últimas décadas se han demostrado sus características nutricionales, lo que ha reafirmado su empleo en acuicultura frente a otros géneros como

*Scenedesmus* o *Chlorella*. Entre las características destacables como alimento vivo se encuentran:

- Alto contenido de proteína, pudiendo ser en algunos casos superior al 30% (Reboloso – Fuentes *et al.*, 2001; Guil – Guerrero *et al.*, 2004; Ohse *et al.*, 2009).
- Presencia de todos los aminoácidos esenciales (Guil – Guerrero *et al.*, 2004).
- Alto contenido de lípidos, de los cuales un elevado porcentaje son ácidos grasos poliinsaturados, principalmente ácido eicosapentaenoico (20:5  $\omega$ -3) (Lubzens *et al.*, 1995; Wen y Chen, 2003; Guedes *et al.*, 2011).

En los últimos años los organismos de este género, en particular han despertado gran interés, ya que parecen ser una opción viable para la producción de lípidos transesterificables para producir biodiesel, esto debido a que:

- En condiciones de estrés, pueden alcanzar porcentajes de lípidos superiores al 50% de la biomasa seca (Rodolfi *et al.*, 2009).
- Algunas especies son marinas, por lo que no requieren agua dulce para su crecimiento (Lubián, 1982; Sukenik *et al.*, 2009).
- Alcanzan valores de productividad de biomasa superiores a organismos con contenidos similares de lípidos (Rodolfi *et al.*, 2009).

- El contenido de lípidos de cadena media (14 – 18) es superior al 80% (Rodolfi *et al.*, 2009).
- Su fuente principal de carbono es el CO<sub>2</sub> atmosférico (Sukenik *et al.*, 2009)

### 1.2.2 Lípidos

En la actualidad el campo de la biotecnología microalgal enfrenta grandes retos derivados principalmente de la necesidad de obtener fuentes de energía renovables que permitan generar independencia del petróleo (Gavrilescu y Chisti, 2005). En este aspecto las microalgas pueden ser una herramienta poderosa, ya que son fábricas biológicas capaces de convertir el CO<sub>2</sub> atmosférico en una infinidad de compuestos, los cuales pueden ser empleados como fuentes de energía (Chisti, 2007).

La acumulación de lípidos es un aspecto particular de cada especie por lo que se vuelve un fenómeno impredecible. La acumulación de fuentes de carbono (lípidos o carbohidratos) se da cuando su velocidad de crecimiento disminuye (Rodolfi *et al.*, 2009; Valenzuela *et al.*, 2012).

Dentro de los diversos biocombustibles que pueden obtenerse de las microalgas se encuentran: el metano producido a partir de la digestión de la biomasa (Spolaore *et al.*, 2006), el hidrógeno producido por fotofermentación (principalmente *Chlamydomonas*) (Ghirardi *et al.*, 2000; Melis, 2012), los lípidos y su posterior transformación en biodiesel (Gavrilescu y Chisti, 2005; Bankovic-Ilic *et al.*, 2012), etc.

Algunos géneros de microalgas en condiciones especiales de cultivo pueden acumular cantidades considerables de lípidos totales (Chisti, 2007; Rodolfi *et al.*, 2009). Este término se refiere a la fracción que es posible extraer de la biomasa algal mediante el empleo de solventes no polares (cloroformo, hexano, etc.), las cantidades de lípidos pueden variar dependiendo del tipo de solvente empleado, siendo su elección un aspecto fundamental en el proceso de extracción (Greenwell *et al.*, 2010).

Las microalgas producen gran variedad de compuestos apolares, dentro de los cuales se encuentran mono, di y triacilgliceroles, fosfo y glucolípidos, entre muchos otros (Chisti, 2007; Hu *et al.*, 2008). Dentro de la fracción no polar solamente los compuestos pertenecientes al grupo acilgliceroles son los que mediante el proceso de transesterificación pueden convertirse en biodiesel (Chisti, 2007; Verma *et al.*, 2010).

#### **1.2.2.1 Inducción**

Se sabe que las microalgas tienden a acumular ciertas sustancias (almidón, glicerol, lípidos, etc.) cuando se encuentran en condiciones adversas como: deficiencia de nitrógeno o de fósforo, cambios en la temperatura, cambios en el contenido de iones del medio de cultivo, exceso de luz etc. (Lynn *et al.*, 2000; Khozin – Goldberg, 2002; Shen *et al.*, 2010; Pal *et al.*, 2011). Diversos autores han demostrado que incrementos drásticos en la temperatura de cultivo afectan de forma considerable el metabolismo de los organismos fotosintéticos debido principalmente a que el fotosistema II es termolábil (Henley *et al.*, 2002).

En algunas microalgas, los cambios en la temperatura no favorecen un aumento significativo en el contenido específico de lípidos totales, sino que el efecto es más apreciable en el perfil lipídico. Se ha observado que cultivos a temperaturas por debajo del valor óptimo tienden a incrementar la porción de ácidos grasos poliinsaturados con respecto a los saturados (Araujo y García, 2005; Carvalho *et al.*, 2009), mientras que temperaturas elevadas favorecen la acumulación de lípidos de cadena media (14 a 16 carbonos), principalmente los saturados o con pocas insaturaciones (Liu *et al.*, 2005).

#### **1.2.2.1.1 Nitrógeno**

La fuente de nitrógeno juega un papel fundamental en el metabolismo de los seres vivos. En el caso de las microalgas, variaciones en el contenido de nitrógeno del medio de cultivo cambia la composición química de la biomasa. En algunos miembros del grupo Haptophyceae, el empleo de una fuente inorgánica de nitrógeno (nitrito y nitrato) favorece la acumulación de lípidos con respecto a cultivos en presencia de urea (Li *et al.*, 2008).

El estrés nutricional es el que más ha sido estudiado en especies de diversos géneros como una forma de incrementar diversos metabolitos. En el caso de *Haematococcus* en esta condición se presenta un incremento del 30% en la concentración de carotenoides y el contenido específico de lípidos totales se triplica respecto al cultivo en presencia de medio mineral completo (Zhekisheva *et al.*, 2002; Imamoglu *et al.*, 2009).



En cultivos de *Parietochloris incisa* la edad del cultivo y la deficiencia de nitrógeno son los dos factores determinantes para la acumulación de lípidos. En los trabajos de Khozin – Goldberg *et al.*, (2002) mientras que cultivos de siete días de edad presentaron valores cercanos al 16% de lípidos totales, cultivos de 14 días alcanzaron cerca del 25%. En cambio cuando se aplicó la deficiencia de nitrógeno se alcanzó un contenido específico de 350 mg g<sup>-1</sup>, que representó un aumento del 40% respecto al cultivo control. Resultados similares han sido reportados para otros organismos por diversos autores (Gouveia *et al.*, 2009; Pruvost *et al.*, 2009).

Algunos trabajos se han enfocado a realizar una dilución gradual del nitrógeno en el medio de cultivo añadiendo medio de cultivo libre de nitrógeno. Esto ha sido realizado empleando diversas especies de microalgas (*Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Nannochloropsis*, *Chaetoceros*, *Chlorella*, etc.) en cultivos en el laboratorio y a la intemperie. En condiciones de laboratorio la deprivación de nitrógeno ocasionó incrementos en el contenido específico de lípidos en especies de los géneros *Nannochloropsis* y *Tetraselmis*, mientras que en clorófitas de agua dulce no se presentaron cambios (Rodolfi *et al.*, 2009).

Una metodología que ha sido utilizada consiste en iniciar los cultivos con concentraciones elevadas de biomasa y baja cantidad de nitrógeno, de forma que después de algunos días la biomasa ha consumido el nitrógeno del medio ocasionando así una limitación natural de este nutriente (Solovchenko *et al.*, 2008; Pruvost *et al.*, 2009). Esta metodología es más fácil de llevar a cabo, ya que no requiere el empleo de medio libre de nitrógeno.

Algunos autores han buscado otras condiciones de estrés que generen efectos similares a la eliminación del nitrógeno, como es el aumento en la concentración de CO<sub>2</sub> (Hoshida *et al.*, 2005), incremento de la salinidad (Takagi *et al.*, 2006), etc., ya que la variación de la concentración de nitrógeno como factor de estrés es difícil de manipular.

#### **1.2.2.1.2 Dióxido de Carbono**

La introducción directa de CO<sub>2</sub> en el medio de cultivo es la mejor manera de controlar el pH, y al mismo tiempo, de suministrar la fuente de carbono y obtener altas productividades en cultivos masivos de algas (Grobbelaar, 2004).

Algunas especies de microalgas toleran concentraciones altas de CO<sub>2</sub> en la corriente gaseosa en el rango de 5 a 15%<sub>V/V</sub>, e incluso en ocasiones al aumentar la cantidad de CO<sub>2</sub> suministrado se han obtenido incrementos en la productividad y la concentración final de biomasa (de Morais y Costa, 2007; Devgoswami *et al.*, 2011). En ambientes extremos se han aislado organismos capaces de crecer en concentraciones de CO<sub>2</sub> aún mayores al 40% (Ota *et al.*, 2009).

Las especies capaces de soportar concentraciones de CO<sub>2</sub> por encima del 3% presentan importantes cambios metabólicos, principalmente un aumento considerable en la tasa de fotosíntesis, debido principalmente al incremento en la actividad de la anhidrasa carbónica (Miyachi *et al.*, 2003; Eberly y Ely, 2012).

Las variaciones metabólicas originadas por cambios en la cantidad de CO<sub>2</sub> suministrada, afecta de manera considerable la composición de la biomasa,

incrementándose en algunos casos, la cantidad de carbohidratos, proteínas o lípidos (Chinnasamy *et al.*, 2009; Ota *et al.*, 2009; Chiu *et al.*, 2009).

Yusof *et al.*, (2011) en su estudio con las clorofíceas *Chlamydomonas* y *Dunaliella*, incorporaron 4% de CO<sub>2</sub> en la corriente gaseosa adicionada al cultivo y provocaron un aumento superior al 10% en la porción de ácido palmítico en los ácidos grasos respecto a los cultivos donde sólo se inyectó aire sin enriquecer. Mientras que en cultivos de *Chlorella*, el efecto fue más importante en el número de insaturaciones de los lípidos, ya que se favoreció la producción de ácidos grasos con dos y tres dobles enlaces.

#### **1.2.2.1.3 Salinidad**

Los organismos autótrofos se encuentran distribuidos en todos los ambientes (agua, aire y suelo), por lo que se han aislado organismos capaces de resistir condiciones muy diversas. En el caso de la salinidad existen organismos que crecen en aguas dulces, salobres y saladas, por lo que el contenido óptimo de sales minerales depende del origen de cada especie.

El agua de mar presenta una salinidad cercana a 33 g L<sup>-1</sup>, por lo que las especies marinas pueden crecer a estas concentraciones de sal e incluso algunos organismos son capaces de crecer a concentraciones superiores (Cho *et al.*, 2007; Rani, 2007).

En *Botryococcus*, *Nostoc* y *Kirchneriella* de agua dulce, la adición de cantidades de entre 1 y 2 g L<sup>-1</sup>, de cloruro de sodio (NaCl) ocasiona un aumento en la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y por lo tanto en la densidad celular final, aunque

cantidades superiores a 2 g L<sup>-1</sup> pueden generar afectaciones importantes en su crecimiento (Liu *et al.*, 2007; Ferroni *et al.*, 2007; Rao *et al.*, 2007).

Por otra parte, existen especies halófilas que viven en ambientes salinos que soportan concentraciones superiores a 30 g L<sup>-1</sup> de NaCl. *Dunaliella salina* es capaz de crecer en medio mineral conteniendo desde 0.5 hasta 5.5 M de NaCl, aunque el valor óptimo de salinidad para su crecimiento se encuentra en torno a 3 M ( $\approx$  200 g L<sup>-1</sup>) (Kacka y Donmez, 2008). Este organismo, cuando es cultivado en concentraciones superiores al 20% de NaCl produce cantidades importantes de glicerol y de  $\beta$  – caroteno, siendo la acumulación de este último compuesto, el motivo de su cultivo masivo y comercialización (Kacka y Donmez, 2008; Araujo *et al.*, 2009).

Los organismos que viven en ambientes salobres crecen en salinidades entre 4 y 33 g L<sup>-1</sup> (0.5 M) de NaCl. El incremento en la salinidad del medio de cultivo por encima de la concentración óptima específica para cada organismo, genera alteraciones en la composición bioquímica de la biomasa modificándose la proporción de proteínas, carbohidratos y lípidos (Takagi *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008; Pal *et al.*, 2011).

Existen especies de diatomeas marinas que tienden a acumular lípidos cuando la concentración de sal sobrepasa los 33 g L<sup>-1</sup> y algunas de ellas disminuyen el número de insaturaciones y la longitud de los ácidos grasos (Raghavan *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2008).

En cultivos de *Nannochloropsis* sp., el incremento en el contenido de NaCl aumenta el contenido específico de lípidos y el contenido de ácidos grasos poliinsaturados,

favoreciendo la acumulación de ácidos grasos saturados de cadena media (14 a 18 átomos de carbono) (Pal *et al.*, 2011).

### **1.3 Fotobiorreactores**

Se puede definir a los fotobiorreactores (FBR) como los sistemas técnicos para la producción de microorganismos fotosintéticos y pueden dividirse en sistemas abiertos y cerrados. Los FBR son evaluados conforme a sus diferentes configuraciones, productividad potencial y factibilidad económica. La diferencia principal entre los tipos de FBR es el hecho de que el microorganismo tiene o no contacto con el ambiente (Chen *et al.*, 2011).

En los sistemas abiertos, no existe una separación física entre el cultivo y el ambiente que lo rodea. Estos sistemas se pueden clasificar en naturales y artificiales, además de que pueden tener diferentes configuraciones (circulares, carrusel, etc.), tamaños y materiales de construcción (Shimamatsu, 2004). La operación de los sistemas abiertos de cultivo son más sencillos que los sistemas cerrados (Pulz, 2001).

La principal característica de los sistemas cerrados es que el cultivo tiene muy poco o nulo contacto con el ambiente y pueden ser de diversos tamaños y configuraciones, aunque destacan principalmente las configuraciones tubulares o de cara plana. Entre los factores determinantes para el desempeño de estos reactores encontramos: la transparencia del material de construcción así como la turbulencia

del líquido al interior de la unidad de cultivo (Pulz, 2001; del Campo *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2011).

Debido a que las microalgas son un grupo de microorganismos muy diverso, se ha generado una gran cantidad de diferentes configuraciones de FBR dirigidas a satisfacer necesidades muy específicas del microorganismo bajo cultivo, principalmente el suministro de luz, estrés hidrodinámico, suministro de CO<sub>2</sub> (Pulz y Scheibenbogen, 1998; Kumar *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010).

### **1.3.1 Sistemas Abiertos**

El sistema abierto para el cultivo de microalgas más empleado, es el de laguna, en donde los organismos se ven expuestos a condiciones similares a las del ambiente natural. Existe una gran variedad de formas y dimensiones de lagunas, pero la configuración más común es la de carrusel con una profundidad de líquido de 15 a 30 cm, agitado por turbinas con paletas (Jorquera *et al.*, 2010). Los valores de biomasa alcanzados con este diseño son alrededor de 1 g L<sup>-1</sup> con productividades de 10 a 250 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (Radmann *et al.*, 2007). Las principales desventajas que presentan las lagunas son: necesidad de grandes extensiones de tierra, pérdidas importantes de agua por evaporación, alto riesgo de contaminación, bajas eficiencias de uso de la luz, variaciones amplias de temperatura, baja concentración de biomasa (Pulz, 2001; Richmond, 2004; Carvalho *et al.*, 2006; Jorquera *et al.*, 2010).

La utilización de lagunas sólo es posible cuando se cultivan microorganismos que crecen en condiciones selectivas (alta alcalinidad, alta salinidad, etc.), esto para que

se garantice la permanencia mayoritaria de las especies de interés (Richmond, 2004). Ejemplos clásicos de organismos cultivados comercialmente en este tipo de sistema de cultivo son: *D. salina*, para la producción de  $\beta$  – caroteno, que requiere un elevado grado de salinidad en su medio de cultivo y las diferentes especies del género *Spirulina*, como fuente de proteína y pigmentos, que requieren valores de pH superiores a 9 (Converti *et al.*, 2006).

A pesar de que se han desarrollado sistemas altamente sofisticados y especializados para el cultivo de microalgas, el empleo de sistemas abiertos es el más importante para la generación de biomasa algal (Chisti, 2007). Sin embargo, para la obtención de productos de interés farmacéutico o alimenticio, o cuando se requiere cultivar a altas concentraciones celulares, se hace necesario el empleo de sistemas cerrados, que permitan controlar las condiciones de producción (Pulz, 2001; Chen *et al.*, 2011).

### **1.3.2 Sistemas Cerrados**

Las condiciones a las que se ven expuestos los cultivos dentro de los FBR son muy diferentes a las condiciones en que las microalgas se desarrollan en el ambiente natural. Principalmente se ven modificadas: la densidad de células, que aumenta en varios órdenes de magnitud y el abastecimiento de luz, que en la naturaleza sigue un ritmo normal, en el laboratorio este abastecimiento se ve modificado a luz continua o fotoperíodos de diferente duración (Pulz, 2001; Brennan y Owende, 2010).

Adicionalmente, en los sistemas cerrados las células se ven sujetas a valores controlados de pH, concentraciones fijas de nutrientes, se evitan las variaciones

fisiológicas y se someten a un estrés mecánico fuerte y continuo generado por la agitación y el burbujeo dentro de las unidades de cultivo (Pulz, 2001; Brennan y Owende, 2010).

Los FBR se caracterizan por la facilidad del control de parámetros biotecnológicos importantes, la reproducibilidad de las condiciones de cultivo, la ausencia de pérdidas importantes de CO<sub>2</sub>, la flexibilidad en el diseño, las pérdidas de agua por evaporación son despreciables, se disminuye el riesgo de contaminación, etc. (Chen *et al.*, 2011).

La posibilidad de evitar la contaminación de los cultivos con organismos no deseados se vuelve trascendental, cuando se desea producir compuestos químicos de alto valor agregado, como son: pigmentos, polisacáridos, antimicóticos, antibacterianos, antitumorales entre muchos otros (Converti *et al.*, 2006; Brennan y Owende, 2010).

Los primeros intentos para desarrollar los sistemas cerrados de cultivo se presentaron a mediados de la década de los 60's, las principales limitaciones fueron el suministro limitado de la luz necesaria para cultivar los microorganismos. Con el fin de resolver el problema de la limitación de luz, se ensayaron muchas propuestas, y entre ellas, el empleo de lámparas sumergibles o de difusores de luz construidos con fibra óptica (Brennan y Owende, 2010) y de aplicación sólo para un número reducido de especies empleadas en acuicultura.

Los FBR cerrados que se utilizan para el cultivo de microalgas, normalmente siguen cualquiera de las siguientes configuraciones:



1. Sistemas tubulares. Pueden ser contruidos con plástico, vidrio, polimetilmetacrilato, policarbonato o incluso bolsas de polietileno (Chen *et al.*, 2011).
2. Sistemas tipo cara plana. Su principal característica es que el espesor del cultivo es menor a 7 cm para favorecer la absorción de luz (Doucha y Livansky, 2009; Torzillo *et al.*, 2010).
3. Configuraciones tipo fermentador. Contruidos principalmente de cristal, tienen la ventaja de poder ser esterilizados con vapor. En ciertos casos estas configuraciones se emplean para realizar cultivos heterotróficos de microalgas (Ugwu *et al.*, 2008), donde se emplean medios de cultivo ricos en carbono orgánico.

Entre las configuraciones de reactores tubulares destacan principalmente: (1) columnas burbujeadas, (2) horizontales, (3) horizontales sumergidos, (4) helicoidales, (5) helicoidales cónicos (Torzillo *et al.*, 1991; Del Campo *et al.*, 2001; Jácome – Pilco *et al.*, 2009). En estos dispositivos, la relación entre el área superficial iluminada y el volumen de cultivo ( $A_s/V$ ) es muy alta. Aunque la configuración y longitud de los tubos, en este tipo de reactores, en ocasiones dificulta la remoción del oxígeno producido por el proceso fotosintético por lo que puede alcanzar concentraciones inhibitorias para el crecimiento (Pulz, 2001).

En los sistemas de cara plana la inyección de aire se realiza por la parte inferior y en esta configuración se presenta alta turbulencia, buena transferencia de masa, pero

una baja relación entre la área superficial iluminada y el volumen de operación del reactor ( $A_s/V$ ), por lo que en cultivos densos se produce el fenómeno de autosombreado.

Los FBR tipo fermentador, tienen una relación  $A_s/V$  muy baja, además, en ellos la eficiencia de utilización de la luz es menor que en los tipos anteriores. En algunos casos se han implementado sistemas sofisticados para la adición extra de energía luminosa como difusores de fibra de vidrio o lámparas internas. Cuando se cultivan especies de microalgas capaces de crecer en condiciones de heterotrofia, donde se requieren condiciones de esterilidad, se emplean con mayor frecuencia este tipo de FBR (Pulz, 2001).

#### **1.3.2.1 Tubulares**

Dentro de los sistemas cerrados, los más empleados han sido los FBR tubulares y los primeros trabajos reportados se remontan a la segunda mitad de década de los 70's. El primer organismo cultivado en FBR de esta configuración fue *Spirulina*, la cual había despertado interés debido a su alto contenido en proteína y su excelente perfil de aminoácidos (Torzillo *et al.*, 1991; Torzillo y Vonshak, 1994). Los primeros intentos pretendían aislar al cultivo del medio ambiente, incrementando así la calidad de la biomasa, dado su uso como alimento humano. Desafortunadamente en estos ensayos se presentaron obstáculos que afectaron el rendimiento de los cultivos, dentro de los cuales destacaron: el aumento en la temperatura del cultivo, ya que se alcanzaban valores superiores en más de 10% con respecto a los valores óptimos (Torzillo *et al.*, 1991; Torzillo y Vonshak, 1994); la acumulación de oxígeno ocasionó

concentraciones que sobrepasaban los valores de saturación en 200 y hasta 400% (Molina *et al.*, 2001).

Sin embargo, la configuración tubular presentó ventajas con respecto a las lagunas, además de permitir aislar el cultivo del ambiente (Molina *et al.*, 2001). Entre los beneficios del empleo de rectores tubulares se encuentran: obtención de cultivos más concentrados, lo que disminuye los gastos de cosecha de la biomasa, empleo más eficiente de la luz suministrada, mejor mezclado y por lo tanto mayor homogeneidad en el cultivo, disminución de las pérdidas de líquido por evaporación, etc. (Torzillo y Vonshak, 1994; Del Campo *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2011).

Actualmente se han desarrollado configuraciones de FBR tubulares con objetivos muy precisos, por lo que existe una gran diversidad de modelos, dentro de las que se pueden destacar las siguientes:

- Tubos de polietileno empleados para el cultivo de diversos géneros de rodofitas, diatomeas, etc. (Rodolfi *et al.*, 2003)
- Tubos horizontales para el cultivo a la intemperie de *Spirulina* (Torzillo *et al.*, 1991; Converti *et al.*, 2006).
- Tubos de polietileno en configuración helicoidal para el cultivo de cianobacterias (Concas *et al.*, 2010).
- Columnas verticales para el cultivo de diversas especies productoras de carotenoides (Loubiere *et al.*, 2009), etc.

Dentro de las configuraciones anteriormente enumeradas probablemente la que más interés y mejores resultados ha dado es sin duda la del FBR tubular horizontal, ya que no necesita sistemas complicados de soporte como es el caso de los que utilizan bolsas de polietileno o los helicoidales (Concas *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011). Además, gracias a su reducido diámetro, el cultivo obtiene la luz necesaria para su crecimiento y en caso de requerir control de temperatura, se pueden sumergir en contenedores con agua a temperatura constante, aunque el gasto energético más importante es el empleado para bombear el cultivo sin embargo resulta menor al generado por otros tipos de configuraciones (García – Gonzales *et al.*, 2005).

## **2. Justificación**

La disminución de las reservas de petróleo, sus altos costos de extracción y refinamiento, así como la contaminación que se genera de su empleo, hace imperiosa la búsqueda de alternativas amigables con el ambiente. Debido a esto se han propuesto diferentes bioenergéticos, dentro de los cuales destaca el biodiesel como un posible sustituto del diesel, ya que su empleo no requiere de modificaciones mayores en los motores de combustión interna.

El biodiesel puede producirse a partir de lípidos mediante una transesterificación de sus ácidos grasos, por lo que actualmente se produce a partir de aceites gastados, grasas animales y más recientemente a partir de aceites vegetales (colza, soya, maíz, etc). Sin embargo, el empleo de aceites comestibles ha generado incrementos en el precio de los alimentos, afectando considerablemente la seguridad alimentaria de la población.

El empleo de los lípidos contenidos en la biomasa de las microalgas, tiene el potencial para ser materia prima en la producción de biodiesel, ya que presenta una composición muy similar a los aceites vegetales, además de que existen géneros que alcanzan contenidos de lípidos hasta del 50% de su biomasa seca.

Dentro de las ventajas que presentan las microalgas frente a los cultivos vegetales destacan: su capacidad para emplear como fuente de carbono el CO<sub>2</sub> proveniente de gases exhaustos de chimenea; el presentar mayores velocidades de crecimiento

respecto a las plantas y el poder cosechar su biomasa en períodos muy cortos de tiempo, lo que hace posible un proceso continuo.

Sin embargo, aún no se ha generado un proceso eficiente que alcance valores elevados de productividad, ya que no se ha encontrado una condición de estrés, que incremente el contenido de lípidos de forma considerable. Por lo que actualmente, los tiempos de inducción son largos (superiores a 5 días).

Por lo anterior, se hace necesario el estudio de las interacciones entre la cantidad suministrada de carbono y el estrés nutricional en la producción de lípidos totales de *Nannochloropsis* sp., con el fin de obtener condiciones que incrementen su productividad, para posteriormente ensayar estas condiciones en un proceso de producción de biomasa empleando *Nannochloropsis* sp. en un FBR tubular horizontal de 20 L.

### 3. Hipótesis de trabajo.

- El contenido específico de lípidos totales de *Nannochloropsis* sp. se incrementará al aplicar estrés por salinidad.
- La adición de CO<sub>2</sub> a un cultivo de *Nannochloropsis* sp., estimulará la actividad fotosintética y el transporte electrónico y favorecerá la producción de lípidos.
- La productividad de lípidos totales de *Nannochloropsis* sp. se verá incrementada en un proceso de dos etapas, la primera de crecimiento celular y la segunda de inducción por incremento en la salinidad del medio de cultivo.

## 4. Objetivo General

Evaluar el efecto de la adición de CO<sub>2</sub>, el cambio de la fuente de nitrógeno y la salinidad del medio de cultivo sobre la producción de biomasa y contenido de lípidos de *Nannochloropsis* sp.

### 4.1 Objetivos Particulares

- Determinar el de la fuente de nitrógeno y la adición de CO<sub>2</sub> en la fisiología, el crecimiento, y contenido de lípidos totales de *Nannochloropsis* sp.
- Determinar el efecto de la concentración de NaCl en el crecimiento, tasa de fotosíntesis y respiración, y contenido de lípidos totales de *Nannochloropsis* sp.
- Evaluar la productividad de *Nannochloropsis* sp. de un proceso en dos etapas, primero crecimiento celular y posteriormente la inducción por incremento en la salinidad del medio de cultivo.



## **5. Materiales y métodos**

### **5.1 Medio de cultivo y microorganismo**

Se emplearon dos cepas, *Nannochloropsis gaditana* facilitada por el Dr. Emilio Molina Grima de la Universidad de Almería, Almería España. *Nannochloropsis* sp. facilitada por el Dr. Avigad Vonshak del J. Blaustein Institute for Desert Research, Universidad Ben Gurion del Negev.

### **5.2 Medio de cultivo**

*N. gaditana* fue mantenida en el medio mineral Algal (Fabregas *et al.*, 1984), mientras que *Nannochloropsis* sp. fue cultivada en agua de mar sintética (Richmond y Cheng – Wu 2001).

### **5.3 Métodos analíticos**

#### **5.3.1 Peso Seco**

El peso celular seco (PS) se cuantificó tomando alícuotas del cultivo de volumen conocido, las cuales se filtraron a través de membranas de nitrocelulosa Millipore® de 2 µm de diámetro de poro. Previamente, los filtros fueron llevados a peso constante, manteniéndolos a 70° C por 24 h. Una vez filtradas, las muestras se desecaron por 24 h a 70° C para después determinar el PS de la biomasa.

### **5.3.2 Pigmentos fotosintéticos**

Las muestras se centrifugaron a 4,000 rpm por 5 min a temperatura ambiente, al paquete celular se le adicionó un volumen conocido de una mezcla acetona:agua destilada (9:1) y aproximadamente 1 g de microesferas de cristal. Para asegurar la ruptura celular, la mezcla se agitó utilizando un vortex a la máxima velocidad por 3 min y después, fue nuevamente centrifugada a 4,000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Al sobrenadante se le midió su absorbancia a 450, 630, 645, 663 y 750 nm y las concentraciones de clorofila *a* y carotenoides totales se determinaron según Lichtenthaler (1987).

### **5.3.3 Contenido específico de lípidos**

#### **5.3.3.1 A partir de biomasa fresca**

Para la determinación de lípidos totales se emplearon alícuotas conteniendo entre 40 y 120 µg de biomasa en tubos de ensayo con cierre hermético (Hasch®, USA), se centrifugaron durante 10 min a 4,000 rpm, el líquido se retiró por decantación. Al paquete celular se le adicionó 1 mL de hexano grado HPLC y aproximadamente 1 g de microesferas de cristal (diámetro entre 0.17 y 0.18 mm). La ruptura celular se realizó agitando en un vortex a máxima velocidad por 3 min, después de los cuales se adicionó un volumen conocido de hexano. La muestra fue mantenida en refrigeración por 24 h para permitir la extracción completa de los lípidos. Transcurrido este tiempo, las muestras se llevaron a temperatura ambiente y se centrifugaron por 3 min a 4,000 rpm. Se tomó una alícuota (por triplicado) de volumen conocido y se

transfirió a un tubo para digestión (Hasch®, USA), el cual fue colocado a 80 °C por 10 min para evaporar el solvente. Al extracto oleoso se le determinó la cantidad de lípidos totales solubles en hexano por el método de carbonización con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Marsh y Weinstein, 1966) utilizando tripalmitina como estándar (Sigma Aldrich®, USA).

### **5.3.3.2 A partir de biomasa liofilizada**

La extracción de lípidos totales se hizo de acuerdo a la técnica de Bligh y Dyer (1959), se partió de biomasa liofilizada (de 50 a 100 mg) a la cual se le agregaron 2 mL de metanol, 1 mL de cloroformo y 0.8 mL de agua destilada agitando en el vortex por 30 s después de cada adición. La mezcla se dejó reposar por 24 h en oscuridad a temperatura ambiente, para favorecer la extracción de los lípidos. Posteriormente se centrifugó a 3600 rpm por 5 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo de ensayo previamente pesado. A la biomasa se le adicionaron 1 mL de metanol, 0.5 mL de cloroformo y 0.4 mL de agua destilada, agitando en el vortex por 30 seg después de cada adición. La mezcla se centrifugó de nuevo a 3500 rpm por 5 min y el sobrenadante se transfirió al tubo de ensayo que contenía la fracción lipídica de la primera extracción. A los solventes conteniendo los lípidos se les adicionaron 1.5 mL de cloroformo y 1.5 mL de agua destilada con el fin de tener una relación metanol: cloroformo: agua de 3:3:2.7 para favorecer la separación de la fracción lipídica (inferior) e hidro – alcohólica (superior).

El extracto lipídico fue centrifugado a 3500 rpm por 5 min. Se retiró la fracción hidro – alcohólica empleando una pipeta Pasteur y la fracción lipídica se llevó a sequedad en

el horno a 60 °C por 24 h hasta peso contante. El contenido de lípidos se calculó de la siguiente forma:

$$\text{Contenido específico (glípidos/100 g}_{\text{Biomasa}}) = \frac{\left(\frac{\text{Peso de tubo con lípidos}}{\text{Biomasa pesada}}\right) - \left(\frac{\text{Peso de tubo sin lípidos}}{\text{Biomasa pesada}}\right)}{\text{Biomasa pesada}} \times 100$$

#### 5.3.4 Perfil de lípidos

Se tomó 1 mL del extracto oleoso y se colocó en baño María a 70° C hasta sequedad, después se adicionaron 0.5 mL de trifluoruro de boro (BF<sub>3</sub>) al 12% en metanol. La mezcla se colocó en baño María a 92° C por 20 min y una vez a temperatura constante se adicionaron 1 mL de hexano y 0.5 mL de agua destilada, se agitó en vortex y luego se dejó en reposo por 5 min, posteriormente con una pipeta Pasteur se extrajo el hexano conteniendo los ésteres metílicos de ácidos grasos y se colocó en viales de cristal con cierre hermético.

La determinación del perfil lipídico se realizó mediante Cromatografía de Gases, empleando un cromatógrafo Perkin – Elmer Autosystem, con una columna HP – INNOWAX 30 m x 0.320 mm x 0.50 µm. La temperatura se varió de la siguiente manera: inició en 150 °C manteniéndose así durante 2 min, después se inició una primera rampa a 5 °C por min hasta alcanzar 200 °C, después se inició una segunda rampa a 2 °C por min hasta alcanzar 250 °C y este valor se mantuvo contante durante 16 min. El inyector y el detector del cromatógrafo se mantuvieron a 150 °C y 250 °C respectivamente. Se inyectaron 2 µL de extracto metil ésteres de ácidos grasos en hexano (FAME) empleando hidrógeno como gas acarreador.

### **5.3.5 Nitrógeno**

Al sobrenadante libre de células se le determinó el contenido de nitrógeno proveniente de nitratos por el método de brucina-ácido sulfámico (APHA *et al.*, 2012).

### **5.3.6 Fósforo**

Para determinar la concentración de fósforo inorgánico en el medio de cultivo, se empleó el método modificado de Taussky y Shorr (González y Peñalosa 2000).

### **5.3.7 Actividad fotosintética por emisión de fluorescencia de la clorofila *a* del fotosistema II (PSII)**

#### **5.3.7.1 Prueba OJIP**

La emisión de la fluorescencia de la clorofila *a* en el PS II se midió utilizando un fluorómetro portátil marca HANDY – PEA (Hansatech, UK). Las muestras (n=3) se ajustaron a una misma concentración de clorofila *a*. Se tomaron 2 mL del cultivo y se depositaron en la cámara interna del instrumento. Previamente las muestras se incubaron en oscuridad por 15 min, para después ser irradiadas con una luz roja (660 nm) saturante ( $1200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) por 2 s. La emisión de fluorescencia fue registrada por un detector con filtro de corte para emisión a 685 nm. Los valores de la fluorescencia mínima,  $F_o$  a los 50  $\mu\text{s}$ , la fluorescencia máxima,  $F_m$  a los 200 ms y la fluorescencia variable ( $F_v = F_m - F_o$ ), se registraron automáticamente por el equipo. La interpretación de los datos se llevó a cabo con el programa Handy-PEA desarrollado por la misma Compañía Hansatech, U.K. y el programa Biolizer – HP3, diseñado en

el Laboratorio de Bioenergética de la Universidad de Ginebra en Suiza. La obtención de los parámetros se realizó según el análisis de la prueba de OJIP, de acuerdo con van Heerden *et al.* (2004).

### **5.3.7.2 Método de pulsos saturantes**

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 (PAM 2100, Walz, Effeltrich, Alemania). La medición se realizó en muestras preincubadas en oscuridad por 5 min. El valor de  $F_o$  a temperatura ambiente se obtuvo irradiando la muestra con una luz modulada de baja intensidad ( $0.3 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) por 4 s, después se sobrepuso un pulso saturante de luz blanca de  $2100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  por 0.8 s para cerrar todos los centros de reacción y obtener el valor máximo de fluorescencia  $F_m$ . La fluorescencia en el estado fotosintético estacionario  $F_s$ , se logró utilizando una luz actínica blanca de  $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . El valor de fluorescencia máxima en estado estacionario  $F'_m$  se obtuvo sobreponiendo un pulso de luz blanca saturante de  $2,100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  por 0.8 s. La fluorescencia mínima  $F'_o$  en estado estacionario se obtuvo apagando la luz roja e irradiando con luz infrarroja de 750 nm a baja intensidad  $1.5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Los valores puntuales de fluorescencia se almacenaron y analizaron empleando el programa PAM – WIN (Walz, Effeltrich, Alemania). Los parámetros obtenidos fueron: el rendimiento cuántico máximo ( $F_v/F_M$ ), el rendimiento cuántico operacional ( $\Phi$  PS II), calculados de acuerdo a Maxwell y Johnson (2000).

### 5.3.8 Tasas de fotosíntesis y respiración

Se realizaron determinaciones de las tasas de fotosíntesis y respiración en alícuotas del cultivo. Las muestras fueron diluidas con medio de cultivo a fin de obtener una concentración de clorofila a de entre 4 y 8 mg Chl a L<sup>-1</sup>. La tasa fotosintética se midió como liberación de oxígeno y la respiratoria como consumo del mismo. Las mediciones se realizaron empleando un oxímetro (Hansatech Instruments, Norfolk, UK) a temperatura controlada de 25° C. La tasa de liberación de oxígeno (Tasa de Fotosíntesis Neta, TFN) se determinó iluminando con luz blanca actínica de 500  $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  por un minuto. Inmediatamente después de apagada la luz, se registró la velocidad de consumo de oxígeno (Tasa de Respiración, TR) por dos minutos.

La tasa total de fotosíntesis (TTF) de los cultivos se calculó como la suma del oxígeno producido (en la luz) y consumido (en la oscuridad).

## **6. Estrategia experimental**

### **6.1 Comparación de cepas del género *Nannochloropsis***

Se realizó una comparación del crecimiento de las cepas *Nannochloropsis* sp. y *Nannochloropsis gaditana* y se compararon al mismo tiempo los medios de cultivo Algal (Fábregas *et al.*, 1984) y ASW (Richmond y Cheng – Wu, 2001).

El seguimiento del cultivo se hizo durante 112 h realizando dos determinaciones diarias de crecimiento, Clorofila *a* y carotenoides totales. Además, al final del experimento se realizó la cuantificación de los lípidos totales. Lo anterior se llevó a cabo en alícuotas procedentes de FBR de columna de burbujeo de 500 mL de volumen total y 450 mL de volumen de operación. Los cultivos fueron burbujeados con aire enriquecido con CO<sub>2</sub> al 3 %<sub>v/v</sub>.

### **6.2 Efecto de la adición de CO<sub>2</sub> y de la fuente de carbono sobre la fisiología, crecimiento y contenido de lípidos de *Nannochloropsis* sp.**

Dado que la cepa de *Nannochloropsis* sp. presentó un mayor crecimiento empleando el medio de cultivo reportado por Richmond y Cheng – Wu (2001) fue la cepa y medio de cultivo empleados en las siguientes etapas experimentales.

Se evaluó el efecto del tipo en la fuente de nitrógeno y la adición de CO<sub>2</sub> sobre el crecimiento, fisiología y contenido específico de lípidos en *Nannochloropsis* sp., se emplearon nitrato de sodio, cloruro de amonio y urea como fuente de nitrógeno, manteniendo la concentración de este elemento en 138.5 mg<sub>N</sub> L<sup>-1</sup>. Se realizó el



seguimiento del cultivo durante 148 h realizando determinaciones diarias de PS, Chla, carotenoides totales y actividad fotosintética por fluorescencia de la Chla del PSII. Al final del experimento se cuantificó el contenido específico de lípidos y se determinó el perfil de ácidos grasos del extracto oleoso.

### **6.3 Efecto de la cantidad de NaCl en el medio de cultivo sobre la fisiología de *Nannochloropsis* sp.**

Se realizaron una serie de experimentos encaminados a determinar el efecto de la adición de NaCl sobre la fisiología de *Nannochloropsis* sp. en los cuales se probaron las concentraciones de 13.5, 27, 54 y 81 g L<sup>-1</sup> de NaCl teniendo como control el cultivo a 27 g L<sup>-1</sup> ya que es la salinidad original del medio de cultivo empleado.

