



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

**Tesis Doctora en Biología**

Evaluación del potencial de una cepa nativa de  
*Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 (Eustigmatophyta)  
como fuente de materia prima para la producción de biodiesel

Natalia Soledad Bongiovani

Bahía Blanca

Argentina

2015





**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

**Tesis Doctora en Biología**

Evaluación del potencial de una cepa nativa de  
*Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 (Eustigmatophyta)  
como fuente de materia prima para la producción de biodiesel

Natalia Soledad Bongiovani

Bahía Blanca

Argentina

2015

## **PREFACIO**

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctora en Biología, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia (Dto. BByF - UNS) y del Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS), dependiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), durante el período comprendido entre el 12 de octubre de 2010 y el 10 de Abril de 2015, bajo la dirección de la Dra. Patricia Leonardi (UNS-CERZOS-CONICET) y la Dra. Diana Constenla (UNS-PLAPIQUI-CONICET).

Lic. Natalia Soledad Bongiovani

30 de Junio de 2015

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

## AGRADECIMIENTOS

A mi directora, Dra. Patricia Leonardi, por haberme dirigido en esta tesis, guiarme en mi formación profesional, iniciarme en la investigación y darme la oportunidad de realizar mi doctorado.

A mi codirectora, Dra. Diana Constenla, por haberme codirigido en esta Tesis, por permitirme formar parte de su laboratorio y por su predisposición para enseñarme y guiarme en una gran parte de las técnicas empleadas en esta Tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haberme otorgado la beca para realizar mi doctorado y llevar a cabo la presente Tesis.

A la Dirección del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, de la Universidad Nacional del Sur, y del Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS) por brindarme los medios necesarios y el lugar de trabajo para el desarrollo de esta Tesis.

Al Laboratorio de Alimentos de la Planta Piloto de Ingeniería Química (PLAPIQUI) y Laboratorio de Química Ambiental del Departamento de Química (UNS), donde realicé una parte importante de esta Tesis.

A la Dra. Cecilia Popovich por sus constantes aportes, consejos y sugerencias que no sólo enriquecieron esta Tesis, sino también mi formación y trabajo en el laboratorio a lo largo de estos años, desde mis inicios con la Tesina de grado.

A la Dra. Ana María Martínez, con quien compartimos muchos momentos en el Laboratorio de Química Ambiental, donde desarrollé una gran parte de mi trabajo, por su buena onda y calidez humana y por despertar en mí una química oculta.

A la Dra. María Virginia Sánchez Puerta por haberme recibido cordialmente en su laboratorio, en la Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, donde realicé una parte de esta Tesis y por haberme contagiado en unos pocos días su entusiasmo por la biología molecular.

Al personal del Laboratorio de Genómica Evolutiva, de la Universidad Nacional de Cuyo, por haberme recibido e integrado a sus tareas durante mi corta estadía en él.

Al Dr. Hugo Freije, con quien compartí el tiempo inicial de esta Tesis en el Laboratorio de Química Ambiental, por sus geniales anécdotas y por sus pequeñas grandes sugerencias y consejos.

Al personal del CERZOS, quienes siempre mostraron predisposición para ayudarme y muy especialmente al personal técnico del laboratorio, Jorge y Riqui, quienes han contribuido enormemente con su trabajo y colaboración, para que siempre disponga del material y las cosas necesarias para poder realizar mis ensayos.

Al personal técnico del Laboratorio de Alimentos de PLAPIQUI, Forbito, Clarisa y Federico, quienes me han brindado su ayuda desinteresada, especialmente a Forbito por haber realizado muchísimas inyecciones en el cromatógrafo.

A todos mis compañeros de laboratorio, Romi, la Cone, Vir, Ceci D., Melanie, Lucas y Pao, por hacer más divertidas las horas de oficina y mesada compartidas. Agradezco a Guada y Belén, con quien se inició una buena amistad y quienes saben lo difícil que es muchas veces ser becario.

A mis padres, Horacio y Nora, quienes desde hace años me brindan el apoyo necesario en todo sentido y quienes han sacrificado muchas cosas por nuestra educación.

A mi hermana, Julieta, que es una de las personas sin las que no habría podido terminar esta Tesis, por haberme bancado las infinitas veces que llegué de mal humor, porque siempre está y estará.

A mis amigos, de la infancia, de la carrera, de la vida. Algunos están cerca, otros se han ido más lejos. Pero siempre están.

## RESUMEN

La producción de biodiesel ha crecido durante los últimos años a nivel mundial, en respuesta al paulatino agotamiento de los recursos fósiles y a los efectos ambientales causados por el uso de los combustibles convencionales. Este biocombustible se obtiene a nivel industrial casi en su totalidad a partir de aceites de semillas. Sin embargo, la gran demanda energética, el agotamiento de los suelos y la utilización de semillas para fines alimenticios plantean la necesidad de nuevas fuentes de materia prima alternativa y sustentable. Muchas especies de microalgas, comúnmente denominadas oleaginosas, pueden almacenar altos contenidos de aceites, lo cual las convierte en una fuente potencial para la producción de este biocombustible. Algunas especies del género *Nannochloropsis* han sido propuestas para tal fin debido a su capacidad de acumular altos contenidos de lípidos, particularmente lípidos neutros, los cuales son la materia prima ideal para la producción de biodiesel.

En Argentina, a diferencia de otras energías renovables, las investigaciones en este campo se encuentran en una etapa incipiente. Sobre la base de estos antecedentes, el objetivo general de esta Tesis fue evaluar el potencial de una cepa marina nativa de *Nannochloropsis*, aislada de la costa atlántica sur, como materia prima para la producción de biodiesel. Particularmente, los objetivos específicos fueron: la identificación a nivel de especie de la cepa en estudio a través de su caracterización morfológica y molecular; la optimización de técnicas para la determinación de la densidad celular, la concentración de pigmentos fotosintéticos y el contenido de lípidos neutros en cultivos a escala de laboratorio; el análisis del efecto de distintas condiciones ambientales (temperatura [15°C y 25°C], intensidad de luz [100 y 300  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ] y fotoperiodo [12:12 h y 16:8 h de luz y oscuridad) y de la carencia de nitrógeno sobre parámetros de crecimiento, producción de biomasa y cantidad, productividad y calidad lipídica, con especial énfasis sobre la fracción de los lípidos neutros. Además, se evaluó el crecimiento de la cepa en estudio en un fotobiorreactor columnar de 25L y con un medio de cultivo (SWES) de menor costo que el empleado en experiencias de laboratorio (f/2).

Los estudios morfológicos y ultraestructurales con microscopios óptico y electrónico y el análisis de los genes nuclear y cloroplástico, 18s rADN y *rbcL* respectivamente, permitieron identificar a la cepa en estudio como

*Nannochloropsis oceanica*. La cepa fue depositada en el cepario Culture Collection of Autotrophic Organism (CCALA), República Checa, bajo la denominación *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978.

Se elaboró un modelo estimador de la densidad celular a través de lecturas de densidad óptica, el cual permite monitorear el crecimiento de *N. oceanica* CCALA 978 en forma rápida. Con respecto a la optimización de métodos para la determinación de pigmentos, el metanol asistido con congelado y descongelado rápido fue el método más efectivo para la extracción de clorofila *a* y carotenoides totales. El pre-tratamiento de las células con dimetilsulfóxido 5% y la tinción con el fluorocromo rojo Nilo se presentó como una técnica adecuada para la detección *in situ* de los lípidos neutros por espectrofluorimetría. Asimismo, la relación entre las intensidades de fluorescencia de la clorofila *a* y del rojo Nilo se propone como un índice para la estimación del tiempo de acumulación máxima de los lípidos neutros y consecuentemente, para la determinación del tiempo de cosecha de la biomasa.

El efecto de las variables ambientales sobre los parámetros de crecimiento indicó que a mayor temperatura (25° C), mayor intensidad de luz (300  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) y con un fotoperíodo de 16:8 h L:O, la especie mostró un aumento de la velocidad de crecimiento (0,85  $\text{div d}^{-1}$ ) a escala de laboratorio. Sin embargo, la producción de biomasa (680  $\text{mg L}^{-1}$ ) no se incrementó en respuesta a la intensidad de luz más alta. Bajo las condiciones ambientales testeadas en este estudio, el contenido de lípidos totales (LT) de *N. oceanica* CCALA 978 fue en general alto (24-34%), y esto se debió a una alta proporción de los lípidos neutros (LN), los cuales representaron entre un 82% y 91% de los LT. No obstante, los mayores contenidos lipídicos se obtuvieron, cuando las células crecieron en un medio de cultivo carente de nitrógeno, a ambas intensidades de luz y un fotoperíodo de 16:8 h L:O (LT: 36% peso seco de biomasa [ps] y LN: 32% ps). Bajo estas condiciones, se alcanzaron productividades de LT y LN de 48  $\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  y 43  $\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , respectivamente.

Con respecto a la calidad de los lípidos, los ácidos grasos saturados (AGS) y monoinsaturados (AGM) fueron las clases predominantes dentro de los LN, bajo todas las condiciones testeadas, representando conjuntamente entre el 90-96% de los ácidos grasos totales. Los AGS-LN aumentaron a 25°C, 16:8 h L:O y 300  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , mientras que los AGM-LN disminuyeron en respuesta a estas variables. Los ácidos grasos poliinsaturados (AGP) fueron la fracción minoritaria

en todas las condiciones de cultivo testeadas. La composición de los ácidos grasos fue similar en todas las condiciones de cultivo probadas, tanto en los lípidos totales como en los lípidos neutros, siendo los principales ácidos grasos el ác. palmítico (C16:0), el ác. palmitoleico (C16:1), el ác. oleico (C18:1n9c) y el ác. eicosapentaenoico (C20:5n3). El ácido palmítico fue el componente mayoritario de los AGS, tanto en los LT como en los LN, e incrementó de manera significativa en función de la mayor temperatura, la mayor intensidad lumínica y la mayor duración de las horas de luz empleados. Dentro de los AGM, el ácido palmitoleico fue el más abundante en todas las condiciones de cultivo en los LT y LN. Se observó una disminución significativa con la temperatura más alta empleada (25°C) y la mayor duración de las horas de luz (16:8 h L:O). El ácido eicosapentaenoico fue el principal componente de los AGP en los LT y LN. Sin embargo, sus valores no superaron el 5%.