Se realizó el seguimiento del cultivo durante 96 h realizando determinaciones diarias de PS, Chla, carotenoides totales, lípidos totales (LT), TTF, TR y actividad fotosintética por emisión de fluorescencia de la clorofila a del PSII. Esto se llevó a cabo en FBR de columna de burbujas de 500 mL de volumen total y 450 mL de volumen de operación. Los cultivos fueron burbujeados con aire enriquecido con 3 %<sub>v/v</sub> de CO<sub>2</sub>.

### **6.4 Efecto inmediato de la cantidad de NaCl en el medio de cultivo sobre la fisiología de *Nannochloropsis* sp.**

Para conocer el efecto inmediato de la adición de NaCl sobre la fisiología de *Nannochloropsis* sp. se emplearon cultivos con 50 mg L<sup>-1</sup> de concentración celular base seca y se expusieron a concentraciones de NaCl de 13.5, 27, 54 y 81 g L<sup>-1</sup>.

Durante 6 h, se realizaron mediciones de tasa de fotosíntesis, tasa de respiración, Chla, carotenoides totales y actividad fotosintética por fluorescencia de la clorofila *a* del PSII. Lo anterior se llevó a cabo en un FBR de columna de burbujas de 500 mL de volumen total y 450 mL de volumen de operación. Los cultivos fueron burbujeados con aire enriquecido con 3 %<sub>v/v</sub> de CO<sub>2</sub>.

### **6.5 Efecto de la concentración de NaCl en el medio de cultivo sobre el crecimiento y contenido de lípidos de *Nannochloropsis* sp., en cultivos de alta densidad celular**

Considerando los resultados obtenidos en la etapa anterior, se emplearon 27 g L<sup>-1</sup> como control y 54 g L<sup>-1</sup> (2X) de NaCl. Para evaluar el efecto de la adición de NaCl sobre cultivos a alta concentración de biomasa (>2 g L<sup>-1</sup>), se realizó el seguimiento de un cultivo por 96 h con una concentración inicial de biomasa de 2.5 g L<sup>-1</sup>. Para obtener dicha concentración inicial de biomasa se centrifugaron 3 L de cultivo creciendo en fase exponencial y se resuspendieron en medio mineral ASW completo con la concentración de NaCl correspondiente (27 g L<sup>-1</sup> y 54 g L<sup>-1</sup>). Se le realizaron determinaciones diarias de PS, Chla y lípidos totales.

### **6.6 Proceso en dos etapas para la producción de lípidos en un FBR de 20 L, la primera de crecimiento celular y una posterior de inducción por estrés salino**

Se construyó un FBR tubular de 20 L de volumen total y 17 L de volumen de operación empleando tubos de acrílico. Se construyó un FBR tubular de 20 L, con un

volumen de operación de 17 L empleando tubos de acrílico de 7 cm de diámetro. Se empleó una bomba con un flujo de  $60 \text{ L min}^{-1}$  para mantener homogéneo el cultivo y un desgasificador de 2 L para favorecer la eliminación del oxígeno del medio de cultivo producido por la fotosíntesis. La adición de  $\text{CO}_2$  se realizó a la salida del desgasificador, para favorecer tiempos de residencia del gas mayores.

## 7. Resultados y Discusión

### 7.1 Comparación de cepas de *Nannochloropsis*

La dificultad del suministro de agua de mar para cultivos de organismos marinos en laboratorios e institutos lejanos a zonas costeras, ha ocasionado que se hayan generado formulaciones de agua de mar sintética (Walne, 1970; Harrison *et al.*, 1980; Spotte *et al.*, 1994; Cañizares *et al.*, 1994).

Los integrantes del género *Nannochloropsis* han sido aislados de diferentes ambientes salinos, algunos de ellos de zonas costeras y muestras de suelo (Hibberd, 1990); ésto ha ocasionado que en los últimos 20 años se hayan desarrollado formulaciones simulando la composición del agua de mar para emplearlas como medios de cultivo para su crecimiento (Fábregas *et al.*, 1984; Richmond y Cheng – Wu, 2001; Hu y Gao, 2006) y se han obtenido diferentes respuestas de las cepas empleadas (Fábregas *et al.*, 1984; Richmond y Cheng – Wu, 2001; Hu y Gao, 2006; Lin y Lin, 2011; Simionato *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012; Griffiths *et al.*, 2012; Sforza *et al.*, 2012).

Debido a las diferentes formulaciones de agua de mar sintética, resulta importante emplear un medio de cultivo que incremente la concentración de biomasa de la cepa de *Nannochloropsis* a emplear. En la Figura 1 se observa la cinética de crecimiento de las cepas *Nannochloropsis* sp. y *N. gaditana* creciendo en los medios de cultivo Algal y ASW. Todos los cultivos presentaron un crecimiento acelerado y sostenido durante el experimento y alcanzaron valores de entre 500 y 700 mg L<sup>-1</sup> a las 112 h.

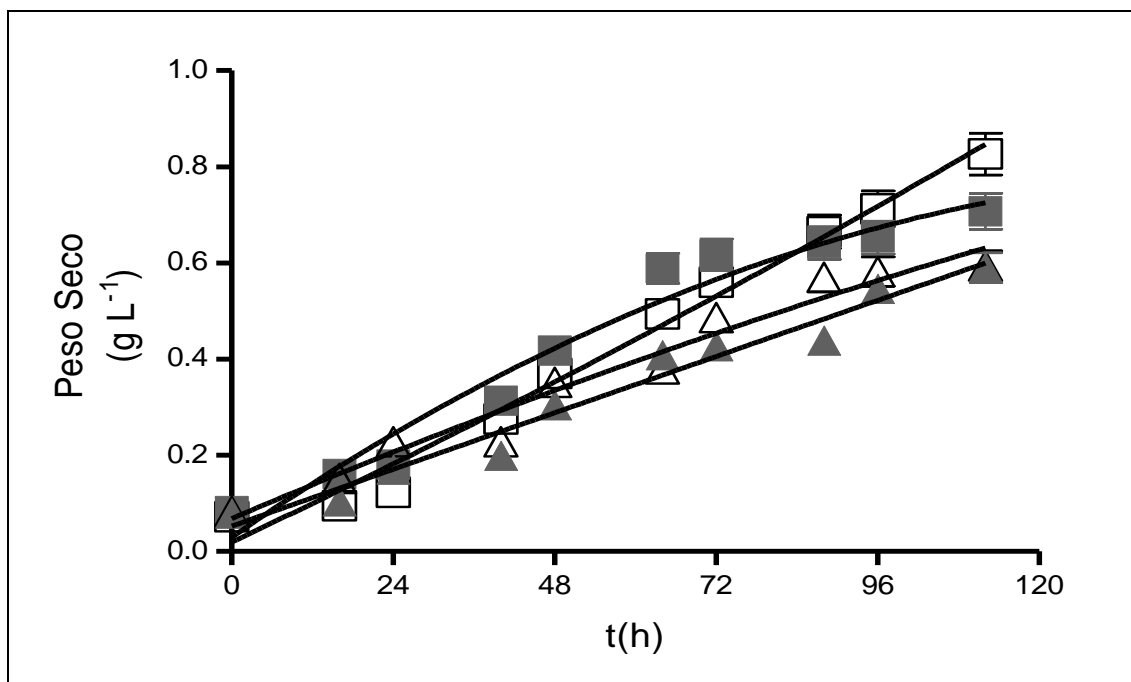


Figura 1. Cinética de crecimiento de dos especies del género *Nannochloropsis* en base a PS. (□) *Nannochloropsis* sp. (Δ) *N. gaditana*. Los símbolos vacíos corresponden al medio ASW y los llenos al Algal.

En la figura 1 se observa que la cepa de *Nannochloropsis* sp. alcanzó valores 39 y 20% superiores a las concentraciones finales de biomasa obtenidas para *N. gaditana* en los medios de cultivo ASW y Algal respectivamente.

El medio de cultivo ASW ocasionó incrementos significativos ( $p < 0.001$ ) en la concentración final de biomasa alcanzada por los cultivos de *Nannochloropsis* sp. respecto a las obtenidas cuando se empleó el medio Algal. Estas diferencias se debieron a que los contenidos de nitrógeno y fósforo del ASW son 5 y 40 veces superiores a los del medio Algal (Fábregas *et al.*, 1984; Gitelson *et al.*, 2000).

Se ha reportado que cuando diversas especies de microalgas crecen en medios ricos en nitrógeno y fósforo se incrementa la acumulación de biomasa (Fábregas *et al.*, 1984; Quevedo *et al.*, 2008; Bermúdez *et al.*, 2004). Esto se atribuye a que altos contenidos de nitrógeno favorecen el incremento de la tasa de producción de proteínas y estimulan la acumulación de ATP, mejorando en consecuencia los procesos de transferencia de energía (Quevedo *et al.*, 2008; Bermúdez *et al.*, 2004).

En los procesos biotecnológicos la productividad volumétrica de biomasa es un parámetro de gran utilidad, ya que en su cálculo se considera el tiempo consumido en el proceso. Dado que la cepa de *Nannochloropsis* sp. presentó los valores de PS mayores, se calculó la productividad volumétrica (Fig. 2). Se observa que los valores alcanzados empleando el medio Algal son significativamente superiores ( $p < 0.001$ ), durante los primeros 3 d de cultivo, a los alcanzados en el medio ASW.

A partir de los 3.5 d del cultivo, las células con medio ASW presentaron valores superiores de productividad y lo mantuvo constante hasta el final del experimento. Los valores máximos de productividad de *Nannochloropsis* sp. para cada medio de cultivo empleados fueron 189.2 y 162.7 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> para Algal y ASW respectivamente.

Los valores de productividad para cultivos de *Nannochloropsis* en condiciones de laboratorio se encuentran en un intervalo de 80 a 250 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (Biondi *et al.*, 2012; Fábregas *et al.*, 2004; Gu *et al.*, 2012). Por lo anterior se puede considerar que los medios de cultivo Algal y ASW serían viables para la producción masiva de *Nannochloropsis* sp. aunque cabe destacar que las células en el medio ASW

mantiene durante más tiempo la productividad en su valor máximo, debido a que presenta mayor contenido de nitrógeno y fósforo.

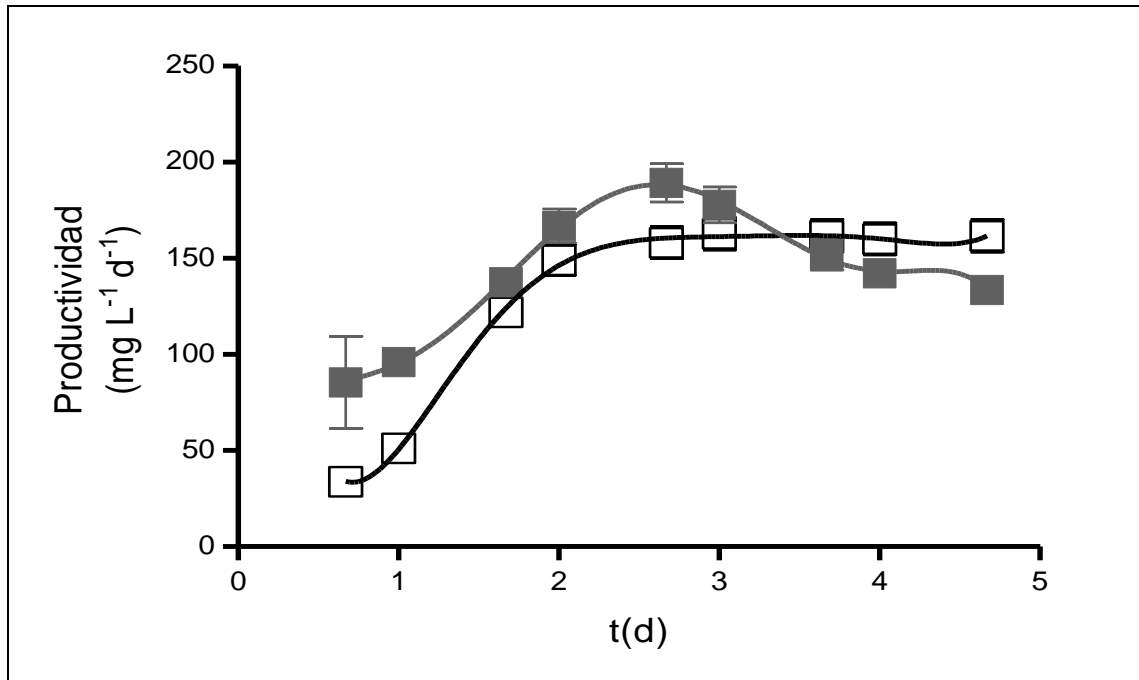


Figura 2. Productividad volumétrica de biomasa de *Nannochloropsis* sp. Los símbolos vacíos corresponden al medio ASW y los llenos al Algal

Respecto a la concentración de Chla (Fig. 3), las cepas empleadas presentaron diferencias significativas ( $p < 0.001$ ), siendo mayor en *Nannochloropsis* sp. que en *N. gaditana*. En esta última se alcanzó una concentración máxima cercana a  $5 \text{ mg L}^{-1}$  entre las 48 y las 60 h sin importar el medio de cultivo empleado.

En cambio, para *Nannochloropsis* sp. las concentraciones máximas se alcanzaron entre las 72 y 96 h y fue de  $10.6 \pm 1.85$  y  $12.8 \pm 1.02 \text{ mg L}^{-1}$  para Algal y ASW respectivamente. A partir de las 96 h la concentración comienza a disminuir sensiblemente, muy probablemente debido al envejecimiento del cultivo, ya que el

contenido de clorofila *a* por célula permanece constante sólo mientras las células crecen exponencialmente y esto ocurre normalmente hasta las 72 o 96 h de cultivo.

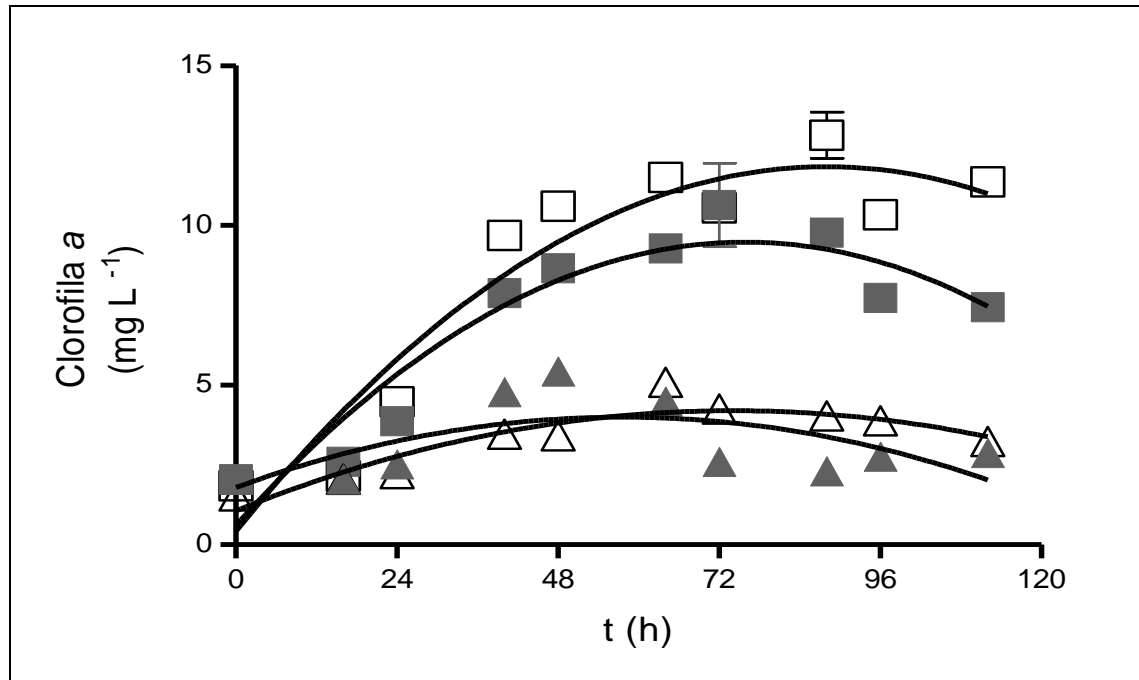


Figura 3. Concentración de Chla de dos especies del género *Nannochloropsis*. (□) *Nannochloropsis* sp. (Δ) *N. gaditana*. Los símbolos vacíos corresponden al medio ASW y los llenos al Algal

En las condiciones experimentales, se ve un aumento exponencial, en la concentración volumétrica de Chla, durante las primeras 48 h, a partir de las cuales en el caso de los cultivos de *N. gaditana* se mantienen constantes hasta el final del experimento.

Se ha reportado que el contenido específico de clorofila se ve modificado por diversos factores ambientales, entre los que destacan: intensidad luminosa, régimen de nutrientes, fuente de energía (autotrofia, mixotrofia o heterotrofia) y cada factor



ocasiona respuestas diferentes. En el caso de la luz, una mayor cantidad disminuye el contenido específico de pigmentos (Simionato *et al.*, 2011), un efecto similar se provoca con la deficiencia de nutrientes (fósforo y nitrógeno principalmente) (Kong *et al.*, 2011).

En el proceso de producción de biomasa de microalgas, un factor importante a considerar es la productividad, ya que este parámetro relaciona la concentración de biomasa alcanzada y el tiempo empleado para ello (Griffiths y Harrison, 2009).

Para el cultivo de especies del género *Nannochloropsis* se han empleado diversas configuraciones de FBR's que van desde lagunas (Crowe *et al.*, 2012), *flat panel* (Richmond y Cheng, – Wu 2001; Rodolfi *et al.*, 2009) y *thin layer* (Torzillo *et al.*, 2010; Quinn *et al.*, 2012) y se ha propuesto un intervalo aceptable de productividad para la producción de biomasa entre 150 y 400 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> con el fin de disminuir los costos para su separación (Richmond y Cheng – Wu, 2001; Griffiths y Harrison, 2009; Rodolfi *et al.*, 2009; Torzillo *et al.*, 2010; Biondi *et al.*, 2012; Quinn *et al.*, 2012).

Dado que la cepa de *Nannochloropsis* sp. al crecer en los medios Algal y ASW no presentó diferencias importantes en su valor de productividad se podría pensar que sería indistinto emplear uno u otro medio, pero no es así, ya que en el medio ASW la productividad se mantuvo constante desde el día 2 y hasta el final del experimento (7 d), mientras que en el medio Algal se alcanzó la máxima productividad a los 2.5 días (189.2 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) y a partir de este momento disminuyó gradualmente.

En todo proceso biotecnológico se busca alcanzar estados estacionarios, donde a pesar de las perturbaciones ambientales la respuesta del sistema no se vea fuertemente modificada. Por lo anterior, se eligió a la cepa de *Nannochloropsis* sp. y al medio de cultivo ASW para continuar con la experimentación de las siguientes etapas, ya que el valor máximo de productividad de biomasa se alcanzó a los 3 d y a partir de ese momento las variaciones fueron despreciables, manteniéndose constante por 5 días.

Además debido a que en las siguientes etapas experimentales se planteaba un estudio fisiológico de *Nannochloropsis* era necesario contar con un medio de cultivo de composición conocida para evitar variaciones.

## **7.2 Efecto de la adición de CO<sub>2</sub> y de la fuente de nitrógeno sobre el crecimiento, fisiología y contenido específico de lípidos de *Nannochloropsis* sp.**

### **7.2.1 Crecimiento**

Los organismos del género *Nannochloropsis* absorben el carbono presente en el medio de cultivo como HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y dentro de la célula lo convierten en CO<sub>2</sub> mediante la acción de una anhidrasa carbónica que es la responsable de mantener un equilibrio entre el bicarbonato y el dióxido de carbono (Huertas *et al.*, 2000, 2002; Hu y Zhou, 2010). Lo anterior ocasiona que para mantener un crecimiento acelerado sea necesario adicionar CO<sub>2</sub> en concentración suficiente para mantenerlo y elegir la fuente de nitrógeno más adecuada.

La absorción de carbono por estos organismos se da mediante transportadores activos, ya que no cuentan con anhidrasa carbónica extracelular. Existe un mecanismo de absorción de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> dependiente de la luz, pero puede mantenerse por un breve periodo de tiempo en la oscuridad. *Nannochloropsis* posee un sistema de transporte de bicarbonato que incrementa la concentración de carbono inorgánico al interior de la célula y cuenta además con una anhidrasa carbónica interna que mantiene el equilibrio entre las concentraciones de CO<sub>2</sub> y HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Huertas *et al.*, 2000, 2002; Hu y Zhou, 2010).

La modificación de la fuente de nitrógeno y carbono puede ocasionar importantes variaciones en crecimiento, composición de la biomasa y por lo tanto en el contenido

específico de lípidos (Lourenco *et al.*, 2002; Hu y Zhou, 2010), estos cambios deben estudiarse a profundidad con el fin de encontrar condiciones que propicien altos valores de biomasa.

El cambio en la fuente de nitrógeno generó cambios significativos ( $p < 0.001$ ) en el crecimiento de *Nannochloropsis* sp., éste (Fig. 4) se incrementó de manera acelerada durante toda la cinética.

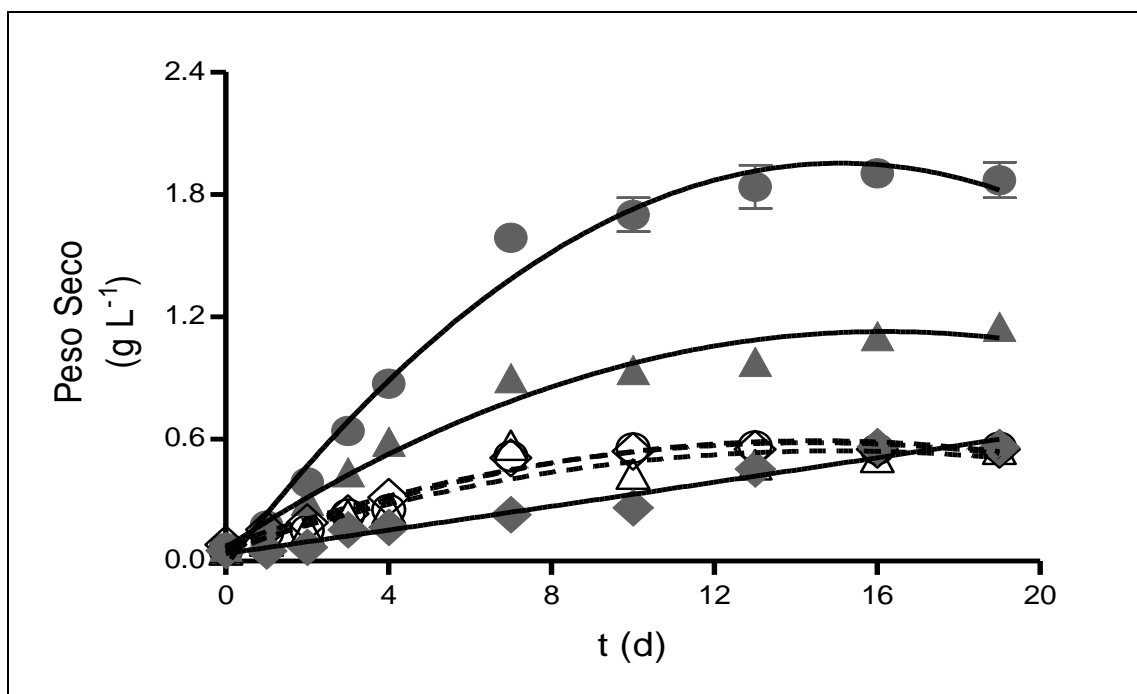


Figura 4. Efecto del cambio de la fuente de nitrógeno sobre el crecimiento de *Nannochloropsis* sp. en diferentes fuentes de nitrógeno. (●)Nitrato. (▲) Amonio (◆) Urea. Los símbolos llenos indican una corriente de aireación enriquecida con 3% v/v CO<sub>2</sub>.

En el caso de los experimentos sin la adición de CO<sub>2</sub>, la concentración máxima de biomasa se alcanzó al día 10 de cultivo y fue de  $560 \pm 6$ ,  $570 \pm 25$  y  $550 \pm 35$  mg L<sup>-1</sup> para nitrato, amonio y urea respectivamente. La velocidad específica de crecimiento

en cada tratamiento fue de  $0.367 \pm 0.008$ ,  $0.372 \pm 0.001$  y  $0.299 \pm 0.004$  d<sup>-1</sup> para los cultivos en presencia de nitrato, amonio y urea respectivamente y sólo en el cultivo con urea la concentración máxima de biomasa fue significativamente diferente resultando 18% menor al valor alcanzado por el cultivo con nitrato.

En el estudio realizado por Armstrong – Howard *et al.*, (2007) empleando una cepa marina de *Pseudo – Nitzschia australis* se observaron disminuciones superiores al 40% en el valor de  $\mu$ , alcanzado por los cultivos en presencia de urea en comparación con cultivos con amonio o nitrato como fuente de nitrógeno.

El enriquecimiento de aire suministrado con 3% de CO<sub>2</sub> generó incrementos significativos sólo para los cultivos adicionados con nitrato y amonio como fuente de nitrógeno. El cultivo con nitrato alcanzó un valor máximo de concentración de biomasa de  $1.90 \pm 0.102$  g L<sup>-1</sup> y el cultivo adicionado con amonio fue de  $1.11 \pm 0.087$  g L<sup>-1</sup>, mientras que el cultivo con urea alcanzó una concentración de  $0.560 \pm 0.062$  g L<sup>-1</sup>.

Si se evalúa el efecto de la adición de CO<sub>2</sub> sobre la concentración final de biomasa (Fig. 4), se observan incrementos de 240 y 95% para los cultivos empleando nitrato y amonio como fuente de nitrógeno respectivamente, esto en comparación con los cultivos que sólo fueron burbujeados con aire.

Los microorganismos pertenecientes al género *Nannochloropsis* son capaces de crecer en diferentes fuentes de nitrógeno alcanzando concentraciones mayores de biomasa cuando se emplean nitrato y amonio y ligeramente inferiores cuando se

emplea urea (Lourenco *et al.*, 2002; Hu y Zhou, 2010). Además el empleo de urea significó la adición de carbono orgánico, lo cual pudo favorecer la proliferación de las bacterias asociadas a *Nannochloropsis* sp. mismas que pudieron consumir los exudados de celulares de *Nannochloropsis* como fuente de carbono y una fracción de los nutrientes contenidos en el medio de cultivo (principalmente nitrógeno y fósforo).

Cuando se emplea amonio como fuente de nitrógeno se debe considerar la tolerancia del microorganismo hacia este nutriente, ya que concentraciones superiores a 180 mg L<sup>-1</sup> pueden desacoplar el transporte electrónico en la cadena transportadora de electrones (Opanasenko y Vasyukhina, 2009; Li *et al.*, 2011). En el caso de *Nannochloropsis*, el empleo de 138 mg N-NO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> no generó una disminución en el valor final de peso seco.

La productividad volumétrica para los cultivos de *Nannochloropsis* sp. sin adición de CO<sub>2</sub> no sobrepasó los 70 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> y la modificación de la fuente de nitrógeno no generó diferencias significativas. Ambos valores se encontraron por debajo de los valores recomendados para cultivos de *Nannochloropsis* (Fábregas *et al.*, 2004; Biondi *et al.*, 2012; Gu *et al.*, 2012), razón por la cual en la Figura 5 sólo se muestran los valores de productividad de biomasa de los cultivos adicionados con CO<sub>2</sub>. En la misma figura, se puede observar que el cultivo con urea como fuente de nitrógeno mantuvo su valor de productividad relativamente constante durante todo el experimento con un valor de 28.1 ± 4.4 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. En cambio, los cultivos en

presencia de nitrato y amonio alcanzaron valores de productividad de biomasa de  $217.5 \pm 10.4 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  y  $118.4 \pm 0.1 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  respectivamente.

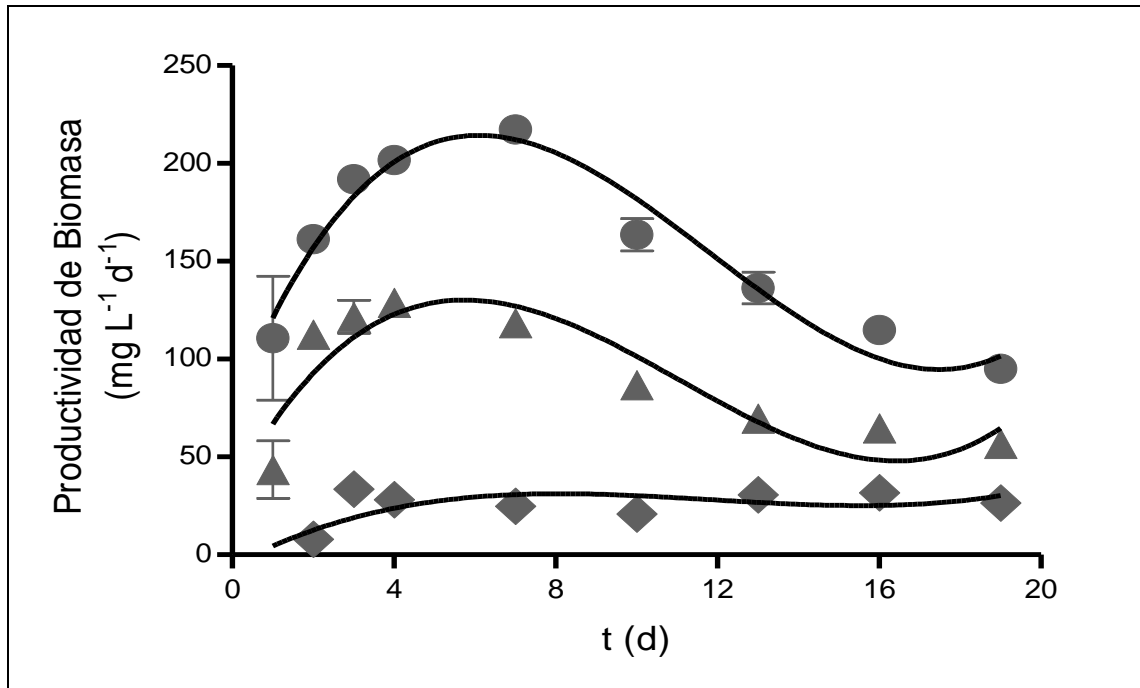


Figura 5. Efecto del cambio de la fuente de nitrógeno sobre la productividad volumétrica de biomasa de *Nannochloropsis* sp. (●)Nitrato. (▲) Amonio (◆) Urea. Los símbolos llenos indican una corriente de aireación enriquecida con 3 %<sub>V/V</sub> de CO<sub>2</sub>.

Es de destacar que el empleo de nitrato de potasio como fuente de nitrógeno ocasionó incrementos de 84% y 270% respecto a los cultivos adicionados con amonio y urea respectivamente.

El valor de productividad alcanzado por el cultivo en presencia de nitrato se encuentra cercano al límite superior del intervalo reportado para cultivos en condiciones de laboratorio, el cual va de 32 a 285 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> obtenidas en diferentes configuraciones de fotobiorreactor (Chini Zitelli *et al.*, 1999, 2003; Cheng-Wu *et al.*,

2001; Richmond y Cheng – Wu, 2001; Rodolfi *et al.*, 2003; Chini Zitelli *et al.*, 2003; Fábregas *et al.*, 2004).

En el caso de la concentración volumétrica de Chla (Fig. 6), sólo para el cultivo en presencia de urea la adición de CO<sub>2</sub> no se observa un incremento significativo ( $p < 0.001$ ). Para los cultivos en presencia de CO<sub>2</sub> la concentración máxima de Chla se presentó al día 10 de cultivo y fue un 350 % superior para el caso del cultivo con nitrato como fuente de nitrógeno; mientras que para el cultivo adicionado con amonio el incremento fue de 105%, esto al ser comparados con las concentraciones de Chla de los cultivos sin adición de CO<sub>2</sub> al mismo día de cultivo.

A los 19 días de cultivo las concentraciones de clorofila para los cultivos sin adición de CO<sub>2</sub> fueron de  $10.2 \pm 0.71$ ,  $16.1 \pm 0.81$  y  $9.9 \pm 1.04$  mg Chla L<sup>-1</sup> para los cultivos con nitrato, amonio y urea como fuente de nitrógeno respectivamente. En cambio los cultivos adicionados con CO<sub>2</sub>, las concentraciones finales fueron de  $27.2 \pm 1.8$ ,  $22.2 \pm 1.04$  y  $8.4 \pm 0.42$  mg Chla L<sup>-1</sup> para nitrato, amonio y urea respectivamente.

Diversos autores han observado que los cultivos de microalgas alcanzan mayores concentraciones volumétricas y contenidos específicos de clorofila *a* cuando son crecidos en presencia de nitrato o amonio que cuando se adiciona nitrógeno orgánico (Berman y Chava, 1999; Armstrong – Howard *et al.*, 2007).



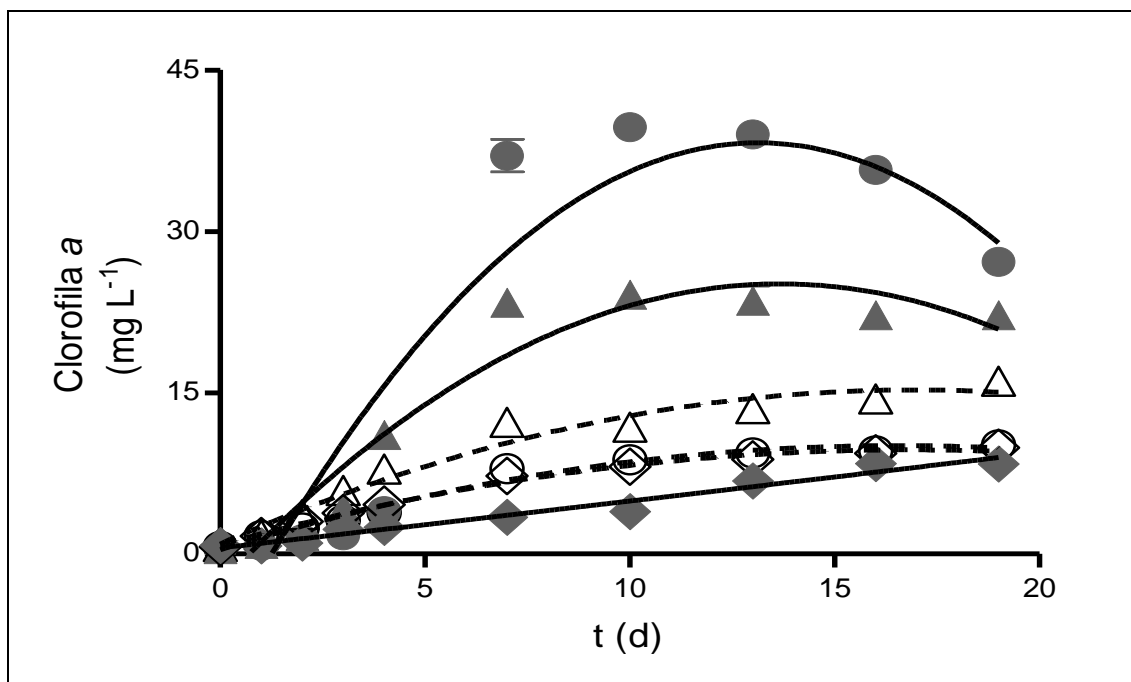


Figura 6. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la concentración de Chl a de *Nannochloropsis* sp. (●)Nitrato. (▲) Amonio (◆) Urea. Los símbolos llenos indican una corriente de aireación enriquecida con 3 %<sub>v/v</sub> de CO<sub>2</sub>.

Las diferencias en el crecimiento presentadas por *Nannochloropsis* sp., pueden explicarse debido a que las tasas de incorporación de las diferentes fuentes de nitrógeno presentan diversos valores. Cochlan *et al.* (2008) reportaron que para el caso de *Pseudo-Nitzschia australis* la velocidad de incorporación de nitrato es hasta 1.5 y 4 veces superior al valor correspondiente para el amonio y urea respectivamente. Aunque esta microalga es una diatomea, es un organismo marino al igual que la cepa empleada en el presente trabajo.

### 7.2.2 Mediciones de emisión de fluorescencia de la Chla del PSII

Las determinaciones fisiológicas mediante mediciones de fluorescencia permitieron explicar la falta de diferencias en los valores de biomasa alcanzados por los cultivos sin adición de CO<sub>2</sub>.

En el caso del rendimiento cuántico teórico máximo ( $\Phi P_0$ ) (Fig. 7), los cultivos presentaron valores similares durante los primeros cuatro días del experimento y para ninguno de los tratamientos la adición de dióxido de carbono generó efectos significativos ( $p > 0.05$ ). Los cultivos con amonio y urea como fuente de nitrógeno presentaron una disminución a partir del día 5 y hasta el final del experimento, obteniéndose valores cercanos a 0.48.

Los cultivos con nitrato de sodio como fuente de nitrógeno presentaron los valores máximos de rendimiento cuántico teórico máximo al día 7 de cultivo y a partir de ese momento disminuyeron su  $\Phi P_0$  ligeramente hasta alcanzar valores finales de  $0.62 \pm 0.051$  y  $0.58 \pm 0.039$  para los cultivos burbujeados con aire y con aire enriquecido con CO<sub>2</sub> respectivamente.

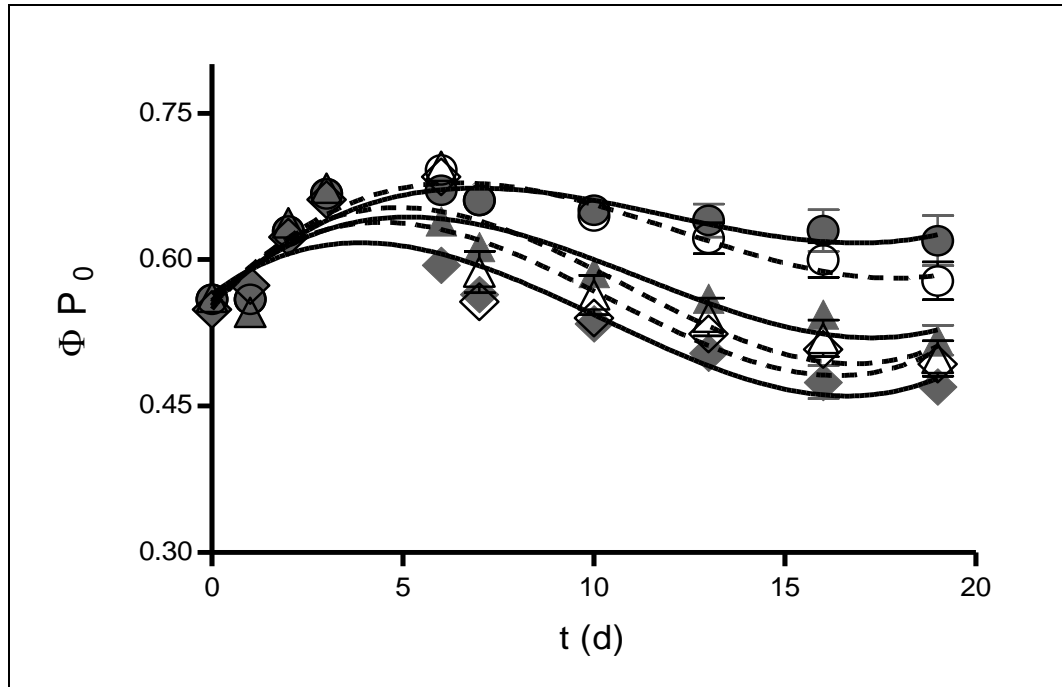


Figura 7. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el  $\Phi P_0$  de *Nannochloropsis* sp. (●)Nitrato. (▲) Amonio (◆) Urea. Los símbolos llenos indican una corriente de aireación enriquecida con 3% V/V de  $CO_2$ .

El incremento del  $\Phi P_0$  durante los primeros días ha sido reportado en cultivos de microalgas y ha sido atribuido a que al renovar el medio se adicionan de nuevo nutrientes como nitrógeno y fósforo. En cambio, la disminución del  $\Phi P_0$  al final del experimento pudo deberse a que algunos nutrientes del medio del cultivo empiezan a ser escasos, lo que disminuye la tasa de recambio de proteínas, algunas de ellas importantes en el proceso de fotosíntesis como es el caso de la proteína D1 (Faraloni y Torzillo, 2010; Wu *et al.*, 2011).

### 7.2.3 Contenido específico de lípidos totales

Los cambios de la fuente de nitrógeno suministrada a los microorganismos, modifica las velocidades de incorporación de este nutriente a la biomasa, su composición y por lo tanto el contenido de lípidos (Vieira Costa *et al.*, 2001; Markou y Georgakakis, 2011).

El contenido específico de lípidos totales (Fig. 8) de los cultivos en presencia de nitrato, amonio y urea al final del cultivo fueron superiores al 20%, lo que concuerda con el contenido específico reportado por diversos autores para *Nannochloropsis* sp. en condiciones estándar de cultivo que va del 20 al 35% (Lubzens *et al.*, 1995; Wen y Chen, 2003).

La adición de CO<sub>2</sub> al medio de cultivo no modificó de forma significativa el contenido específico de lípidos totales de *Nannochloropsis* sp. para ninguna de las fuentes de nitrógeno estudiadas ( $p>0.05$ ).

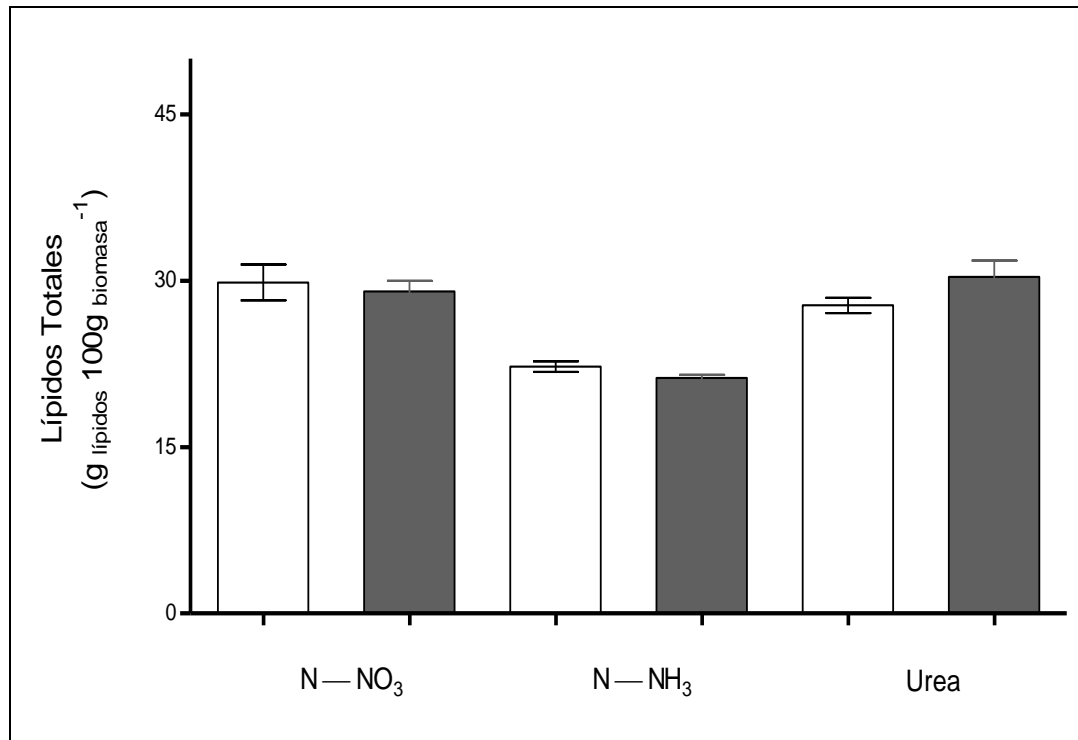


Figura 8. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el contenido específico de lípidos en cultivos de *Nannochloropsis* sp. Las barras llenas indican una corriente de aireación enriquecida con 3% v/v de CO<sub>2</sub>.

Los cultivos en presencia de nitrato y urea, adicionados con CO<sub>2</sub>, presentaron valores de 29.04% ± 2.880 y 30.34% ± 3.328 respectivamente sin diferencia significativa entre ellos ( $p > 0.05$ ), mientras que el cultivo en presencia de amonio alcanzó un valor de 22.24% ± 1.441 lo que fue significativamente menor ( $p < 0.01$ ) en aproximadamente un 25% respecto a los cultivos crecidos en nitrato y urea

Li *et al.* (2008) encontraron que el cambio en la fuente de nitrógeno empleada en cultivos de *Neochloris oleoabundans* modifica el contenido específico de lípidos totales, encontrando que la mejor fuente de nitrógeno para favorecer la producción de lípidos totales es el nitrato.

Tomando como base los valores de productividad de biomasa y los contenidos específicos de lípidos se calculó la productividad de lípidos totales (Tabla 1), el efecto más importante sobre este parámetro fue el de las diferencias en las concentraciones finales de biomasa, ya que los contenidos específicos no presentaron diferencias tan importantes.

El cultivo que presentó la mayor productividad de lípidos fue el que empleó nitrato como fuente de nitrógeno, alcanzando un valor de  $28.6 \pm 5.96 \text{ mg lípidos L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . En cambio los cultivos en presencia de amonio y urea alcanzaron valores de 12.4 y 7.2  $\text{mg lípidos L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ .

Tabla 1. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la productividad de lípidos en cultivos de *Nannochloropsis* sp.

Fuente de nitrógeno	Productividad de lípidos ( $\text{mg lípidos L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ )
Nitrato	$28.6 \pm 5.96$
Amonio	$12.4 \pm 1.12$
Urea	$7.2 \pm 0.46$

Los valores de productividad de lípidos se ven modificados por las condiciones de cultivo y fuente de nitrógeno empleadas. El máximo valor de productividad de lípidos reportado para cultivos de microalgas es de aproximadamente  $1.2 \text{ g lípidos L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  alcanzado por Xiong *et al.*, (2008); sin embargo este valor fue alcanzado en un cultivo heterotrófico de *Chlorella protothecoides*, la cual puede alcanzar densidades celulares superiores a los  $20 \text{ g L}^{-1}$ .

Si sólo se consideran los resultados obtenidos en condiciones autotróficas, el intervalo de productividad de lípidos para cultivos de microalgas en condiciones de laboratorio va de 2 y hasta 134 mg lípidos L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (Illman *et al.*, 2000; Cheng – Wu *et al.*, 2002; Takagi *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008; Solovchenko *et al.*, 2008; Xiong *et al.*, 2008).

En el caso específico de *Nannochloropsis* sp., los valores de productividad se encuentran dentro del rango de 4 a 134 mg lípidos L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> para cultivos en condiciones de laboratorio (Rodolfi *et al.*, 2009; Huerlimann *et al.*, 2010). Es de destacar que aunque los cultivos en las tres fuentes de nitrógeno alcanzaron valores dentro del intervalo se encuentran cercanos al límite inferior.

Se ha reportado que el empleo de mezclas equimolares de nitrato y urea como fuentes de nitrógeno favorece la acumulación de biomasa y modifica el perfil de lípidos (Lin y Lin, 2011), por lo ésta podría ser una estrategia para incrementar la productividad de biomasa y como consecuencia la de lípidos totales.

Las bajas productividades de lípidos alcanzados por los cultivos (Tabla 1) sin importar la fuente de nitrógeno empleada pudo deberse al espesor de las botellas usadas, ya que aunque son de cara plana (lo que permite un ingreso uniforme de luz al cultivo), su profundidad es de alrededor de 8.5 cm. Ha sido reportado por diversos autores que en caso de dispositivos de cara plana para el cultivo de microalgas el espesor del medio no debe exceder los 7 cm, sobre todo se estos se encuentran en condiciones de laboratorio donde la cantidad de luz adicionada no es mayor a 400 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, ya que por encima de 500 mg L<sup>-1</sup> de biomasa se da el fenómeno de

autosombreado (Doucha y Livansky, 2009; Torzillo *et al.*, 2010; Torzillo *et al.*, 2012), lo que ocasiona baja productividad de biomasa y como consecuencia de lípidos.

#### **7.2.4 Perfil de ácidos grasos**

El interés que ha despertado el género *Nannochloropsis* para la producción de biocombustibles deriva de su capacidad de acumular grandes cantidades de lípidos, de los cuales la porción mayoritaria son triacilgliceroles (Sukenik, 1999; Sukenik *et al.*, 2009; Rodolfi *et al.*, 2009), los cuales pueden ser convertidos en biodiesel.

Algunos autores han afirmado que el perfil de ácidos grasos de *Nannochloropsis* debe estar constituido por moléculas con un número par de átomos de carbono y de entre 14 y 20 y que se presentan hasta cinco insaturaciones (Boussiba *et al.*, 1987; Renaud y Parry, 1994; Chini Zittelli *et al.*, 1999; Richmond *et al.*, 2003; Chiu *et al.*, 2009; Khozin-Goldberg y Boussiba, 2011).

Uno de los rasgos característicos de los ácidos grasos *Nannochloropsis* sp., es la presencia de ácidos; mirístico (14 C) palmítico, palmitoléico (16 C); oleico, linoleico, linolénico, éste último tanto n3 como n6 (18 C); y el ácido eicosapentaenoico (EPA) (20 C y cinco insaturaciones) (Renaud y Parry, 1994; Sukenik, 1999; Khozin-Goldberg y Boussiba, 2011).

Diversos autores han estudiado los cambios en la composición de ácidos grasos en *Nannochloropsis* al modificar las condiciones de cultivo, encontrando que normalmente lo que ocurre son modificaciones en las proporciones de los componentes (Renaud y Parry, 1994; Pal *et al.*, 2011; Van Wagenen *et al.*, 2012).



Aunque en la mayoría de las veces los efectos resultan casi despreciables debido a las diferencias mínimas encontradas (Wen y Chen, 2001)

En la Tabla 2 se pueden observar los perfiles de ácidos grasos obtenidos al final del experimento para cada una de las fuentes de nitrógeno empleadas. Es de destacar que en el caso de la urea se redujeron considerablemente los porcentajes correspondientes a los ácidos grasos poliinsaturados respecto al cultivo en presencia de nitrato (de 38.6 a 35.9% respectivamente); esto ya ha sido reportado con anterioridad por autores trabajando con especies de microalgas empleadas en acuicultura (Lourenco *et al.*, 2002).

Tabla 2. Perfil de ácidos grasos para cultivos de *Nannochloropsis* sp. en diferentes fuentes de nitrógeno.

Ácido graso	Nitrato (%)	Amonio (%)	Urea (%)
C14:0	7.6 ± 2.39	7.8 ± 2.51	9.6 ± 1.14
C16:0	21.0 ± 6.01	22.4 ± 5.45	24.1 ± 6.64
C16:1	13.9 ± 5.23	14.8 ± 2.09	20.7 ± 5.35
C18:1	13.8 ± 3.39	7.2 ± 6.52	11.1 ± 2.45
C18:2	2.4 ± 0.47	13.8 ± 6.85	3.3 ± 0.49
C18:3	23.1 ± 9.02	15.1 ± 3.80	18.8 ± 10.55
C20:5	13.1 ± 11.26	7.2 ± 6.63	13.8 ± 2.34
Otros	11.8 ± 14.55	20.3 ± 8.69	3.4 ± 3.91
Saturados	28.7	30.2	33.6

Monoinsaturados	27.7	21.9	31.8
Saturados + Monoinsaturados	56.4	52.2	65.4
Poliinsaturados	38.6	36.1	32.6

Wen y Chen (2001) reportaron que el empleo de urea en *Nitzschia laevis* genera incrementos de alrededor de un 10% en las proporciones correspondientes a los ácidos mirístico, palmítico, palmitoleico y eicosapentaenoico. Algo similar fue observado en el presente trabajo, ya que los incrementos fueron de 7.6 a 9.6 para mirístico, de 21 a 24.1 para palmítico, de 13.9 a 20.7 para palmitoleico y de 13 a 13.8 para EPA.

Considerando las grandes diferencias en los valores de productividades de lípidos y que el efecto sobre la composición del perfil de lípidos no fue significativo, se decidió emplear de nitrato potasio como fuente de nitrógeno; lo cual concuerda con lo que proponen Wen y Chen (2001).

### **7.3 Efecto del contenido de NaCl en el medio de cultivo sobre el crecimiento, fisiología y contenido específico de lípidos de *Nannochloropsis* sp.**

La producción masiva de biomasa de microalgas en FBR conlleva altos consumos energéticos, los cuales deben minimizarse sí lo que se busca es la producción de biocombustibles, ya que es necesario que el balance energético sea positivo, es decir, que la energía generada supere a la consumida (Demirbas, 2009).

Una de las estrategias para disminuir la demanda energética de la producción de biomasa microalgal es el empleo de sistemas de cultivo de bajo consumo energético y altas productividades de biomasa, tal es el caso de los FBR's abiertos tipo *thin – layer* (Jorquera *et al.*, 2010; Torzillo *et al.*, 2010).

Sin embargo, esta clase de FBR's presenta altas tasas de evaporación (Pulz, 2001; Richmond, 2004; Carvalho *et al.*, 2006; Jorquera *et al.*, 2010), lo que genera modificaciones en las concentraciones de las sales disueltas en el medio de cultivo que es de vital importancia en el caso de organismos marinos. Lo anterior se debe a que si se sobrepasan los niveles de tolerancia del microorganismo se pueden ocasionar afectaciones fisiológicas. Por lo anterior, en esta etapa se evaluó el efecto de la modificación de la salinidad del medio de cultivo sobre el crecimiento de *Nannochloropsis* sp.

### 7.3.1 Crecimiento

El incremento en la concentración de NaCl generó un efecto negativo sobre *Nannochloropsis* sp. Respecto a la concentración celular (PS), el efecto adverso fue significativo ( $p < 0.001$ ) a partir de los 54 g L<sup>-1</sup> de NaCl (Fig. 9).

Los cultivos expuesto a 13.5 y 27 g L<sup>-1</sup> presentaron un comportamiento similar creciendo exponencialmente durante las 96 h del experimento sin diferencias significativas entre ellos ( $p > 0.05$ ). En contraste, los cultivos con incrementos en la concentración de NaCl (54 y 81 g L<sup>-1</sup>) presentaron disminuciones significativas en el crecimiento ( $p < 0.001$ ). Los cultivos expuestos a alta salinidad presentaron concentraciones finales de biomasa 47.8 y 77.02 % menores al valor final alcanzado por el cultivo con 27 g L<sup>-1</sup>, esto para los cultivos con 54 y 81 g L<sup>-1</sup> de NaCl respectivamente.

El efecto adverso del incremento de la salinidad del medio de cultivo sobre *Nannochloropsis* sp. fue también evidente en los valores de velocidad específica de crecimiento (Tabla 3). Los cultivos con 13.5 y 27 g L<sup>-1</sup> de NaCl no presentaron diferencias entre ellos y alcanzaron un valor de alrededor de 0.025 h<sup>-1</sup>, mientras que los cultivos en presencia de 54 y 81 g L<sup>-1</sup> presentaron disminuciones de 24.3 y 61% respectivamente.

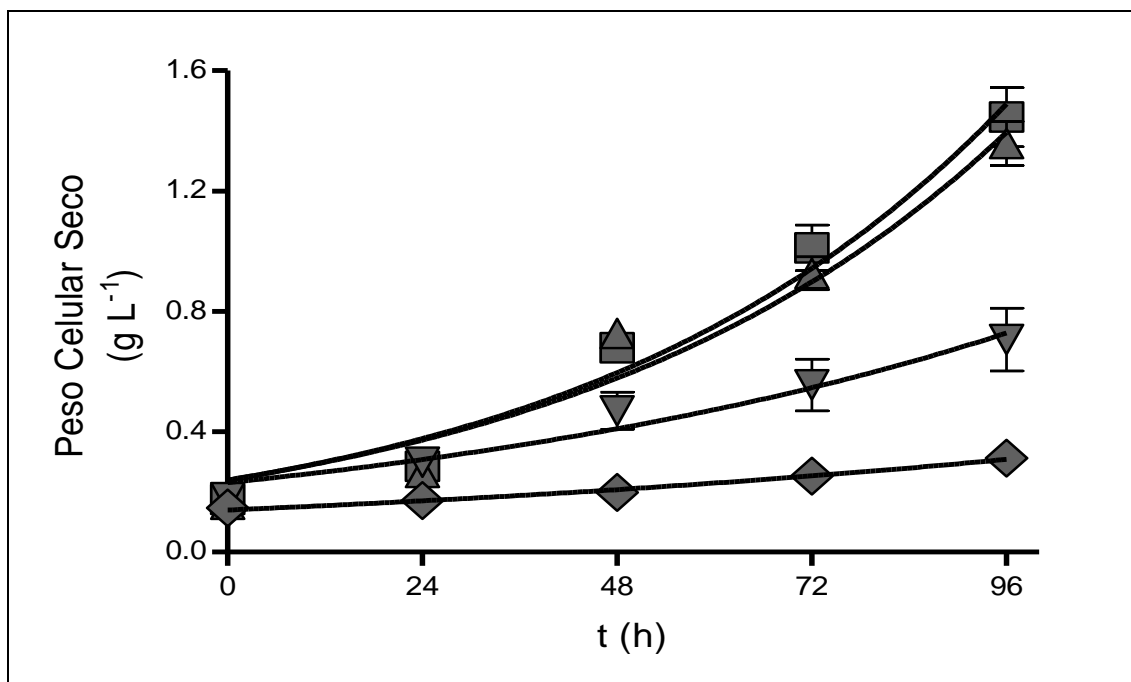


Figura 9. Efecto de la salinidad sobre el crecimiento de *Nannochloropsis* sp. creciendo a diferentes concentraciones de NaCl (■) 13.5 g L<sup>-1</sup> de NaCl (▲) 27 g L<sup>-1</sup> de NaCl (▼) 54g L<sup>-1</sup> de NaCl (◆) 81g L<sup>-1</sup> de NaCl.

Tabla 3 Concentración final de biomasa y velocidad específica de crecimiento de *Nannochloropsis* sp. a diferentes concentraciones de NaCl

NaCl (g L <sup>-1</sup> )	Crecimiento (g L <sup>-1</sup> )	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )
13.5	1.44 ± 0.197	0.026 ± 0.0017
27.0	1.36 ± 0.127	0.024 ± 0.0013
54.0	0.71 ± 0.181	0.018 ± 0.0051
81.0	0.312 ± 0.076	0.009 ± 0.0004

Cuando los organismos fotosintéticos son expuestos a elevadas concentraciones de NaCl se provocan disminuciones en el crecimiento que pueden deberse a grandes pérdidas de agua, desbalance iónico dentro de la célula o la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno. Este último puede causar estrés oxidativo, inactivación de enzimas y reducción en la tasa de fotosíntesis (Mahajan y Tuteja, 2005; Sudhir y Murthy, 2004). El rango de salinidad en el cual se afecta el crecimiento depende de cada especie, incluso para algunos organismos halofílicos el efecto adverso se vuelve evidente a concentraciones superiores a 0.5 M (29.2 g L<sup>-1</sup>) (Chen *et al.*, 2006; Takagi *et al.*, 2006).

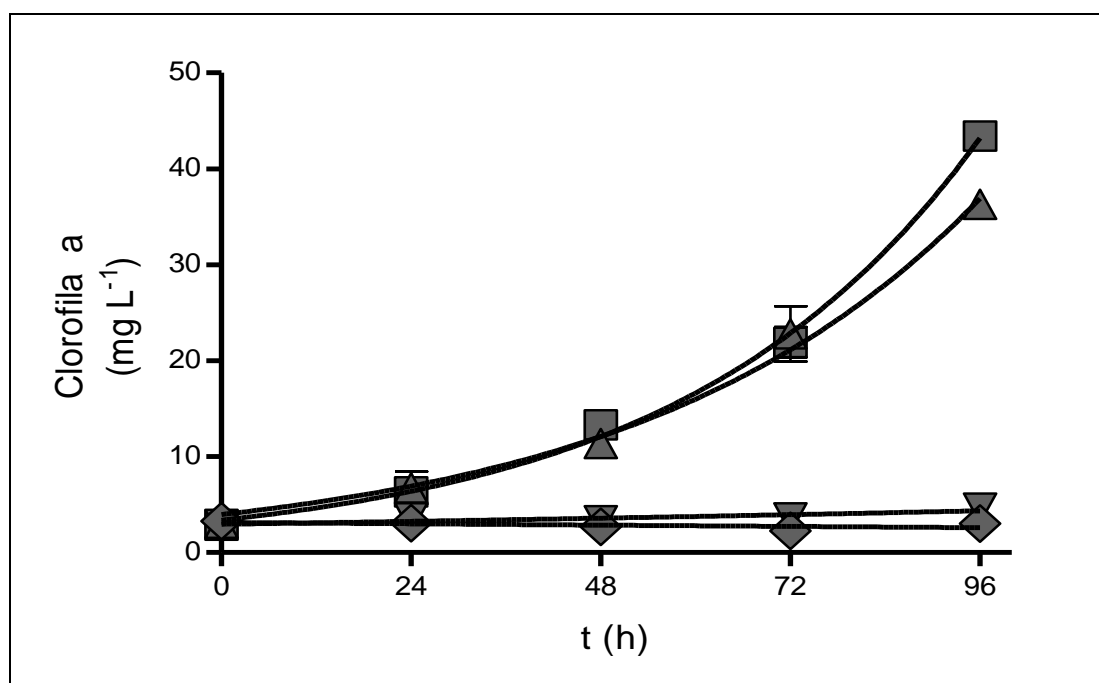


Figura 10. Efecto del incremento de la salinidad sobre la concentración de Chl a. (■) 13.5 g L<sup>-1</sup> de NaCl (▲) 27 g L<sup>-1</sup> de NaCl (▼) 54 g L<sup>-1</sup> de NaCl (◆) 81 g L<sup>-1</sup> de NaCl.

El desbalance iónico y la inactivación de enzimas ocasionados por el estrés por salinidad modifica diferentes procesos metabólicos; uno de los más afectados es la síntesis de pigmentos (Stepien y Klobus, 2006). El cultivo con 13.5 g L<sup>-1</sup> incrementó en un 19.56% su concentración final de Chla (Fig. 10), mientras que la del cultivo con 54 g L<sup>-1</sup> disminuyó significativamente en un 88.16% respecto al cultivo control ( $p>0.001$ ). Por otra parte, el cultivo expuesto a 81 g L<sup>-1</sup> no incrementó la concentración de Chla durante las 96 h que duró el experimento.

### **7.3.2 Tasa de Fotosíntesis y Tasa de Respiración**

Los valores de TTF (Fig. 11) presentaron un comportamiento inversamente proporcional al contenido de NaCl en el medio de cultivo. Este efecto fue inmediato en el cultivo con 81 g L<sup>-1</sup> de NaCl (sección 6.4) y a las 24 h presentó una reducción de 82.3% respecto al cultivo control (27 g L<sup>-1</sup> de NaCl).

Después de las primeras 72 h, el cultivo con 27 g L<sup>-1</sup> de NaCl disminuyó su TTF de 243.98 a 203.84  $\mu\text{mol O}_2 \text{ mg Chla}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , a este mismo tiempo se observaron valores similares en el cultivo con 54 g L<sup>-1</sup> de NaCl. El cultivo con 81 g L<sup>-1</sup> disminuyó de forma importante su TTF. Al inició presentó un valor de  $243.98 \pm 8 \mu\text{mol O}_2 \text{ mg Chla}^{-1} \text{ h}^{-1}$  y a las 24 y 96 h de aplicado el estrés por salinidad los valores de TTF fueron de  $61.01 \pm 8$  y  $78.57 \pm 37 \mu\text{mol O}_2 \text{ mg Chla}^{-1} \text{ h}^{-1}$  respectivamente, lo que representa reducciones del 75% y 68%.

Es posible que el incremento de la salinidad por encima de 54 g L<sup>-1</sup> ocasionara choque osmótico, el cual fue particularmente evidente por la reducción de los valores

de tasa de fotosíntesis en el cultivo que contenía  $81 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl. El decremento en la TTF puede ser atribuido a la inhibición de actividades enzimáticas involucradas en el proceso fotosintético. De acuerdo con Stepien y Klobus (2006) algunos de estos procesos enzimáticos son particularmente sensibles a cambios en la salinidad del medio de cultivo. *Nannochloropsis* sp. fue capaz de mantener su TTF en un amplio intervalo de salinidad, que fue de  $13.5$  a  $54 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl por lo que esta especie puede ser considerada como un organismo eurihalino.

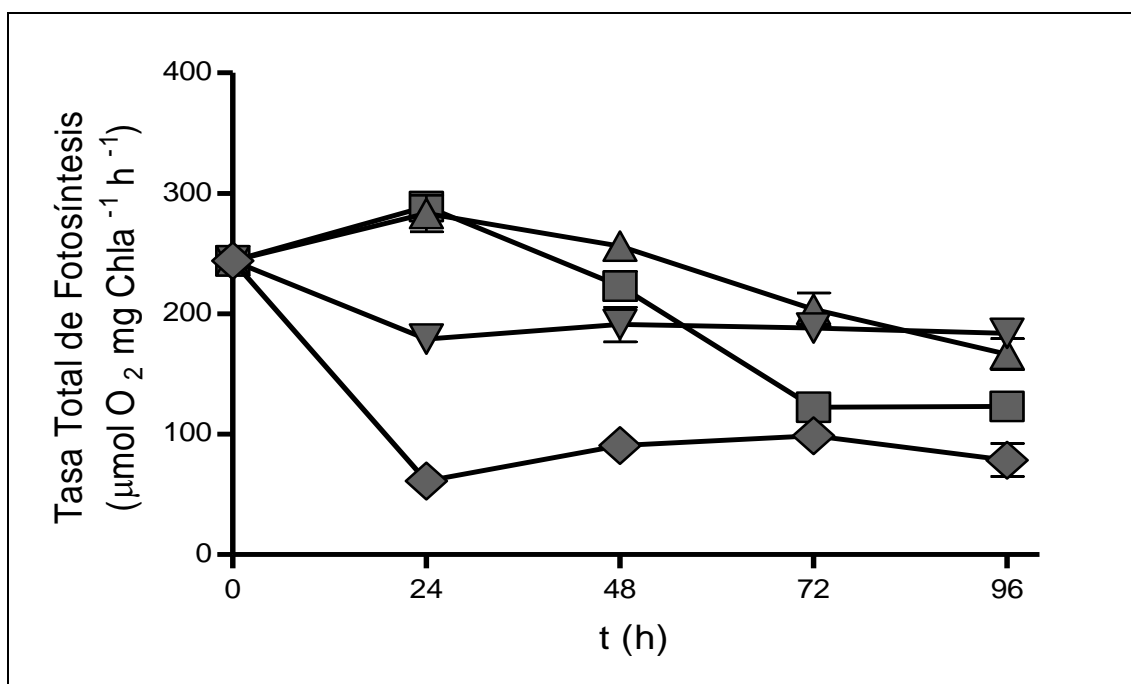


Figura 11. Efecto del incremento de la salinidad sobre la Tasa Total de Fotosíntesis. (■)  $13.5 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl (▲)  $27 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl (▼)  $54 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl (◆)  $81 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl.

La reducción de la TTF en el cultivo con  $81 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl fue causada por una reducción en la capacidad de transportar electrones a lo largo de la cadena transportadora (CTE) (Figs. 13, 14 y 15) y concuerda con lo observado por Mehta *et al.*, (2010) y Stepien and Klobus (2005) aunado con una disminución en la



producción de pigmentos fotosintéticos (Chla) (Stepien y Klobus, 2006). Se han reportado reducciones en la TTF para diferentes géneros de clorofíceas, cianobacterias y diversas especies de plantas superiores (Henley *et al.*, 2002; Sudhir and Murthy, 2004; Chen *et al.*, 2006).

El comportamiento de la TR se muestra en la figura 12. La respiración fue significativamente modificada por el cambio en la concentración de NaCl del medio de cultivo ( $p < 0.001$ ). Mientras que el cultivo expuesto a la concentración más elevada de sal ( $81 \text{ g L}^{-1}$ ) presentó un incremento en su TR: los cultivos con  $13.5$  y  $27 \text{ g L}^{-1}$  desaceleraron su TR. Este comportamiento probablemente se debió al envejecimiento del cultivo y a un incremento en el contenido específico de clorofila a lo que reduce la sección transversal que puede ser atravesada por la luz.

La relación entre la TTF y la TR (TTF/TR) en los cultivos con  $13.5$  y  $27 \text{ g L}^{-1}$  of NaCl fue superior a 4 a partir de las 24 h y hasta el final del experimento, en promedio presentaron valores de 4.6 and 4.22 respectivamente. El cultivo en presencia de  $54 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl redujo su relación TTF/TR casi en un 50% respecto al cultivo control, alcanzando un valor promedio de 2.45. La mayor afectación metabólica se observó cuando *Nannochloropsis* sp. fue cultivada a  $81 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl, el cual alcanzó un valor promedio de la relación TTF/TR de 1.45

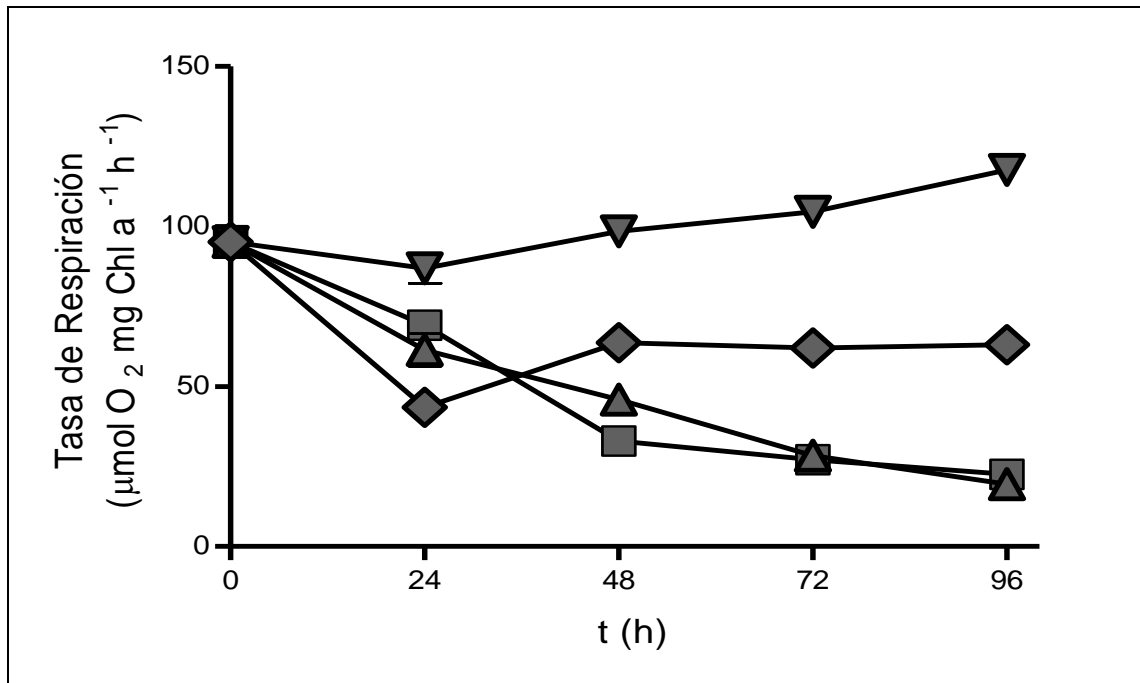


Figura 12. Efecto del incremento de la salinidad sobre la Tasa de Respiración. (■) 13.5 g L<sup>-1</sup> de NaCl (▲) 27 g L<sup>-1</sup> de NaCl (▼) 54g L<sup>-1</sup> de NaCl (◆) 81g L<sup>-1</sup> de NaCl.

La relación TTF/TR en microalgas puede presentar diferentes valores, ya que la TR puede variar de un 10 a un 50% de la energía capturada en el proceso fotosintético (Zemke *et al.*, 2010). Para especies de microalgas y cianobacterias aisladas de ambientes marinos, esta relación va de 4 a 10 cuando se cultivan en condiciones óptimas de salinidad, contenido de nutrientes, iluminación, etc.

Las diferencias mínimas entre los cultivos a 13.5 y 27 g L<sup>-1</sup> de NaCl en sus valores de TTF/TR explica el hecho de que no se hayan observado diferencias significativas en la concentración final de biomasa y la velocidad específica de crecimiento (Figs. 9Figura 1 y Tabla 3). Por otra parte, para los cultivos con 54 y 81 g L<sup>-1</sup> de NaCl las reducciones en la relación TTF/TR fueron de 41.9 y 65.6% respectivamente en relación con el cultivo control (27 g L<sup>-1</sup>), esto corresponde con sus respectivas

disminuciones en el peso celular seco final, que fueron de 46.8 y 76.8% respectivamente.

Se ha reportado para diferentes especies de algas y cianobacterias incrementos en la tasa de respiración celular, como consecuencia de incrementos en la salinidad del medio de cultivo y se han atribuido a incrementos en los procesos de reparación celular (Alyabyev *et al.*, 2007; Srivastava *et al.*, 2008).

En condiciones óptimas, la energía consumida por el microorganismo para procesos de mantenimiento y reparación celular representa entre el 10 y el 20% del total de la energía capturada por el proceso fotosintético. Sin embargo, diferencias en el suplemento de nutrientes o condiciones adversas de cultivo, ocasionan que esta fracción se incremente alcanzando valores cercanos al 50% de la energía capturada por fotosíntesis, esto causa reducciones en la acumulación de biomasa en el cultivo (Beardall *et al.*, 2009; Zemke *et al.*, 2010).

### **7.3.3 Mediciones de emisión de fluorescencia por la Chla del PSII**

El efecto fisiológico del incremento del contenido de NaCl del medio de cultivo fue claramente evidenciado por las mediciones de Fluorescencia de la Chla del PSII. El rendimiento cuántico teórico máximo (Fig. 13) en los cultivos con las menores concentraciones de NaCl (13.5 and 27 g L<sup>-1</sup>) presentó valores relativamente constantes de alrededor de 0.68 durante las 96 h de duración del experimento y sin diferencias significativas entre ellos ( $p > 0.05$ ).

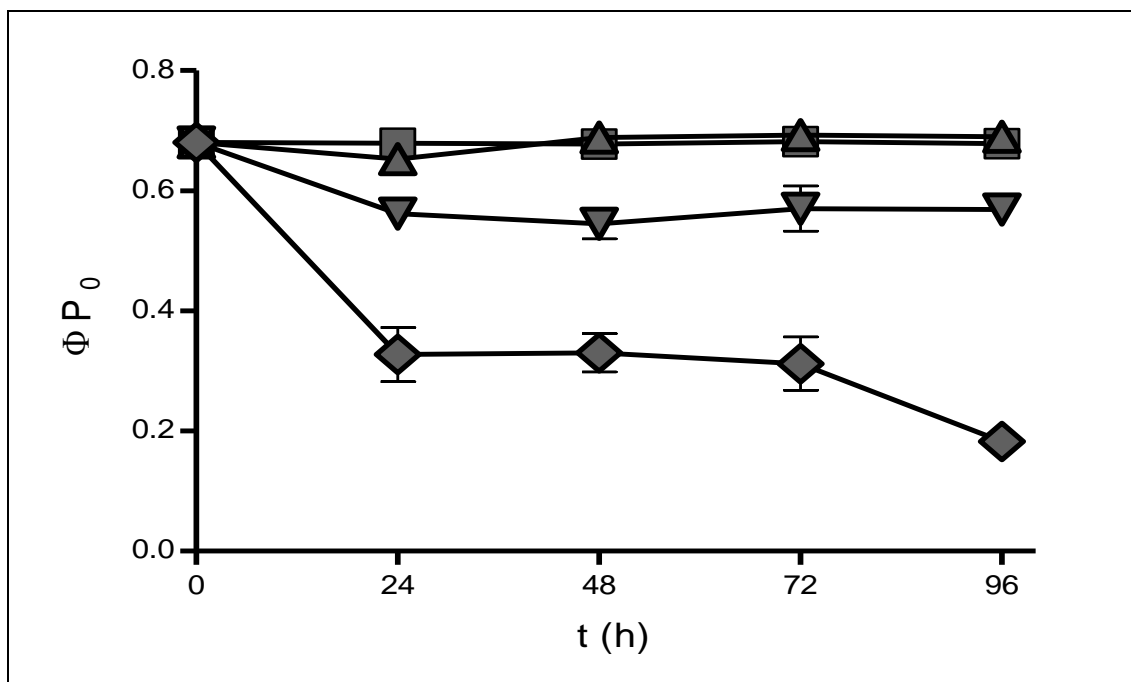


Figura 13. Efecto del incremento de la salinidad sobre el  $\Phi P_0$ . (■) 13.5 g L<sup>-1</sup> de NaCl (▲) 27 g L<sup>-1</sup> de NaCl (▼) 54g L<sup>-1</sup> de NaCl (◆) 81g L<sup>-1</sup> de NaCl.

En contraste, el cultivo con 54 g L<sup>-1</sup> NaCl mostró una disminución de 19% en el  $\Phi P_0$  a partir de las 24 h (Fig. 13), y permaneció sin cambio durante las siguientes horas. El  $\Phi P_0$  permaneció casi constante lo que indica que las células alcanzaron un equilibrio entre el daño generado por el incremento en la salinidad y los procesos de reparación celular.

El cultivo en presencia de 81 g L<sup>-1</sup> de NaCl presentó una disminución importante en los valores de  $\Phi P_0$  respecto al valor inicial. La caída en el  $\Phi P_0$  mostró un comportamiento bifásico evidenciando un importante daño celular que ocurrió casi de forma inmediata una vez que las células fueron expuestas a las altas concentraciones de sal. Al final del experimento el valor del  $\Phi P_0$  fue de  $0.182 \pm 0.0117$ , lo que representó una reducción del 73% respecto a su valor inicial.

La disminución en los valores de  $\Phi P_0$  debidos a la adición de 81 g L<sup>-1</sup> de NaCl se relaciona con un incremento en las especies reactivas de oxígeno (ERO) generadas por la inhibición del metabolismo celular. Esto pudo afectar no sólo al rendimiento teórico máximo sino también a la capacidad de reparación del PSII, lo que ha sido observado en plantas superiores, cianobacterias y algas verdes (Henley *et al.*, 2002; Murata *et al.*, 2007; Affenzeller *et al.*, 2009).

Los valores de  $\Phi P_0$  alcanzados por los cultivos en presencia de 54 y 81 g L<sup>-1</sup> de NaCl evidencian afectaciones estructurales en el PSII. De acuerdo con Henley *et al.*, (2002), esto puede deberse a un desbalance en la cadena transportadora de electrones y como consecuencia una disminución en la producción de ATP. Esto último directamente afecta la síntesis de importantes proteínas como la D1 cuya abundancia impacta a la velocidad de reparación del PSII.

El efecto de la alta salinidad sobre el metabolismo de *Nannochloropsis* sp. se vuelve más evidente en los valores de la eficiencia operacional del PSII (Fig. 14). En efecto, este parámetro expresa la eficiencia efectiva del PSII cuando las células se encuentran adaptadas a la luz y da una idea más real del desempeño del cultivo en una condición dada de estrés. Esto es posible porque este parámetro considera las disminuciones en la eficiencia fotosintética ocasionadas por el relajamiento no fotoquímico (NPQ). Por lo anterior los valores obtenidos para el  $\Phi_{PSII}$  resultan menores que los obtenidos para el  $\Phi P_0$  cuando los cultivos se encuentran en condiciones de estrés.