En relación a los parámetros de calidad del aceite, el índice de Yodo, el número de cetano y el contenido de ácido linolénico estuvieron dentro de los límites establecidos por el estándar de calidad europeo EN14214. Estas características permiten inferir que los aceites de *N. oceanica* CCALA 978 se presentan como una materia prima adecuada para la producción de biodiesel.

En la experiencia de cultivo de *N. oceanica* CCALA 978 en el fotobiorreactor columnar, se obtuvo un crecimiento sostenido de la cepa con el medio SWES, alcanzando 1,11 g L<sup>-1</sup> de biomasa. Sin embargo, la intensidad de luz empleada y el diseño del fotobiorreactor constituyeron un impedimento para maximizar la producción de biomasa.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se concluye que la cepa nativa *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 es una microalga oleaginosa y robusta, y por lo tanto se la puede proponer como una fuente microalgal potencialmente útil de aceites para procesos de producción de biodiesel. Además, la información derivada de este trabajo representa una base para la implementación de nuevas estrategias de cultivos con fines bioenergéticos, tendientes a incrementar la biomasa, los contenidos de lípidos y las productividades lipídicas, condiciones indispensables para lograr un proceso potencialmente rentable.

## ABSTRACT

In recent years, biodiesel production has grown worldwide in response to the gradual depletion of fossil resources and the environmental disturbances caused by the use of conventional fuels. Biodiesel is industrially obtained almost entirely from seed oils. However, the high energy demand, the depletion of soils and the use of seeds for food purposes raise the need for new sources of alternative sustainable feedstocks. Many species of microalgae, called oleaginous, can store high oils contents that turn them into a potential source for the production of biodiesel. Some species of *Nannochloropsis* genus have been proposed for this purpose due to ability to accumulate high lipid contents, in particular neutral lipids, which are considered the ideal feedstock for biodiesel production.

Unlike other renewable energies in Argentina, research in this field is at early stage. Based on this background, the overall objective of this Thesis was to evaluate the potential of a native marine *Nannochloropsis* strain, isolated from the south Atlantic coast, as feedstock for biodiesel production. The specific objectives were followings: identification at specific level of the strain under study by both morphological and molecular characterization; optimization of techniques to determine the cell density, photosynthetic pigments concentration and neutral lipid content at laboratory scale; analysis of the effect of different environmental conditions (temperature [15°C and 25°C], light intensity [100 y 300  $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ] and photoperiod [12:12 h and 16:8 h of light:darkness]) and the nitrogen deprivation on growth, biomass production, lipid quantity, lipid productivity and lipid quality, with special emphasis on the neutral lipids fraction. In addition, the growth of the strain under study was evaluated in a 25L columnar photobioreactor, with a culture medium (SWES) cheaper than the one used in laboratory experiments (f/2).

Both morphological and ultrastructural studies of light and electron microscopes and the analysis of nuclear and chloroplast genes, 18S rDNA and *rbcL* respectively, allowed identifying the strain under study as *Nannochloropsis oceanica*. The strain was deposited in the Culture Collection of Autotrophic Organism, Czech Republic (CCALA) as *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978.

An estimation model for cell density was developed through optical density readings. In this way, the growth of *N. oceanica* 978 CCALA could quickly be

monitored. Regarding methods to determine pigment concentration, methanol assisted with rapid freezing and unfreezing was the most effective method for the extraction of chlorophyll *a* and total carotenoids. Pre-treatment of the cells with 5% dimethyl sulphoxide and the staining with Nile red proved to be a suitable technique for *in situ* detection of the neutral lipids by spectrofluorimetry. Besides, the ratio between the fluorescence intensities of Chlorophyll *a* and Nile red was proposed as an index for the estimation of the maximum neutral lipid accumulation period and, consequently, for the determination of the biomass harvesting time.

The effect of environmental variables on growth parameters indicated that under higher temperature (25°C), higher light intensity (300  $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and a photoperiod of 16:8 h L:D, the species showed increased growth rate (0.85  $\text{div d}^{-1}$ ) at laboratory scale. However, the biomass production (680  $\text{mg L}^{-1}$ ) did not increase in response to higher light intensity. Under environmental conditions tested in this study, the content of total lipids (TL) in *N. oceanica* CCALA 978 was generally high (24-34%). This was due to a high proportion of neutral lipids (NL), which represented between 82% and 91% of TL. However, higher contents were obtained when the cells were grown in a culture medium devoid of nitrogen, at both light intensities and 16:8 h L:D photoperiod (TL: 36% dry weight of biomass [dw] and NL: 32% dw). Under these conditions, the highest productivities of 48  $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$  (TL) and 43  $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$  (NL) were obtained.

Regarding the quality of lipids, under all conditions tested, saturated fatty acids (SFA) and monounsaturated fatty acids (MUFA) were the predominant classes within NL, representing both SFA-NL and MUFA-NL 90-96% of total fatty acids. The SFA-NL increased at 25°C, 16:8 h L:D and 300  $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , while the MUFA-NL decreased in response to these variables. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) were the minority class in all tested culture conditions. For all these tests, the fatty acid composition was similar in both TL and NL, being the major fatty acids following: palmitic (C16:0), palmitoleic (C16:1), oleic (C18:1n9c) and eicosapentaenoic (C20:5n3). Palmitic acid was the major component of the SFA, in both TL and NL, and it significantly increased in response to higher temperature and light intensity and longer daylight hours employed. Within MUFA, palmitoleic acid was the most abundant in the TL and NL in all culture conditions. This fatty acid decreased significantly under the highest temperature (25°C) and the longest daylight hours (16:18 h L:D) employed. Eicosapentaenoic acid was the

main component of PUFA on TL and NL. However, its values did not exceed 5% under all conditions probed.

In regard to oil quality parameters, iodine index, cetane number and content of linolenic acid were within the limits set by European quality standard EN14214. These features allow us to infer that the oils of *N. oceanica* CCALA 978 constitute a suitable feedstock for the production of biodiesel.

Respecting culture experience of *N. oceanica* CCALA 784 in the columnar photobioreactor, sustained growth of the strain was obtained with the SWES medium, reaching 1.11 g L<sup>-1</sup> of biomass. However, both employed light intensity and photobioreactor design were an impediment to maximize biomass production.

According to these results, it is concluded that the native strain of *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 is an oleaginous robust microalga. Therefore, it can be proposed as a potentially useful oil source for biodiesel production processes. In addition, the obtained information represents a basis for the implementation of new strategies for bioenergy cultures, aimed to increase biomass, lipid content and lipid productivities, which are requisites to achieve a potentially profitable process.

## ESTRUCTURA DE LA TESIS

En el **Capítulo 1** se realiza una introducción general del tema a desarrollar, mediante una breve descripción de la situación energética global, poniendo especial énfasis en el creciente interés mundial por las energías alternativas y renovables, y particularmente en la bioenergía y el biodiesel de tercera generación a partir de microalgas. Se introducen las características generales de las microalgas y la importancia y principales ventajas de las microalgas oleinosas como materia prima para la producción de biodiesel. Además, se describe la importancia del género *Nannochloropsis* como potencial fuente de materia prima para la obtención de este biocombustible. Finalmente, se plantean el objetivo general y los objetivos específicos de esta Tesis. Las hipótesis de trabajo se detallan en cada capítulo según corresponda.

En el **Capítulo 2** se detallan los materiales y métodos comunes al desarrollo integral de la Tesis. Los protocolos y procedimientos específicos, así como los análisis estadísticos abordados en cada capítulo, se describen en cada uno de ellos según corresponda.

En el **Capítulo 3** se lleva a cabo la identificación a nivel específico de la cepa nativa de *Nannochloropsis* en estudio. Primero se realiza una caracterización morfológica y ultraestructural mediante las técnicas convencionales de microscopía óptica y electrónica de transmisión. Luego, se efectúa la identificación de la cepa a nivel molecular mediante el análisis de los genes nuclear y cloroplástico, 18Sr ADN y *rbcL*, respectivamente.

En el **Capítulo 4** se describen y analizan diferentes métodos para la estimación rápida de la densidad celular, la extracción y determinación del contenido de los pigmentos fotosintéticos y la detección y cuantificación *in situ* de los lípidos neutros en *N. oceanica* CCALA 978.

En el **Capítulo 5** se evalúan los efectos de diferentes condiciones ambientales (temperatura, intensidad de luz y fotoperíodo) y de la carencia de nitrógeno sobre la velocidad de crecimiento, el contenido de pigmentos fotosintéticos y la producción y productividad de biomasa en *N. oceanica* CCALA 978. Además, se

evalúa el efecto de estas variables sobre el contenido de lípidos totales y las fracciones lipídicas, las productividades de lípidos totales y lípidos neutros y la composición de los ácidos grasos. Por último, se infieren las propiedades del biodiesel a partir de la composición de los ácidos grasos de la fracción de lípidos neutros en base a los estándares internacionales de calidad.

En el **Capítulo 6** se realiza una experiencia de cultivo de *N. oceanica* CCALA 978 en un fotobiorreactor columnar de 25 L de capacidad con un medio de cultivo de menor costo que el empleado en experiencias de laboratorio. Se analizan el crecimiento y la producción y productividad de biomasa. Además, se evalúan los contenidos de lípidos totales y las distintas fracciones lipídicas, así como también la composición de los ácidos grasos, con énfasis en la fracción de lípidos neutros.

Finalmente, se presentan las **Conclusiones Generales** donde se destacan los hallazgos más relevantes y se plantean estudios futuros, que se desprenden de los resultados y los nuevos interrogantes surgidos a lo largo de la Tesis.