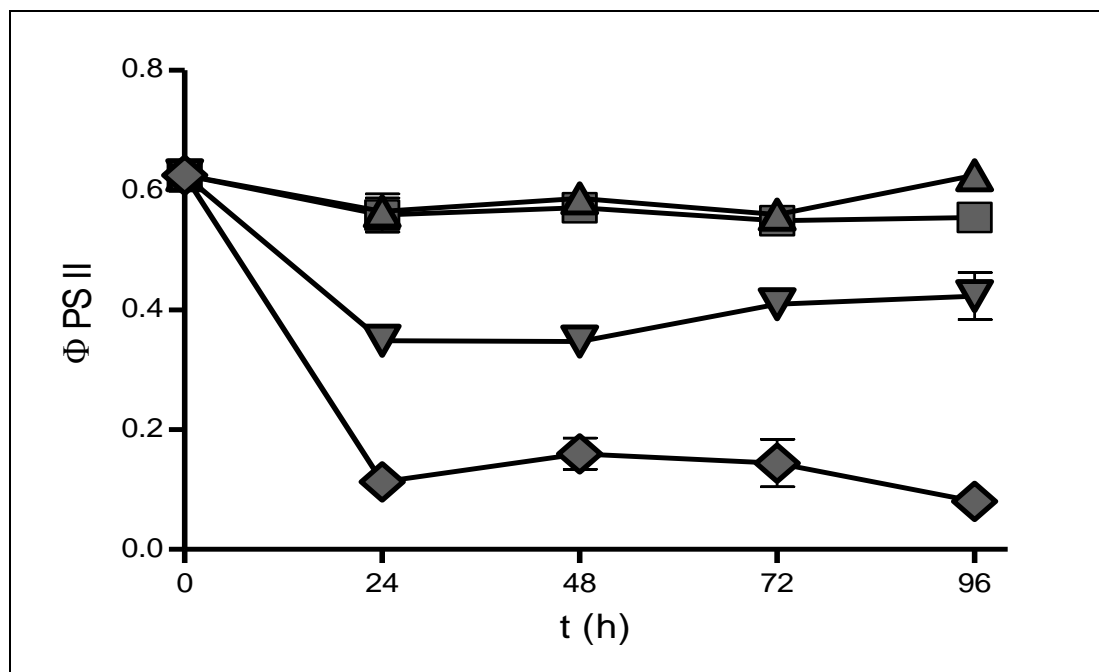


Figura 14. Efecto del incremento de la salinidad sobre el  $\Phi$ PSII. (■) 13.5 g L<sup>-1</sup> de NaCl (▲) 27 g L<sup>-1</sup> de NaCl (▼) 54g L<sup>-1</sup> de NaCl (◆) 81g L<sup>-1</sup> de NaCl.

El  $\Phi$ PSII (Fig. 14) y el peso celular seco (Fig. 9) manifestaron una estrecha correlación entre ellos. De hecho, los cultivos a 13.5 y 27 g L<sup>-1</sup> de NaCl no mostraron diferencias significativas entre ellos para ambos parámetros ( $p > 0.05$ ) durante todo el experimento. Mientras que el cultivo con 54 g L<sup>-1</sup> de NaCl presentó, a las 96 h, reducciones de 32.31 y 47.95% para el rendimiento cuántico operacional y el peso celular seco respectivamente. Algo similar pudo observarse para el cultivo con 81 g L<sup>-1</sup> de NaCl, en el cual las disminuciones fueron de 87.16% para el  $\Phi$ PSII y de 77.03 % para el PS respecto con el cultivo control (27 g L<sup>-1</sup>). Estos resultados confirman la fuerte correlación entre  $\Phi$ PSII y el PS que ha sido observada por otros autores en cultivos de cianobacterias (Torzillo *et al.*, 1998).

En la Figura 15 se muestra el comportamiento del relajamiento no fotoquímico de los cultivos de *Nannochloropsis* sp. expuestos a diferentes niveles de salinidad. La tendencia del NPQ fue inversa a la observada para el  $\Phi P_0$  (Fig. 13). De hecho, la disipación de la energía fue mayor en los cultivos expuestos a altas concentraciones de sal (54 and 81 gL<sup>-1</sup> NaCl). Lo anterior puede indicar que la adición de NaCl a concentraciones superiores a 27 g L<sup>-1</sup> activa procesos de relajamiento no fotoquímico (Horton y Ruban, 2005; Lavaud y Kroth, 2006), debido a que el estrés por NaCl incrementa substancialmente la disipación de energía por vías no fotoquímicas disminuyendo el transporte de electrones a través de la cadena transportadora (Mehta *et al.*, 2010; Stepien y Klobus, 2005).

De acuerdo con Allakhverdiev y Murata (2008), el estrés por salinidad causa una disociación en las proteínas relacionadas con la estabilidad del PSII; esta inestabilidad en el PSII inactiva los sitios catalíticos en el complejo liberador de oxígeno conformado por el *cluster* de manganeso.

La disminución en los valores de rendimiento cuántico en los cultivos a 54 y 81 g L<sup>-1</sup> de NaCl, evidencia el desacoplamiento en la cadena transportadora de electrones, lo que incrementa la porción de energía disipada por procesos no fotoquímicos (NPQ). Es importante enfatizar el desempeño del cultivo a 54 g L<sup>-1</sup>, ya que después de 48 h de aplicado el estrés, los valores de NPQ comienzan a disminuir (Fig. 15), lo que pudo ser el resultado de un proceso de adaptación.

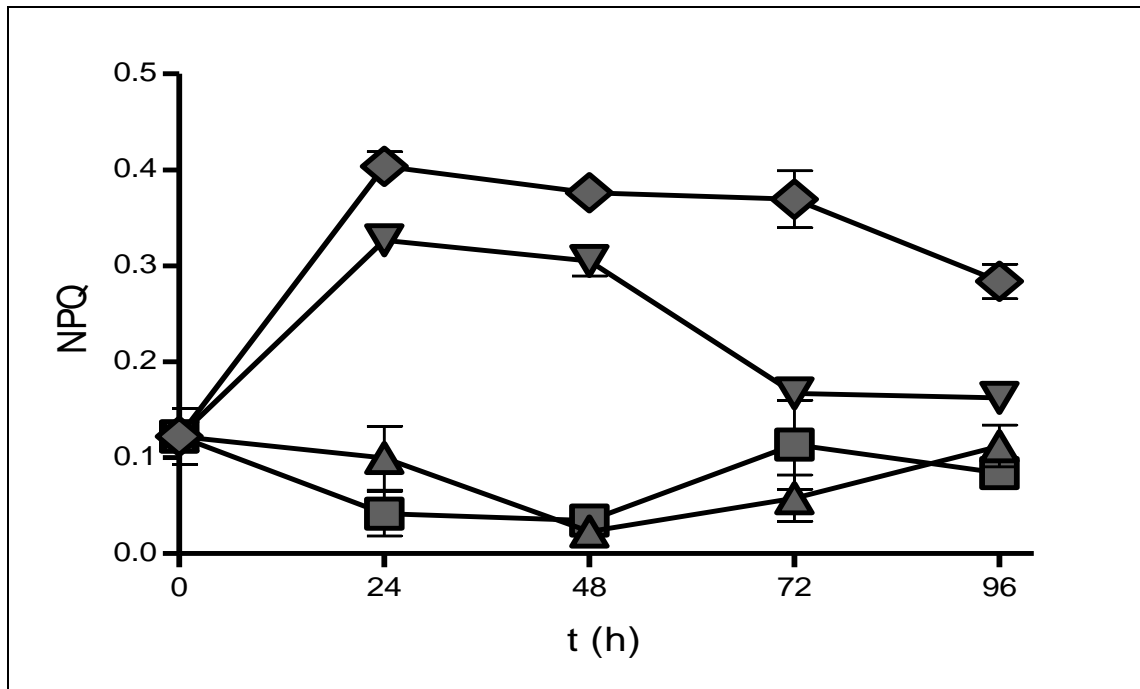


Figura 15. Efecto del incremento de la salinidad sobre el NPQ. (■) 13.5 g L<sup>-1</sup> de NaCl (▲) 27 g L<sup>-1</sup> de NaCl (▼) 54g L<sup>-1</sup> de NaCl (◆) 81g L<sup>-1</sup> de NaCl.

De acuerdo con Allakhverdiev y Murata (2008), los organismos fotosintéticos en condiciones de estrés por salinidad, son capaces de producir ATP y activar de manera lenta procesos de reparación celular cuando se encuentran en presencia de luz (condiciones autotróficas). Esto puede restaurar la actividad de los PSI y PSII y estimular la acción de H<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> *antiporters*, lo que favorece la tolerancia a incrementos en la concentración de NaCl del medio de cultivo.

A partir de los valores normalizados de fluorescencia de la clorofila *a* en el PSII, que fueron medidos y registrados en un fluorómetro portátil marca HANDY – PEA (Hansatech, UK), se realizó el cálculo de las bandas conocidas como ΔVt.



Estas bandas reflejan de manera más sensible el efecto de las condiciones de estrés sobre la cadena transportadora de electrones, ya que si la banda presenta valores positivos gran parte de la energía se disipa en forma de NPQ, mientras que si la banda presenta valores negativos se presenta un transporte electrónico favorecido (Tsimilli – Michael y Strasser, 2007).

En la Figura 16 se observa como los cultivos con 54 y 81 g L<sup>-1</sup> de NaCl presentaron afectaciones en la cadena transportadora de electrones, ya que presentan valores positivos de  $\Delta V_t$ , lo que concuerda con los valores altos de NPQ (Fig. 15) y los bajos valores de PS (Fig. 9) alcanzados por ambos cultivos.

Además el cultivo a 0.5X no presentó bandas, lo que reafirma el hecho de que no existieran diferencias entre los valores alcanzados por este cultivo y el control para PS, Chl<sub>a</sub>, TTF, TR,  $\Phi$ PSII y NPQ (Figs. 9, 10, 11, 12, 14, 15).

Se puede observar que el incremento en la salinidad favoreció la disipación no fotoquímica, además es claro que la mayor disipación se da a los 10 ms lo que correspondería a la oxidación de Q<sub>A</sub> y Q<sub>B</sub> (fases I y J respectivamente) según lo reportado por diversos autores (Tsimilli – Michael y Strasser, 2007; González Moreno *et al.*, 2008).

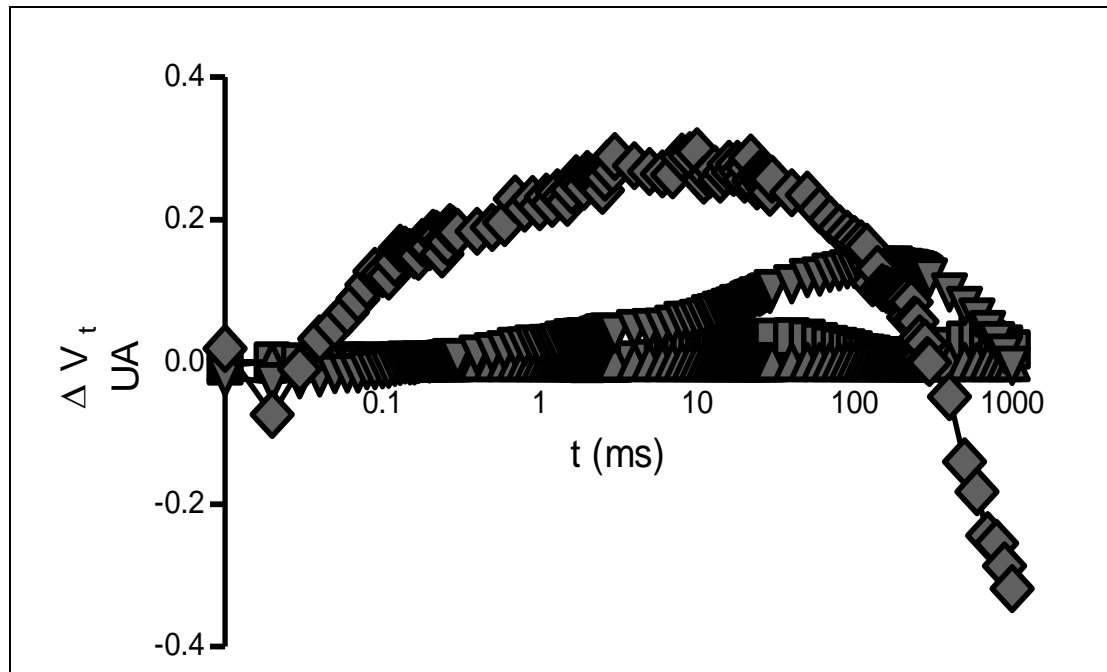


Figura 16. Efecto del incremento de la salinidad sobre el  $\Delta V_t$ . (■)  $13.5 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl (▲)  $27 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl (▼)  $54 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl (◆)  $81 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl.

Lo anterior estaría afirmando que la salinidad dificulta el transporte entre  $Q_A$  y  $Q_B$  porque ambas son moléculas liposolubles y el estrés por salinidad modifica la composición de las membranas celulares y por lo tanto su fluidez; además de que pueden generarse especies reactivas de oxígeno que pueden oxidar a estos acarreadores electrónicos (Sudhir y Murthy, 2004; Mahajan y Tuteja, 2005).

Diversos autores han observado bandas de disipación energética como las observadas en la Figura 16 y dichas bandas han demostrado ser una herramienta eficiente en el estudio del efecto de incrementos en la temperatura (Schansker *et al.*, 2011) y en la búsqueda de variedades de plantas resistentes a salinidad (Venkatesh *et al.*, 2012).

### 7.3.4 Contenido específico de lípidos

En el caso de los cultivos con 54 y 81 g L<sup>-1</sup> de NaCl, el contenido específico de lípidos totales presentó una relación directamente proporcional al contenido de NaCl del medio de cultivo. El contenido de lípidos (Fig. 17) fue influido significativamente por el tiempo transcurrido ( $p < 0.001$ ).

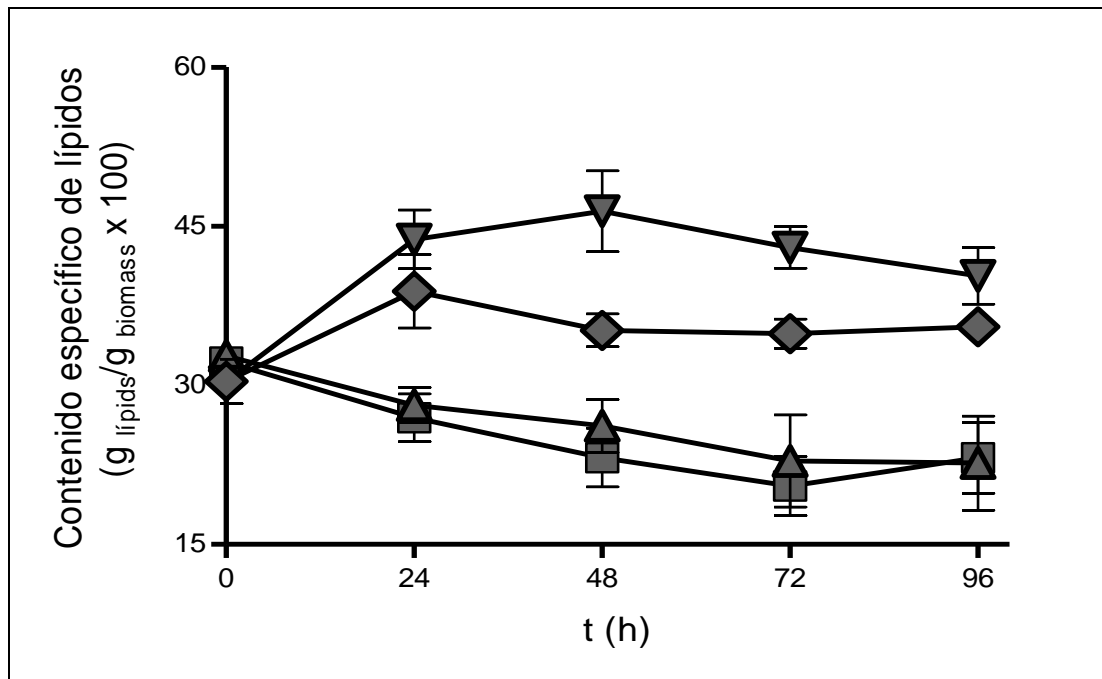


Figura 17. Efecto del incremento de la salinidad sobre el contenido específico de lípidos totales. (■) 13.5 g L<sup>-1</sup> de NaCl (▲) 27 g L<sup>-1</sup> de NaCl (▼) 54g L<sup>-1</sup> de NaCl (◆) 81g L<sup>-1</sup> de NaCl.

Los cultivos a 13.5 y 27 g L<sup>-1</sup> de NaCl no presentaron diferencias significativas en el contenido específico de lípidos entre ellos durante todo el experimento, mientras que los cultivos expuestos a 54 and 81 g L<sup>-1</sup> de NaCl mostraron incrementos significativos después de 24 h, alcanzando valores máximos de 46.41% ± 7.61 a las 48 h y 38.87% ± 6.93 a las 24 h para los cultivos con 54 y

81 g L<sup>-1</sup> de NaCl respectivamente y permanecieron prácticamente constantes hasta las 96 h.

Los valores de productividad de lípidos alcanzados en *Nannochloropsis* sp. van de 15 a 170 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> , pero empleando el estrés por deficiencia de nitrógeno como una estrategia de inducción; este enfoque tiene el inconveniente de requerir largos periodos de tiempo (Su *et al.*, 2011). En cultivos de *Dunaliella*, el incremento en la concentración de NaCl en el medio de cultivo ocasionó incrementos en el contenido de lípidos (Afify Abd El-Moneim *et al.*, 2010; Takagi *et al.*, 2006) así como aumento en la porción de triacilglicérol.

Lo anterior hace posible proponer la inducción por salinidad como una metodología más simple para producir lípidos transesterificables que la inducción por deficiencia de nitrógeno (Pal *et al.*, 2011; Takagi *et al.*, 2006). Respecto al perfil de ácidos grasos, la salinidad promueve la acumulación de monoinsaturados reduciendo la porción de poliinsaturados (Pal *et al.*, 2011; Su *et al.*, 2011). Considerando lo anterior, la inducción de la producción de lípidos por salinidad en microalgas se propone como un método simple y efectivo para obtener lípidos transesterificables y producir biodiesel. Además, la inducción por salinidad es más rápida y amigable con el ambiente comparada con la privación de nitrógeno, para la cual generalmente son necesarios lavados, diluciones sucesivas y más de 12 días de inducción.

### 7.3.5 Perfil de ácidos grasos

El perfil de ácidos grasos presentado por los cultivos en presencia de diferentes niveles de salinidad (Tabla 4) fue el típico para organismos de la clase Eustigmatophyceae. Estos organismos presentan ácidos grasos de 14 a 20 átomos de carbono con varias insaturaciones (Renaud y Parry, 1994; Sukenik, 1999; Khozin-Goldberg y Boussiba, 2011).

En la Tabla 4 se puede observar que la proporción de los ácidos grasos mirístico y palmítico incrementaron de manera considerable al incrementar la salinidad del medio de cultivo; mientras que para los ácidos de 18 carbonos, solo los que presentan 3 insaturaciones se incrementaron al aumentar el contenido de NaCl del medio de cultivo.

Respecto a los ácidos grasos de mayor peso molecular (20 y 22 átomos de carbono), su comportamiento estuvo directamente relacionado con el incremento del contenido de NaCl del medio, alcanzándose los valores máximos en el cultivo con 81 g L<sup>-1</sup> de NaCl.

Al agrupar a los ácidos grasos en saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, sólo se observa un efecto significativo para el caso de los poliinsaturados, los cuales pasaron de representar alrededor del 10% en los cultivos en baja salinidad hasta aproximadamente 30% en los cultivos con alta salinidad. Es de destacar que a pesar de los incrementos de la fracción de poliinsaturados, la suma de saturados y monoinsaturados (útiles para producción de biodiesel),

siempre fue superior al 50% del total de lípidos extraídos de la biomasa de *Nannochloropsis* sp.

El principal inconveniente del empleo de los lípidos extraídos de la biomasa de *Nannochloropsis* para la producción de biodiesel es su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, el cual puede alcanzar hasta el 30% del total (Renaud y Parry, 1994; Sukenik, 1999; Khozin-Goldberg y Boussiba, 2011) ya que contenidos tan altos de PUFA's puede afectar negativamente las características del biodiesel. Tal es el caso del número de cetanos y la estabilidad a la oxidación que disminuyen considerablemente (Knothe, 2012).

Tabla 4 Perfil de ácidos grasos en cultivos de *Nannochloropsis* sp. a diferentes salinidades

A. Graso	Concentración de NaCl			
	13.5 g L <sup>-1</sup> (%)	27 g L <sup>-1</sup> (%)	54 g L <sup>-1</sup> (%)	81 g L <sup>-1</sup> (%)
C14	8.1 ±0.07	7.9 ±0.60	4.9 ±0.80	4.5 ±1.04
C16	29.8 ±0.04	27.0 ±0.21	19.4 ±2.51	15.0 ±3.1
C16:1	23.9 ±0.63	22.4 ±0.16	15.7 ±1.88	11.3 ±2.65
C18	3.1 ±0.39	4.1 ±0.01	1.9 ±0.71	5.4 ±0.78
C18:1	5.8 ±0.86	5.9 ±0.59	7.0 ±0.54	5.3 ±0.77
C18:2	2.8 ±0.39	2.1 ±0.21	1.6 ±0.03	0.9 ±0.63
C18:3	3.0 ±0.85	1.3 ±1.06	5.4 ±6.96	10.6 ±3.69

C22	10.0 ±1.66	9.2 ±0.05	8.1 ±5.19	23.1 ±2.89
C20:4	ND	3.1 ±0.70	10.6 ±0.91	8.7 ±1.53
C20:5	4.6 ±0.55	2.6 ±0.11	13.3 ±5.79	13.8 ±7.65
Otros	9.1 ±3.53	14.4 ±0.17	12.1 ±0.46	1.4 ±1.1
Saturados	51	48.2	34.3	48
Monoinsaturados	29.7	28.3	22.7	16.6
Poliinsaturados	10.4	9.1	30.9	34
Saturados + Mono insaturados	80.7	76.5	57.0	64.6

### 7.3.6 Consumo de nutrientes

El medio de cultivo empleado presenta un contenido de nitrógeno como nitrato cercano a 150 mg  $N-NO_3 L^{-1}$ , dado que los cultivos a 13.5 y 27 g de NaCl  $L^{-1}$  presentaron un crecimiento acelerado, se esperaba que al final del experimento la concentración de nitrógeno fuera la menor.

El comportamiento del  $N-NO_3$  se muestra en la Figura 18 y se observa que efectivamente, los cultivos con 13.5 y 27 g de NaCl  $L^{-1}$  presentaron la menor concentración final de nitrógeno, siendo de 67.1 y 71.1 mg  $N-NO_3 L^{-1}$  respectivamente, dichos valores no mostraron diferencias significativas entre ellos ( $p>0.05$ ). A las 96 h del experimento, la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo fue alrededor de 45% del contenido inicial (150 mg  $N-NO_3 L^{-1}$ ), lo cual justifica el hecho de que estos cultivos no presentaran cambios importantes en el contenido específico de lípidos

(Fig. 17), ya que en ningún momento se encontraron en condiciones de deficiencia de nutrientes.

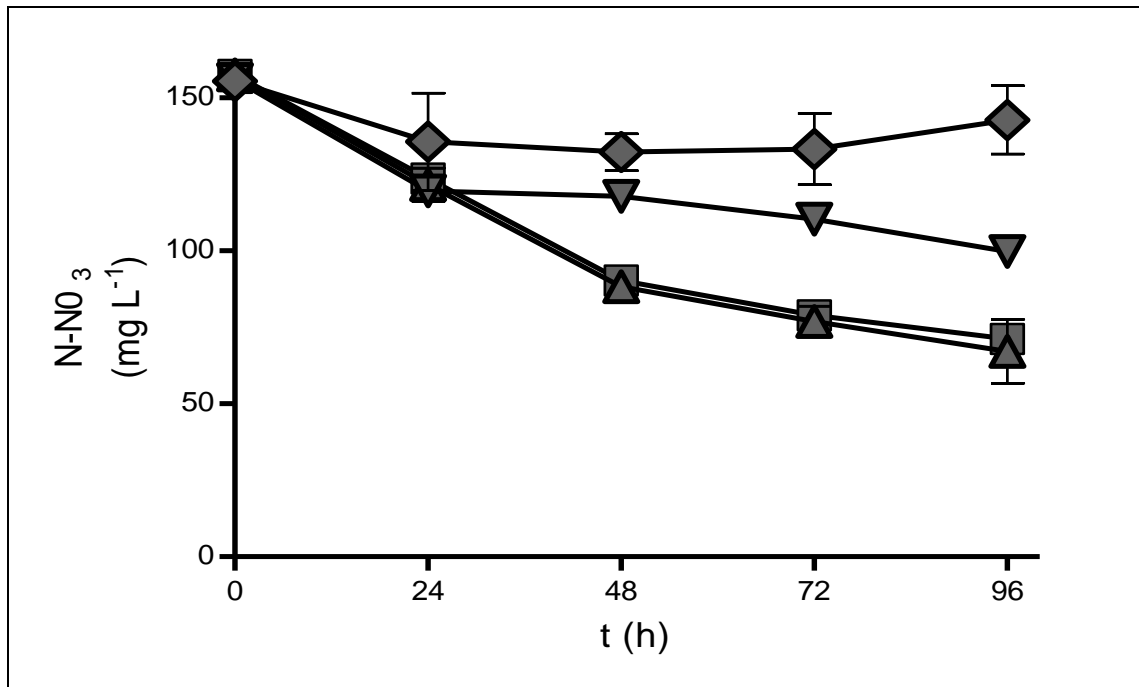


Figura 18. Concentración de N-NO<sub>3</sub> en cultivos de *Nannochloropsis* sp. a diferentes concentraciones de NaCl. (■) 13.5 g L<sup>-1</sup> de NaCl (▲) 27 g L<sup>-1</sup> de NaCl (▼) 54g L<sup>-1</sup> de NaCl (◆) 81g L<sup>-1</sup> de NaCl.

El cultivo con 54 g de NaCl L<sup>-1</sup> presentó una disminución de la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo menos importante que los cultivos con 13.5 y 27 g L<sup>-1</sup>. A las 96 h la concentración de nitrógeno fue de 99.8 mg N-NO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>, lo que representó un consumo de 33.3%. En cambio, el cultivo en presencia de 81 g L<sup>-1</sup>, mostró un consumo de sólo 10 mg N-NO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>, lo que se justifica considerando la poca concentración de biomasa presente en esta condición de cultivo (Fig. 9).



El contenido específico de lípidos totales obtenidos en las cuatro condiciones empleadas pueden atribuirse completamente al efecto de la salinidad, ya que *Nannochloropsis* es un organismo que puede incorporar nitrógeno a concentraciones menores a 5 mg L<sup>-1</sup> (Hu y Zhou, 2010) y en todos los casos este valor fue superior.

Por otro lado, el contenido de fósforo en el medio de cultivo fue de alrededor de 15 mg P-PO<sub>4</sub> L<sup>-1</sup> y su comportamiento (Fig. 19) en el medio de cultivo fue similar al presentado por el nitrógeno (Fig. 18). Esto debido a que la disminución en los cultivos con 13.5 y 27 g de NaCl L<sup>-1</sup> fueron las más importantes con valores finales de 6.1 y 6.9 mg P-PO<sub>4</sub> L<sup>-1</sup> respectivamente, lo que representa una reducción cercana al 60% (59.33 y 54% respectivamente) respecto a la concentración inicial.

Los cultivos en condición de estrés por salinidad, consumieron cantidades menores de fósforo respecto al cultivo control; mientras que el cultivo en presencia de 54 g L<sup>-1</sup> de NaCl consumió el 39.9% del fosfato en el medio de cultivo, el cultivo a 81 g de NaCl L<sup>-1</sup> solo un 9%.

Las especies del género *Nannochloropsis* disminuyen su metabolismo cuando el contenido de fósforo del medio de cultivo es inferior a 1 mg L<sup>-1</sup> (Hu y Zhou, 2010); por lo anterior, se puede considerar que el medio ASW contiene nutrientes suficientes para sostener un crecimiento masivo de *Nannochloropsis* sp.

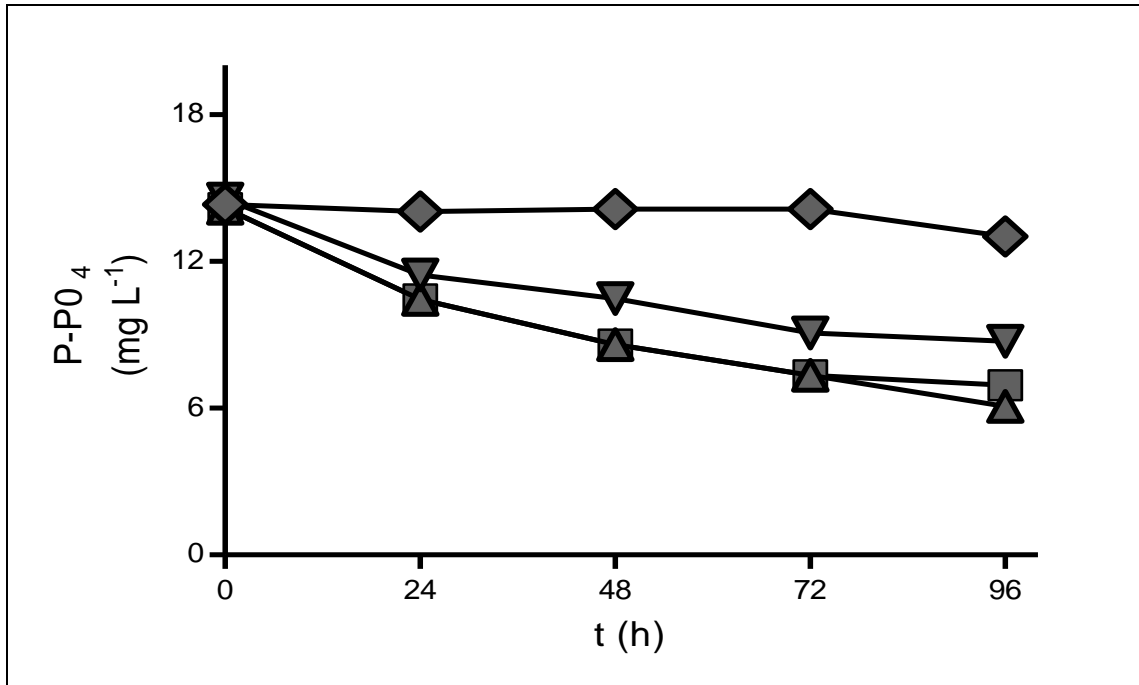


Figura 19. Concentración de P-PO<sub>4</sub> en cultivos de *Nannochloropsis* sp. a diferentes concentraciones de NaCl. (■) 13.5 g L<sup>-1</sup> de NaCl (▲) 27 g L<sup>-1</sup> de NaCl (▼) 54g L<sup>-1</sup> de NaCl (◆) 81g L<sup>-1</sup> de NaCl.

#### **7.4 Efecto inmediato del contenido de NaCl en el medio de cultivo sobre el crecimiento, fisiología y contenido específico de lípidos de *Nannochloropsis* sp.**

Los organismos fotosintéticos y en particular las microalgas se encuentran distribuidos en diversos ambientes (Barsanti y Gualtieri, 2006; Barsanti *et al.*, 2008), lo que ocasiona que los cambios metabólicos en condiciones de estrés estén en función de su entorno. En particular, para el estrés por salinidad la respuesta del microorganismo dependerá primeramente de su intensidad y de si se trata de una microalga de agua dulce, agua de mar etc.

En los organismos marinos como *Nannochloropsis* sp. se pueden tomar acciones casi inmediatas contra la salinidad, las cuales están encaminadas principalmente a la producción de solutos compatibles que ayudan a obtener un equilibrio osmótico intracelular. A largo plazo se expresarán genes y modificarán rutas metabólicas con el fin de mantener activo el metabolismo celular generando cierta tolerancia a la salinidad (Ma *et al.*, 2006).

En la figura 20 se puede observar el efecto de la concentración volumétrica de Chla, donde se destaca que los cuatro experimentos no presentaron diferencias significativas entre ellos ( $p > 0.05$ ) durante las primeras 4 h del experimento. A partir de la hora 5 los cultivos en presencia de 13.5 y 27 g L<sup>-1</sup> de NaCl comenzaron a incrementar su concentración de Chla alcanzando a las 6 h las mayores concentraciones de  $4.5 \pm 0.75$  y  $5.2 \pm 0.61$  mg L<sup>-1</sup> respectivamente; mientras que los

cultivos con 54 y 81 g L<sup>-1</sup> de NaCl alcanzaron valores de 3.9 ± 0.51 y 3.4 ± 0.12 mg L<sup>-1</sup> respectivamente.

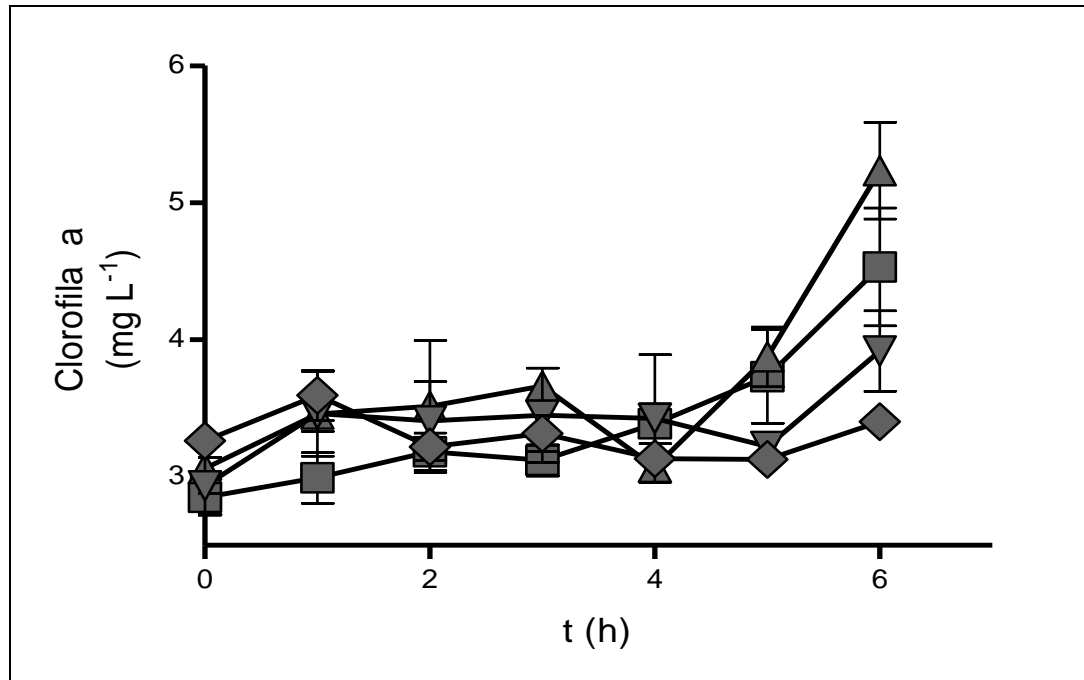


Figura 20. Efecto inmediato del incremento de la salinidad sobre la concentración de Chla. (■) 13.5 g L<sup>-1</sup> de NaCl (▲) 27 g L<sup>-1</sup> de NaCl (▼) 54 g L<sup>-1</sup> de NaCl (◆) 81 g L<sup>-1</sup> de NaCl.

Se sabe que en los organismos fotosintéticos uno de los primeros procesos metabólicos que se ve afectado por el estrés por salinidad es la síntesis de pigmentos, especialmente la de clorofila presentándose un retraso en su producción o disminuciones en su contenido específico (Stepien y Klobus, 2006). Ambas situaciones se observan en la figura 20 ya que el inicio de la síntesis de este pigmento se atrasa alrededor de una 1 h para los cultivos con 54 y 81 g L<sup>-1</sup> de NaCl y posterior a las 4 h el contenido específico disminuye.

#### 7.4.1 Tasa de Fotosíntesis y Tasa de Respiración

El estrés por salinidad genera disminuciones tanto en la tasa de fotosíntesis como en la de respiración, derivado de un desajuste en el contenido iónico intracelular y disminuciones en la velocidad de recambio de proteínas (Faraloni y Torzillo, 2010; Wu *et al.*, 2011).

En la figura 21 se observa el comportamiento de la tasa de fotosíntesis medida como liberación de oxígeno, todos los cultivos presentaron un valor de  $244 \pm 8 \mu\text{mol O}_2 \text{ mg Chla}^{-1} \text{ h}^{-1}$  y conforme transcurrió el tiempo, los cultivos presentaron diferentes comportamientos. Los cultivos en presencia de 13.5 y 27 g L<sup>-1</sup> de NaCl presentaron valores superiores al inicial durante todo el experimento y la liberación de oxígeno fue 12 y 40% superior durante las primeras 6 h del experimento. Esto se puede explicar porque la medición inicial corresponde al valor presentado por el inóculo y la adición de medio de cultivo nuevo conlleva suministro de nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo, lo que regularmente se ve reflejado en estimulaciones del metabolismo fotosintético.

El cultivo con 54 g L<sup>-1</sup> de NaCl mantuvo el valor constante de su TTF durante las primeras 5 h no encontrándose diferencias significativas con respecto al valor inicial ( $p > 0.05$ ), a la hora 6 se presentó una disminución del 13%. En cambio, para el cultivo en presencia de 81 g L<sup>-1</sup> de NaCl fueron suficientes 5 min de exposición al NaCl para que la TTF disminuyera en un 83%, alcanzando un valor de  $42 \pm 6.5 \mu\text{mol O}_2 \text{ mg Chla}^{-1} \text{ h}^{-1}$  el cual se mantuvo constante hasta el final del experimento.

Las reducciones en la tasa de liberación de oxígeno por estrés por salinidad se deben a que se desacelera de forma considerable el recambio de proteínas, lo que es fundamental en el proceso fotosintético ya que uno de los componentes del PSII, la proteína D1, debe ser sustituida de forma continua y si este proceso no se lleva a cabo, se disminuye la eficiencia del funcionamiento del PSII y por lo tanto la generación de ATP y NADPH (Murata *et al.*, 2007).

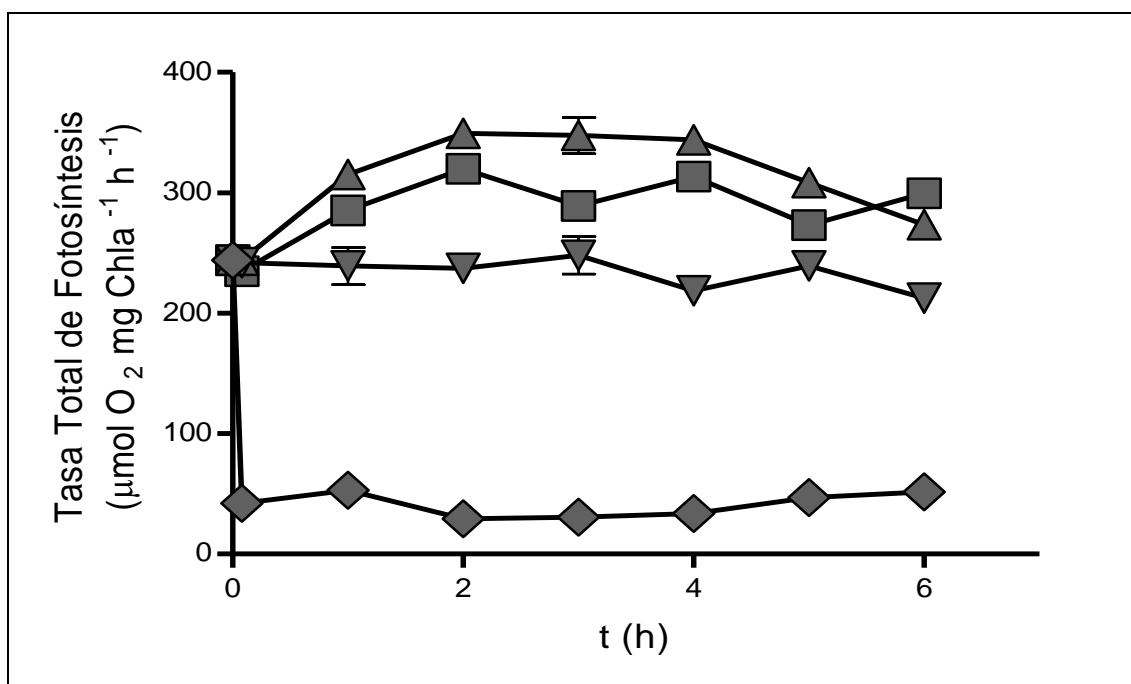


Figura 21. Efecto inmediato del incremento de la salinidad sobre la Tasa Total de Fotosíntesis. (■) 13.5 g L<sup>-1</sup> de NaCl (▲) 27 g L<sup>-1</sup> de NaCl (▼) 54g L<sup>-1</sup> de NaCl (◆) 81g L<sup>-1</sup> de NaCl.