## ÍNDICE

<b>Agradecimientos</b> .....	I
<b>Prefacio</b> .....	II
<b>Resumen</b> .....	IV
<b>Abstract</b> .....	VII
<b>Estructura de la Tesis</b> .....	X
<b>Capítulo 1 – Introducción General</b> .....	1
1.1 Situación energética global .....	1
1.2 Bioenergía y Biocombustibles .....	3
1.2.1 Biocombustibles de primera generación .....	5
1.2.2 Biocombustibles de segunda generación .....	6
1.2.3 Biocombustibles de tercera generación .....	7
1.3 Biodiesel .....	8
1.4 Microalgas como fuente de materia prima para la producción de biodiesel..	9
1.5 <i>Nannochloropsis</i> como especie modelo para la producción de biodiesel ...	13
Objetivos .....	14
Objetivo General .....	14
Objetivos Específicos.....	15
<b>Capítulo 2 – Materiales y Métodos</b> .....	16
2.1 Material de estudio.....	16
2.2 Acondicionamiento del material de laboratorio .....	16
2.3 Preparación de medios de cultivo .....	16
2.3.2 Preparación de medio SWES .....	18
2.4 Mantenimiento de cultivos stock .....	19
2.5 Escalado de cultivos .....	20
<b>Capítulo 3 – Caracterización morfológica y molecular de la cepa nativa de <i>Nannochloropsis</i> en estudio</b> .....	22
3.1 Introducción .....	22
3.2 Materiales y Métodos .....	24
Caracterización morfológica .....	24
3.2.1 Condiciones de cultivo .....	24
3.2.2 Estudio con microscopio óptico.....	24
3.2.3 Estudio con microscopio electrónico de transmisión (MET).....	24
3.2.4 Estudio con microscopio confocal.....	25

3.2.5 Extracción y cuantificación de pigmentos .....	25
Caracterización molecular y análisis filogenético.....	25
3.2.6 Condiciones de cultivo .....	26
3.2.7 Identificación Molecular .....	26
3.2.7.1 Extracción de ADN.....	26
3.2.7.2 Selección de primers .....	28
3.2.7.3 Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	28
3.2.7.4 Electroforesis en gel de agarosa.....	29
3.2.7.5 Secuenciación de los productos 18S rADN y <i>rbcL</i> .....	29
3.2.7.6 Búsqueda de secuencias de nucleótidos .....	29
3.2.7.7 Análisis filogenético y construcción de árboles filogenéticos .....	31
3.3. Resultados .....	31
Caracterización morfológica .....	31
3.3.1 Estudio con microscopio óptico.....	31
3.3.2 Estudio con microscopio electrónico de transmisión (MET).....	34
3.3.3 Estudio con microscopio confocal.....	35
Caracterización molecular y análisis filogenético.....	36
3.4 Discusión .....	42
3.5 Conclusiones.....	45
Anexo.....	46

<b>Capítulo 4 – Optimización de métodos para determinar la densidad celular, el contenido de pigmentos fotosintéticos y los lípidos neutros en <i>Nannochloropsis oceanica</i> CCALA 978 .....</b>	<b>51</b>
4.1 Introducción .....	51
4.2 Materiales y Métodos .....	55
4.2.1 Condiciones de cultivo .....	55
4.2.2 Estimador de densidad celular.....	55
4.2.2.1 Obtención de diluciones.....	55
4.2.2.2 Estimación de la densidad celular con cámara de recuento .....	56
4.2.2.3 Estimación de la densidad óptica con espectrofotómetro .....	56
4.2.2.4 Validación del modelo empleado como estimador de la densidad celular .....	57
4.2.3 Optimización de métodos de extracción de pigmentos.....	57
4.2.3.1 Análisis de los métodos de extracción de pigmentos.....	57
4.2.3.2 Análisis estadístico .....	58

Optimización de métodos espectrofluorométricos para la determinación <i>in situ</i> del contenido de lípidos neutros y la detección simultánea de clorofila <i>a</i> .....	59
4.2.4 Medición <i>in vivo</i> de clorofila <i>a</i> .....	59
4.2.5 Optimización de métodos de tinción con rojo Nilo .....	59
4.2.5.1 Mediciones de intensidad de fluorescencia .....	59
4.2.5.2 Optimización del tiempo de incubación con rojo Nilo.....	60
4.2.5.3 Pre-tratamientos .....	60
4.3.1 Modelo estimador de densidad celular .....	61
4.3.2 Optimización de métodos para la extracción de pigmentos.....	62
4.3.3 Optimización de los métodos fluorimétricos para la determinación simultánea de lípidos neutros y clorofila <i>a</i> .....	63
4.3.3.1 Espectro de fluorescencia.....	63
4.3.3.2 Optimización del tiempo.....	64
4.3.3.3 Optimización de los métodos de pre-tratamiento.....	64
4.3.4 Evaluación del estado del cultivo mediante la aplicación de los métodos seleccionados .....	66
4.4 Discusión .....	67
4.5 Conclusiones.....	71
<b>Capítulo 5 –Evaluación del crecimiento, la biomasa, el contenido y la productividad de lípidos en <i>Nannochloropsis oceanica</i> CCALA 978 bajo diferentes condiciones ambientales y carencia de nitrógeno.....</b>	<b>72</b>
5.1 Introducción .....	72
5.1.1 Lípidos .....	73
5.1.2 Factores físicos y químicos que afectan el crecimiento y la producción de lípidos en el género <i>Nannochloropsis</i> .....	75
5.1.2.1 Temperatura .....	76
5.1.2.3 Fotoperíodo .....	78
5.1.2.4 Deficiencia de nitrógeno .....	78
5.2 Materiales y Métodos .....	80
5.2.1 Metodología experimental.....	80
5.2.2 Condiciones experimentales de cultivo.....	83
5.2.2.2 Efecto de la intensidad de luz .....	84
5.2.2.3 Efecto de la carencia de nitrógeno y de la intensidad de luz .....	84
5.2.3 Cuantificación de la velocidad de crecimiento, producción y productividad de biomasa .....	85
5.2.3.1 Determinación de la velocidad de crecimiento.....	85

5.2.3.2 Determinación de biomasa .....	85
5.2.3.3 Productividad de biomasa.....	86
5.2.4 Determinación del contenido de pigmentos .....	86
Análisis lipídico .....	86
5.2.6 Detección de lípidos neutros mediante espectrofluorimetría .....	86
5.2.7 Extracción, fraccionamiento de lípidos totales y caracterización del perfil de ácidos grasos.....	87
5.2.7.1 Extracción de lípidos totales .....	87
5.2.7.2 Fraccionamiento de lípidos totales en lípidos neutros, glicolípidos y fosfolípidos.....	88
5.2.7.3 Determinación del perfil de los ácidos grasos.....	88
5.2.8 Productividad lipídica .....	89
5.2.9 Evaluación de la calidad de los aceites para la producción de biodiesel .....	90
5.2.10 Análisis estadístico .....	91
5.4 Resultados .....	91
5.4.1 Crecimiento, biomasa y contenido de lípidos en <i>N. oceanica</i> CCALA .....	978
.....	91
5.4.1.1 Efecto de la temperatura y el fotoperiodo .....	91
Velocidad de crecimiento, producción y productividad de biomasa y cinética de pigmentos fotosintéticos .....	91
Mediciones <i>in situ</i> por fluorimetría de lípidos neutros y de clorofila <i>a</i> .....	94
Contenido de lípidos totales y de las fracciones lipídicas y productividad lipídica.....	95
5.4.1.2 Efecto de la intensidad de luz .....	97
Velocidad de crecimiento, producción y productividad de biomasa y contenido de pigmentos fotosintéticos .....	97
Mediciones <i>in situ</i> por fluorimetría de lípidos neutros y de clorofila <i>a</i> .....	99
Contenido de lípidos totales y de las fracciones lipídicas y productividad lipídica.....	100
5.4.1.3 Efecto de la carencia de nitrógeno y de la intensidad de luz .....	102
Velocidad de crecimiento, producción y productividad de biomasa y contenido de pigmentos fotosintéticos .....	102
Mediciones <i>in situ</i> por fluorimetría de los lípidos neutros y de la clorofila <i>a</i> .....	104
Contenido de lípidos totales y de las fracciones lipídicas y productividad lipídica.....	105

5.4.2 Efecto de las diferentes condiciones ambientales y la carencia de nitrógeno sobre la composición de los ácidos grasos en <i>N. oceanica</i> CCALA 978.....	106
5.4.3 Calidad del biodiesel inferida a partir de la composición de los ácidos grasos de los aceites obtenidos.....	113
5.4 Discusión .....	114
Crecimiento, producción y productividad de biomasa, contenido de lípidos y productividad lipídica en <i>N. oceanica</i> CCALA 978.....	114
Composición de ácidos grasos en <i>N. oceanica</i> CCALA 978 bajo diferentes condiciones de cultivo.....	123
5.5 Conclusiones.....	128
Anexo.....	131
<b>Capítulo 6 – Cultivo de <i>Nannochloropsis oceanica</i> CCALA 978 en fotobiorreactor</b> .....	139
6.1 Introducción .....	139
6.2 Materiales y métodos .....	141
6.2.1 Fotobiorreactor.....	141
6.2.2 Obtención del inóculo .....	142
6.2.3 Cultivo en fotobiorreactor.....	142
6.2.4 Toma de muestras .....	143
6.2.5 Cosecha de biomasa .....	143
6.2.6 Cuantificación de la velocidad de crecimiento, la producción y productividad de biomasa .....	144
6.2.7 Cuantificación de nitratos disueltos.....	144
6.2.5 Análisis lipídico .....	144
6.3 Resultados .....	144
6.3.1 Crecimiento, producción y productividad de biomasa, contenido de clorofila y cinética del consumo de nitrógeno .....	144
6.3.2 Cinética de acumulación de lípidos neutros.....	146
6.3.3 Contenido de lípidos totales y fracciones lipídicas.....	147
6.3.4 Composición de los ácidos grasos.....	148
6.5 Discusión .....	149
6.6 Conclusiones.....	152
Anexo .....	154
<b>Síntesis y Conclusiones Generales</b> .....	156
<b>Referencias</b> .....	159

<b>Listado de publicaciones y presentaciones a congresos derivadas de esta Tesis .....</b>	<b>174</b>
--	------------

# Capítulo 1 – Introducción General

---

## 1.1 Situación energética global

La energía cumple un papel primordial en la vida del hombre (Demirbas y Demirbas 2010). La sociedad requiere de energía tanto para satisfacer sus necesidades básicas (luz, calefacción, alimentación, comunicación, transporte) como para llevar a cabo diferentes procesos, a partir de los cuales se genera la enorme variedad de productos consumidos por el hombre. Además, es vital para el desarrollo socioeconómico de cualquier país (Demirbas y Demirbas 2010).

De acuerdo con la Agencia de Información de Energía (EIA, por sus siglas en inglés), el mundo necesitará aproximadamente un 60% más de energía en el 2040 (Fig. 1.1 A) (World Energy Outlook 2013). Las estimaciones futuras de incremento de la población mundial, la progresiva industrialización y el continuo aumento del transporte son los principales factores que contribuirán a esta creciente demanda energética (World Energy Outlook 2013).

Así, uno de los grandes desafíos que enfrenta la humanidad es la búsqueda y el desarrollo de nuevas fuentes de energías renovables, amigables con el medio ambiente, rentables y capaces de complementar a los recursos fósiles ya existentes y así poder suplir la futura demanda energética (Demirbas 2009).

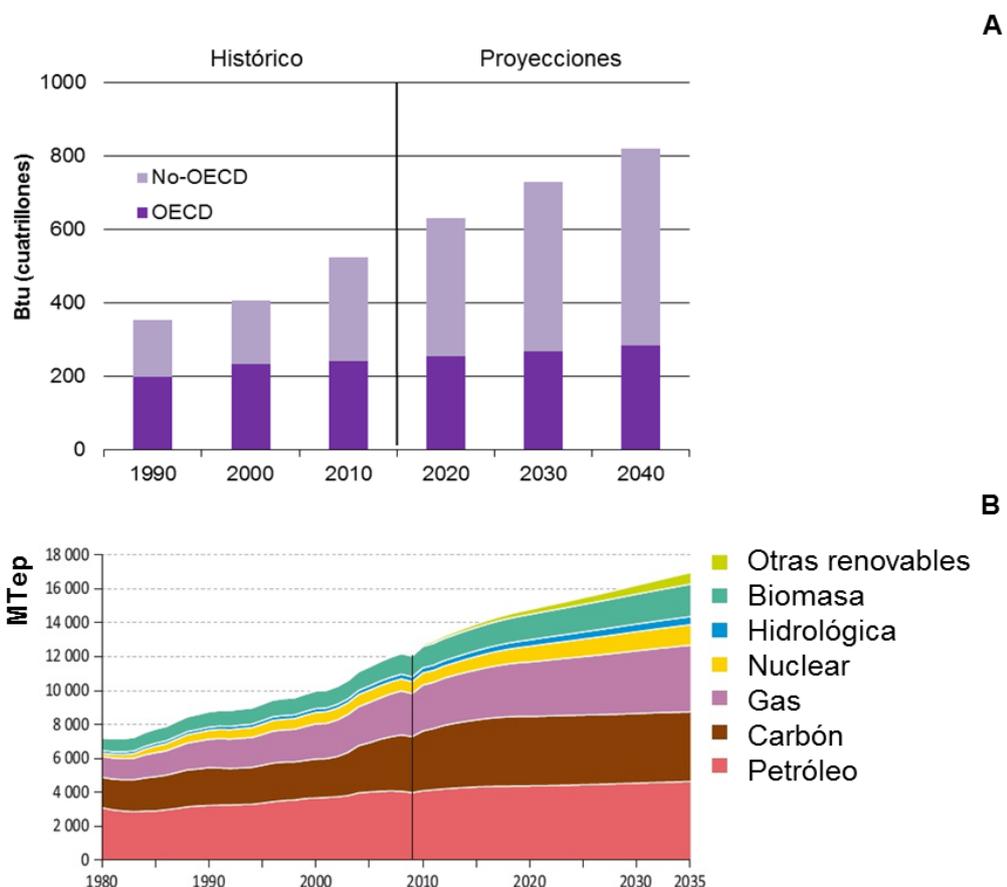
Además de los factores mencionados anteriormente, la disminución de las reservas de combustibles fósiles y el incremento de sus precios, han impulsado activamente la búsqueda de fuentes de energía alternativas (Schenk *et al.* 2008; Brennan y Owende 2010; Mata *et al.* 2010).

Junto con el paulatino agotamiento de las reservas de petróleo, otro problema a nivel mundial que incentiva la búsqueda de nuevos recursos energéticos, es el incremento de las emisiones de gases de efecto invernadero, responsable del conocido cambio climático global (Naik *et al.* 2010). La quema de combustibles fósiles, particularmente petróleo, representa el principal contribuyente al incremento de los niveles de dióxido de carbono en la atmósfera (Salomon *et al.* 2007).

En la actualidad, la demanda energética mundial es cubierta en gran parte por la explotación y producción de combustibles fósiles no renovables, como el

carbón, el petróleo y el gas natural. Los combustibles fósiles representan alrededor del 86,9 % de la energía primaria consumida, con el petróleo abarcando un 33,1% del total, el carbón, un 29,9% y el gas natural un 23,9%; mientras que las energías renovables, representan un 13,1% del consumo total energético (BP Annual Review 2013). Particularmente, se estima que la demanda global de energías renovables, incluyendo la biomasa tradicional, se incremente el doble hacia el año 2035 (World Energy Outlook 2012) (Fig. 1.1 B).

En la actualidad, muchas fuentes de energías alternativas están siendo estudiadas e implementadas con distinto grado de éxito, no sólo con el objeto de mejorar la eficiencia de los procesos ya existentes, sino también orientado a la búsqueda y el desarrollo de nuevas tecnologías. Dentro de las energías renovables se encuentran la energía solar (térmica y fotovoltaica), eólica, hidroeléctrica, geotérmica, mareomotriz y la bioenergía (Demirbas *et al.* 2009; Jacobson 2009; Mata *et al.* 2010).



**Figura 1.1: A)** Demanda mundial de energía total y la proyección de consumo futura. OECD: Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo. **B)** Perspectivas futuras del crecimiento de las energías renovables (MTep: Millones de toneladas equivalentes de petróleo). Fuente: Annual Energy Review, EE.UU Energy Information Administration (2011); World Energy Outlook, International Energy Agency (2011, 2012).

## 1.2 Bioenergía y Biocombustibles

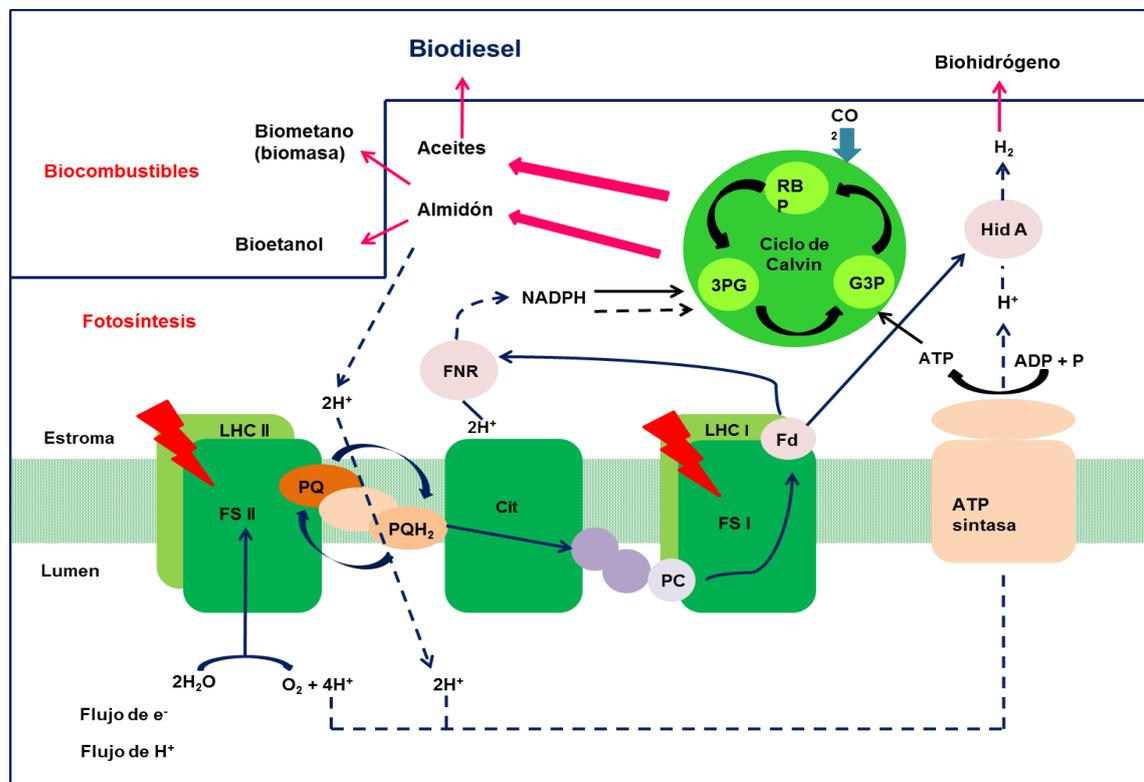
Como se mencionó anteriormente, el suministro de energías renovables es uno de los principales desafíos que se deberá enfrentar en las próximas décadas. Frente a esta problemática, la búsqueda de energías limpias y sustentables se ha intensificado de manera notable en estos últimos años.

Particularmente, la bioenergía se presenta como uno de los mayores recursos de energía renovable, ya que tiene un enorme potencial global de explotación y expansión para la producción de calor, electricidad y combustibles para el transporte. Además, presenta numerosos beneficios ambientales y socio-económicos, contribuyendo así, a la mitigación de los gases de efecto invernadero, a la seguridad energética, al desarrollo de economías rurales y a la gestión de recursos y residuos (IEA Bioenergy 2009).