La tasa de respiración al igual que la fotosintética se ve modificada bajo condiciones de estrés. En la figura 22 se muestra el comportamiento de la TR de los cultivos expuestos a diferentes niveles de salinidad. Se observa que la salinidad tuvo un

efecto inversamente proporcional sobre la tasa de consumo de oxígeno ( $p>0.001$ ).  
cuyo valor inicial fue de  $95 \pm 2.0 \mu\text{mol O}_2 \text{ mg Chl a}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

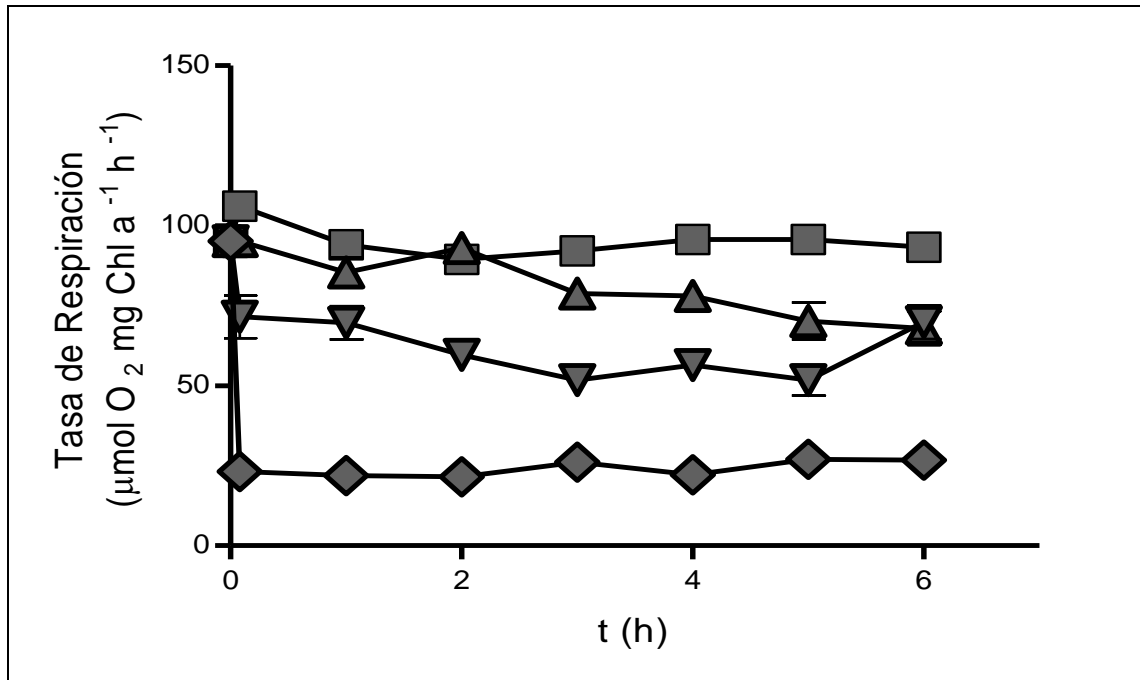


Figura 22. Efecto inmediato del incremento de la salinidad sobre la Tasa de Respiración. (■)  $13.5 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl (▲)  $27 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl (▼)  $54 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl (◆)  $81 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl.

Los cultivos bajo estrés salino disminuyeron su TR de manera más drástica que el cultivo control ( $27 \text{ g L}^{-1}$ ) y el efecto fue casi inmediato. Para el cultivo en presencia de  $54 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl, se observó una disminución superior al 25% durante todo el experimento y alcanzándose un valor final de  $70 \pm 14 \mu\text{mol O}_2 \text{ mg Chl a}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

Los cultivos en presencia de  $13.5$  y  $27 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl presentaron los valores máximos durante el experimento y no presentaron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) durante las primeras 3 h, a partir de este momento mientras que el cultivo en

presencia de  $13.5 \text{ g L}^{-1}$  mantuvo su valor contante, el cultivo con  $27 \text{ g L}^{-1}$  tendió a disminuirlo alcanzando un valor final de  $68 \pm 14.0 \mu\text{mol O}_2 \text{ mg Chla}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , lo que representa una disminución del 29 % respecto a su valor inicial.

El efecto más evidente en la TR se observó en el cultivo adicionado con  $81 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl, donde la disminución se presentó a los 5 min alcanzando un valor de  $23 \pm 8.5 \mu\text{mol O}_2 \text{ mg Chla}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , que representa una disminución del 76% respecto a su valor inicial, a partir de este momento la TR se mantuvo contante sin que presentara diferencias significativas respecto al valor inicial ( $p>0.05$ ).

Si se analiza el efecto inmediato y el efecto a largo plazo (Sección 7.3) de manera simultánea, se puede observar que el cultivo en la condición de estrés por salinidad, específicamente a  $81 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl, incrementó de manera considerable los valores de TTF (Figs. 11 y 21) y TR (Figs. 12 y 22) al final del experimento, respecto a los valores presentados a la 1h, para cada parámetro, lo que haría evidente un proceso de adaptación a la salinidad. Hussain *et al.* (2008) ha reportado que los organismos tolerantes a la sal después de un tiempo en condiciones de estrés por NaCl accionan una estrategia de secuestro de iones sodio dentro de las vacuolas con el fin de disminuir su concentración en el citoplasma, incrementando de manera considerable la relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  hasta alcanzar niveles que permitan el buen desarrollo de procesos enzimáticos intracelulares.



#### 7.4.2 Mediciones de emisión de fluorescencia por la Chl a del PSII

Los incrementos en la salinidad del medio de cultivo en *Nannochloropsis* sp., al igual que ocurre en otras microalgas, ocasionó la disminución del transporte de electrones a través de la cadena transportadora, lo que se vio reflejado en los parámetros fisiológicos obtenidos mediante la medición de fluorescencia de la clorofila.

En la Figura 23 se observa el comportamiento del  $\Phi P_0$  durante todo el experimento. El efecto de la salinidad sobre este parámetro fue significativo ( $p > 0.001$ ) y de igual manera que para la fotosíntesis y la respiración resultó inversamente proporcional.

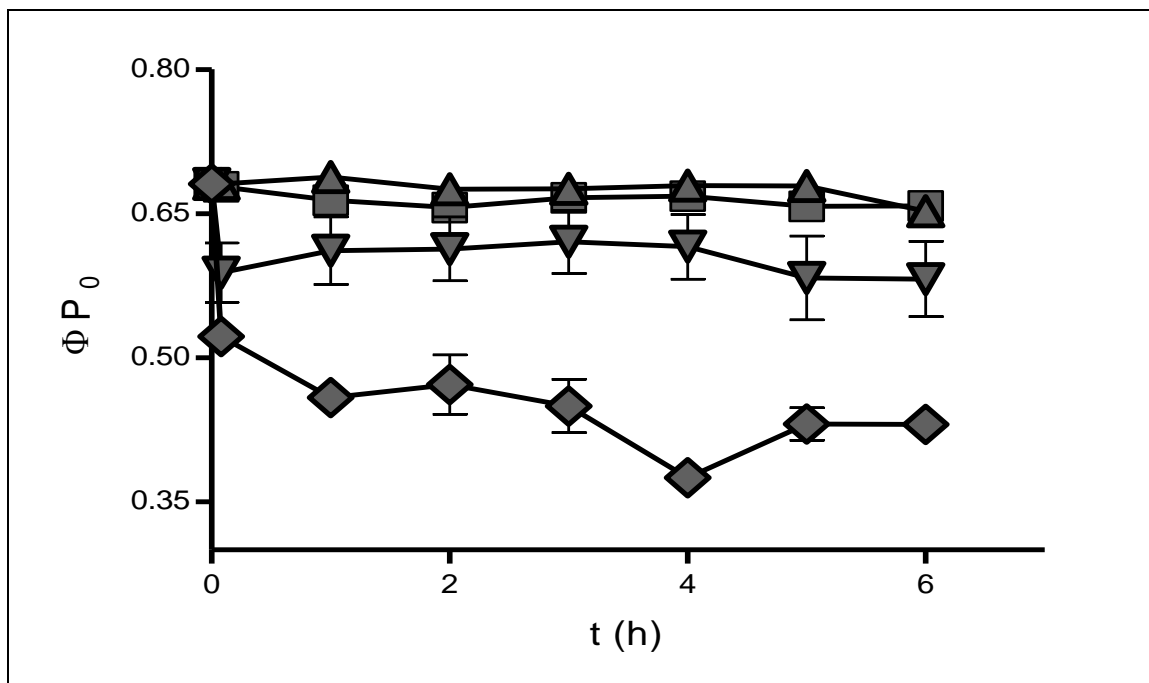


Figura 23. Efecto inmediato del incremento de la salinidad sobre el  $\Phi P_0$ . (■) 13.5 g L<sup>-1</sup> de NaCl (▲) 27 g L<sup>-1</sup> de NaCl (▼) 54 g L<sup>-1</sup> de NaCl (◆) 81 g L<sup>-1</sup> de NaCl.

Los cultivos en presencia de 13.5 y 27 g L<sup>-1</sup> de NaCl presentaron los valores mayores para el rendimiento cuántico teórico máximo sin diferencias significativas entre ellos

( $p > 0.05$ ) durante todo el experimento. Ambos cultivos alcanzaron valores superiores a 0.67, valor que resulta cercano a los valores máximos posibles para el cultivo de microalgas (Cosgrove y Borowitzka, 2011).

A pesar de que el cultivo adicionado con  $54 \text{ g L}^{-1}$  presentó valores cercanos a 0.62, no presentó diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) respecto al cultivo control ( $27 \text{ g L}^{-1}$ ) durante el experimento. Mientras que el cultivo adicionado con  $81 \text{ g L}^{-1}$  presentó una drástica caída a los 5 min de iniciado el experimento de alrededor del 25% respecto al valor inicial, para después presentar una tendencia a la baja hasta el final del experimento alcanzando un valor de 0.43, lo que representa una disminución del 37% respecto a su valor inicial.

Debido a que el  $\Phi P0$  sólo se refiere al estado estructural de la cadena transportadora de electrones, es necesario realizar la determinación del rendimiento cuántico operacional que nos dice realmente cómo funciona la CTE. En la figura 24 se presenta el comportamiento de dicho parámetro y se observa un panorama muy similar al del  $\Phi P0$  para los cultivos con  $13.5$ ,  $27$  y  $81 \text{ g L}^{-1}$ , sin embargo, para el cultivo adicionado con  $54 \text{ g L}^{-1}$  sí se observan disminuciones significativas en el valor del  $\Phi PSII$  cercanas al 30% respecto al cultivo control ( $27 \text{ g L}^{-1}$ ), situación que no fue evidente para el  $\Phi P0$ .

Esta diferencia entre el  $\Phi P0$  y el  $\Phi PSII$  radica en que el primero se determina cuando el cultivo está acondicionado a la oscuridad y en consecuencia, todos los centros de reacción se encuentran oxidados, lo que permite evaluar la situación estructural de la CTE. En cambio, el  $\Phi PSII$  se determina en condiciones iluminadas,

lo que significa que la CTE se encuentra en plena operación dándonos una evaluación “funcional” de la CTE (Cosgrove y Borowitzka, 2011), es por esto que el  $\Phi$ PSII se encuentra fuertemente vinculado a la acumulación de biomasa (Sección 7.3.3).

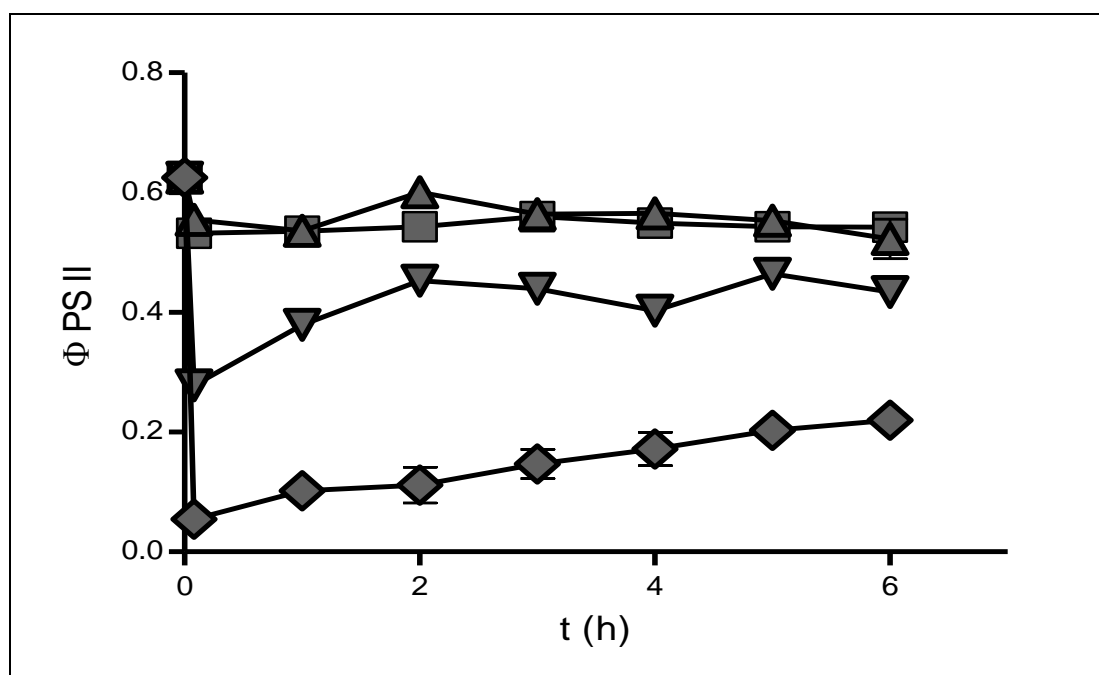


Figura 24. Efecto inmediato del incremento de la salinidad sobre el  $\Phi$ PSII. (■) 13.5 g L<sup>-1</sup> de NaCl (▲) 27 g L<sup>-1</sup> de NaCl (▼) 54g L<sup>-1</sup> de NaCl (◆) 81g L<sup>-1</sup> de NaCl.

Cuando los cultivos de microalgas se encuentran en condiciones adversas (en presencia de algún tipo de estrés) que afectan el proceso fotosintético, se incrementa la fracción de energía que se disipa por vías no fotoquímicas. Esto se ve reflejado en un aumento del NPQ (González Moreno *et al.*, 2008; Cosgrove y Borowitzka, 2011). En la figura 25 se observa el comportamiento de dicho parámetro en los cultivos de *Nannochloropsis* sp. expuesta a diferentes niveles de salinidad.

El comportamiento observado para el NPQ resultó inverso al obtenido para el  $\Phi$ PSII. El cultivo que presentó los valores máximos fue el que contenía  $81 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl, con valores de alrededor de 0.6 durante todo el experimento. Lo anterior era de esperarse, ya que mientras que el  $\Phi$ PSII nos indica si el proceso fotosintético funciona de manera correcta, el NPQ nos ayuda a inferir que tanta energía es “desperdiciada” en forma de calor y fluorescencia.

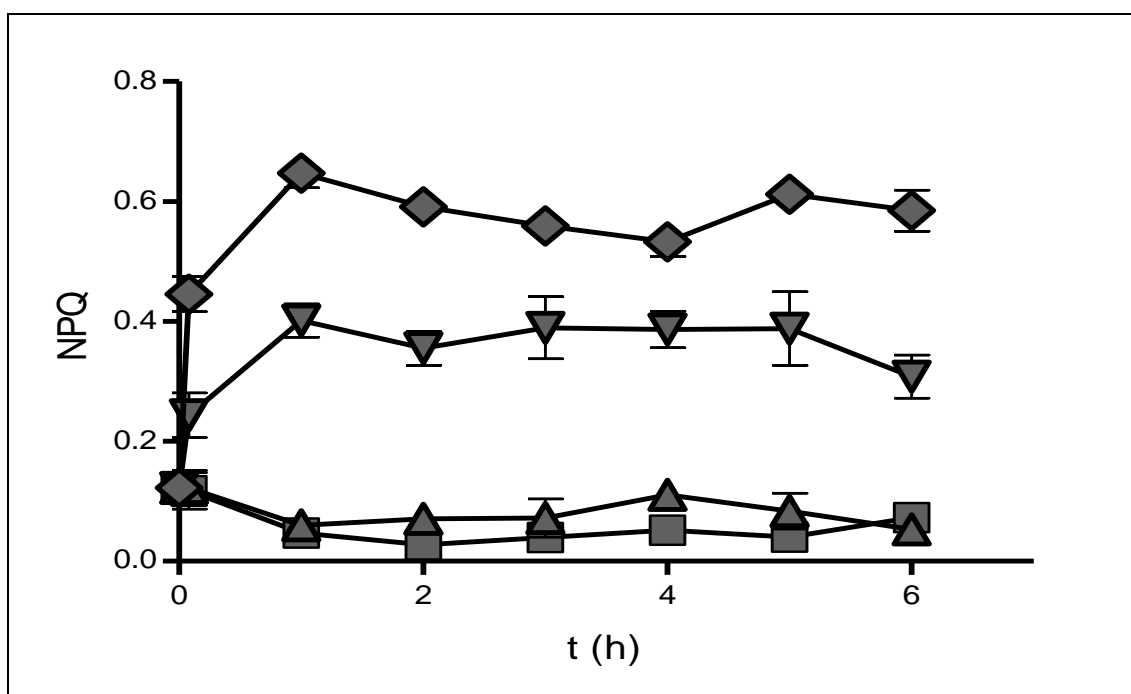


Figura 25. Efecto inmediato del incremento de la salinidad sobre el NPQ. (■)  $13.5 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl (▲)  $27 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl (▼)  $54 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl (◆)  $81 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl.

El estrés por incrementos en la salinidad del medio de cultivo genera modificaciones a corto plazo; dentro de las que se encuentran la expresión de genes de resistencia, la mayoría de ellos relacionados con la producción de osmorreguladores (Ma *et al* 2006). Además se generan disminuciones en la actividad del PSII (Caramelo y Iusem, 2009) y de la tasa de recambio de la proteína D1 (Murata *et al.*, 2007), lo que

ocasiona disminuciones en la tasa fotosintética, rendimiento cuántico, etc. (Lu y Vonshak, 1999).

Los organismos marinos tienen la capacidad de generar estrategias para defenderse del estrés por salinidad, sobre todo cuando éste es ocasionado por NaCl, dentro de las cuales cabe destacar la capacidad de producir antitransportadores Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> para ajustar la concentración de sodio en el citoplasma y en caso de que este mecanismo no sea suficiente, la célula es capaz de atrapar iones de sodio en las vacuolas, con el fin de disminuir su concentración intracelular a niveles en los cuales la síntesis y recambio de proteínas no se vea afectada (Chinnasamy *et al.*, 2005).

A largo plazo las respuestas pueden ser todavía más drásticas, ya sea incrementando el sistema antioxidante intracelular (concentración de ascorbato, glutatión reducido, superóxido dismutasa, etc.) o modificando el metabolismo hacia la acumulación intracelular de sustancias de reserva como azúcares o lípidos o de moléculas antioxidantes como carotenoides o incluso generando estructuras de resistencia como quistes (Mustard y Renault, 2004; Ma *et al.*, 2006; Hussain *et al.*, 2008; Ramos *et al.*, 2011).

## **7.5 Efecto del contenido de NaCl en el medio de cultivo sobre el crecimiento y contenido específico de lípidos en cultivos de alta concentración celular de *Nannochloropsis* sp.**

La reacción de los microorganismos a ciertas condiciones de estrés depende del número de individuos que se ven expuestos a dichas condiciones adversas. Se ha reportado que para el caso de la luz, la concentración celular es un factor importante para evitar procesos de fotoinhibición (Goksan *et al.*, 2003; Torzillo *et al.*, 2012) y algo similar se observa para otras condiciones adversas de cultivo.

### **7.5.1 Crecimiento**

Debido a que los datos obtenidos en los experimentos anteriores reflejaban que la adición de NaCl disminuía la velocidad de crecimiento y favorecía la acumulación de lípidos, se procedió a realizar una serie de experimentos donde se inició con concentraciones elevadas de biomasa (superiores a  $2.5 \text{ g L}^{-1}$ ) con el fin de conocer el efecto de la salinidad sobre el contenido específico de lípidos de *Nannochloropsis* sp. sin afectar demasiado la productividad de los mismos.

La concentración de biomasa en el cultivo (Fig. 26) se vio afectada de forma significativa por los días transcurridos en el experimento ( $p < 0.001$ ), presentándose en ambos cultivos un incremento importante en la concentración a las 24 h de iniciado el experimento y a partir de éste, el PS no presentó diferencias significativas ( $p > 0.05$ )

Sin embargo, la cantidad de NaCl presente en el medio de cultivo generó una disminución significativa ( $p < 0.001$ ) en la cantidad máxima de biomasa, ya que al final del experimento (96 h) la concentración de biomasa del cultivo adicionado con  $54 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl fue de  $3.9 \pm 0.19 \text{ g L}^{-1}$ , lo que representa una disminución del 10.24% respecto al cultivo control ( $27 \text{ g L}^{-1}$ ).

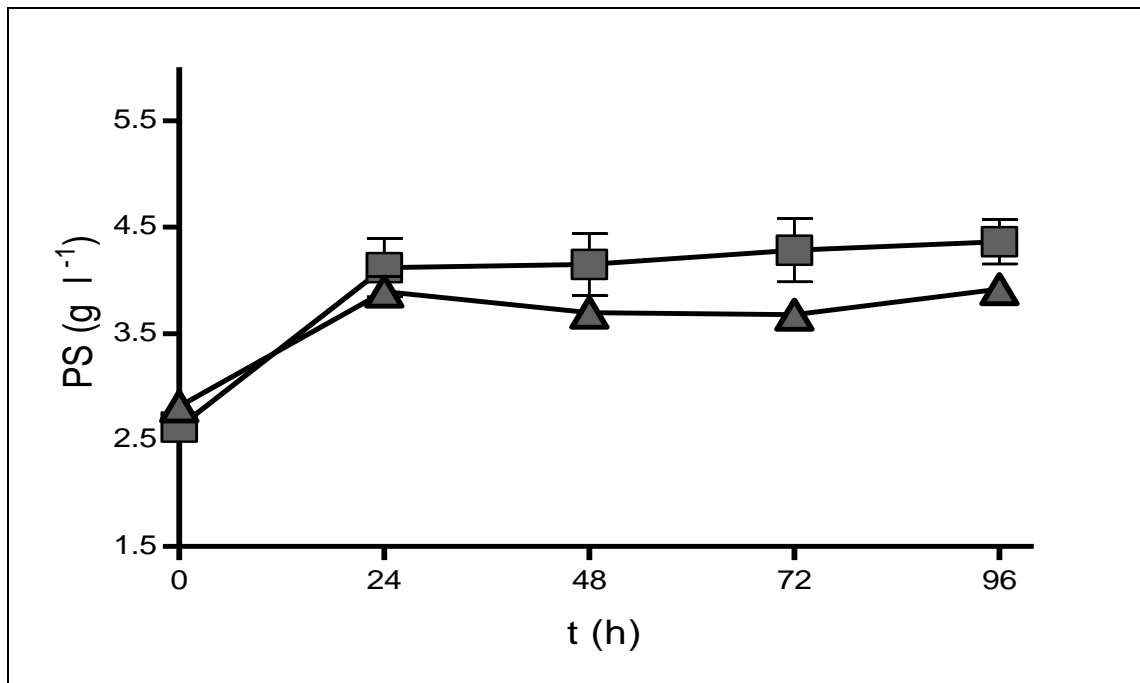


Figura 26. Efecto del incremento de la salinidad sobre el crecimiento de *Nannochloropsis* sp. en cultivos de alta concentración celular. (■)  $27 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl (▲)  $54 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl

Sin importar la concentración de NaCl ensayada no se presentó una cantidad de biomasa superior a  $4 \text{ g L}^{-1}$ , lo que hace pensar que por encima de este valor, la cantidad de energía luminosa suministrada al cultivo ( $75 + 75 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-2}$ ), resultó insuficiente para generar crecimiento, ya que a partir de este valor la producción de biomasa se detuvo casi completamente en ambos cultivos. Ha sido reportado por

algunos autores que en cultivos de alta densidad celular la relación entre la cantidad de biomasa y la luz incidente es un factor trascendental para obtener altas concentraciones celulares (Hu y Gao, 2006; Hu *et al.*, 2008).

El incremento en la concentración de NaCl en el medio de cultivo afectó la concentración de Chla (Fig. 27) de manera significativa ( $p < 0.001$ ); ya que mientras que el cultivo en presencia de  $27 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl incrementó la concentración volumétrica en 85% aproximadamente, en el cultivo adicionado con  $54 \text{ g L}^{-1}$  sólo fue del 10%. Este comportamiento fue similar al observado cuando el estrés por salinidad fue aplicado desde el inicio del cultivo, es decir a baja concentración celular (Sección 7.3.1).

El contenido específico de Chla (Fig. 27) también presentó diferencias significativas entre ambos tratamientos ( $p > 0.001$ ). Mientras que el cultivo en presencia de  $27 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl presentó valores de alrededor de  $35 \text{ mg Chla g PS}^{-1}$ , para el cultivo con  $54 \text{ g L}^{-1}$  fue cercana a  $25 \text{ mg Chla g PS}^{-1}$ , lo que representa una disminución de aproximadamente 29%.



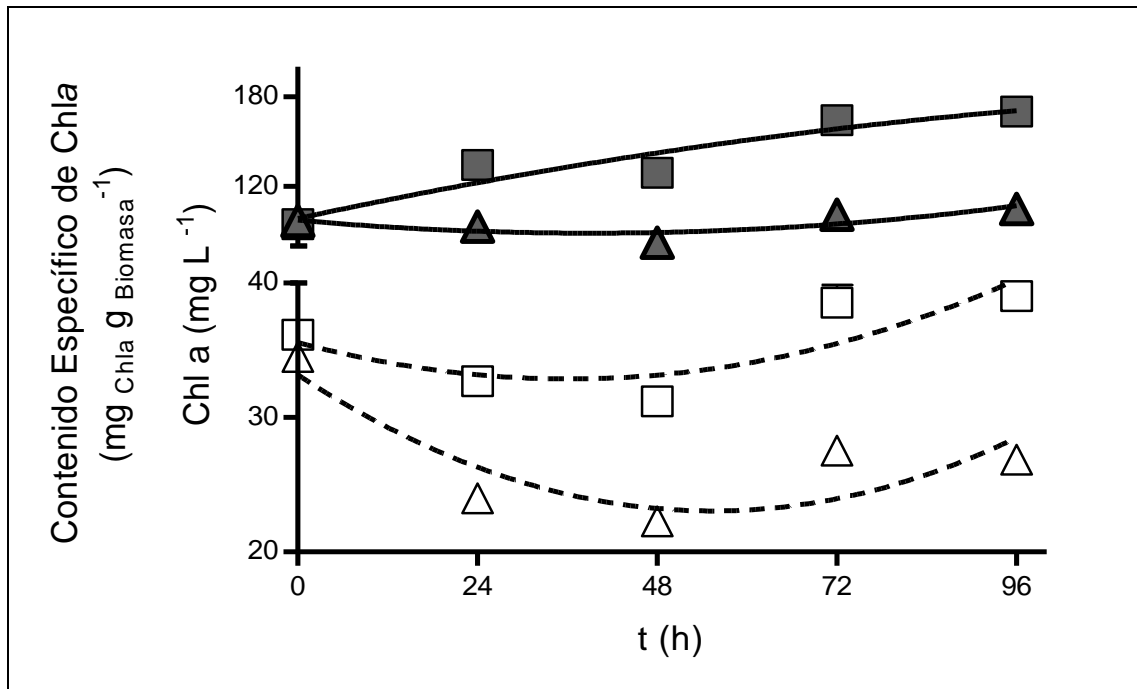


Figura 27. Efecto del incremento de la salinidad sobre la concentración de Chl a en *Nannochloropsis* sp. en cultivos de alta concentración celular. (■) 27 g L<sup>-1</sup> de NaCl (▲) 54 g L<sup>-1</sup> de NaCl. Símbolos llenos representan concentraciones volumétricas y los vacíos contenidos específicos de Chl a

Diversos autores han reportado que el estrés por salinidad afecta de forma considerable la producción de proteínas y enzimas, y aunque la Chl a es un pigmento, su producción depende del buen funcionamiento de la maquinaria enzimática intracelular, por lo que la exposición a concentraciones elevadas de NaCl, ocasiona la disminución del contenido de pigmentos fotosintéticos (Stepien y Klobus, 2006)

### 7.5.2 Contenido específico de lípidos totales

El contenido específico de lípidos totales se vio incrementado al aumentar la concentración de NaCl del medio de cultivo (Fig. 28) de manera significativa ( $p > 0.001$ ). Mientras que el cultivo en presencia de 27 g L<sup>-1</sup> presentó un contenido de

lípidos de alrededor del 25% durante todo el experimento, el cultivo en presencia de  $54 \text{ g L}^{-1}$  alcanzó un 55% aproximadamente después de 24 h de adicionar el NaCl y lo mantuvo constante hasta el final del experimento. Esto resultó similar a lo obtenido en los cultivos a baja concentración celular, donde el cultivo con  $54 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl alcanzó un contenido específico de lípidos de alrededor de 45% a 24 h de adicionada la sal y lo mantuvo así durante las 96 h que duró el experimento (Sección 7.3.4).

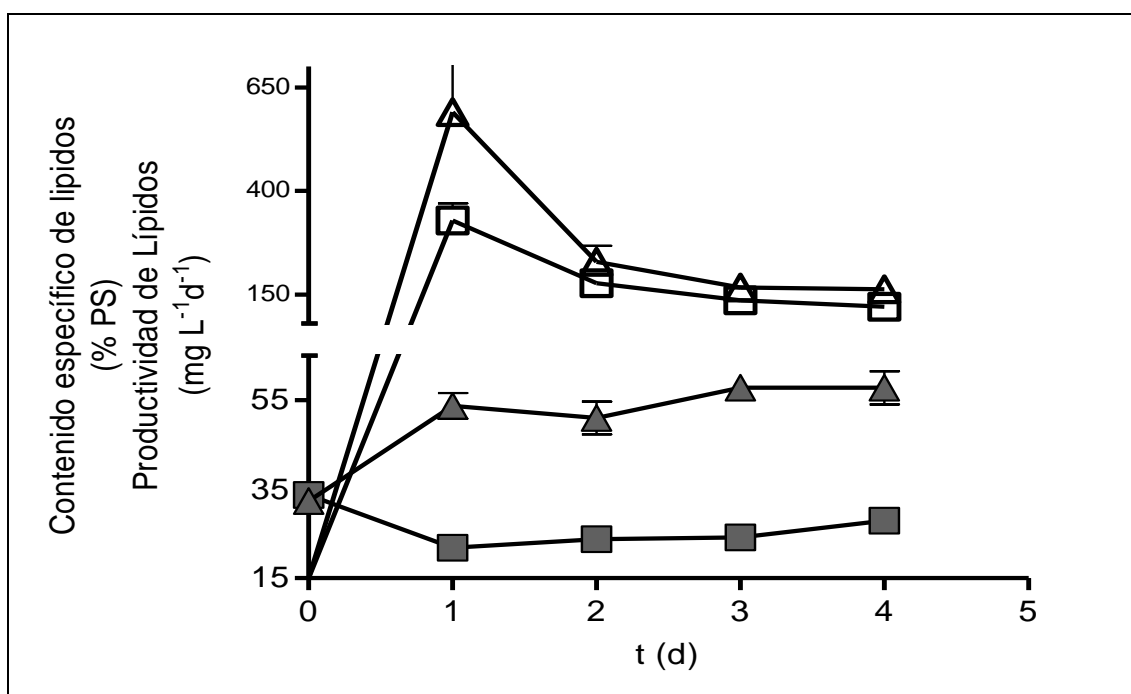


Figura 28. Contenido específico de lípidos en base a peso seco y productividad de lípidos de *Nannochloropsis* sp. a diferentes niveles de salinidad. (■)  $27 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl (▲)  $54 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl. Símbolos llenos representan al contenido específico y los vacíos la productividad de lípidos

El efecto positivo de incrementos en la salinidad del medio de cultivo sobre el contenido de lípidos ha sido reportado para cultivos de *Dunaliella* (Afify Abd El-Moneim *et al.*, 2010; Takagi *et al.*, 2006) y *Nannochloropsis*, incluso se ha

demostrado que no sólo se incrementa el contenido de lípidos sino que la fracción correspondiente a los triacilgliceroles también se ve favorecida (Pal *et al.*, 2011; Takagi *et al.*, 2006).

La productividad de lípidos (Fig. 28) presentó su valor máximo a las 24 h de adicionado el NaCl, siendo de  $329 \pm 91$  y  $590 \pm 273$  mg lípidos L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> para los cultivos adicionados con 27 y 54 g L<sup>-1</sup> de NaCl respectivamente, estos valores son significativamente diferentes y la adición de 54 g L<sup>-1</sup> de sal generó un incremento de 80% respecto al cultivo control.

A partir de las 48 h los cultivos no presentaron diferencias significativas y mantuvieron sus valores de productividad relativamente constantes y alrededor de 150 mg lípidos L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Actualmente, el máximo valor de productividad de lípidos reportado para cultivos de microalgas es de 1.2 g lípidos L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> y fue alcanzado por Xiong *et al.*, (2008); sin embargo este valor fue alcanzado en un cultivo heterotrófico de *Chlorella protothecoides*. Se sabe que el empleo de esta estrategia de cultivo favorece concentraciones celulares de 20 g L<sup>-1</sup> e incluso superiores, lo que impacta de manera importante el valor de productividad. Sin embargo, si sólo se consideran los valores de productividad de lípidos obtenidos en autotrofía, el rango va de 2 hasta 134 mg lípidos L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (Illman *et al.*, 2000; Cheng – Wu *et al.*, 2002; Takagi *et al.*, 2006; Li *et al* 2008; Liu *et al.*, 2008; Solovchenko *et al.*, 2008; Xiong *et al.*, 2008).

*Nannochloropsis* sp., es considerado como un organismo oleaginoso, por lo que normalmente sus valores de productividad de lípidos se encuentran dentro de los más altos, el valor máximo reportado es de 134 mg lípidos L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> para cultivos en

condiciones de laboratorio (Rodolfi *et al.*, 2009; Huerlimann *et al.*, 2010). Es destacable el hecho de que todos los valores de productividad obtenidos en los cultivos con alta concentración celular son superiores a este valor. Esto se debe a que normalmente la concentración celular alcanzada por cultivos de *Nannochloropsis* no supera los 800 mg L<sup>-1</sup>.

## **7.6 Proceso en dos etapas para la producción de lípidos en un FBR de 20 L, la primera de crecimiento celular y una posterior de inducción por estrés salino**

El cultivo de microalgas empleando FBR's depende de una gran cantidad de factores de operación dentro de los cuales se encuentran el contenido de nutrientes (nitrógeno y fósforo principalmente), la intensidad lumínica, la cantidad de CO<sub>2</sub> adicionada etc. Este último factor resulta trascendental cuando se emplean reactores con un tiempo de residencia del gas dentro del reactor elevado, tal es el caso de los FBR tubulares horizontales (Ketheesan y Nirmalakhandan, 2012; Pires *et al.*, 2012).

Cuando el tiempo de residencia del gas es elevado, la cantidad de CO<sub>2</sub> que difunde de las burbujas al líquido es mayor, por lo que puede llegar a acumularse en el medio de cultivo y acidificarlo (González – López *et al.*, 2012). La acumulación de CO<sub>2</sub> en el medio de cultivo depende directamente de la velocidad específica de crecimiento del organismo (Ho *et al.*, 2011), ya que altas velocidades de crecimiento resultarían en elevados consumos de CO<sub>2</sub>.

### **7.6.1 Crecimiento**

Para evaluar la tolerancia del cultivo de *Nannochloropsis* sp. al CO<sub>2</sub> se estudiaron las siguientes condiciones: sin burbujeo, 150 g CO<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> y 700 g CO<sub>2</sub> d<sup>-1</sup>. Como se observa en la figura 29 el crecimiento se favoreció significativamente ( $p > 0.001$ ) al adicionar CO<sub>2</sub> en comparación con el cultivo control (sin adición de CO<sub>2</sub>), alcanzándose una

concentración final de  $332 \pm 23 \text{ mg L}^{-1}$  y  $169 \pm 5 \text{ mg L}^{-1}$  para los cultivos adicionados con  $150 \text{ g CO}_2 \text{ d}^{-1}$  y  $700 \text{ g CO}_2 \text{ d}^{-1}$  respectivamente.

El cultivo control no incrementó de manera importante la concentración de biomasa, esto debido a que el único suministro de carbono que recibió provino del  $\text{NAHCO}_3$  presente en el medio de cultivo ( $40 \text{ mg L}^{-1}$ ) y del  $\text{CO}_2$  difundido a través de la superficie de agua presente en el desgasificador.

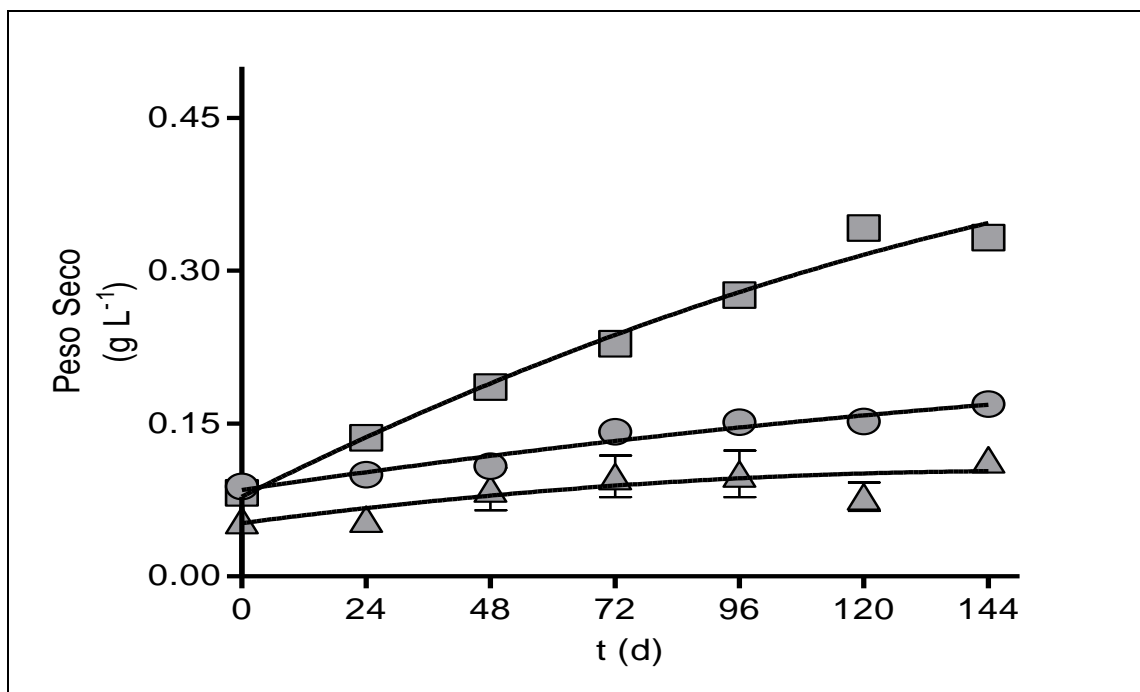


Figura 29. Cinética de crecimiento de *Nannochloropsis* sp. en base a Peso Seco en diferentes flujos de  $\text{CO}_2$ . (■)  $150 \text{ g CO}_2 \text{ d}^{-1}$  (●)  $700 \text{ g CO}_2 \text{ d}^{-1}$  (▲) Sin adición de  $\text{CO}_2$

El efecto de la adición de carbono se vio también reflejada en los valores de  $\mu$  alcanzados en cada uno de los tratamientos, los cuales se muestran en la tabla 5, donde se observa que los cultivos sin adición de  $\text{CO}_2$  y el adicionando con  $700 \text{ g CO}_2 \text{ d}^{-1}$  alcanzaron valores de  $0.14 \pm 0.013 \text{ d}^{-1}$  y  $0.12 \pm 0.007 \text{ d}^{-1}$  y no presentaron

diferencias significativas entre ellos ( $p>0.05$ ). En cambio, el cultivo adicionado con 150 g CO<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> presentó un valor de  $0.28 \pm 0.021$  d<sup>-1</sup>, lo que representa incrementos del 100% respecto al cultivo control.