El término bioenergía se aplica a la energía obtenida a partir de diferentes recursos biomásicos o materias primas de naturaleza orgánica. Ejemplos de estos recursos son la madera y sus residuos, los cultivos agrícolas y forestales y los residuos derivados de éstos, los residuos ganaderos, la materia orgánica proveniente de residuos sólidos municipales y otros residuos orgánicos, los residuos derivados del procesamiento de alimentos, así como también las plantas acuáticas y algas (Demirbas *et al.* 2009). A través de una gran variedad de procesos, estas materias primas pueden ser transformadas y empleadas para producir electricidad o calor o para producir combustibles líquidos, sólidos o gaseosos (Nigam y Singh 2011).

Los biocombustibles provienen de la biomasa vegetal o animal y también de residuos orgánicos. La principal ventaja de los biocombustibles es su capacidad de poder regenerarse en forma natural o artificial en cortos períodos de tiempo. Además, los biocombustibles de origen vegetal colaboran mitigando el efecto invernadero, ya que el dióxido de carbono liberado en el procesamiento de los combustibles fósiles y por las industrias es utilizado por las plantas y las microalgas (Chisti 2007, 2008; Durrett *et al.* 2008). Muchos de los productos originados a partir de la fotosíntesis y en procesos metabólicos específicos representan la materia prima a partir de la cual se pueden generar biocombustibles (Schenk *et al.* 2008) (Fig. 1.2). Así, el flujo de protones y electrones que se genera a través de la membrana tilacoidal se puede aprovechar para la producción de biohidrógeno, los azúcares y el almidón producidos para la

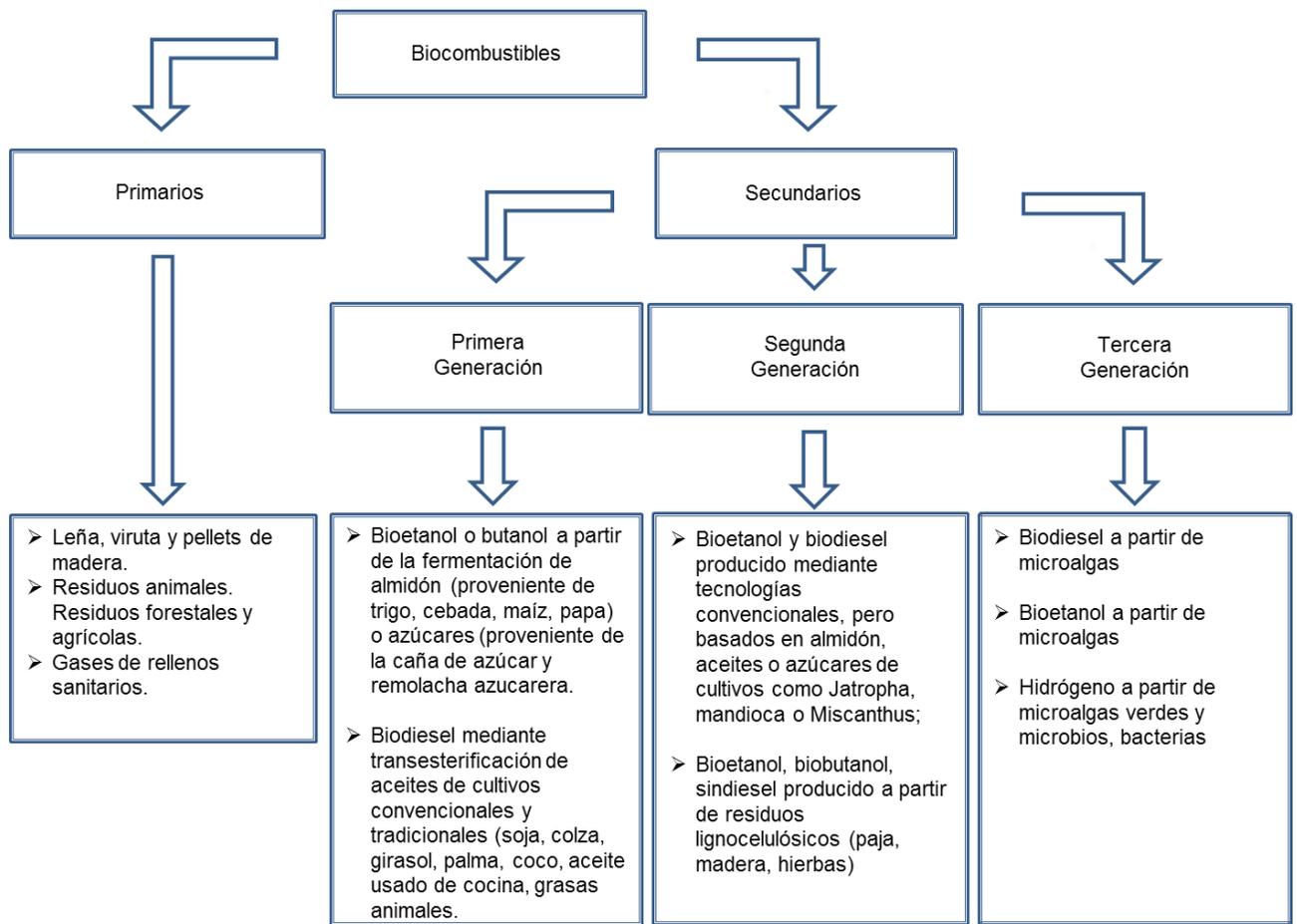
obtención bioetanol, los lípidos para la generación de biodiesel y la biomasa restante para la producción de biogás o biometano (Hankamer *et al.* 2007; Brennan y Owende 2010; Costa y de Morais 2011).



**Figura 1.2:** Vías potenciales de producción de materias primas para la obtención de biocombustibles a partir de la fotosíntesis. Adaptado de Schenk *et al.* (2008).

Los biocombustibles pueden ser sólidos (carbón vegetal, pellets de madera), líquidos (bioetanol y biodiesel) o gaseosos (biometano). En la Figura 1.3 se observa una clasificación general en primarios y secundarios (Nigam y Singh 2011).

Los biocombustibles primarios son aquellos empleados directamente como formas no procesadas. Ejemplos de éstos son la leña, las astillas y los pellets de madera. Mientras que los biocombustibles secundarios son producidos a partir del procesamiento de diferentes recursos de biomasa. Éstos últimos a su vez pueden ser clasificados como biocombustibles de primera, segunda y tercera generación en función del tipo de materia prima empleada, su nivel de desarrollo o el tipo de tecnología aplicada en su procesamiento (Nigam y Singh 2011) (Fig. 1.3).



**Figura 1.3:** Clasificación de los biocombustibles. Adaptado de Nigam y Singh (2011).

### 1.2.1 Biocombustibles de primera generación

Los biocombustibles de primera generación son aquellos producidos a partir de materias primas provenientes de cultivos agrícolas destinados a la alimentación, muchos de ellos *comodities* mundiales (Demirbas 2010; Ahmad *et al.* 2011; Bashkar *et al.* 2011; Nigam y Singh 2011). Los principales biocombustibles de primera generación son el biodiesel y el bioetanol. El biodiesel es obtenido mediante transesterificación de aceites, a partir de materias primas convencionales como la soja, el girasol, la colza, entre otros (Naik *et al.* 2011, Nigam y Singh 2011). Por su parte, el bioetanol es producido mediante fermentación de los azúcares del maíz, la caña de azúcar, la remolacha azucarera, el trigo, la cebada, entre otros (de Vries *et al.* 2010; Dragone *et al.* 2010; Bashkar *et al.* 2011).

El empleo de biocombustibles de primera generación presenta varias limitaciones relacionadas con varios factores: la utilización de materias primas

alimenticias (por ejemplo, más del 95% del biodiesel de primera generación se obtiene a partir de aceites comestibles como la soja), la continuidad de disponibilidad de materias primas, la demanda y uso de grandes áreas de tierras cultivables y el impacto medioambiental que esto genera sobre la biodiversidad, la deforestación, la transformación de ecosistemas naturales, el establecimiento de monocultivos y la degradación y erosión de suelos (Wilcove y Koh 2010; Naik *et al.* 2011).

## 1.2.2 Biocombustibles de segunda generación

Los biocombustibles de segunda generación son aquellos producidos a partir de materias primas no comestibles. Estas constituyen la mayor parte de los productos económicos, abundantes y no alimenticios (Bhaskar *et al.* 2011; Naik *et al.* 2011) y reducen la dependencia de los aceites comestibles (Ahmad *et al.* 2011). Ejemplos de estos son las materias primas lignocelulósicas derivadas de los residuos de la agricultura o industria forestal, como la madera, los tallos, las cáscaras de los cultivos, ramas, cortezas, hojas, entre otros (Gómez *et al.* 2008; Sims *et al.* 2010). Además, en los últimos años se han intensificado los estudios en la producción de biocombustibles de segunda generación a partir de plantas, como por ejemplo la *Jatropha*, jojoba, mandioca, *Miscanthus*, semillas de tabaco, entre otras (Pramanik *et al.* 2003; Usta 2005; Canoira *et al.* 2006; Emil *et al.* 2009; Balat 2011; Singh y Singh 2011; Atabani *et al.* 2013; Ong *et al.* 2013).