Los valores de velocidad específica de crecimiento reportados para *Nannochloropsis* van de 0.2 a 0.75 d<sup>-1</sup> (Boussiba *et al.*, 1987; Zou *et al.*, 2000), por lo que se puede asegurar que tanto la adición de 700 g CO<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> como la falta de adición de carbono a los cultivos genera condiciones de estrés, el primero de ellos por una acidificación del medio de cultivo debido a la acumulación de CO<sub>2</sub> (González – López *et al.*, 2012; Toledo – Cervantes *et al.*, 2013) y el segundo debido a una deficiencia de carbono dado el bajo contenido de bicarbonato del medio y la poca superficie para el intercambio gaseoso.

El valor máximo de productividad volumétrica de biomasa (Tabla 5) fue el obtenido por el cultivo adicionado con 150 g CO<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> igual a  $41 \pm 3.42$  mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, mientras que el cultivo control y el adicionado con 700 g CO<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> no lograron superar los 14 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>.

Tabla 5. Valores de productividad volumétrica y velocidad específica máxima de crecimiento de *Nannochloropsis* sp. a diferentes flujos de CO<sub>2</sub>.

CO <sub>2</sub>	$\mu$ (d <sup>-1</sup> )	Productividad (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
Sin adición de CO <sub>2</sub>	$0.14 \pm 0.013$	$9.9 \pm 1.33$
150 g CO <sub>2</sub> d <sup>-1</sup>	$0.28 \pm 0.021$	$41.8 \pm 3.42$
700 g CO <sub>2</sub> d <sup>-1</sup>	$0.12 \pm 0.007$	$13.5 \pm 2.43$

El valor de productividad de biomasa del cultivo adicionado con 150 g CO<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> se encuentra en el rango de productividades volumétricas reportadas para el género *Nannochloropsis* cultivada en diferentes configuraciones de FBR, que va de 32 a 285 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (Chini – Zitelli *et al.*, 1999, 2003; Cheng – Wu *et al.*, 2001; Richmond y Cheng – Wu, 2001; Rodolfi *et al.*, 2003; Fábregas *et al.*, 2004); sin embargo se encuentra cercano al límite inferior.

La concentración de Chla (Fig. 30) presentó un comportamiento similar al peso celular seco (Fig. 29), sólo en el cultivo con 150 g CO<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> se presentó un incremento significativo ( $p > 0.001$ ) con un valor final de  $7.1 \pm 0.39$  mg L<sup>-1</sup>; mientras que para los cultivos control y el adicionado con 700 g CO<sub>2</sub> d<sup>-1</sup>, los valores permanecieron relativamente constantes y no presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre ellos durante todo el experimento. La acidificación del medio de cultivo debido a la adición de CO<sub>2</sub> puede generar la disminución de la velocidad de producción de Chla, y en casos extremos su degradación (Richmond y Cheng – Wu, 2001).

El contenido específico de clorofila *a* del cultivo adicionado con 150 g CO<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> se mantuvo constante a lo largo del experimento, con un valor de  $17.44 \pm 0.675$  mg Chla g<sup>-1</sup>. El género *Nannochloropsis* puede presentar grandes variaciones en el contenido específico de clorofila, dependiendo de las condiciones de cultivo a las que se exponga (iluminación, suplemento de CO<sub>2</sub>, concentración celular, suplemento de nutrientes, etc.), pudiendo alcanzar valores de entre 5 y 23 mg Chla g<sup>-1</sup> (Kromkamp *et al.*, 2009).



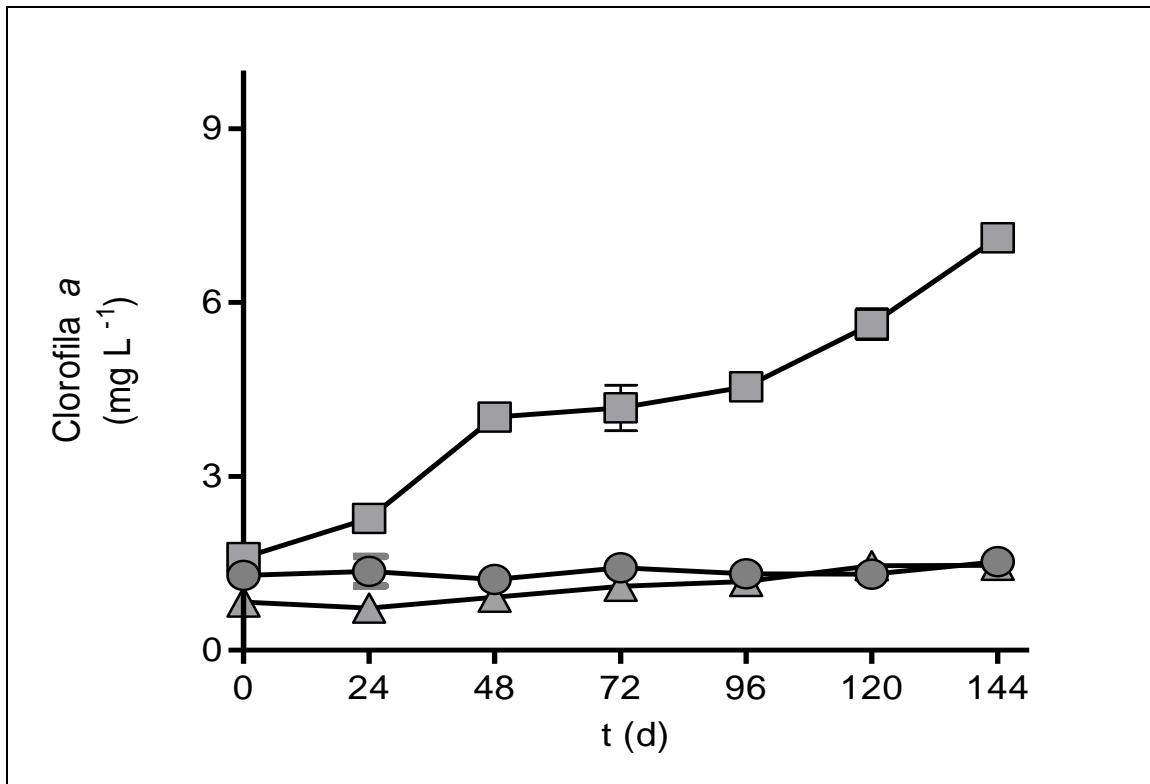


Figura 30. Cinética de crecimiento en base a Chla de *Nannochloropsis* sp. a diferentes flujos de CO<sub>2</sub>. (■) 150 g CO<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> (●) 700 g CO<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> (▲) Sin adición de CO<sub>2</sub>

### 7.6.2 Mediciones de emisión de fluorescencia por la Chla del PSII

El suplemento de carbono es un aspecto que debe ser considerado al momento de realizar el cultivo de microalgas. El efecto se ve reflejado en el desempeño del aparato fotosintético, el cual puede ser fácilmente determinado mediante mediciones de fluorescencia y posterior cálculo de los rendimientos cuánticos, tanto teórico máximo como operacional (El-Sabaawi y Harrison, 2006).

El comportamiento del  $\Phi P0$  se muestra en la figura 31 y se observa que los tres cultivos presentaron un comportamiento similar durante todo el experimento,

manteniendo relativamente constante sus valores y sin diferencias significativas respecto a su valor inicial ( $p > 0.05$ ).

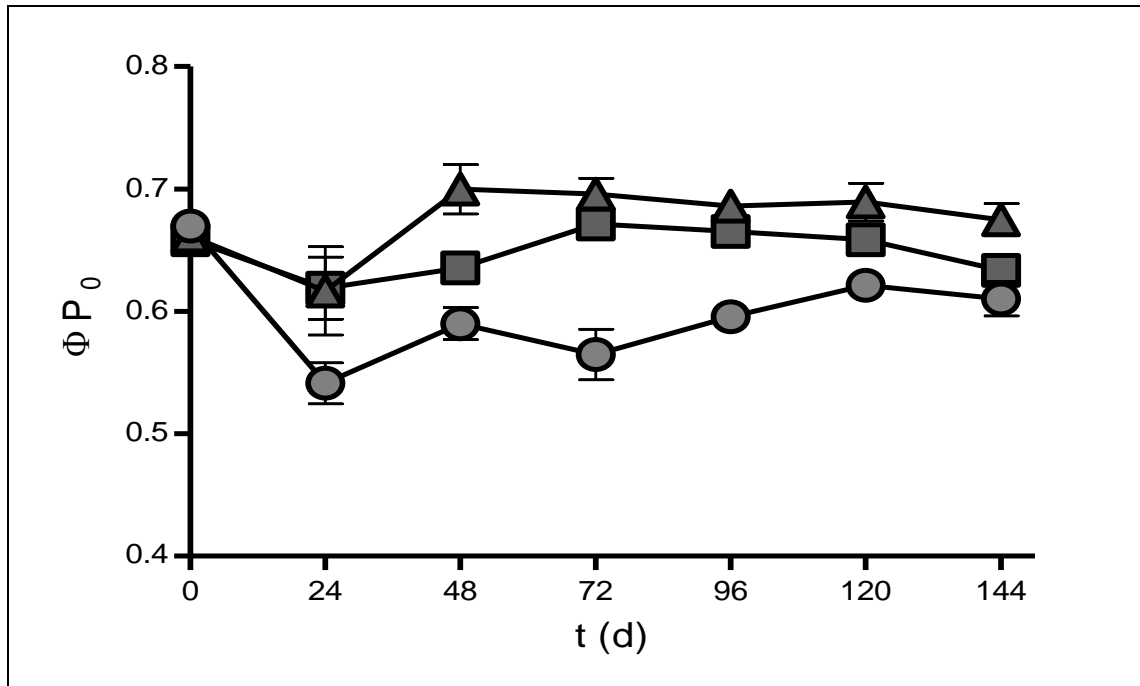


Figura 31. Rendimiento cuántico máximo teórico de *Nannochloropsis* sp. a diferentes flujos de CO<sub>2</sub>. (■) 150 g CO<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> (●) 700 g CO<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> (▲) Sin adición de CO<sub>2</sub>

Los valores máximos del rendimiento cuántico máximo teórico fueron alcanzados por los cultivos sin adición de CO<sub>2</sub> y los adicionados con 150 g CO<sub>2</sub> d<sup>-1</sup>, mismos que mantuvieron su  $\Phi P_0$  por encima de 0.60 durante las 144 h del experimento. Por su parte, el cultivo adicionado con 700 g CO<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> presentó una disminución significativa respecto a los otros cultivos y cabe destacar que su rendimiento teórico máximo no sobrepasó el valor de 0.61.

Lo anterior demuestra que el cultivo sin adición de CO<sub>2</sub> no acumuló biomasa de manera importante debido a una deficiencia de carbono y no a condiciones

adversas de cultivo. En base a los valores de rendimiento cuántico teórico máximo, es posible asegurar que estructuralmente la CTE no presentó alteraciones estructurales.

Por otro lado, el cultivo adicionado con  $700 \text{ g CO}_2 \text{ d}^{-1}$  presentó afectaciones fisiológicas leves, evidenciadas por la disminución de su valor de  $\Phi P0$ . Lo anterior pudo deberse a cambios en el pH del cultivo, generados por la acumulación de  $\text{CO}_2$ , que tiende a disminuir el valor de pH del medio de cultivo (Masojídek *et al.*, 2010).

Los tres cultivos presentaron valores de rendimiento cuántico operacional (Fig. 32) menores a los obtenidos para el rendimiento teórico máximo (Fig. 31). El cultivo control alcanzó un valor máximo de  $\Phi \text{PSII}$  de  $0.27 \pm 0.05$  a las 144 h del experimento, que no presentó diferencia significativa con el valor inicial ( $p > 0.05$ ).

Un comportamiento similar fue observado para el cultivo adicionado con  $700 \text{ g CO}_2 \text{ d}^{-1}$ , el cual mantuvo su  $\Phi \text{PSII}$  relativamente constante y por debajo de 0.25 durante todo el experimento. En cambio, el cultivo adicionado con  $150 \text{ g CO}_2 \text{ d}^{-1}$  presentó una tendencia creciente alcanzado un valor máximo de  $\Phi \text{PSII}$  al final del experimento igual a  $0.53 \pm 0.029$ .

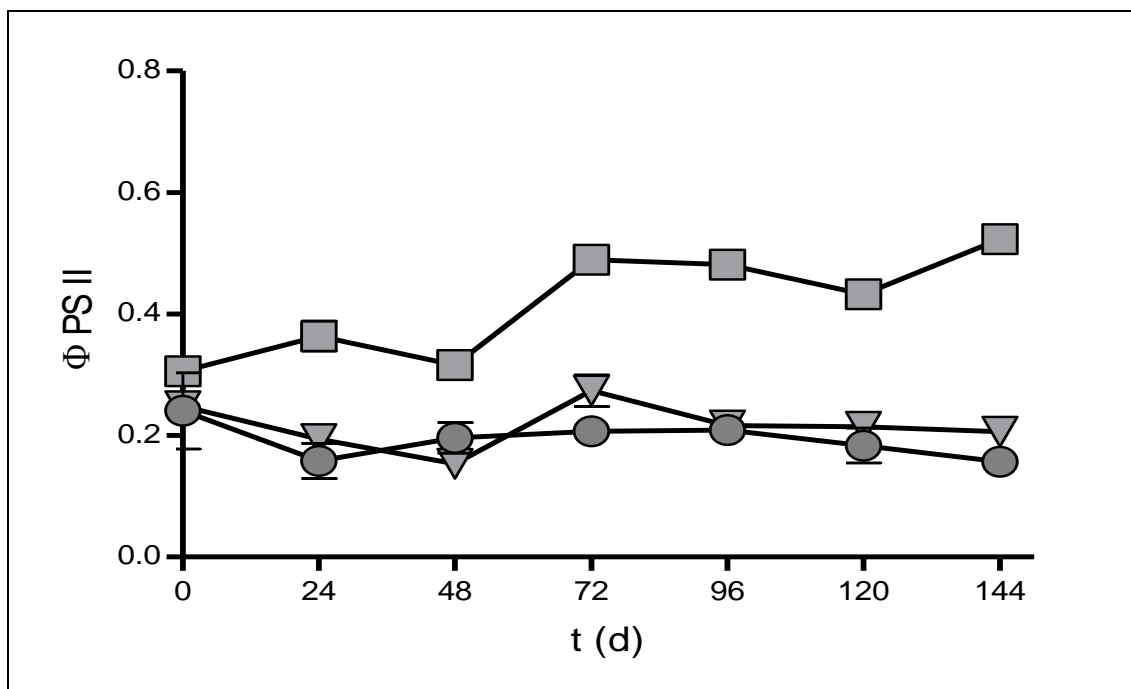


Figura 32. Rendimiento máximo operacional de *Nannochloropsis* sp. a diferentes flujos de CO<sub>2</sub>. (■) 150 g CO<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> (●) 700 g CO<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> (▲) Sin adición de CO<sub>2</sub>

El comportamiento del  $\Phi$ PSII (Fig. 32) fue similar al observado para el PS (Fig. 29) en todos los experimentos, ya que estos dos parámetros normalmente presentan una estrecha relación entre ellos (El-Sabaawi y Harrison, 2006; Červený *et al.*, 2009).

Las condiciones de cultivo empleadas en los experimentos no generaron ninguna clase de estrés, por lo que el contenido específico de lípidos totales no se vio modificado de forma importante y alcanzó un valor de  $29.03 \pm 0.63\%$  sin diferencias significativas entre los tratamientos ( $p > 0.05$ ).

### 7.6.3 Proceso de producción en dos etapas

En el proceso en dos etapas y después de aplicar un estrés salino, se esperaba que el crecimiento de *Nannochloropsis* se desacelerara ligeramente y que el contenido de lípidos se incrementara de forma considerable.

Sin embargo, como se observa en la figura 33, el comportamiento del PS no se detuvo y la biomasa aumentó hasta un valor de  $0.81 \pm 0.001 \text{ g L}^{-1}$  a los 10 días de cultivo. Aunque *Nannochloropsis* incrementó su concentración de biomasa, los valores de PS alcanzados son inferiores a los obtenidos en las Secciones 7.3 y 7.4. Esto se debe a que en dichas secciones se empleó una columna de burbujeo en donde el estrés de corte es insignificante, mientras que en el FBR tubular la agitación se realizó por bombeo lo que pudo generar estrés hidrodinámico.

El contenido específico de lípidos totales (Fig. 33) no se modificó durante los primeros 4 d y alcanzó un valor de  $27 \pm 5.42\%$ . Al momento de incrementar el contenido de NaCl en el medio de cultivo, con el fin de generar un estrés por salinidad, se incrementó el contenido específico de lípidos aproximadamente en un 80% respecto al cultivo control.

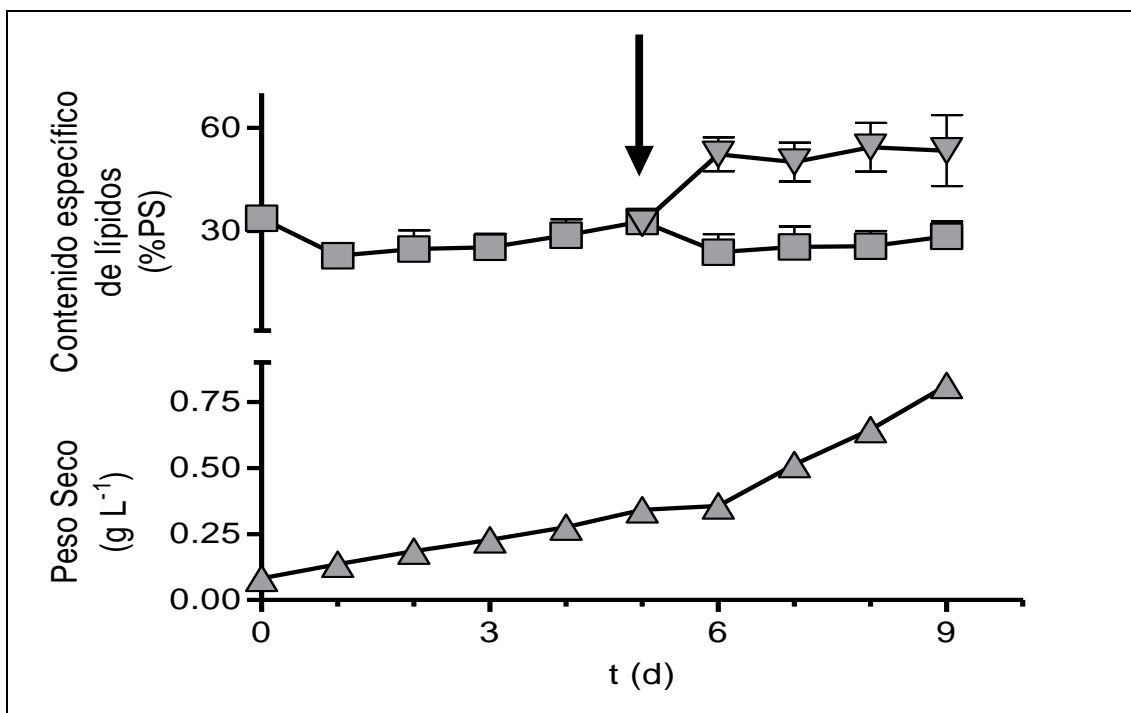


Figura 33. Proceso de producción en dos etapas de *Nannochloropsis* sp. en un FBR de tubular de 20L para la producción de lípidos. (▲) Concentración de biomasa (■) Contenido específico de lípidos en el cultivo sin inducción (▼) Contenido específico de lípidos en el cultivo con inducción. La flecha indica el momento de aplicación el estrés salino.

Después del “shock” osmótico generado por el NaCl, el contenido específico de lípidos se mantuvo constante, consiguió un valor de  $48 \pm 10.3\%$  sin que hubiera diferencias significativas con el cultivo control ( $p > 0.05$ ), el cual mantuvo el contenido de lípidos entre el 25 y el 30% durante todo el experimento sin diferencias significativas entre los valores ( $p > 0.05$ ).

Los valores de productividad de lípidos alcanzados en el proceso en dos etapas en el FBR tubular de 20 L se observan en la figura 34. Al día 5 la productividad del cultivo fue de  $22.4 \pm 2.39 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  y al final del experimento, el cultivo

control alcanzó un valor de  $25.7 \pm 3.92 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , sin diferencias significativas respecto al valor del día 5 ( $p > 0.05$ ). En cambio, el cultivo bajo estrés salino alcanzó un valor máximo de productividad de lípidos a los 9 días de  $48.3 \pm 9.33 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , lo que representa un incremento cercano al 90% respecto al cultivo control.

Los valores de productividad de lípidos alcanzado en el proceso en dos etapas, presentó valores similares a los reportados para diferentes especies del género *Nannochloropsis* bajo estrés por privación de nitrógeno. Sin embargo, se encuentran cercanos al límite inferior, ya que el rango reportado por diferentes autores va de 2 hasta  $134 \text{ mg lípidos L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  (Illman *et al.*, 2000; Cheng – Wu *et al.*, 2002; Takagi *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008; Solovchenko *et al.*, 2008; Xiong *et al.*, 2008).

Los valores de productividad alcanzados en el proceso en dos etapas resultaron inferiores a los obtenidos en la Sección 7.5 en cultivos de alta concentración celular, dicha disminución se debió a las bajas productividades de biomasa alcanzadas empleando el FBR tubular de 20 L ya que el contenido específico de lípidos resultó similar.

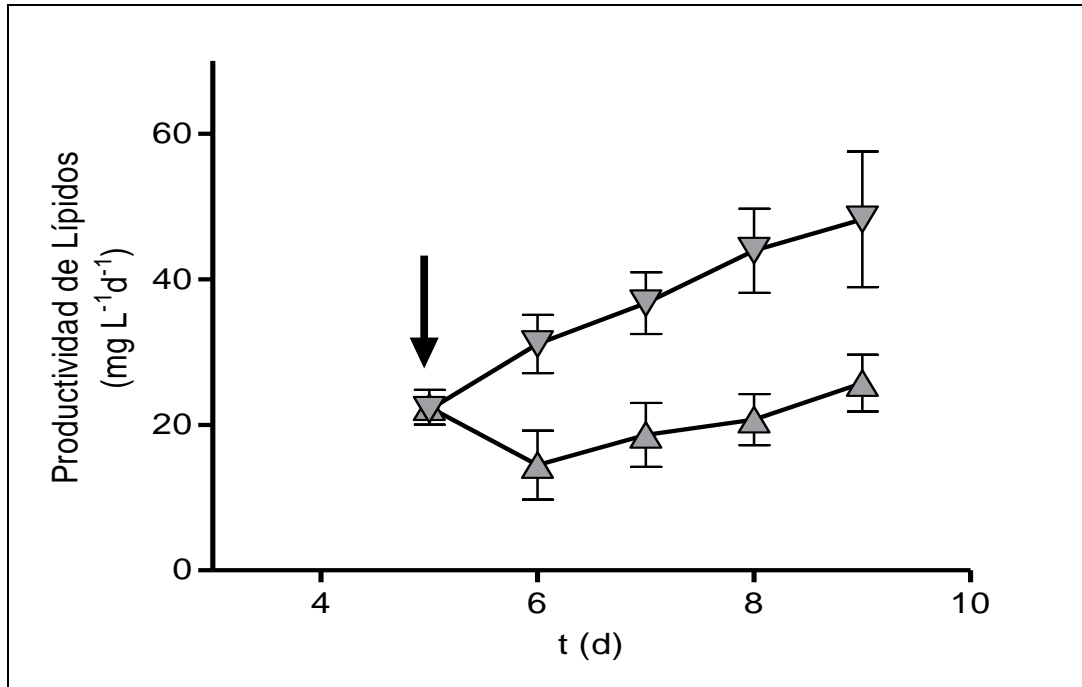


Figura 34. Productividad de un proceso de producción de lípidos de *Nannochloropsis* sp. en dos etapas en un FBR de 20L. La flecha indica el momento de aplicado el estrés salino. (▲) Cultivo sin inducción por salinidad (▼) Cultivo con inducción por salinidad.

Como se mencionó antes, la disminución en la producción de biomasa pudo deberse a un estrés hidrodinámico, ya que se ha reportado por diversos autores que el paso de las células a través de sistemas de bombeo disminuye considerablemente el desempeño de éstos. Este efecto negativo ha sido observado principalmente en la tasa de liberación de oxígeno, crecimiento (Torzillo *et al.*, 2010; Scarsella *et al.*, 2011), velocidad específica de crecimiento, transporte electrónico a través de la CTE (Scarsella *et al.*, 2011; Leupold *et al.*, 2012) y viabilidad (Michels *et al.*, 2010).



## 8. Conclusiones

1. El incremento en el contenido de cloruro de sodio en el medio de cultivo favoreció el incremento en el contenido de lípidos totales en *Nannochloropsis* sp., ya que aunque el metabolismo se abatió de forma significativa, la tasa de fotosíntesis siempre fue superior a la de respiración.
2. La adición de CO<sub>2</sub> favoreció la actividad fotosintética de *Nannochloropsis* sp., incrementándose el peso celular seco y el contenido específico de clorofila. Sin embargo, el contenido específico de lípidos totales no se vio favorecido
3. El empleo de un proceso en dos etapas, la primera de crecimiento, seguida de una inducción por salinidad, impactó positivamente la productividad de lípidos totales.
4. El estado fisiológico y la concentración de biomasa resultaron parámetros trascendentales al aplicar el “shock” osmótico.

## 9. Recomendaciones

1. Dada la capacidad de *Nannochloropsis* sp. de crecer en fuentes de nitrógeno inorgánicas y orgánicas, se sugiere emplear este organismo en un proceso de biorremediación de aguas costeras, donde sería posible remover el nitrógeno y el fósforo presentes y obtener algún subproducto de alto valor agregado como lípidos transesterificables, azúcares, etc.
2. Realizar la construcción de un FBR “thin layer”, que permite alcanzar altas concentraciones celulares en cultivos a la intemperie con el fin de observar el comportamiento del cultivo en el proceso en dos etapas a escala mayor, para obtener información con el fin de evaluar su factibilidad.
3. Investigar el efecto del incremento gradual en la salinidad del medio de cultivo. Esto debido a que en condiciones a la intemperie la evaporación del líquido y la reposición con agua de mar, generaría incrementos graduales en el contenido de sales del medio de cultivo en aproximadamente 10% diariamente, con lo que se podría evitar la segunda etapa de inducción.
4. Proponer un proceso de biorrefinería donde a través de la fijación de CO<sub>2</sub> pudieran generarse una serie de productos de alto valor agregado como podrían ser: pigmentos (violaxantina β-caroteno), lípidos transesterificables, ácidos grasos esenciales, proteína de origen

unicelular, etc., lo que incrementaría la factibilidad económica del bioproceso.

## 10. Bibliografía

1. Affenzeller M.J., Darehshouri A., Andosch A., Lutz C., Lutz-Meindl U. (2009) Salt stress-induced cell death in the unicellular green alga *Micrasterias denticulata*. *J. Exp. Bot.* **60** (3): 939 – 954.
2. Afify Abd El-Moneim M.R., Shalaby Emad A., Shanab Sanaa M.M., (2010) Enhancement of biodiesel production from different species of algae. *Grasas Aceites.* **61** (4): 416 – 422.
3. Allakhverdiev S. I., Murata N., (2008) Salt stress inhibits photosystems II and I in cyanobacteria. *Photosynth. Res.* **98** (1 – 3): 529 – 539
4. Alyabyev A.J., Loseva N.L., Gordon L.K., Andreyeva I.N., Rachimova G.G., Tribunskih V.I., Ponomareva A.A., Kemp R.B. (2007) The effect of changes in salinity on the energy yielding processes of *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella maritima* cells. *Thermochim. Acta.* **458** (1 – 2): 65 – 70.
5. Amaro H.M., Guedes C.A., Malcata X.F. (2011) Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Appl. Energ.* **88** (10): 3402 – 3410.
6. Amaro H.M., Macedo A.C., Malcata, X.F. (2012) Microalgae: An alternative as sustainable source of biofuels? *Energy.* **44** (1): 158 – 166.
7. Andersen R.A., Brett R.W., Potter D., Sexton J.P. (1998) Phylogeny of the *Eustigmatophyceae* based upon 18S rDNA, with emphasis on *Nannochloropsis*. *Protist.* **149** (1): 61 – 74.
8. APHA, Rice E.W., AWWA, Baird R.B., Eaton A.D., WEF, Clesceri L.S. (2012) Standard methods for the examination of water and wastewater. Amer Public Health Assn. EUA. 1496 pp.
9. Araujo O.Q.F., Gobbi C.N., Chaloub R.M., Coelho M.A.Z. (2009) Assessment of the impact of salinity and irradiance on the combined carbon dioxide sequestration and carotenoids production by *Dunaliella salina*: a mathematical model. *Biotechnol. Bioeng.* **102** (2): 425 – 435.
10. Araujo S.D., García, V.M.T. (2005) Growth and biochemical composition of the diatom *Chaetoceros* cf. *wighamii* brightwell under different temperature,

- salinity and carbon dioxide levels. I. Protein, carbohydrates and lipids. *Aquaculture*. **246** (1 – 4): 405 – 412.
11. Armstrong – Howard M.D., Cochlan W.P., Ladizinsky N., Kudela R.M.(2007) Nitrogenous preference of toxigenic *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) from field and laboratory experiments. *Harmful Algae* **6** (2): 206 – 217.
  12. Atabani A.E., Silitonga A.S., Badruddin I.A., Mahlia T.M.I., Masjuki H.H., Mekhilef S. (2012) A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **16** (4): 2070 – 2093
  13. Atadashi I.M., Aroua M.K., Aziz A.R.A., Sulaiman N.M.N. (2012) Production of biodiesel using high free fatty acid feedstocks. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **16** (5): 3275 – 3285.
  14. Balat M., Balat H. (2010) Progress in biodiesel processing. *Appl. Energ.* **87** (6): 1815 – 1835.
  15. Bankovic-Ilic I.B., Starnenkovic O.S., Veljkovic V.B. (2012) Biodiesel production from non-edible plant oils *Renew. Sust. Energ. Rev.* **16** (6): 3621 – 3647.
  16. Barsanti L. Coltelli P. Evangelista V. Frassanito A.M. Passarelli V. Vesentini N. Gualtieri P. (2008) The World of Algae. In Evangelista V. Barsanti L. Frassanito A.M. Passarelli V. Gualtieri P. (eds) *Algal toxins: nature, occurrence, effect and detection*. Springer, Países Bajos, pp 1 – 15.
  17. Barsanti L., Gualtieri P. (2006) *Algae. Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. Taylor and Francis Group, New York, USA. 283 pp.
  18. Beardall J., Ihnken S., Quigg A. (2009) Gross and net primary production: closing the gap between concepts and measurements. *Aquat. Microb. Ecol.* **56** (2 – 3): 113 – 122.
  19. Behrens P.W., Kyle D.J. (1996) Microalgae as a source of fatty acids. *J. Food Lipids*. **3** (4): 259 – 272.

20. Berman T., Chava S. (1999) Algal growth on organic compounds as nitrogen sources. *J. Plankt. Res.* **21** (8): 1423 – 1437.
21. Bermúdez J., Rosales N., Loreto C., Briceno B., Morales E. (2004) Exopolysaccharide, pigment and protein production by the marine microalga *Chroomonas* sp in semicontinuous cultures. *World J Microb Biot.* **20** (2): 179 – 183.
22. Biondi N., Bassi N., Chini Zittelli G., De Faveri D., Giovannini A., Rodolfi L., Allevi C., Macrì C., Tredici M. R. (2012) *Nannochloropsis* sp. F&M-M24: Oil production, effect of mixing on productivity and growth in an industrial wastewater. *Environ. Prog. Sustainable Energy.* doi: 10.1002/ep.11681
23. Bligh E.G., Dyer W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Phys.* **37** (8): 911 – 917.
24. Boussiba S., Vonshak A., Cohen Z., Avissar Y., Richmond A. (1987) Lipid and biomass production by the halotolerant microalga *Nannochloropsis salina*. *Biomass* **12** (1): 37-47.
25. Brennan L., Owende P. (2010) Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co – products. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **14** (2): 557 – 577.
26. Cañizares-Villanueva R.O., Molina G. Domínguez A.R. (1994) Composición química de dos microalgas marinas utilizadas como alimento en maricultura. *Cryptogamie Algol.* **15** (2): 121 – 133.
27. Caramelo J.J., Iusem N.D. (2006) When cells lose water: Lessons from biophysics and molecular biology. *Prog. Biophys. Mol. Bio.* 99: 1–6
28. Carvalho A.P., Meireles L.A., Malcata F.X. (2006) Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnol. Progr.* **22** (6): 1490 – 1506.
29. Carvalho A.P., Monteiro C.M., Malcata F.X. (2009) Simultaneous effect of irradiance and temperature on biochemical composition of the microalga *Pavlova lutheri*. *J. Appl. Phycol.* **21** (5): 543 – 552.

30. Červený J., Šetlík I., Trtílek M., Nedbal L. (2009) Photobioreactor for cultivation and real-time, in-situ measurement of O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> exchange rates, growth dynamics, and of chlorophyll fluorescence emission of photoautotrophic microorganisms. *Engineering in Life Sciences*. **9** (3): 247 – 253.
31. Chen C.Y., Yeh K.L., Aisyah R., Lee D.J., Chang J.S. (2011) Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technol.* **102** (1): 71 – 81.
32. Chen G.Q., Jiang Y., Chen F. (2008) Salt – induced alterations in lipid composition of diatom *Nitzschia laevis* (*Bacillariophyceae*) under heterotrophic culture condition. *J. Phycol.* **44** (5): 1309 – 1314.
33. Chen L.Z., Li D.H., Song L.R., Hu C.X., Wang G.H., Liu Y.D. (2006) Effects of salt stress on carbohydrate metabolism in desert soil alga *Microcoleus vaginatus*. *J. Integr. Plant Biol.* **48** (8): 914–919.
34. Chen Y., Wang J.F., Liu T.Z., Gao L.L. (2012) Effects of initial population density (IPD) on growth and lipid composition of *Nannochloropsis* sp. *J. Appl. Phycol.* **24** (6): 1623 – 1627.
35. Cheng – Wu, Z., Zmora, O., Kopel, R., Richmond, A. (2001) An industrial-size flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis* sp. (*Eustigmatophyceae*). *Aquaculture*. **195** (1 – 2): 35 – 49.
36. Cheng-Wu Z., Cohen Z., Khozin – Goldberg I., Richmond A. (2002) Characterization of growth and arachidonic acid production of *Parietochloris incisa* comb. nov (*Trebouxiophyceae*, Chlorophyta). *J. Appl. Phycol.* **14** (6): 453 – 460.
37. Chini Zitelli, G., Rodolfi, L., Tredici, M.R. (2003) Mass cultivation of *Nannochloropsis* sp. in annular reactors *J. Appl. Phycol.* **15** (2 – 3): 107 – 114.
38. Chini-Zittelli G., Lavista F., Batianini A., Rodolfi L., Vincenzini M., Tredici M. (1999). Production of eicosapentanoic acid by *Nannochloropsis* sp., cultures in outdoor tubular photobioreactors. *J Biotechnol.* **70** (1 – 3): 299-312.

39. Chinnasamy S., Ramakrishnan B., Bhatnagar A., Das K.C. (2009) Biomass production potential of a wastewater alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under elevated levels of CO<sub>2</sub> and temperature. *Int. J. Mol. Sci.* **10** (2): 518 – 532.
40. Chinnasamy V., Jagendorf A., Zhu J.K. (2005) Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Sci.* **45** (2), 437-448.
41. Chisti Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* **25** (3): 294 – 306.
42. Chisti Y., Yan J. (2011) Energy from algae: Current status and future trends *Algal biofuels - A status report.* *Appl Energ.* **88** (10): 3277 – 3279.
43. Chiu S.Y., Kao C.Y., Tsai M.T., Ong S.C., Chen C.H., Lin C.S. (2009) Lipid accumulation and CO<sub>2</sub> utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO<sub>2</sub> aeration. *Bioresource Technol.* **100** (2): 833 – 838.
44. Cho S.H., Ji S.C., Hur S.B., Bae J., Park I.S., Song Y.C. (2007) Optimum temperature and salinity conditions for growth of green algae *Chlorella ellipsoidea* and *Nannochloris oculata*. *Fisheries Sci.* **73** (5): 1050 – 1056.
45. Cochlan W.P., Herndon J., Kudelab R.M. (2008) Inorganic and organic nitrogen uptake by the toxigenic diatom *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) *Harmful Algae.* **8** (1):111 – 118.
46. Concas A., Pisu M., Cao G. (2010) Novel simulation model of the solar collector of BIOCOIL photobioreactors for CO<sub>2</sub> sequestration with microalgae. *Chem. Eng. J.* **157** (2 – 3): 297 – 303.
47. Converti A., Lodi A., Del Borghi A., Solisio C. (2006) Cultivation of *Spirulina platensis* in a combined airlift – tubular reactor system. *Biochem. Eng. J.* **32** (1): 13 – 18.
48. Cosgrove J., Borowitzka M.A. (2011) Chlorophyll fluorescence terminology: An introduction. In Suggett D.J., Prasil O., Borowitzka M.A. (eds) *Chlorophyll a fluorescence in aquatic sciences; methods and applications.* Springer, Netherlands, pp 1–17.
49. Crowe B., Attalah S., Agrawal S., Waller P., Ryan R., Van Wagenen J., Chavis A., Kyndt J., Kacira M. Ogden K.L. Huesemann M. (2012) A



comparison of *Nannochloropsis salina* growth performance in two outdoor pond designs: conventional raceways versus the ARID pond with superior temperature management. International Journal of Chemical Engineering. 920608.

50. D'Ippolito S.A., Yori J.C., Iturria M.E., Vera C.R. (2007) Analysis of a two – step, noncatalytic, supercritical biodiesel production process with heat recovery. Energ. Fuel. **21** (1): 339 – 346.
51. Damiani M.C., Popovich C.A., Constenla D., Leonardi P.I. (2010) Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as a biodiesel feedstock. Bioresource Technol. **101** (11): 3801 – 3807.
52. De Morais M.G., Costa J.A.V. (2007) Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide. Energ. Convers. Manage. **48** (7): 2169 – 2173.
53. De Paula Gomes M.S., Muylaert de Araujo M.S. (2009) Bio – fuels production and the environmental indicators. Renew. Sust. Energ. Rev. **13** (8): 2201 – 2204.
54. Del Campo J.A., García – González M., Guerrero M.G. (2007) Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. Appl. Microbiol. Biot. **74** (6): 1163 – 1174.
55. Del Campo J.A., Rodríguez H., Moreno J., Vargas M., Rivas J., Guerrero M.G. (2001) Lutein production by *Muriellopsis* sp. in an outdoor tubular photobioreactor. J. Biotechnol. **85** (3): 289 – 295.
56. Demirbas A. (2007) Importance of biodiesel as transportation fuel. Energ. Policy. **35** (9): 4661 – 4670.
57. Demirbas A. (2009) Progress and recent trends in biodiesel fuels. Energ. Convers. Manage. **50** (1):14 – 34.
58. Demirbas A. (2011) Biodiesel from oilgae, biofixation of carbon dioxide by microalgae: A solution to pollution problems. Appl. Energ. **88** (10): 3541 – 3547-

59. Devgoswami C.R., Kalita M.C., Talukdar J., Bora R., 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. Bot.* **10** (61): 13128 – 13138.
60. Doucha J., Livansky K. (2006) Productivity, CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> exchange and hydraulics in outdoor open high density microalgal (*Chlorella* sp.) photobioreactors operated in a middle and southern european climate. *J. Appl. Phycol.* **18** (6): 811 – 826.
61. Doucha J., Lívanský K. (2009) Outdoor open thin-layer microalgal photobioreactor: potential productivity. *J. Appl. Phycol.* **21** (1): 111 – 117.
62. Eberly J., Ely R. (2012) Photosynthetic accumulation of carbon storage compounds under CO<sub>2</sub> enrichment by the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongates* J. *Ind. Microbiol. Biot.* **39** (6): 843 – 850.
63. El – Sabaawi R., Harrison P.J. (2006) Interactive effects of irradiance and temperature on the photosynthetic physiology of the pennate diatom *Pseudo-Nitzschia granii* (Bacillariophyceae) from the Northeast Subarctic Pacific. *J. Phycol.* **42** (4): 778 – 785.
64. Fábregas J., Abalde J., Herrero C., Cabezas B., Veiga M. (1984) Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture* **42** (3–4): 207 – 215.
65. Fábregas J., Maseda A., Domínguez A., Otero A. (2004) The cell composition of *Nannochloropsis* sp. changes under different irradiances in semicontinuous culture. *World J Microb Biot.* **20** (1): 31 – 35.
66. Faraloni C., Torzillo G. (2010) Phenotypic characterization and hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii* Q(B)-Binding D1-protein mutants under sulfur starvation: changes in Chl fluorescence and pigment composition1. *J. Phycol.* **46** (4): 788 – 799.
67. Fawley K.P., Fawley M.W. (2007) Observations on the diversity and ecology of freshwater *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae), with descriptions of new taxa. *Protist.* **158** (3): 325 – 336.