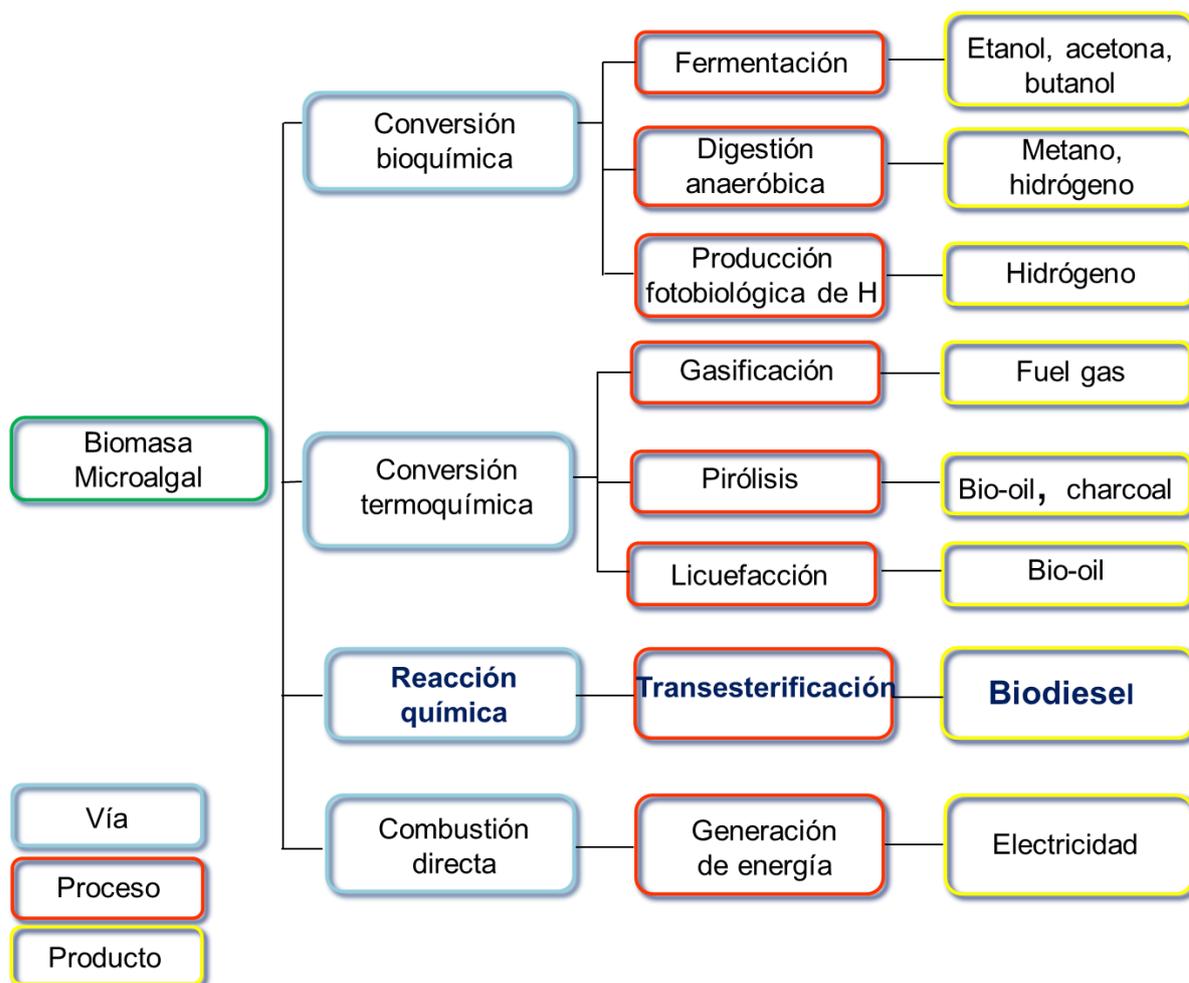
El aumento de las críticas respecto de la sostenibilidad de muchos biocombustibles de primera generación ha incrementado la atención en los de segunda generación, debido a varias ventajas que estos presentan (Naik *et al.* 2011). Dependiendo de la selección de las materias primas y técnicas de cultivo, la producción de estos biocombustibles tiene el potencial de proporcionar beneficios tales como el consumo de residuos de desecho de determinadas actividades agrícolas e industriales y el uso de tierras abandonadas o no destinadas a cultivos comestibles (Naik *et al.* 2011). Además, los aceites derivados de estos cultivos muchas veces no son aptos para el consumo humano, debido a la presencia de componentes tóxicos en ellos; son ambientalmente más amigables respecto de los biocombustibles de primera generación; y permiten obtener subproductos que pueden ser aprovechados en otros procesos químicos o quemados para generar calor y electricidad (Ahmad *et al.* 2011).

Sin embargo, una de sus principales desventajas es que la producción de biocombustibles a partir de estas materias primas puede satisfacer una pequeña proporción de la demanda creciente de los combustibles líquidos (Ahmad *et al.* 2011; Naik *et al.* 2011).

### **1.2.3 Biocombustibles de tercera generación**

Los biocombustibles de tercera generación son aquellos producidos a partir de recursos derivados de biomasa microalgal y de otros microorganismos (Schenk *et al.* 2008; Dragone *et al.* 2010). Este tipo de biocombustible es considerado en la actualidad como una de las alternativas potenciales, ya que presenta ventajas respecto de los biocombustibles de primera y segunda generación (Chisti 2007, 2008; Nigam y Singh 2011).

La biomasa microalgal puede ser convertida en biocombustibles a través de diferentes procesos (Brennan y Owende 2010; Dragone *et al.* 2010). Los procesos involucrados en el tratamiento de la biomasa microalgal son similares a los empleados para la biomasa terrestre y dependen en gran medida de los tipos y fuentes de biomasa, las opciones de conservación y el uso final del producto (McKendry 2002). Los mismos se separan en cuatro grandes grupos: conversión bioquímica, conversión termoquímica, reacción química y combustión directa. En la Figura 1.4 se observan resumidamente los diferentes procesos de conversión empleados dentro de esos cuatro grupos y sus respectivos productos: fermentación (Hirano *et al.* 1997), digestión anaeróbica (Sialve *et al.* 2009), producción fotobiológica de hidrógeno (Benemann 2000; Ghirardi *et al.* 2000), gasificación (Minowa y Sawayama 1999), pirólisis (Miao *et al.* 2004), licuefacción termoquímica (Dote *et al.* 1994; Minowa *et al.* 1999), transesterificación (Umdu *et al.* 2009) y combustión directa (Kadam 2002).

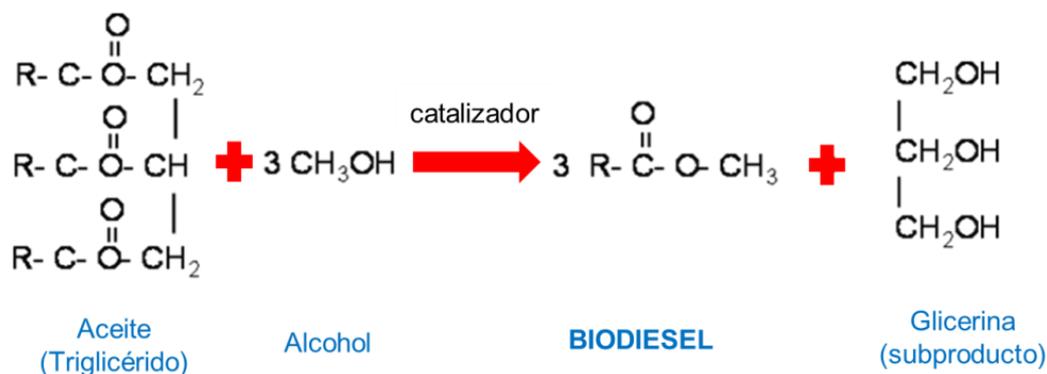


**Figura 1.4:** Procesos de obtención de biocombustibles a partir de biomasa microalgal. Modificado a partir de Wang *et al.* (2008).

### 1.3 Biodiesel

El biodiesel se presenta como la principal alternativa a los combustibles fósiles. Éste es un equivalente al diesel o gasoil convencional.

Químicamente, el biodiesel se define como monoalquil-ésteres derivados de aceites vegetales o grasas animales y se obtiene a partir de un proceso químico denominado transesterificación (Knothe 2005). La transesterificación es una reacción reversible que ocurre entre triglicéridos y un alcohol de cadena corta, en presencia de un catalizador (ácido ó básico), para producir alquil-ésteres de ácidos grasos (biodiesel) y glicerol como subproducto (Fig. 1.5). En este proceso se mantiene la composición de los ácidos grasos presentes en la materia prima, por lo tanto el perfil de los ésteres de ácidos grasos formado durante la transesterificación es un reflejo de la composición de la materia prima empleada (Lang *et al.* 2001; Ramos *et al.* 2009).



**Figura 1.5:** Reacción de transesterificación.

El biodiesel es un biocombustible que presenta varias ventajas con respecto al combustible fósil: 1) es renovable y biodegradable, con una toxicidad mínima; 2) es ambientalmente amigable, ya que contribuye a la reducción de las emisiones de dióxido de carbono debido a su ciclo de carbono cerrado; 3) durante su combustión produce menos emisiones nocivas de sulfuros, hidrocarburos aromáticos, partículas de hollín y otras sustancias nocivas para el medioambiente; 4) posee propiedades lubricantes que reducen el desgaste de los motores; 5) puede usarse en motores convencionales diesel operando con pocas o ninguna modificación; 6) puede mezclarse con el diesel convencional a diferentes niveles de corte; 7) es mejor que el gasoil convencional en términos de su perfil más bajo de combustión; y 8) puede proporcionar una mejor combustión debido a su alto contenido de oxígeno (Demirbas 2009; Balat y Balat 2010; Ahmad *et al.* 2011; Mutanda *et al.* 2011).

## 1.4 Microalgas como fuente de materia prima para la producción de biodiesel

Las algas son los principales productores primarios y forman un grupo diverso de organismos fotosintéticos que habitan numerosos ecosistemas (Lee 2008). Se caracterizan por presentar rutas metabólicas semejantes a las de las plantas superiores, como la fotosíntesis oxigénica y la síntesis y acumulación de una gran variedad de compuestos orgánicos (Sheehan *et al.* 1998; Li *et al.* 2008).

Particularmente, las microalgas son organismos microscópicos (de 2-200  $\mu\text{m}$ ), procariotas o eucariotas que pueden crecer rápidamente y pueden vivir bajo una gran variedad de condiciones debido a su estructura unicelular o colonial.