68. Fawley K.P., Fawley M.W., Elias M., Nemjova K., Probst N.K. (2011) Phylogeny of the Eustigmatophyceae. *J. Phycol.* **47** (SI2): S31 – S31.
69. Ferreira M., Seixas P., Coutinho P., Fabregas J., Otero A. (2011) Effect of the nutritional status of semi-continuous microalgal cultures on the productivity and biochemical composition of *Brachionus plicatilis*. *Mar. Biotechnol.* **13** (6): 1074 – 1085.
70. Ferroni L., Baldisserotto C., Pantaleoni L., Billi P., Fasulo M.P., Pancaldi S. (2007) High salinity alters chloroplast morpho – physiology in a freshwater *Kirchneriella* species (*Selenastraceae*) from Ethiopian Lake Awasa. *Am. J. Bot.* **94** (12): 1972 – 1983.
71. Fietz S., Bleiss W., Hepperle D., Koppitz H., Krienitz L., Nicklisch A. (2005) First record of *Nannochloropsis limnetica* (*Eustigmatophyceae*) in the autotrophic picoplankton from Lake Baikal. *J. Phycol.* **41** (4): 780 – 790.
72. Fu W.Q., Gudmundsson O., Feist A.M., Herjolfsson G., Brynjolfsson S., Palsson, B.O. (2012) Maximizing biomass productivity and cell density of *Chlorella vulgaris* by using light-emitting diode-based photobioreactor. *J. Biotechnol.* **61** (3): 242 – 249.
73. Fukuda H., Kondo A., Tamalampudi S. (2009) Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole – cell biocatalysts. *Biochem. Eng. J.* **44** (1): 2 – 12.
74. García – González M., Moreno J., Manzano J.C., Florencio F.J., Guerrero M.G. (2005) Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9 – cis – beta – carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. *J. Biotechnol.* **115** (1): 81 – 90.
75. Gardner R.D., Cooksey K.E., Mus F., Macur R., Moll K., Eustance E., Carlson R.P., Gerlach R., Fields M.W., Peyton B.M. (2012) Use of sodium bicarbonate to stimulate triacylglycerol accumulation in the chlorophyte *Scenedesmus* sp and the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *J Appl. Phycol.* **24** (5): 1311 – 1320.

76. Gavrilescu M., Chisti Y. (2005) Biotechnology – a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnol. Adv.* **23** (7 – 8): 471 – 499.
77. Ghirardi M.L., Zhang J.P., Lee J.W., Flynn T., Seibert M., Greenbaum E., Melis A. (2000) Microalgae: a green source of renewable H<sub>2</sub>. *Trends Biotechnol.* **18** (12): 506 – 51.
78. Gitelson A.A., Grits Y.A., Etzion D., Ning Z., Richmond A. (2000) Optical properties of *Nannochloropsis* sp. and their application to remote estimation of cell mass. *Biotechnol. Bioeng.* **69** (5): 516 – 525.
79. Goksan T., Durmaz Y., Gokpinar S. (2003) Effects of light path lengths and initial culture density on the cultivation of *Chaetoceros muelleri* (Lemmermann, 1898). *Aquaculture.* **217** (1 – 4): 431 – 436.
80. González Moreno S., Perales Vela H., Salcedo Alvarez 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. *Revista de Educación Bioquímica.* **27** (4): 119 – 129.
81. González S., Peñalosa C. (2000) *Biomoléculas, métodos de análisis*. 1a. edición. Universidad Nacional Autónoma de México, ENEPI. México. 196p.
82. González – López C.V., Ación Fernández F.G., Fernández–Sevilla J.M., Sánchez Fernández J.F., Molina Grima E. (2012) Development of a process for efficient use of CO<sub>2</sub> from flue gases in the production of photosynthetic microorganisms. *Biotechnol. Bioeng.* **109** (7): 1637–1650.
83. Gouveia L., Marques A.E., da Silva T., Reis A. (2009) *Neochloris oleabundans* UTEX #1185: a suitable renewable lipid source for biofuel production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **36** (6): 821 – 826.
84. Greenwell H.C., Laurens L.M.L., Shields R.J., Lovitt R.W., Flynn K.J. (2010) Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *J. R. Soc. Interface.* **7** (46): 703 – 726.
85. Griffiths M.J., Harrison S.T.L. (2009) Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J. Appl. Phycol.* **21** (5): 493 – 507.

86. Griffiths M.J., van Hille R.P., Harrison S.T.L. (2012) Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. *J. Appl. Phycol.* **24** (5): 989 – 1001.
87. Grobbelaar J.U. (2004) Algal biotechnology: real opportunities for Africa. *S. Afr. J. Bot.* **70** (1): 140 – 144.
88. Gu, N., Lin, Q., Li, G., Tan, Y., Huang, L. and Lin, J. (2012) Effect of salinity on growth, biochemical composition, and lipid productivity of *Nannochloropsis oculata* CS 179. *Eng. Life Sci.* doi: 10.1002/elsc.201100204
89. Guedes A.C., Amaro H.M., Barbosa C.R., Pereira R.D., Malcata F.X. (2011) Fatty acid composition of several wild microalgae and cyanobacteria, with a focus on eicosapentaenoic, docosahexaenoic and alpha-linolenic acids for eventual dietary uses. *Food Res. Int.* **44** (9): 2721 – 2729
90. Guil – Guerrero J.L., Navarro – Juarez R., Lopez – Martinez J.C., Campra – Madrid P., Reboloso – Fuentes M.M. (2004) Functional properties of the biomass of three microalgal species. *J. Food Eng.* **65** (4): 511 – 517.
91. Harrison P.J., Waters R.E., Taylor F.J.R. (1980) A broad-spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. *J. Phycol.* **16** (1): 28 – 35.
92. Harwood J.L., Guschina I.A. (2009) The versatility of algae and their lipid metabolism. *Biochimie.* **91** (6): 679 – 684.
93. Hemaiswarya S., Raja R., Kumar R.R., Ganesan V., Anbazhagan C. (2011) Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture. *World J. Microb. Biot.* **27** (8): 1737 – 1746.
94. Henley W.J., Major K.M., Hironaka J.L. (2002) Response to salinity and heat stress in two halotolerant chlorophyte algae. *J. Phycol.* **38** (4): 757 – 766.
95. Hibberd D.J. (1981) Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes Eustigmatophyceae and Tribophyceae (Synonym Xanthophyceae). *Bot. J. Linn. Soc.* **82** (2): 93-119.

96. Hibberd D.J. (1990) Phylum Eustigmatophyta. In Margulis L., Corliss J.O., Melkonian M. Chapman D.J. [eds.] Handbook of Protoctista. Jones and Bartlett Publishers, Massachusetts, USA, pp. 326–33.
97. Ho S.H., Chen C.Y., Lee D.J., Chang J.S. (2011) Perspectives on microalgal CO<sub>2</sub>–emission mitigation systems —A review. *Biotechnol. Adv.* **29** (2): 189 – 198.
98. Hoekman S.K., Broch A., Robbins C., Cenicerros E., Natarajan M. (2012) Review of biodiesel composition, properties, and specifications. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **16** (1): 143 – 169.
99. Horton P., Ruban A. (2005) Molecular design of the photosystem II light-harvesting antenna: photosynthesis and photoprotection. *J. Exp. Bot.* **56** (411): 365 – 373.
100. Hoshida H., Ohira T., Minematsu A., Akada R., Nishizawa Y. (2005) Accumulation of eicosapentaenoic acid in *Nannochloropsis* sp. in response to elevated CO<sub>2</sub> concentrations. *J. Appl. Phycol.* **17** (1): 29 – 34.
101. Hu H., Gao K. (2006) Response of growth and fatty acid compositions of *Nannochloropsis* sp. to environmental factors under elevated CO<sub>2</sub> concentration. *Biotechnol. Lett.* **28** (3): 987 – 992.
102. Hu H.H., Zhou Q.B. (2010) Regulation of inorganic carbon acquisition by nitrogen and phosphorus levels in the *Nannochloropsis* sp. *World J. Microb. Biot.* **26** (5): 957 – 961.
103. Hu Q., Sommerfeld M., Jarvis E., Ghirardi M., Posewitz M., Seibert M., Darzins A. (2008) Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* **54** (4): 621 – 639.
104. Huerlimann R., de Nys R., Heimann K. (2010) Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production. *Biotechnol. Bioeng.* **107** (2): 245 – 257.
105. Huertas I.E., Colman B., Espie G.S. (2002) Inorganic carbon acquisition and its energization in *Eustigmatophyte* algae. *Funct. Plant. Biol.* **29** (2 – 3): 271 – 277.

106. Huertas I.E., Espie G.S., Colman B., Lubián L.M. (2000) Light – dependent bicarbonate uptake and CO<sub>2</sub> efflux in the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. *Planta*. **211** (1): 43 – 49.
107. Hussain, T. M., Chandrasekhar, T., Hazara, M., Sultan, Z., Saleh, B. K., Gopal, G. R. (2008) Recent advances in salt stress biology—a review. *Biotechnol Mol Biol Rev*. **3** (1): 8 – 13.
108. Illman A.M., Scragg A.H., Shales S.W. (2000) Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enz. Microb. Technol.* **27** (8): 631 – 635.
109. Imamoglu E., Dalay MM.C., Sukan F.V. (2009) Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *New Biotechnol.* **26** (3 – 4): 199 – 204.
110. Jacome – Pilco C.R., Cristiani – Urbina E., Flores – Cotera L.B., Velasco – García R., Ponce – Noyola T., Canizares – Villanueva R.O. (2009) Continuous Cr(VI) removal by *Scenedesmus incrassatulus* in an airlift photobioreactor. *Bioresource Technol.* **100** (8): 2388 – 2391.
111. Jiang J.G., Zhu Y.H. (2010) Preliminary and comparative studies on the cultivations of *Dunaliella salina* between outdoors and in the photobioreactor. *J. Food Process Eng.* **33** (1): 104 – 114.
112. Johnson J. (2007) Algae to biofuels. *Chem. Eng. News*. **85** (46): 15 – 15
113. Jorquera O., Kiperstok A., Sales Emerson A., Embirucu M., Ghirardi M.L. (2010) Comparative energy life – cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. *Bioresour. Technol.* **101** (4): 1406 – 1413.
114. Juan J.C., Kartika D.A., Wu T.Y., Hin T.Y.Y. (2011) Biodiesel production from jatropha oil by catalytic and non-catalytic approaches: An overview. *Bioresource Technol.* **102** (2): 452 – 460.
115. Kacka A., Donmez G. (2008) Isolation of *Dunaliella* spp. from a hypersaline lake and their ability to accumulate glycerol. *Bioresource Technol.* **99** (17): 8348 – 8352.

116. Kannan G.R., Anand R. (2012) Biodiesel as an alternative fuel for direct injection diesel engines: A review. *J. Renew. Sustain. Ener.* **4** (1): 012703
117. Karmakar P., Pujol C.A., Damonte E.B. Gosh T. Ray B. (2010) Polysaccharides from *Padina tetrastratica*: Structural features, chemical modification and antiviral activity. *Carbohydr Polym.* **80** (2): 513 – 520.
118. Ketheesan B., Nirmalakhandan N. (2012) Feasibility of microalgal cultivation in a pilot-scale airlift-driven raceway reactor. *Bioresource Technol.* **108**: 196 – 202.
119. Khan S.A., Rashmi, Hussain M.Z., Prasad S., Banerjee U.C. (2009) Prospects of biodiesel production from microalgae in India. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **13** (9): 2361 – 2372.
120. Khozin – Goldberg I., Bigogno C., Shrestha P, Cohen Z. (2002) Nitrogen starvation induces the accumulation of arachidonic acid in the freshwater alga *Parietochloris incisa* (Trebouxiophyceae). *J. Phycol.* **38** (5): 991-994.
121. Khozin – Goldberg I., Boussiba S. (2011) Concerns over the reporting of inconsistent data on fatty acid composition for microalgae of the genus *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae). *J. Appl. Phycol.* **23** (5): 933 – 934.
122. Khozin – Goldberg I., Iskandarov U., Cohen Z. (2011) LC-PUFA from photosynthetic microalgae: occurrence, biosynthesis, and prospects in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biot.* **91** (4): 905 – 915
123. Kim S.M., Jung Y.J., Kwon O.N., Cha K.H., Um B.H., Chung D., Pan C.H. (2012) A potential commercial source of fucoxanthin extracted from the microalga *Phaeodactylum tricornerutum*. **166** (7): 1843 – 1855.
124. Kiron V., Phromkunthong W., Huntley M., Archibald I., De Scheemaker G. (2012) Marine microalgae from biorefinery as a potential feed protein source for Atlantic salmon, common carp and whiteleg shrimp. *Aquacult. Nutr.* **18** (5): 521 – 531.
125. Knothe G. (2012) Fuel properties of highly polyunsaturated fatty acid methyl esters. Prediction of fuel properties of algal biodiesel. *Energ. Fuel.* **26** (8): 5265 – 5273.



126. Knothe G., Sharp C.A., Ryan T.W. (2006) Exhaust emissions of biodiesel, petrodiesel, neat methyl esters, and alkanes in a new technology engine. *Energ. Fuel.* **20** (1): 403 – 408.
127. Kong W.B., Song H., Cao Y.T., Yang H., Hua S.F., Xia C.G. (2011) The characteristics of biomass production, lipid accumulation and chlorophyll biosynthesis of *Chlorella vulgaris* under mixotrophic cultivation. *Afr. J. Biotechnol.* **10** (55): 11620 – 11630.
128. Kromkamp J.C., Beardall J., Sukenik A., Kopecky J., Masojidek J., Bergeijk V.S., Gabai S., Shaham E., Yamson A. (2009) Short-term variations in photosynthetic parameters of *Nannochloropsis* cultures grown in two types of outdoor mass cultivation systems. *Aquat. Microb. Ecol.* **56**: 309 – 322.
129. Kumar A., Yuan X., Sahu A.K., Ergas S.J., Van Langenhove H., Dewulf J. (2010) A hollow fiber membrane photo – bioreactor for CO<sub>2</sub> sequestration from combustion gas coupled with wastewater treatment: A process engineering approach. *J Chem. Technol. Biot.* **85** (3): 387 – 394.
130. Lavaud J., Kroth P.G. (2006) In diatoms, the transthylakoid proton gradient regulates the photoprotective non-photochemical fluorescence quenching beyond its control on the xanthophyll cycle. *Plant Cell Physiol.* **47** (7): 1010 – 1016.
131. Leupold M., Hindersin S., Gust G., Kerner M., Hanelt D. (2012) Influence of mixing and shear stress on *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*, and *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Appl. Phycol.* **25**:485 – 495.
132. Li Y., Horsman M., Wang B., Wu N., Lan C.Q. (2008) Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81** (4): 629 – 636.
133. Li Y.C., Chen Y.F., Chen P., Min M., Zhou W.G., Martinez B., Zhu J., Ruan R. (2011) Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. *Bioresource Technol.* **102** (8): 5138 – 5144.

134. Lichtenthaler H.K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Method. Enzymol.* **148**: 350 – 382
135. Lin Q., Lin J. (2011) Effects of nitrogen source and concentration on biomass and oil production of a *Scenedesmus rubescens* like microalga. *Bioresource Technol.* **102** (2): 1615 – 1621.
136. Liu W., Au D.W.T., Anderson D.M., Lam P.K.S., Wu R.S.S. (2007) Effects of nutrients, salinity, pH and light: dark cycle on the production of reactive oxygen species in the alga *Chattonella marina*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **346** (1 – 2): 76 – 86.
137. Liu X.J., Jiang Y., Chen F. (2005) Fatty acid profile of the edible filamentous cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* at different temperatures and developmental stages in liquid suspension culture. *Process. Biochem.* **40** (1): 371 – 377.
138. Liu Z.Y., Wang G.C., Zhou B.C. (2008) Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.* **99** (11): 4717 – 4722.
139. Lora E.S., Andrade R.V. (2009) Biomass as energy source in Brazil. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **13** (4): 777 – 788.
140. Loubiere K., Olivo E., Bougaran G., Pruvost J., Robert R., Legrand J. (2009) A new photobioreactor for continuous microalgal production in hatcheries based on external-loop air lift and swirling flow. *Biotechnol. Bioeng.* **102** (1): 132 – 147.
141. Lourenco S.O., Barbarino E., Mancini – Filho J., Schinke K.P., Aidar E. (2002) Effects of different nitrogen sources on the growth and biochemical profile of 10 marine microalgae in batch culture: an evaluation for aquaculture. *Phycologia.* **41** (2): 158 – 168.
142. Lu C., Vonshak A. (1999) Characterization of PSII photochemistry in salt-adapted cells of cyanobacterium *Spirulina platensis*. *New Phytol.* **141** (2): 231 – 239.
143. Lubián L.M. (1982) *Nannochloropsis* sp. nov., una nueva Eustigmatophyceae marina. *Lazaroa.* **4**: 287 – 293.

144. Lubzens E., Gibson O., Zmora O., Sukenik A. (1995) Potential advantages of frozen algae (*Nannochloropsis* sp.) for rotifer (*Brachionus – plicatilis*) culture. *Aquaculture*. **133** (3 – 4): 295 – 309.
145. Lynn S.G., Kilham S.S., Kreeger D.A., Interlandi S.J. (2000) Effect of nutrient availability on the biochemical and elemental stoichiometry in the freshwater diatom *Stephanodiscus minutulus* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* **36** (3): 510 – 522.
146. Ma S., Gong Q., Bohnert H.J. (2006). Dissecting salt stress pathways *J. Exp. Bot.* **57** (5): 1097 – 1107.
147. Mahajan S., Tuteja N., (2005) Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Arch. Biochem. Biophys.* **444** (2): 139 – 158.
148. Markou G, Georgakakis D (2011). Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Appl. Energ.* **88**(10): 3389 – 3401.
149. Marsh J.B., Weinstein D.B. (1966). Simple charring method for determination of lipids. *J. Lipid. Res.* **7** (4): 574 – 576.
150. Masojidek J., Sergejevova M., Rottnerova K., Jirka V., Korecko J., Kopecky J., Zat'kova I., Torzillo G., Stys D. (2009) A two – stage solar photobioreactor for cultivation of microalgae based on solar concentrators. *J. Appl. Phycol.* **21** (1): 55 – 63.
151. Masojidek J., Vonshak A., Torzillo G. (2010) Chlorophyll fluorescence applications in microalgal mass cultures. In Suggett D.J., Prasil O., Borowitzka M.A. *Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications*. Springer. Países Bajos, pp. 277 – 292.
152. Maxwell K., Johnson G. N. (2000) Chlorophyll fluorescence: a practical guide. *J. Exp. Bot.* **51** (345): 659 – 668.
153. Mehta P., Jajoo A., Mathur S., Bharti S. (2010) Chlorophyll a fluorescence study revealing effects of high salt stress on Photosystem II in wheat leaves. *Plant Physiol. Bioch.* **48** (1): 16 – 20.

154. Melis A. (2012) Photosynthesis-to-fuels: from sunlight to hydrogen, isoprene, and botryococcene production *Energ. Environ. Sci.* **5** (2): 5531 – 5539
155. Michels M.H., van der Goot A.J., Norsker N.H., Wijffels R.H. (2010). Effects of shear stress on the microalgae *Chaetoceros muelleri*. *Bioproc. Biosyst. Eng.* **33** (8): 921 – 927.
156. Minami E., Saka S. (2006) Kinetics of hydrolysis and methyl esterification for biodiesel production in two-step supercritical methanol process. *Fuel*. **85** (17 – 18): 2479 – 2483.
157. Mishra A., Kavita K., Jha B. (2011) Characterization of extracellular polymeric substances produced by micro-algae *Dunaliella salina* *Carbohydr. Polym.* **83** (2): 852 – 857.
158. Mixson S.M.; Burkholder J.M. (2012) Enhancing lipid production in the marine microalga *Dunaliella* through environmental stressors. *J. Phycol.* **48** (SI 1): S43 – S44.
159. Miyachi S., Iwasaki I., Shiraiwa Y. (2003) Historical perspective on microalgal and cyanobacterial acclimation to low – and extremely high – CO<sub>2</sub> conditions. *Photosynth. Res.* **77** (2 – 3): 139 – 153.
160. Moheimani N.R., Borowitzka M.A. (2007) Limits to productivity of the alga *Pleurochrysis carterae* (Haptophyta) grown in outdoor raceway ponds. *Biotechnol. Bioeng.* **96** (1): 27 – 36.
161. Molina E., Fernández J., Ación F.G., Chisti Y. (2001) Tubular photobioreactor design for algal cultures. *J. Biotechnol.* **92** (2): 113 – 131.
162. Murata N., Takahashi S., Nishiyama Y., Allakhverdiev S.I. (2007) Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *BBA. Bioenergetics.* **1767** (6): 414 – 421.
163. Mustard J, Renault S. (2004) Effects of NaCl on water relations and cell wall elasticity and composition of red-osier dogwood (*Cornus stolonifera*) seedlings. *Physiol. Plantarum* **121** (2): 265 – 271.

164. Ohse S., Derner R.B., Ozorio R.A., Braga M.V.D., Cunha P., Lamarca C.P., Dos Santos M.E. (2009) Production of biomass and carbon, hydrogen, nitrogen and protein contents in microalgae. *Ciencia Rural*. **39** (6): 1760 – 1767.
165. Opanasenko V. K., Vasyukhina L. A. (2009) Synergism of ammonium and palmitic acid in uncoupling of electron transfer and ATP synthesis in chloroplasts. *Biochemistry – Moscow+*. **74** (6): 643 – 647
166. Ota M., Kato Y., Watanabe H., Watanabe M., Sato Y., Smith R.L., Inomata H. (2009) Fatty acid production from a highly CO<sub>2</sub> tolerant alga, *Chlorocuccum littorale*, in the presence of inorganic carbon and nitrate. *Bioresource Technol.* **100** (21): 5237 – 5242.
167. Packer M. (2009) Algal capture of carbon dioxide; biomass generation as a tool for greenhouse gas mitigation with reference to New Zealand energy strategy and policy. *Energ. Policy*. **37** (9): 3428 – 3437.
168. Pal D., Khozin-Goldberg I., Cohen Z., Boussiba S. (2011) The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. *Appl. Microbiol. Biot.* **90** (4): 1429 – 1441.
169. Pires J.C.M., Alvim-Ferraz M.C.M., Martins F.G., Simoes M. (2012) Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: Engineering aspects and biorefinery concept. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **16** (5): 3043 – 3053.
170. Plaza M., Santoyo S., Jaime L., Reina G.B., Herrero M., Senorans F.J., Ibanez E. (2010) Screening for bioactive compounds from algae *J. Pharmaceut. Biomed.* **51** (2): 450 – 455.
171. Pruvost J., Van Vooren G., Cogne G., Legrand J. (2009) Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor. *Bioresource Technol.* **100** (23): 5988 – 5995.
172. Pulz O. (2001) Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Appl. Microbiol. Biot.* **57** (3): 287 – 293.

173. Pulz O., Scheibenbogen K. (1998) Photobioreactors: design and performance with respect to light energy input. *Adv. Biochem. Eng. Biot.* **59**: 124 – 154.
174. Quevedo C., Morales S.P., Acosta A. (2008) *Scenedesmus* sp growth in different culture mediums for microalgal protein production. *Vitae-Columbia.* **15** (1): 25 – 31.
175. Quinn J.C., Yates T., Douglas N., Weyer K., Butler J., Bradley T.H., Lammers P.J. (2012) *Nannochloropsis* production metrics in a scalable outdoor photobioreactor for commercial applications. *Bioresource Technol.* **111** (164 – 171):
176. Radmann E.M., Reinehr C.O., Costa J.A.V. (2007) Optimization of the repeated batch cultivation of microalga *Spirulina platensis* in open raceway ponds. *Aquaculture.* **265** (1 – 4): 118 – 126.
177. Raghavan G., Haridevi C.K., Gopinathan C.P. (2008) Growth and proximate composition of the *Chaetoceros calcitrans* f. *pumilus* under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. *Aquac. Res.* **39** (10): 1053 – 1058.
178. Ramos A, J Polle, D Tran, JC Cushman, E Jin, J Valera - Algae, 2011 The unicellular green alga *Dunaliella salina* Teod. as a model for abiotic stress tolerance: Genetic advances and future perspectives *Algae.* **26**(1): 3 – 20.
179. Rani G. (2007) Changes in protein profile and amino acids in *Cladophora vagabunda* (*Chlorophyceae*) in response to salinity stress. *J. Appl. Phycol.* **19** (6): 803 – 807.
180. Rao A.R., Dayananda C., Sarada R., Shamala T.R., Ravishankar G.A. (2007) Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresource Technol.* **98** (3): 560 – 564.
181. Reboloso – Fuentes M.M., García – Camacho F., Navarro – García A., Guil –Guerrero J.L. (2001) Biomass nutrient profiles of the microalga *Nannochloropsis* spp. *J. Agr. Food Chem.* **49** (6): 2966 – 2972

182. Reddy M., Radha K., Mastan S.A. (2012) Non-conventional protein for human race from spirulina maxima. J. Pure Appl. Microbio. **6** (2): 921 – 925.
183. Refaat A.A. (2009) Correlation between the chemical structure of biodiesel and its physical properties. Int. J. Environ. Sci. Technol. **6** (4): 677 – 694
184. Renaud S., Parry D. (1994) Microalgae for use in tropical aquaculture. 2. Effect of salinity on growth, gross chemical-composition and fatty-acid composition of 3 species of marine microalgae. J. Appl. Phycol. **6** (3):347–356
185. Richmond A., Cheng – Wu Z. (2001) Optimization of a flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis* sp. outdoors. J. Biotechnol. **85** (3): 259 – 269
186. Richmond A., Cheng-Wu Z., Zarmi Y. (2003) Efficient use of strong light for high photosynthetic productivity: interrelationships between the optical path, the optimal population density and cell-growth inhibition. Biomol Eng 20 (4 – 6):229 – 236.
187. Richmond, A. (2004) Principles for attaining maximal microalgal productivity in photobioreactors: an overview. Hydrobiologia. **512** (1 – 3): 33 – 37.
188. Rocha J.M.S., García J.E.C., Henriques M.H.F. (2003) Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. Biomol. Eng. **20** (4 – 6): 237 – 242.
189. Rodolfi L., Chini Zitelli G., Barsanti L., Rosati G., Tredici M.R. (2003) Growth medium recycling in *Nannochloropsis* sp. mass cultivation. Biomolecular Engineering. **20** (4 – 6): 243 – 248.
190. Rodolfi L., Zittelli G.C., Bassi N., Padovani G., Biondi N., Bonini G., Tredici M.R. (2009) Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low – cost photobioreactor. Biotechnol. Bieng. **102** (1): 100 – 112.
191. Scarsella M., Torzillo G., Cicci A., Belotti G., De Filippis P., Bravi M. (2011) Mechanical stress tolerance of two microalgae. Process Biochem. **47** (11): 1603 – 1611

192. Schansker G., Tóth Z.S., Kovács L., Holzwarth A.R., Garab G. (2011) Evidence for a fluorescence yield change driven by a light-induced conformational change within photosystem II during the fast chlorophyll a fluorescence rise. *Biochim. Biophys. Acta.* **1807** (9):1032–1043
193. Sforza E., Bertucco A., Morosinotto T., Giacometti G.M. (2012) Photobioreactors for microalgal growth and oil production with *Nannochloropsis salina*: from lab-scale experiments to large-scale design. *Chem. Eng. Res. Des.* **90** (9): 1151 – 1158.
194. Shen Y., Yuan W., Pei Z., Mao E. (2010) Heterotrophic culture of *Chlorella protothecoides* in various nitrogen sources for lipid production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **160** (6): 1674 – 1684.
195. Shimamatsu H. (2004) Mass production of *Spirulina*, an edible microalga. *Hydrobiologia.* **512** (1 – 3): 39 – 44.
196. Sierra E., Acién F.G., Fernández J.M., García J.L., González C. (2008) Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae. *Chem. Eng. J.* **138** (1 – 3): 136 – 147.
197. Simionato D., Sforza E., Corteggiani Carpinelli E., Bertucco A., Giacometti G.M., Morosinotto T. (2011) Acclimation of *Nannochloropsis gaditana* to different illumination regimes: Effects on lipids accumulation. *Bioresource Technol.* **102** (10): 6026 – 6032.
198. Smyrniotopoulos V., Vagias C., Rahman M.M., Gibbons S., Roussis V. (2010) Structure and antibacterial activity of brominated diterpenes from the red alga *Sphaerococcus coronopifolius*. *Chem. Biodivers.* **7** (1): 186 – 195.
199. Solovchenko A.E., Khozin – Goldberg I., Didi – Cohen S., Cohen Z., Merzlyak M.N. (2008) Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*. *J. Appl. Phycol.* **20** (3): 245 – 251.
200. Spolaore P., Joannis – Cassan C., Duran E., Isambert A. (2006) Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* **10** (2): 87 – 96.



201. Spotte S., Adams G., Bubucis P.M. (1984) GP2 medium is an artificial seawater for culture or maintenance of marine organisms. *Zoo Biol.* **3** (3): 229 – 240.
202. Srivastava A.K., Bhargava P., Thapar R., Rai L.C. (2008) Salinity-induced physiological and proteomic changes in *Anabaena doliolum*. *Environ. Exp. Bot.* **64** (1): 49 – 57.
203. Stepien P., Klobus G. (2005) Antioxidant defense in the leaves of C3 and C4 plants under salinity stress. *Physiol. Plantarum.* **125** (1): 31 – 40.
204. Stepien P., Klobus G. (2006) Water relations and photosynthesis in *Cucumis sativus* L. leaves under salt stress. *Biol. Plantarum.* **50** (4): 610 – 616.
205. Su C.H., Chien L.J., Gomes J., Lin Y.S., Yu Y.K., Liou J.S., Syu R.J. (2011) Factors affecting lipid accumulation by *Nannochloropsis oculata* in a two-stage cultivation process. *J. Appl. Phycol.* **23** (5): 903 – 905.
206. Sudhir P., Murthy S.D.S. (2004) Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. *Photosynthetica.* **42** (4): 481 – 486.
207. Sukenik A. (1999) Production of EPA by *Nannochloropsis*. In: Cohen Z. (ed) *Chemicals from microalgae*. Taylor and Francis, London, pp 41 – 56.
208. Sukenik A., Beardall J., Kromkamp J.C., Kopecky J., Masojidek J., van Bergeijk S., Gabai S., Shaham E., Yamshon A. (2009) Photosynthetic performance of outdoor *Nannochloropsis* mass cultures under a wide range of environmental conditions. *Aquat. Microb. Ecol.* **56** (2 – 3): 297 – 308.
209. Sukenik A., Tchernov D., Kaplan A., Huertas E., Lubián L.M., Livne A. (1997) Uptake, efflux, and photosynthetic utilization of inorganic carbon by the marine eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *J. Phycol.* **33** (6): 969 – 974.
210. Takagi M., Karseno, Yoshida T. (2006) Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *Biosci. Bioeng.* **101** (3): 223 – 226.

211. Toledo – Cervantes A., Morales M., Novelo E., Revah, S. (2013) Carbon dioxide fixation and lipid storage by *Scenedesmus obtusiusculus*. *Bioresource Technol.* **130**: 652 – 658.
212. Torzillo G., Bernardini P., Masojidek J. (1998) On – line monitoring of chlorophyll fluorescence to assess the extent of photoinhibition of photosynthesis induced by high oxygen concentration and low temperature and its effect on productivity of outdoor cultures of *Spirulina platensis* (Cyanobacteria). *J. Phycol.* **34** (3): 504 – 510.
213. Torzillo G., Giannelli L., Martínez – Roldán A.J., Verdone N., De Filippis P., Scarsella M., Bravi M. (2010). Microalgae culturing in thin – layer photobioreactors. *Chem Eng Trans.* **20**: 265 – 270. DOI: 10.3303/CET1020045.
214. Torzillo G., Sacchi A., Materassi R., Richmond A. (1991) Effect of temperature on yield and night biomass loss in *Spirulina – platensis* grown outdoors in tubular photobioreactors. *J. Appl. Phycol.* **3** (2): 103 – 109.
215. Torzillo G., Vonshak A. (1994) Effect of light and temperature on the photosynthetic activity of the cyanobacterium *Spirulina – platensis*. *Biomass Bioenerg.* **6** (5): 399 – 403.
216. Torzillo, G., Faraloni, C., Silva, A.M., Kopecky, J., Pilny, J. & Masojidek, J. (2012). Photoacclimation of *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae) cultures grown outdoors in photobioreactors and open ponds. *Eur. J. Phycol.* **47**(2): 169 – 181
217. Tsimilli – Michael M., Strasser R.J. (2007) Experimental resolution and theoretical complexity determine the amount of information extractable from the chlorophyll fluorescence transient OJIP. *Photosynth. Res.* **91** (2 – 3): 197 – 197.
218. Ugwu C.U., Aoyagi H., Uchiyama H. (2008) Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technol.* **99** (10): 4021 – 4028.
219. Valenzuela J., Mazurie A., Carlson R.P., Gerlach R., Cooksey K.E., Peyton B.M., Fields M.W. (2012) Potential role of multiple carbon fixation pathways

- during lipid accumulation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Biotechnol Biofuels*. **5**: 40.
220. Van Heerden P.D., Viljoen M.M., De Villiers M.F., Krüger G.H. (2004) Limitation of photosynthetic carbon metabolism by dark chilling in temperate and tropical soybean genotypes. *Plant Physiol. Bioch.* **42** (2): 117 – 124.
221. Van Wageningen J., Miller T.W., Hobbs S., Hook P., Crowe B., Huesemann M. (2012) Effects of light and temperature on fatty acid production in *Nannochloropsis salina*. *Energies*. **5** (3): 731 – 740.
222. Venkatesh J., Upadhyaya C.P., Yu J.W., Hemavathi A., Kim D.H., Strasser R.J., Park S.W. (2012) Chlorophyll a fluorescence transient analysis of transgenic potato overexpressing D-galacturonic acid reductase gene for salinity stress tolerance. *Horticulture Environment and Biotechnology*. **53** (4): 320 – 328.
223. Verma N.M., Mehrotra S., Shukla A., Mishra B.N. (2010) Prospective of biodiesel production utilizing microalgae as the cell factories: A comprehensive discussion. *Afr. J. Biotechnol.* **9** (10): 1402 – 1411.
224. Vieira Costa JA, Cozza KL, Oliveira L, Magagnin G (2001). Different nitrogen sources and growth responses of *Spirulina platensis* in microenvironments. *World J. Microb. Biot.*, **17**(5): 439 – 442.
225. Vyas A.P., Verma J.L., Subrahmanyam N. (2010) A review on FAME production processes. *Fuel*. **89** (1): 1 – 9.
226. Walne P.R. (1970) Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria*, and *Mytilis*. *Fish. Invest.* **26**: 162.
227. Wang L., Li Y.C., Chen P., Min M., Chen Y.F., Zhu J., Ruan R.R. (2010) Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil – rich green microalgae *Chlorella* sp. *Bioresource Technol.* **101** (8): 2623 – 2628.

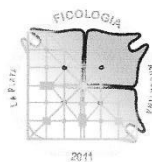
228. Wen Z.Y., Chen F. (2001) Optimization of nitrogen sources for heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia laevis*. *Enzyme Microb. Tech.* Volume: **29** (6 – 7): 341 – 347.
229. Wen Z.Y., Chen F. (2003) Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnol. Adv.* **21** (4): 273 – 294
230. Wiesenthal T., Leduc G., Christidis P., Schade B., Pelkmans L., Govaerts L., Georgopoulos P. (2009) Biofuel support policies. In Europe: Lessons learnt for the long way ahead. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **13** (4): 789 – 800.
231. Wu H.Y., Abasova L., Cheregi O., Deak Z., Gao K.S., Vass I. (2011) D1 protein turnover is involved in protection of Photosystem II against UV-B induced damage in the cyanobacterium *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *J. Photoch. Photobio. B.* **104** (1 – 2): 320 – 325.
232. Wu L.B., Li Z., Song Y.Z. (2010) Hydrodynamic conditions in designed spiral photobioreactors. *Bioresour. Technol.* **101** (1): 298 – 303.
233. Wu L.F., Chen P.C., Huang A.P., Lee C.M. (2012) The feasibility of biodiesel production by microalgae using industrial wastewater. *Bioresource Technol.* **113** (SI): 14 – 18.
234. Wu Z.Y., Qu C.B., Shi X.M. (2009) Biochemical system analysis of lutein production by heterotrophic *Chlorella pyrenoidosa* in a fermentor. *Food Technol. Biotech.* **47** (4): 450 – 455.
235. Xiong W., Li X., Xiang J., Wu Q. (2008) High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for micro-biodiesel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **78** (1):29–36.
236. Yusof Y.A.M., Basari J.M.H., Mukti N.A., Sabuddin R., Muda A.R., Sulaiman S., Makpol S., Ngah W.Z.W. (2011) Fatty acids composition of microalgae *Chlorella vulgaris* can be modulated by varying carbon dioxide concentration in outdoor culture. *Afr. J. Biotechnol.* **10** (62): 13536 – 13542.
237. Zemke P.E., Wood B.D., Dye D.J. (2010) Considerations for the maximum production rates of triacylglycerol from microalgae. *Biomass Bioenerg.* **34** (1): 145 – 151.

238. Zhang B.Y., Geng Y.H., Li Z.K., Hu H.J., Li Y.G. (2009) Production of astaxanthin from *Haematococcus* in open pond by two – stage growth one – step process. *Aquaculture*. **295** (3 – 4): 275 – 281.
239. Zhekisheva M., Boussiba S., Khozin – Goldberg I., Zarka A., Cohen Z. (2002) Accumulation of oleic acid in *Haematococcus pluvialis* (*Chlorophyceae*) under nitrogen starvation or high light is correlated with that of astaxanthin esters. *J. Phycol.* **38** (2): 325 – 331.
240. Zou N., Zhang C., Cohen Z., Richmond A. (2000) Production of cell mass and eicosapentaenoic acid (EPA) in ultrahigh cell density cultures of *Nannochloropsis* sp. (*Eustigmatophyceae*). *Eur. J. Phycol.* **35** (2): 127 – 133.

## 11. Anexos

### 11.1 Trabajos presentados en Congresos Internacionales

Comparación del crecimiento y contenido de lípidos de dos cepas del género *Nannochloropsis* en dos diferentes medios de cultivo. IX Congreso de Ficología de Latinoamérica y el Caribe VII Reunión Iberoamericana de Ficología IX Simposio Argentino de Ficología. La Plata, Argentina. 7 al 11 de Noviembre de 2011.