Habitán en ambientes acuáticos, marinos, salobres o dulceacuícolas (Lee 2008). Debido a que se encuentran en ambientes sumergidos, pueden aprovechar de manera eficiente el agua, el CO<sub>2</sub> y los nutrientes disponibles (Falcowski y Raven 1997). Las microalgas producen naturalmente lípidos, carbohidratos y proteínas, así como también otros compuestos a través de diversos procesos metabólicos (Hu *et al.* 2008).

Además, muchos de estos microorganismos fotosintéticos presentan un enorme potencial de aplicación en la industria alimentaria, nutracéutica, farmacéutica, cosmética y en salud humana, debido a su capacidad de generar productos de alto valor agregado (Borowitzka 2013a; Borowitzka y Moheimani 2013). Algunos ejemplos de estos productos son los carotenoides, ácidos grasos polinsaturados de cadena larga, ficobilinas, esteroides, polisacáridos, compuestos bioactivos, colorantes, suplementos nutricionales y alimenticios (Borowitzka 2013b; Leu y Boussiba 2014).

En los últimos años las microalgas también han recibido considerable atención en el sector energético (Borowitzka 2010), como una fuente alternativa de biodiesel, debido a varias ventajas competitivas respecto de los cultivos terrestres (Chisti 2007; Li *et al.* 2008; Mata *et al.* 2010):

- ✓ Tienen tasas de crecimiento relativamente altas (presentan tiempos de duplicación cortos de hasta 3 h) y altos contenidos de lípidos (20-65% de peso seco de biomasa) (Sporaloe *et al.* 2006; Chisti 2007). Estas tasas de crecimiento altas le confieren a las microalgas mayores productividades de biomasa y lipídicas que las plantas superiores;
- ✓ Poseen una eficiencia alta de conversión de la energía lumínica en compuestos orgánicos a través de la fotosíntesis (3-8% versus 0,5% de las plantas superiores);
- ✓ Presentan una capacidad alta para tomar CO<sub>2</sub>. Por lo tanto, debido a esta capacidad de absorber grandes cantidades de CO<sub>2</sub>, las microalgas son consideradas un recurso potencial para mantener y mejorar la calidad del aire, contribuyendo así a la mitigación del efecto invernadero (Chisti 2007);
- ✓ Pueden ser cultivadas en tierras no aptas para cultivos agrícolas, como por ejemplo las áreas áridas y desérticas o las planicies de mareas o costeras, no compitiendo por tierras arables y cultivables destinadas a cultivos alimenticios (Searchinger *et al.* 2008);

- ✓ Las especies de microalgas eurihalinas tienen la capacidad de crecer en ambientes salinos, representando una gran ventaja, ya que no compiten por los recursos dulceacuícolas (Sheehan *et al.* 1998);
- ✓ Pueden aprovechar para su crecimiento los nutrientes (nitrógeno y fósforo) disueltos en aguas residuales, actuando a la vez como biorremediadores (Cantrell *et al.* 2008);
- ✓ El cultivo de microalgas no requiere de la aplicación de pesticidas y herbicidas, por lo tanto presentan mínimo impacto ambiental respecto a otras formas de obtención de materia prima para la producción de biodiesel (Rodolfi *et al.* 2009).

A nivel mundial, numerosas investigaciones sugieren a las microalgas como un recurso de biomasa alternativo y potencial para la producción de biodiesel de tercera generación, que puede complementar o eventualmente reemplazar a los combustibles fósiles (Chisti 2007; Schenk *et al.* 2008; Demirbas y Demirbas 2010; Ahmad *et al.* 2011). La importancia como materia prima para la producción de biodiesel radica en el aprovechamiento de los lípidos que producen estos microorganismos.

Todas las microalgas producen lípidos como resultado de los procesos metabólicos. Sin embargo, la cantidad y tipo de lípidos que producen es especie-específica, es decir varía entre las especies y además es dependiente de las condiciones ambientales y de las estrategias de cultivo (Hu *et al.* 2008). Las microalgas denominadas oleaginosas tienen la capacidad de sintetizar altos contenidos de lípidos, particularmente lípidos neutros. Dentro de éstos, los triglicéridos o TAG, son considerados la materia prima ideal para la producción de biodiesel (Hu *et al.* 2008).

La cantidad de lípidos puede ser incrementada mediante la manipulación de las condiciones ambientales y de las estrategias llevadas a cabo para cultivar una determinada especie. Dentro de estas condiciones se incluyen la deficiencia de nitrógeno (Weldy y Huesemann 2007; Ordog *et al.* 2012; Popovich *et al.* 2012; Damiani *et al.* 2014), la deficiencia de fósforo (Khozin-Goldberg y Cohen 2006), la intensidad lumínica alta (Damiani *et al.* 2010), la temperatura (McGinnis *et al.* 1997; Thompson 1999; Renaud *et al.* 2002; Roleda *et al.* 2013), la salinidad alta (Renaud y Parry 1994; Henley *et al.* 2002; Takagi y Hoshida 2006), altas concentraciones de dióxido de carbono (Chiu *et al.* 2009; Yoo *et al.* 2010; Abd El

Baky *et al.* 2014), entre otras. Bajo condiciones de cultivo normales, el carbono asimilado mediante la fotosíntesis es empleado para el crecimiento y la reproducción. Sin embargo, cuando las microalgas se someten a condiciones de estrés, ese carbono fijado es convertido en compuestos de almacenamiento altamente energéticos, como los lípidos (Hu *et al.* 2008).

Se ha indicado que algunas especies de microalgas oleaginosas, son capaces de acumular lípidos en un rango de 15-75% de su biomasa seca, bajo un amplio espectro de condiciones ambientales (Tabla 1.1).

**Tabla 1.1:** Contenido de lípidos totales (% de peso seco de biomasa, % ps) en algunas especies de microalgas oleaginosas. Fuente: Chisti (2007).

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

La búsqueda y la evaluación de especies de microalgas potencialmente útiles como materia prima para la producción de biodiesel comprende la consideración de varios aspectos: a) la bioprospección de microalgas; b) el empleo de cepas nativas; c) la capacidad de crecer rápidamente bajo una amplia variedad de condiciones; d) producción y productividad de biomasa altos; e) contenidos lipídicos y productividades lipídicas altos; y f) proporción de lípidos neutros a lípidos polares alta.

La correcta identificación de cepas microalgales potencialmente útiles como materia prima para la producción de biodiesel representa el primer paso en esta búsqueda (Leonardi *et al.* 2011). La selección y el empleo de cepas robustas, adaptadas a las condiciones climáticas locales es también importante al momento de evaluar a una determinada especie como materia prima (Rodolfi *et al.* 2009),

ya que poseen la ventaja de estar medianamente adaptadas al medio donde se las va a cultivar (Griffiths y Harrison 2009).

Además, el estudio y análisis de las condiciones de cultivo que favorecen el crecimiento de una determinada especie es indispensable para determinar el rango de condiciones que permitan obtener un máximo crecimiento. En tal sentido, las especies o cepas deben presentar una elevada tasa de crecimiento que permita obtener una elevada concentración de biomasa en períodos de tiempo relativamente cortos. Una tasa de crecimiento alta asegura una alta productividad de biomasa y reduce el riesgo de contaminación con otros microorganismos (Griffiths y Harrison 2009).

En relación a los lípidos, tanto el contenido de lípidos totales y la productividad lipídica (Griffiths y Harrison 2009), como el balance entre las fracciones lipídicas y la composición de los ácidos grasos (Hu *et al.* 2008; Griffiths y Harrison 2009; Harwood y Guschina 2009) resultan indispensables conocer al momento de evaluar y elegir a una determinada especie como materia prima para la producción de biodiesel. Una productividad lipídica alta asegura la obtención del producto deseado en el menor tiempo posible, reduciendo así los costos en las etapas posteriores del procesamiento (Borowitzka 1992). Además, es necesaria una proporción alta de lípidos neutros, específicamente de TAG, ya que, como se mencionó anteriormente, éstos son la materia prima ideal para la producción de biodiesel. En cuanto al perfil de los ácidos grasos, el conocimiento preciso del mismo es otro parámetro importante a tener en cuenta, ya que su composición determinará la calidad del biodiesel.

## **1.5 *Nannochloropsis* como especie modelo para la producción de biodiesel**

Algunas especies del género *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) han sido consideradas modelo para la producción de biodiesel (Leu y Boussiba 2014). *Nannochloropsis* es un género que se caracteriza por su robustez y plasticidad para crecer en diversos ambientes (Pal *et al.* 2011; Simionato *et al.* 2011). Tradicionalmente, las especies de este género han sido empleadas en acuicultura para alimentación de larvas (Renaud *et al.* 1991; Volkman *et al.* 1993; Ferreira *et al.* 2009) y como fuente de ácido eicosapentaenoico (EPA) (Sukenic *et al.* 1993),

un ácido graso poliinsaturado esencial (Lebeau y Robert 2003). Sin embargo, estudios recientes han evidenciado y destacado el potencial de algunas especies de *Nannochloropsis* como fuente de materia prima para la producción de biodiesel, debido a la capacidad de acumular altos contenidos de lípidos, principalmente lípidos neutros, hasta 65% de su peso seco (Rodolfi *et al.* 2009; Bondioli *et al.* 2012) y por su elevada cantidad de ácidos grasos saturados y monoinsaturados en los lípidos neutros (Sukenik *et al.* 1989). Diversas investigaciones se han focalizado en el estudio del crecimiento, las condiciones y las distintas estrategias de cultivo para inducir e incrementar la acumulación de lípidos en las especies marinas de este género (Rodolfi *et al.* 2009; Mata *et al.* 2010; Sforza *et al.* 2010, 2012; Pal *et al.* 2011, 2013; Simionato *et al.* 2011; Bondioli *et al.* 2012; Griffiths *et al.* 2012; Dong *et al.* 2013; Solovchenko *et al.* 2014).