IX CONGRESO DE FICOLOGÍA DE LATINOAMÉRICA Y EL CARIBE  
VII REUNIÓN IBEROAMERICANA DE FICOLOGÍA  
IX SIMPOSIO ARGENTINO DE FICOLOGÍA

7 al 11 de noviembre de 2011 - La Plata, Argentina



**Certificamos que**

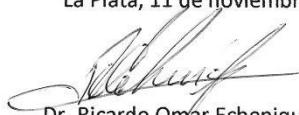
*Martínez-Roldán, A.J., G. Torzillo, R.O. Cañizares-Villanueva.*

*han presentado su trabajo*

**COMPARACIÓN DEL CRECIMIENTO Y CONTENIDO DE LÍPIDOS DE DOS CEPAS DEL GÉNERO  
NANNOCHLOROPSIS EN DOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO.**

La Plata, 11 de noviembre de 2011

  
Lic. Anabella Aguilera  
Secretaría Comisión Organizadora

  
Dr. Ricardo Omar Echenique  
Presidente Comisión Organizadora



Efecto de la concentración de NaCl sobre el crecimiento, consumo de nutrientes y contenido específico de lípidos en *Nannochloropsis* sp. IX Congreso de Ficología de Latinoamérica y el Caribe VII Reunión Iberoamericana de Ficología IX Simposio Argentino de Ficología. La Plata, Argentina. 7 al 11 de Noviembre de 2011.



## 11.2 Artículos publicados

Torzillo G., Giannelli L., Martínez – Roldán A.J., Verdone N., De Filippis P., Scarsella M., Bravi M. (2010) Microalgae culturing in thin-layer photobioreactors. Chemical Engineering Transactions. DOI: 10.3303/CET1020045.

Arias Peñaranda M.T., Martínez – Roldán A.J., Cañizares – Villanueva R.O. (2013). Producción de biodiesel a partir de microalgas: parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. Acta Biológica Colombiana 18 (1): 43 – 68.

Martínez – Roldán A.J., Perales – Vela H.V., Cañizares – Villanueva R.O., Torzillo G. (2013) Physiological response of *Nannochloropsis* sp. to saline stress in laboratory batch cultures. J. Appl. Phycol.



*Physiological response of Nannochloropsis  
sp. to saline stress in laboratory batch  
cultures*

**A. J. Martínez-Roldán, H. V. Perales-  
Vela, R. O. Cañizares-Villanueva &  
G. Torzillo**

Journal of Applied Phycology

ISSN 0921-8971

J Appl Phycol  
DOI 10.1007/s10811-013-0060-1



 Springer

## Physiological response of *Nannochloropsis* sp. to saline stress in laboratory batch cultures

A. J. Martínez-Roldán · H. V. Perales-Vela ·  
R. O. Cañizares-Villanueva · G. Torzillo

Received: 19 March 2013 / Revised and accepted: 30 May 2013  
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

**Abstract** In the present paper, we investigated the physiological response of the marine microalga *Nannochloropsis* sp. to salt stress (13, 27, 54, and 81 g L<sup>-1</sup> NaCl). Increasing the sodium chloride concentration caused up to a 70 % decrease in the chlorophyll *a* concentration, cell growth, and net photosynthesis rate. The chlorophyll *a* fluorescence measurements indicated a strong reduction in the effective quantum yield of photosystem II (~60%) and an increase in nonphotochemical quenching when the cells were exposed to NaCl concentrations greater than 27 g L<sup>-1</sup> (control). In contrast, the specific lipid content increased up to 80 % when the sodium chloride concentration was increased from 27 to 54–81 g L<sup>-1</sup>. These results are relevant for the outdoor cultivation of this microalga using open photobioreactors, in which microalgae are subjected to strong changes in salinity concentration caused by water evaporation.

**Keywords** Microalgae · Eutigmatophyceae · *Nannochloropsis* · Lipids · Salinity · Fluorescence

A. J. Martínez-Roldán · R. O. Cañizares-Villanueva (✉)  
C. Laboratorio de Biotecnología de Microalgas, Departamento de  
Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigación y de  
Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Ave. IPN  
2508, Col. San Pedro Zacatenca, Mexico City 07360, Mexico  
e-mail: rcanizares@ciqinvest.mx

H. V. Perales-Vela  
Laboratorio de Bioquímica, Unidad de Morfología y Función,  
Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional  
Autónoma de México, Los Reyes Iztacala, Ave. de los Barrios #1,  
Tlalapantla, Estado de México, Mexico

G. Torzillo  
CNR-Istituto per lo Studio degli Ecosistemi, Via Madonna del  
Piano 10, Sesto Fiorentino 50019, Firenze, Italy

### Introduction

In recent years, environmental concerns and increased petroleum prices have stimulated the search for renewable energy sources (Gavrilescu and Chisti 2005). Some microalgae species, when grown under stress conditions, can accumulate significant quantities of total lipids (Chisti 2007; Rodolfi et al. 2009), especially mono-, di-, and triacylglycerols and glycolipids (Chisti 2007; Hu et al. 2008). The nonpolar fraction, the acylglycerol group, can be converted to biodiesel through a transesterification reaction using a low molecular weight alcohol (Chisti 2007). Oleaginous marine species, such as the *Nannochloropsis* species, are considered to be promising for mass cultivation for the production of biofuel (Rodolfi et al. 2009) due to their ability to accumulate high amounts of triacylglycerol (TAG) under conditions of nutrient starvation. *Nannochloropsis* TAG consists mostly of saturated and mono-unsaturated C16 and C18 fatty acids (Sukerik and Carmeli 1990; Rodolfi et al. 2009; Bondioli et al. 2012), which may provide good feedstock for biodiesel.

Lipid accumulation in *Nannochloropsis* is influenced by environmental conditions, such as light intensity, nutrient limitation (particularly nitrogen), salinity, temperature, pH, and culture age (Boussiba et al. 1987; Khozin-Goldberg et al. 2002; Rodolfi et al. 2009; Pal et al. 2011; Bondioli et al. 2012). Under unfavorable conditions, microalgal growth ceases, photosynthesis decreases, and the excess reducing power produced by photosynthesis may be stored in the form of lipids or other storage products, such as carbohydrates. The feasibility of the large-scale production of *Nannochloropsis* in shallow ponds and photobioreactors has already been demonstrated (Chini-Zimelli et al. 1999; Kromkamp et al. 2009; Rodolfi et al. 2009; Sukerik et al. 2009; Bondioli et al. 2012; Bondioli et al. 2012; Recht et al. 2012). Daily evaporation in cultures of marine microalgae in open ponds (usually as much as 1 cm in depth) in arid and desert areas can be almost 0.2 L m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> (Cooney et al. 2011); this evaporation increases

the salt concentration of the culture medium, thus doubling the salt concentration in 4 days if the water lost is not restored. However, if marine water is added to recover the culture volume, the salinity level doubles in 7–8 days. This fact emphasizes the importance of evaluating the salinity tolerance of marine species.

The aim of this work was to evaluate the effect of increased salinity levels (NaCl) on the growth and photosynthesis of laboratory batch cultures of *Nannochloropsis* sp. Our results show that increasing the salinity up to 81 g L<sup>-1</sup> causes strong inhibition of photosystem II (PSII) activity, as evaluated via the chlorophyll *a* fluorescence technique. In contrast, the lipid concentration in the cells increased with increasing salinity of the medium.

### Materials and methods

The *Nannochloropsis* sp. (CCALA 804) strain used in the present investigation was donated by Professor Avigad Voshak from the Blaustein Institute for Desert Research, Ben Gurion University. Artificial seawater (ASW) was employed with the following composition: 27 g L<sup>-1</sup> NaCl, 6.6 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 5.6 g L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1.5 g L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1.45 g L<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub>, 0.12 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.04 g L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>, 0.01 g L<sup>-1</sup> FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.078 g L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>EDTA, 0.01 mg L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.022 mg L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.01 mg L<sup>-1</sup> CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.18 mg L<sup>-1</sup> MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, and 0.006 mg L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O. The ASW was enriched with 75 mg L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> and 5 mg L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Cultures were grown in 400-mL glass columns (internal diameter 5 cm) and were illuminated with white light (OSRAM DULUX L Daylight, Germany) at an irradiance of 75 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. This relatively low photon flux density was chosen to minimize the effect of photoinhibition by light. The temperature was maintained at 25 °C. The cultures were bubbled with an air-CO<sub>2</sub> mixture (*v/v* 97/3) with an airflow of 0.5 vvm.

The physiological responses of *Nannochloropsis* sp. exposed for 96 h to different NaCl concentrations (13.5, 27, 54, and 81 g L<sup>-1</sup>) were studied; the culture with 27 g L<sup>-1</sup> NaCl was used as the control. Characterization of the effect of NaCl concentration on *Nannochloropsis* was performed by daily determinations of the following: dry weight (DW), chlorophyll *a* (Chl*a*) concentration, specific lipid content, net photosynthetic rate (NPR), respiration rate (RR), and photosynthetic activity by the PSII Chl*a* fluorescence emission.

DW was measured in triplicate in 5 mL of culture samples. The cell suspension was diluted 10-fold with distilled water and was filtered through a previously weighed GFC glass microfibre filter (Whatman); the filters were dried at 105 °C for 2 h. Chlorophyll *a* concentration was determined according to Lichtenthaler (1987). To measure the photosynthesis activity, a 2-mL aliquot of culture (~5 mg Chl*a* L<sup>-1</sup>)

was placed in an OxyLab cell (Hanatech Instruments, UK) at 25 °C and was illuminated with 500 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> of light. The light source consisted of an array of 11 red LEDs with a maximum emission peak at 650 nm. The photosynthetic rate was evaluated by oxygen evolution. Respiration rates (oxygen uptake) were measured on independent samples. Gross photosynthesis rates were calculated by adding the respiration to the net oxygen evolution rates.

Chlorophyll *a* fluorescence measurements were performed on 2 mL of samples using a pulse amplitude-modulated fluorometer (PAM-2100; H. Walz, Germany). To measure the maximum quantum yield of PSII, samples were dark-adapted for 20 min. The minimal fluorescence (*F*<sub>0</sub>) value was obtained by exciting the samples with low-intensity modulated light (0.3 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) and by superimposing a saturating pulse of white light (4,000 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) for 0.8 s to close all reaction centers and attain the maximum fluorescence yield in the dark-adapted samples (*F*<sub>M</sub>). The steady-state fluorescence in the light (*F*<sub>S</sub>) was obtained using a white actinic light having 150 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. The maximal fluorescence in the light-adapted state (*F*'<sub>M</sub>) was obtained by superimposing a saturate white light pulse (4,000-μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) for 0.8 s. The minimal fluorescence in the light-adapted state (*F*'<sub>0</sub>) was obtained by turning off the red light and by irradiating the culture with a low-intensity (1.5 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) infrared light (750 nm). Data were analyzed employing PAM-WIN 1.17 (H. Walz, Germany) software, and parameters were calculated according to Congrove and Borowitzka (2011).

$$\Phi_{70} = \frac{F_M - F_0}{F_M} \quad \Phi'_{70} = \frac{F'_M - F'}{F'_M} \quad NPQ = \frac{F'_M - F'_M}{F'_M}$$

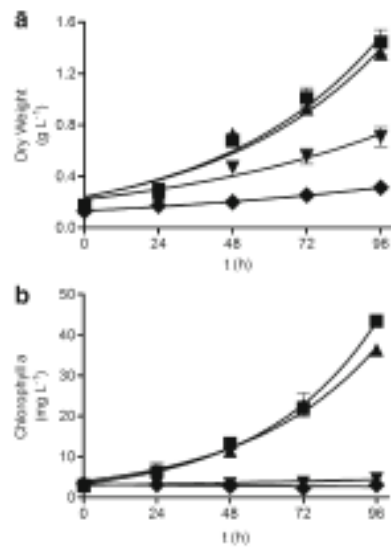
The total lipid content was determined spectrophotometrically according to Rodolfi et al. (2009) and Bondoli et al. (2012). A calibration curve employing tripalmitate as a standard (Sigma-Aldrich, USA) was used for quantification.

Statistical analysis was conducted using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., USA); first, two-way ANOVA was used, followed by a Bonferroni post-ANOVA analysis.

### Results

Increasing the NaCl concentration in the culture medium had a negative effect on the final biomass concentration (*p* < 0.001) (Fig. 1). The cultures exposed to 13.5 and 27 g L<sup>-1</sup> (control) NaCl showed analogous exponential growth kinetics and reached similar biomass concentrations after 96 h of continuous illumination (Fig. 1). In contrast, the cultures exposed to 54 and 81 g L<sup>-1</sup> NaCl showed significant growth inhibition (*p* < 0.001) once exposed to high salt concentrations, and at the end of the experiment, the culture growth levels were 47.8 and





**Fig. 1** Effect of salinity increase on *Nannochloropsis* sp. growth, in terms of a DW and Chl a, at different NaCl concentrations: 13.5 g L<sup>-1</sup> of NaCl (squares), 27 g L<sup>-1</sup> of NaCl (upright triangles), 54 g L<sup>-1</sup> of NaCl (inverted triangles), and 81 g L<sup>-1</sup> of NaCl (diamonds). Mean±SD (n=3)

77.02 % lower, respectively, than the control culture (exposed to 27 g L<sup>-1</sup> NaCl).

The adverse effect of NaCl on the *Nannochloropsis* sp. cultures was also evident in the specific growth rate (Table 1). The specific growth rates were comparable at 13.5 and 27 g L<sup>-1</sup> NaCl (mean 0.024 h<sup>-1</sup>), whereas the rates decreased by 37.5 and 70.8 % in the cultures exposed to 54 and 81 g L<sup>-1</sup> NaCl, respectively, compared to the control culture (exposed to 27 g L<sup>-1</sup> NaCl).

The ionic imbalance and enzyme inactivation due to salt stress affected several metabolic processes, such as carbon fixation, photosynthesis, respiration, and pigment synthesis; one of the most affected processes was pigment synthesis (Stepien and Klobus 2006; Pal et al. 2011). The Chl a concentration of the culture exposed to 13.5 g L<sup>-1</sup> NaCl increased by 19.56 % (Fig. 1b), whereas that of the culture exposed to 54 g L<sup>-1</sup> NaCl decreased by 88.16 % with respect to the control culture (p > 0.001). Moreover, the Chl a

concentration of the culture exposed to 81 g L<sup>-1</sup> NaCl did not increase during the 96-h experiment.

Total photosynthetic rate (TPR) values were inversely proportional to the NaCl concentration (Fig. 2). This effect was nearly immediate (within 5 min) in the culture exposed to 81 g L<sup>-1</sup> NaCl at 24 h (data not shown), whose TPR decreased by 82.3 % with respect to the control culture.

After the first 72 h, the TPR of the culture containing 27 g L<sup>-1</sup> NaCl decreased from 243.98 to 203.84 μmol O<sub>2</sub> mg Chl a<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>; similar values at this time point were also observed in the culture exposed to 54 g L<sup>-1</sup> of NaCl. In the culture containing 81 g L<sup>-1</sup> NaCl, there was a decrease in its initial NPR value (243.98 ± 8 μmol O<sub>2</sub> mg Chl a<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) of nearly 75 % at 24 h and of 67 % at the end of the experiment (61.01 ± 8 and 78.57 ± 37 μmol O<sub>2</sub> mg Chl a<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectively).

The reduction in TPR in the culture containing 81 g L<sup>-1</sup> NaCl was caused by a reduction in the capacity of electron transport through the electron transport chain (ETC) (Stepien and Klobus 2005; Mehta et al. 2010) coupled with a reduction in pigment production (Chl a) (Stepien and Klobus 2006). Similar reductions in TPR have been reported for different genera of Chlorophyceae, cyanobacteria, and for several species of higher plants (Henley et al. 2002; Sufair and Murthy 2004; Chen et al. 2006).

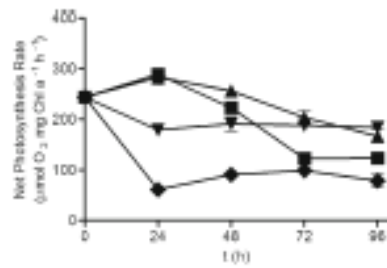
RR values (Fig. 3) were strongly affected by the increased salt concentration (p < 0.001). Except for the culture exposed to the highest salt concentration, which showed an increased RR, all other cultures showed a deceleration in their RR, notably for those cultures exposed to mild salt stress, that is, 13 and 27 g L<sup>-1</sup> NaCl. This behavior was most likely due to culture aging and to an increased amount of chlorophyll per cell, which reduced the chlorophyll cross section.

The NPR/RR ratios of the cultures at 13.5 and 27 g L<sup>-1</sup> of NaCl were greater than 4 (4.6 and 4.22, respectively) (Table 1). The NPR/RR of the culture at 54 g L<sup>-1</sup> NaCl decreased by almost 50 % (2.45) with respect to the control culture, but the metabolic effect was stronger when *Nannochloropsis* was cultivated at 81 g L<sup>-1</sup>; the NPR/RR ratio of this culture reached a value of 1.45.

NPR/RR ratios in microalgae can show very different values because the respiration rate can vary from 10 to 50 % of the energy captured by the photosynthetic process (Zemke et al. 2010). For the marine species of microalgae and

**Table 1** Final biomass concentration (DW), specific growth rate (μ), and medium nutrients' final concentrations

NaCl (g L <sup>-1</sup> )	DW (g L <sup>-1</sup> )	μ (h <sup>-1</sup> )	Nitrogen concentration (mg L <sup>-1</sup> )	Phosphorus concentration (mg L <sup>-1</sup> )
13.5	1.44 ± 0.20	0.024 ± 0.002	71.1 ± 3.07	6.9 ± 0.09
27.0	1.36 ± 0.13	0.024 ± 0.001	67.1 ± 10.48	6.1 ± 0.02
54.0	0.7 ± 0.18	0.015 ± 0.005	99.8 ± 1.58	8.7 ± 0.09
81.0	0.3 ± 0.08	0.007 ± 0.001	142.8 ± 11.23	13.0 ± 0.07

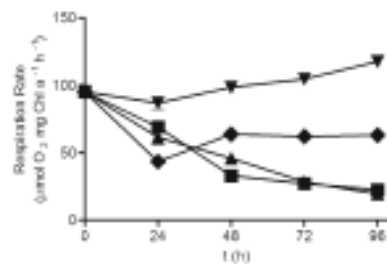


**Fig. 2** Effect of salinity increase on net photosynthesis rate at different salinity levels: 13.5 g L<sup>-1</sup> of NaCl (squares), 27 g L<sup>-1</sup> of NaCl (upright triangles), 54 g L<sup>-1</sup> of NaCl (inverted triangles), and 81 g L<sup>-1</sup> of NaCl (diamonds). Means ± SEM (n=3)

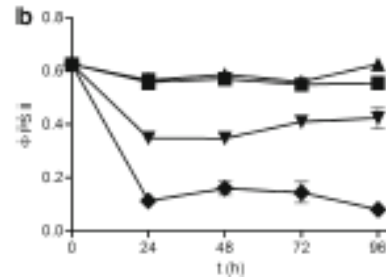
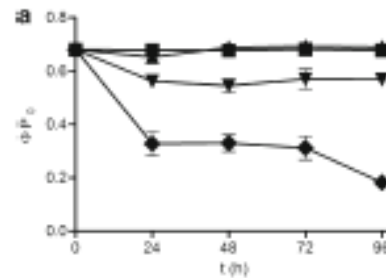
cyanobacteria, this ratio ranges from 4 to 10 under optimal culture conditions. The small differences in the NPR/RR ratio for the cultures at 13.5 and 27 g L<sup>-1</sup> NaCl explain why there are no significant differences in the final biomass concentrations of the two cultures (Fig. 1a and Table 1). However, for the cultures containing 54 and 81 g L<sup>-1</sup> NaCl, the reductions in the NPR/RR ratio were 41.9 and 65.6 %, respectively, with respect to the control culture. These values correspond to the decreases in DW, which were 46.8 and 76.8 % for the cultures containing 54 and 81 g L<sup>-1</sup> NaCl, respectively.

**Chlorophyll a fluorescence measurements**

The physiological effect of increased amounts of salt in the cultures was clearly evidenced by the Chl a fluorescence measurements. The maximum photochemical quantum yield of PSII ( $\Phi_{P_0}$ ) (Fig. 4a) of the cultures exposed to the lowest salt concentrations, 13.5 and 27 g L<sup>-1</sup>, had constant values between 0.67 and 0.68 throughout the entire experiment. In contrast, for the culture containing 54 g L<sup>-1</sup> NaCl, the  $\Phi_{P_0}$  decreased by 19 % at 24 h (Fig. 4a). However, during the subsequent time points, the  $\Phi_{P_0}$  remained almost constant,



**Fig. 3** Effect of salinity increase on respiration rate at different salinity levels: 13.5 g L<sup>-1</sup> of NaCl (squares), 27 g L<sup>-1</sup> of NaCl (upright triangles), 54 g L<sup>-1</sup> of NaCl (inverted triangles), and 81 g L<sup>-1</sup> of NaCl (diamonds). Means ± SEM (n=3)



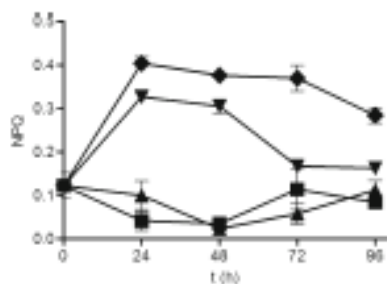
**Fig. 4** Effect of salinity increase on quantum efficiency, a  $\Phi_{P_0}$  and b  $\Phi_{PSII}$ , at different salinity levels: 13.5 g L<sup>-1</sup> of NaCl (squares), 27 g L<sup>-1</sup> of NaCl (upright triangles), 54 g L<sup>-1</sup> of NaCl (inverted triangles), and 81 g L<sup>-1</sup> of NaCl (diamonds). Means ± SEM (n=3)

thus indicating that cells had reached equilibrium between the damage and recovery processes.

In contrast, the culture containing 81 g L<sup>-1</sup> NaCl had a strong decrease in the  $\Phi_{P_0}$  with respect to the initial value. The decrease in the  $\Phi_{P_0}$  had biphasic behavior with a higher rate of damage occurring as soon as the cells were exposed to high salt. At the end of the experiment (96h hour), the  $\Phi_{P_0}$  value decreased to 0.182 ± 0.0117, which represents a reduction of 73 % with respect to the initial value.

The PSII quantum opening efficiency ( $\Phi_{PSII}$ ) (Fig. 4b) and the DW (Fig. 1a) were strongly correlated; in fact, the cultures at 13.5 and 27 g L<sup>-1</sup> NaCl did not differ significantly with regard to either parameter during the experiment ( $p > 0.001$ ). In contrast, the culture at 54 g L<sup>-1</sup> of NaCl at 96 h, had reductions of 32.31 and 47.95 % in the PSII opening efficiency and the DW, respectively. A similar trend was observed for the culture at 81 g L<sup>-1</sup> NaCl; at the end of the experiment, a decrease in the  $\Phi_{PSII}$  of 87.16 % and a decrease in the DW of 77.03 % with respect to the control culture (27 g L<sup>-1</sup>) were observed. These findings confirm the strong correlation between the opening efficiency of PSII and biomass accumulation (Torzillo et al. 1998).

Figure 5 shows the course of nonphotochemical quenching (NPQ) of the cultures under different salt stress intensities. The behavior of NPQ mirrored that observed with the  $\Phi_{P_0}$ . Indeed, the dissipation of excitation energy (heat) via NPQ



**Fig. 5** Effect of salinity increase on nonphotochemical quenching at different salinity levels: 13.5 g L<sup>-1</sup> of NaCl (squares), 27 g L<sup>-1</sup> of NaCl (upright triangles), 54 g L<sup>-1</sup> of NaCl (inverted triangles), and 81 g L<sup>-1</sup> of NaCl (diamonds). Mean  $\pm$  SEM (n=3)

was higher in the cultures exposed to high salt stress (54 and 81 g L<sup>-1</sup> NaCl). This result can indicate that the addition of NaCl concentrations above 27 g L<sup>-1</sup> activates nonphotochemical quenching processes (Fig. 5) (Horton and Ruban 2005; Lavrad and Kioth 2006) because the stress caused by NaCl substantially reduces the capacity of cells to dissipate energy via photochemical quenching, that is, to transport electrons in the ETC (Stepien and Klobus 2005; Melita et al. 2010).

The values of  $\Phi_{PO}$  reached by the cultures exposed to 54 and 81 g L<sup>-1</sup> NaCl indicated structural damages in the PSII. According to Henley et al. (2002), this result could be caused by an imbalance in the electron transport chain and, therefore, a decrease in the production of ATP. The latter directly affects the synthesis of important proteins, such as D1, which then directly impacts the rate of repair of PSII.

According to Allakhverdiev and Munta (2008), the salinity stress causes a dissociation in the proteins related to the stability of PSII; this instability in PSII inactivates the catalytic site in the oxygen-evolving complex conformed by the manganese cluster. The reduction in the quantum yield in the cultures containing 54 and 81 g L<sup>-1</sup> of NaCl indicates decoupling in the ETC, which increases the amount of

energy that is dissipated in nonphotochemical processes (NPQ). It is important to emphasize the behavior of the culture with 54 g L<sup>-1</sup> NaCl; its NPQ values decrease after 48 h (Fig. 5), which may be caused by adaptation processes.

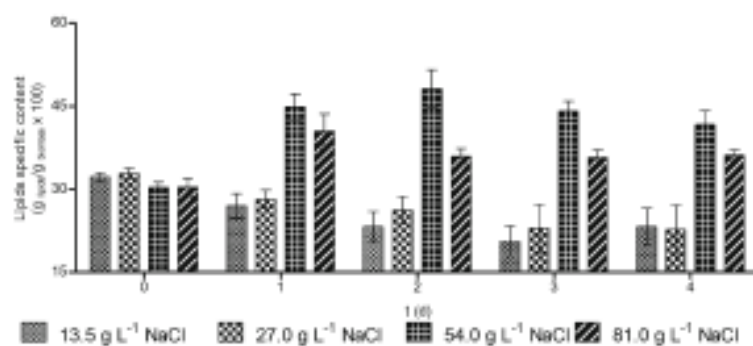
#### Lipid accumulation

The specific content of total lipids (Fig. 6) was significantly influenced by the elapsed time during the experiment ( $p < 0.001$ ). The cultures at 13.5 and 27 g L<sup>-1</sup> of NaCl did not have significant differences during the entire experiment. However, the total lipid specific content of cultures exposed to 54 and 81 g L<sup>-1</sup> of NaCl increased significantly ( $p > 0.001$ ) after 24 h, reaching maximum values of 48.15  $\pm$  7.66 % at 48 h and 40.48  $\pm$  6.99 % at 24 h and remained constant until 96 h. This effect was caused only by osmotic stress because at the end of the experiments, the culture medium contained nearly 70 mg L<sup>-1</sup> of nitrogen (Table 1) for the cultures with 13.5 and 27 g L<sup>-1</sup> NaCl and approximately 50 and 70 % of the initial nitrogen concentrations for the cultures with 54 and 81 g L<sup>-1</sup> of NaCl, respectively.

Cessation of growth, however, under high salt stress promoted the accumulation of total lipids. The lipid content in cultures exposed to 54 g L<sup>-1</sup> NaCl reached ~50 % of the dry weight, which was only slightly lower than that obtained during nitrogen starvation (~60 %) (Rodolfi et al. 2009; Biondi et al. 2012; Bondioli et al. 2012; Reicht et al. 2012) in a shorter period of time. The organisms were able to accumulate lipids because, despite the salt stress (at 54 and 81 g L<sup>-1</sup> NaCl), they maintained an NPR/RR ratio greater than 1, suggesting that the organisms stored the extra captured energy in the form of lipids, which are carbon- and energy-rich molecules.

The volumetric lipid productivity (Fig. 7) reached values greater than 60 mg L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>; this value is in the middle of the range reported for this genus. Some authors report values between 15 and 170 mg L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> for *Nannochloropsis* cultures, but these studies use nitrogen starvation induction.

**Fig. 6** Specific content of total lipids in *Nannochloropsis* sp. at different salinity levels. Mean  $\pm$  SEM (n=3)





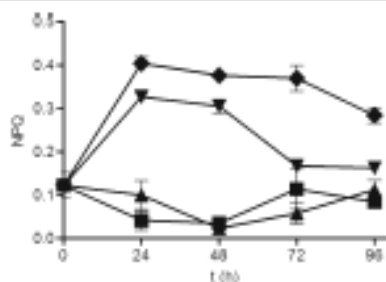


Fig. 5 Effect of salinity increase on nonphotochemical quenching at different salinity levels: 13.5 g L<sup>-1</sup> of NaCl (square), 27 g L<sup>-1</sup> of NaCl (upright triangles), 54 g L<sup>-1</sup> of NaCl (inverted triangles), and 81 g L<sup>-1</sup> of NaCl (diamond). Mean±SEM (n=3)

was higher in the cultures exposed to high salt stress (54 and 81 g L<sup>-1</sup> NaCl). This result can indicate that the addition of NaCl concentrations above 27 g L<sup>-1</sup> activates nonphotochemical quenching processes (Fig. 5) (Horton and Ruban 2005; Lavand and Kroth 2006) because the stress caused by NaCl substantially reduces the capacity of cells to dissipate energy via photochemical quenching, that is, to transport electrons in the ETC (Stepien and Kloban 2005; Mehta et al. 2010).

The values of  $\Phi_{PO}$  reached by the cultures exposed to 54 and 81 g L<sup>-1</sup> NaCl indicated structural damages in the PSII. According to Henley et al. (2002), this result could be caused by an imbalance in the electron transport chain and, therefore, a decrease in the production of ATP. The latter directly affects the synthesis of important proteins, such as D1, which then directly impacts the rate of repair of PSII.

According to Allakhverdiev and Muntz (2008), the salinity stress causes a dissociation in the proteins related to the stability of PSII; this instability in PSII inactivates the catalytic site in the oxygen-evolving complex conformed by the manganese cluster. The reduction in the quantum yield in the cultures containing 54 and 81 g L<sup>-1</sup> of NaCl indicates decoupling in the ETC, which increases the amount of

energy that is dissipated in nonphotochemical processes (NPQ). It is important to emphasize the behavior of the culture with 54 g L<sup>-1</sup> NaCl; its NPQ values decrease after 48 h (Fig. 5), which may be caused by adaptation processes.

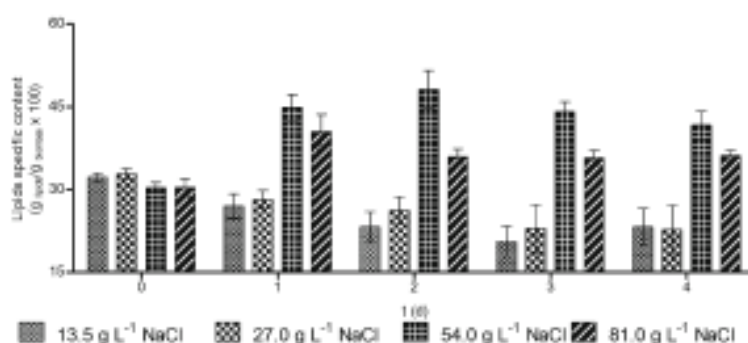
#### Lipid accumulation

The specific content of total lipids (Fig. 6) was significantly influenced by the elapsed time during the experiment ( $p < 0.001$ ). The cultures at 13.5 and 27 g L<sup>-1</sup> of NaCl did not have significant differences during the entire experiment. However, the total lipid specific content of cultures exposed to 54 and 81 g L<sup>-1</sup> of NaCl increased significantly ( $p > 0.000$ ) after 24 h, reaching maximum values of  $48.15 \pm 7.66$  % at 48 h and  $40.48 \pm 6.99$  % at 24 h and remained constant until 96 h. This effect was caused only by osmotic stress because at the end of the experiments, the culture medium contained nearly 70 mg L<sup>-1</sup> of nitrogen (Table 1) for the cultures with 13.5 and 27 g L<sup>-1</sup> NaCl and approximately 50 and 70 % of the initial nitrogen concentrations for the cultures with 54 and 81 g L<sup>-1</sup> of NaCl, respectively.

Cessation of growth, however, under high salt stress promoted the accumulation of total lipid. The lipid content in cultures exposed to 54 g L<sup>-1</sup> NaCl reached ~30 % of the dry weight, which was only slightly lower than that obtained during nitrogen starvation (~60 %) (Rodolfi et al. 2009; Biondi et al. 2012; Bondioli et al. 2012; Reht et al. 2012) in a shorter period of time. The organisms were able to accumulate lipids because, despite the salt stress (at 54 and 81 g L<sup>-1</sup> NaCl), they maintained an NPR/RR ratio greater than 1, suggesting that the organisms stored the extra captured energy in the form of lipids, which are carbon- and energy-rich molecules.

The volumetric lipid productivity (Fig. 7) reached values greater than 60 mg L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>; this value is in the middle of the range reported for this genus. Some authors report values between 15 and 170 mg L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> for *Nannochloropsis* cultures, but these studies use nitrogen starvation induction.

Fig. 6 Specific content of total lipids in *Nannochloropsis* sp. at different salinity levels. Mean±SEM (n=3)



washing steps and incubation for more than 90 h are generally required) (Rodolfi et al. 2009; Su et al. 2011; Bondioli et al. 2012; Bondioli et al. 2012; Recht et al. 2012).

In conclusion, lipid production via salt induction may be more practical and environmentally friendly than that via nitrogen starvation (through successive dilution or washing steps) because it would considerably reduce the induction time.

**Acknowledgments** A.J. Martini-Bonelli received a graduate scholarship awarded by the Consiglio Nazionale delle Ricerche for doctoral studies and a "Becca Miata" scholarship for a research stay at the Istituto per lo Studio degli Ecosistemi-CNR, Firenze, Italy.

## References

- Affenzeller MJ, Durbahouri A, Androsch A, Lutz C, Lutz-Meindl U (2009) Salt stress-induced cell death in the unicellular green alga *Microrrestor denticalata*. *J Exp Bot* 60:939–954
- Afify Abd El-Moneim MR, Shalaby Emad A, Shorah Samia MM (2010) Enhancement of biofuel production from different species of algae. *Grass Acetiv* 6:1416–422
- Allakhverdiev SI, Murata N (2008) Salt stress inhibits photosystem II and I in cyanobacteria. *Photosynth Res* 98:529–539
- Beardall J, Irwin S, Quigg A (2009) Gross and net primary production: closing the gap between concepts and measurement. *Aquat Microb Ecol* 56:113–122
- Biondi N, Bassi N, Chini Zittelli G, De Fevri D, Giovannini A, Rodolfi L, Allevi C, Maeri C, Trudici MR, Biondi N, Bassi N, Chini Zittelli G, De Fevri D, Giovannini A, Rodolfi L, Allevi C, Maeri C, Trudici MR (2012) *Nannochloropsis* sp. F&M-M24: oil production, effect of mixing on productivity and growth in an industrial wastewater. *Environ Prog Sust Energy*. doi:10.1002/ep.11681
- Biondi N, Della Bella L, Rivolta G, Chini Zittelli G, Bassi N, Rodolfi L, Casini D, Praso M, Chianamenti D, Trudici MR (2012) Oil production by the marine microalgae *Nannochloropsis* sp. F&M-M24 and *Tetraselmis suecica* F&M-M33. *Bioresour Technol* 114:367–372
- Bouaoua S, Vornhake A, Cohen Z, Avizur Y, Richmond A (1987) Lipid and biomass production by the halotolerant microalgae *Nannochloropsis salina*. *Biomass* 12:37–47
- Chen LZ, Li DH, Song LR, Hu CX, Wang GH, Liu YD (2006) Effects of salt stress on carbohydrate metabolism in desert soil alga *Micromonas vaginatus*. *J Integr Plant Biol* 48:914–919
- Chini-Zittelli G, Lavista F, Bazzani A, Rodolfi L, Vincenzini M, Trudici M (1999) Production of cis-pentadecenoic acid (EPA) by *Nannochloropsis* sp. cultures in outdoor tubular photobioreactors. *J Biotechnol* 70:299–312
- Chisti Y (2007) Biofuel from microalgae. *Biotechnol Adv* 25:294–306
- Cooney MJ, Young G, Pate R (2011) Bio-oil from photosynthetic microalgae: case study. *Bioresour Technol* 102:166–177
- Cougrove J, Borowitzka MA (2011) Chlorophyll fluorescence terminology: an introduction. In: Suggitt DJ, Prasil O, Borowitzka MA (eds) *Chlorophyll a fluorescence in aquatic cyanococci: methods and applications*. Springer, Dordrecht, pp 1–17
- Gavrilova M, Chisti Y (2005) Biotechnology—a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnol Adv* 23:471–499
- Harley WJ, Major KM, Hironaka JL (2002) Response to salinity and heat stress in two halotolerant chlorophyte algae. *J Phycol* 38:757–766
- Horton P, Ruben A (2005) Molecular design of the photosystem II light-harvesting antenna: photosynthesis and photoprotection. *J Exp Bot* 56:365–373
- Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M, Darzins A (2008) Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J* 54:621–639
- Khazin-Goldberg I, Biggino C, Shoshita E, Cohen Z (2002) Nitrogen starvation induces the accumulation of anshidonic acid in the freshwater alga *Parietochloris incisa* (Tribouxiophyceae). *J Phycol* 38:991–994
- Kromkamp JC, Beardall J, Sukerik A, Kopacký J, Mrazek J, van Bergijk SA, Galbi S, Shaban E, Yarnham A (2009) Short-term variations in photosynthetic parameters of *Nannochloropsis* cultures grown in two types of outdoor mass cultivation systems. *Aquat Microb Ecol* 56:309–322
- Lavaud J, Krath PG (2006) In diatoms, the trans-thylakoid proton gradient regulates the photoprotective non-photochemical fluorescence quenching beyond its control on the xanthophyll cycle. *Plant Cell Physiol* 47:1010–1016
- Lichtenhaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoid pigments of photosynthetic biomembranes. *Method Enzymol* 148:349–382
- Mahajan S, Tuteja N (2005) Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch Biochem Biophys* 444:139–158
- Mishra P, Bajaj A, Mathur S, Bharti S (2010) Chlorophyll a fluorescence study revealing effects of high salt stress on photosystem II in wheat leaves. *Plant Physiol Bioch* 48:16–20
- Pal D, Khazin-Goldberg I, Cohen Z, Bouaoua S (2011) The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. *Appl Microbiol Biotechnol* 90:1429–1441
- Recht L, Zarka A, Bouaoua S (2012) Patterns of carbohydrate and fatty acid changes under nitrogen starvation in the microalgae *Haematococcus pluvialis* and *Nannochloropsis* sp. *Appl Microbiol Biotechnol* 94:1495–1503
- Rodolfi L, Zittelli GC, Bassi N, Padovani G, Biondi N, Bonini G, Trudici MR (2009) Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol Bioeng* 102:100–112
- Srivastava AK, Bhargava P, Thapar R, Rai LC (2005) Salinity-induced physiological and proteomic changes in *Anabaena doliolae*. *Environ Exp Bot* 64:49–57
- Stepien P, Klobus G (2005) Antioxidant defense in the leaves of C3 and C4 plants under salinity stress. *Physiol Plantarum* 125:31–40
- Stepien P, Klobus G (2006) Water relations and photosynthesis in *Cacanthus l. leaves* under salt stress. *Biol Plantarum* 50:610–616
- Su CH, Chien LJ, Gerng J, Lin YS, Yu YK, Liou JS, Syu RJ (2011) Factors affecting lipid accumulation by *Nannochloropsis oculata* in a two-stage cultivation process. *J Appl Phycol* 23:903–905
- Sudhir P, Murthy SDS (2004) Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. *Photosynthetica* 42:481–486
- Sukerik A, Beardall J, Kromkamp JC, Kopacký J, Mrazek J, van Bergijk S, Galbi S, Shaban E, Yarnham A (2009) Photosynthetic performance of outdoor *Nannochloropsis* mass cultures under a wide range of environmental conditions. *Aquat Microb Ecol* 56:297–308
- Sukerik A, Carmeli Y (1990) Lipid synthesis and fatty acid composition in *Nannochloropsis* sp. (*Haematococcus*) grown in a light-dark cycle. *J Phycol* 26:463–469
- Takagi M, Katsuno Yoshida T (2006) Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *J Biosci Bioeng* 101:223–226
- Toranzo G, Bernardini P, Mrazek J (1998) On-line monitoring of chlorophyll fluorescence to assess the extent of photoinhibition of photosynthesis induced by high oxygen concentration and low temperature and its effect on productivity of outdoor cultures of *Spirulina platensis* (Cyanobacteria). *J Phycol* 34:504–510
- Zarka PE, Wood BD, Dye DJ (2010) Considerations for the maximum production rates of triacylglycerol from microalgae. *Biomass Bioeng* 34:145–151