Reportes científicos actuales presentan a *Nannochloropsis* como un género con potencial mercado de aplicación en el sector energético y en la industria nutracéutica, farmacéutica y alimentaria (Leu y Boussiba 2014). Estos autores proponen a algunas especies de *Nannochloropsis* como un recurso potencial a emplearse en biorrefinerías, tanto para la producción de biocombustibles como para el aprovechamiento de EPA. En la actualidad, el estado de las investigaciones en el género *Nannochloropsis* está principalmente focalizado en: 1) el estudio detallado de la acumulación y fisiología de lípidos a escala de laboratorio, 2) el cultivo en plantas piloto para la producción de EPA y TAG, y 3) análisis genómicos y transcriptómicos, y transformación genética (Leu y Boussiba 2014).

## **Objetivos**

### **Objetivo General**

El objetivo general de esta Tesis consistió en el estudio de una cepa nativa de *Nannochloropsis*, aislada de la costa atlántica sur de Argentina, con el fin de evaluar su potencial como fuente de materia prima para la producción de biodiesel. Las investigaciones abarcaron el estudio de su crecimiento, producción de biomasa y síntesis de lípidos bajo diversas condiciones de cultivo a escala de

laboratorio. Adicionalmente, se realizó una experiencia preliminar de cultivo en un fotobiorreactor columnar.

## **Objetivos Específicos**

Los objetivos específicos de esta Tesis consistieron en:

- 1) Identificar a la cepa de *Nannochloropsis* en estudio a través de su caracterización morfológica y ultraestructural, mediante microscopía óptica y electrónica de transmisión, y molecular, mediante el análisis de los genes 18S rADN y *rbcL*.
- 2) Optimizar los métodos de cuantificación de la velocidad de crecimiento, concentración de pigmentos y detección cualitativa de lípidos neutros mediante la tinción con el fluorocromo rojo Nilo.
- 3) Analizar el efecto de las condiciones de cultivo sobre el crecimiento y la obtención de biomasa rica en lípidos, a diferentes condiciones de temperatura, intensidad de luz, fotoperiodo y carencia de nitrógeno.
- 4) Cuantificar el contenido de los lípidos totales y de las fracciones lipídicas (lípidos neutros, glicolípidos y fosfolípidos), obtenidos bajo las diferentes condiciones de cultivo.
- 5) Evaluar la composición de los ácidos grasos mediante el análisis de los perfiles de lípidos totales y la fracción de lípidos neutros.
- 6) Inferir la calidad del biodiesel a obtener en base a los estándares internacionales de calidad del aceite.
- 7) Cultivar a la cepa de *Nannochloropsis* en un fotobiorreactor columnar de 25 L de capacidad, con un medio de cultivo de menor costo que el empleado en las experiencias de laboratorio.

## Capítulo 2 – Materiales y Métodos

---

### 2.1 Material de estudio

La especie en estudio fue aislada del Océano Atlántico Sur, identificada como *Nannochloropsis oculata* y gentilmente donada por el Instituto de Biología Marina y Pesquera Almirante Storni, San Antonio Oeste, provincia de Río Negro, Argentina. Posteriores estudios moleculares realizados en esta Tesis, permitieron corroborar que la cepa corresponde a la especie *Nannochloropsis oceanica* (ver Capítulo 3). La cepa fue depositada en el cepario Culture Collection of Autotrophic Organism (CCALA), Instituto de Botánica, Academia de Ciencia, en República Checa, bajo la siguiente denominación: *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978.

### 2.2 Acondicionamiento del material de laboratorio

El material de vidrio (Erlenmeyer, tubos de repique, pipetas, kitsato, etc.) empleado, tanto en el mantenimiento de los cultivos stock y en la preparación del medio de cultivo así como en las distintas experiencias, fue lavado con detergente no iónico (1% v/v) y enjuagado reiteradas veces con agua corriente. Posteriormente se lavó con una solución de HCl 10% (v/v) y se realizaron varios enjuagues sucesivos con agua destilada. El material se colocó en estufa de secado a 90°C y finalmente se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 120°C y 1 atm de presión.

### 2.3 Preparación de medios de cultivo

El medio de cultivo empleado en las diferentes experiencias de crecimiento y síntesis de lípidos en laboratorio fue el medio f/2 (Guillard1973). Además, para la experiencia de cultivo en el fotobiorreactor (Capítulo 6), se empleó el medio SWES (Universidad de Goettingen, Alemania).

### 2.3.1 Preparación del medio f/2

La preparación del medio de cultivo f/2 se realizó en dos etapas:

#### 1)- *Filtración del agua de mar*

El agua de mar utilizada en todos los ensayos fue recolectada en el muelle de Puerto Cuatrerros, General Daniel Cerri, Bahía Blanca y almacenada en una cámara fría (4°C) durante 4 meses para lograr su envejecimiento. Antes de iniciar cada ensayo, se filtró un volumen determinado de agua de mar mediante el uso de un filtro de nitrato de celulosa Gamafil (0,45 µm de poro, 45 mm de diámetro) en un Kitasato conectado a una bomba de vacío. El agua filtrada se colocó en botellas de vidrio o Erlenmeyer, previamente acondicionados de acuerdo con lo detallado en la Sección 2.2 y se esterilizó en autoclave a 1 atm de presión y 120°C durante 15 minutos.

#### 2)- *Agregado de nutrientes*

Por cada litro de agua de mar filtrada y estéril se agregaron mediante filtración macronutrientes, metales traza (micronutrientes), vitaminas y TRIS, de acuerdo con lo detallado en la Tabla 2.1, empleando un filtro estéril de nitrato de celulosa Whatman (0,20 µm de poro y 45 mm de diámetro).

**Tabla 2.1:** Concentración y volumen de los componentes del medio f/2.

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración</b>	<b>Volumen (mL)</b>
NaNO <sub>3</sub>	75,0 g/L dH <sub>2</sub> O	1
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	5,0 g/L dH <sub>2</sub> O	1
Metales traza		1
Vitaminas		0,50
TRIS		1

La solución de metales traza estuvo constituida por los siguientes compuestos, preparados a partir de soluciones madre, de acuerdo con la Tabla 2.2.

**Tabla 2.2:** Concentración y volumen de micronutrientes del medio de cultivo f/2.

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración</b>	<b>Volumen (mL)</b>
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	3,15 g	
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	4,36 g	
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	9,8 g/L dH <sub>2</sub> O	1
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	6,3 g/L dH <sub>2</sub> O	1
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	22,0 g/L dH <sub>2</sub> O	1
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	10,0 g/L dH <sub>2</sub> O	1
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	180,0 g/L dH <sub>2</sub> O	1

La solución de vitaminas estuvo constituida por los compuestos detallados en la Tabla 2.3

**Tabla 2.3:** Concentración y volumen de las vitaminas del medio de cultivo f/2.

<b>Vitamina</b>	<b>Concentración</b>	<b>Volumen (mL)</b>
B <sub>12</sub>	1,0 g/L dH <sub>2</sub> O	1
Biotina	0,1 g/L dH <sub>2</sub> O	10
Tiamina HCl	200 mg	

### 2.3.2 Preparación de medio SWES

El medio SWES está compuesto por agua de mar envejecida, enriquecida con macronutrientes, micronutrientes y extracto de suelo. Su preparación se llevó a cabo en tres etapas:

#### 1)- *Filtración de agua de mar*

La filtración del agua de mar se realizó de la misma manera detallada para la preparación del medio f/2. Sin embargo, el agua se esterilizó, luego del agregado de los nutrientes, en autoclave a 120°C y 1 atm de presión durante 15 minutos.

#### 2)- *Preparación del extracto de suelo*

En primer lugar, se preparó la suspensión de suelo en agua destilada y luego se realizaron tres esterilizaciones sucesivas.

Se dispuso en una botella de vidrio de 1 L una proporción de suelo:agua destilada de 1:3. El suelo fue recolectado en el predio del CERZOS-CCT-CONICET Bahía Blanca y previamente tamizado. La solución se agitó vigorosamente en un shaker durante 15 minutos y se dejó decantar un día, hasta lograr la sedimentación de las partículas. Al día siguiente, se filtró el sobrenadante empleando papel de filtro y se dispuso en una botella de vidrio Scoch

termorresistente de 1L. Se realizó una primera esterilización durante 30 minutos a 1 atm de presión y 120°C. Se dejó enfriar a temperatura ambiente. Durante los dos días sucesivos se realizaron dos esterilizaciones más bajo las mismas condiciones.

### 3)- *Agregado de nutrientes y esterilización*

Por cada litro de agua de mar filtrada se agregaron los siguientes nutrientes detallados en la Tabla 2.4.

**Tabla 2.4:** Composición del medio de cultivo SWES.

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración</b>
NaNO <sub>3</sub>	0,20 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,02 g
Metales traza	5 mL
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1,25 g
Extracto de suelo	30 mL

La solución de metales traza estuvo constituida por los compuestos indicados en la Tabla 2.2. Luego de la esterilización, se agregaron 30 mL de extracto de suelo estéril.

## 2.4 Mantenimiento de cultivos stock

Los cultivos stock se mantuvieron en tubos de ensayo con tapa a rosca en una cámara de cultivo, a 15°C, bajo una intensidad lumínica promedio de 60  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , medida con un fotorradiómetro (LICOR, LI-192 SB 2 $\pi$  Model), aportada por tubos fluorescentes Philips L-35 de luz blanca y con un fotoperíodo de 12:12 h L:O (luz: oscuridad) (Fig. 2.1 A-E). Los cultivos stock fueron agitados cada 2-3 días en forma manual para favorecer el contacto entre el medio y las células y evitar la sedimentación de las mismas. Se realizaron repiques quincenales para evitar el agotamiento de los nutrientes y la proliferación bacteriana.

Para la manipulación de los cultivos, se trabajó bajo una cámara de flujo laminar, en condiciones de asepsia (Fig. 2.1 A) y con material acondicionado y esterilizado de acuerdo con lo detallado en la Sección 2.2.

Previamente al inicio de cada ensayo, los cultivos stock fueron separados y transferidos a la correspondiente cámara de cultivo, por un período de una semana, con el objeto de lograr una buena aclimatación de las células a las condiciones experimentales.

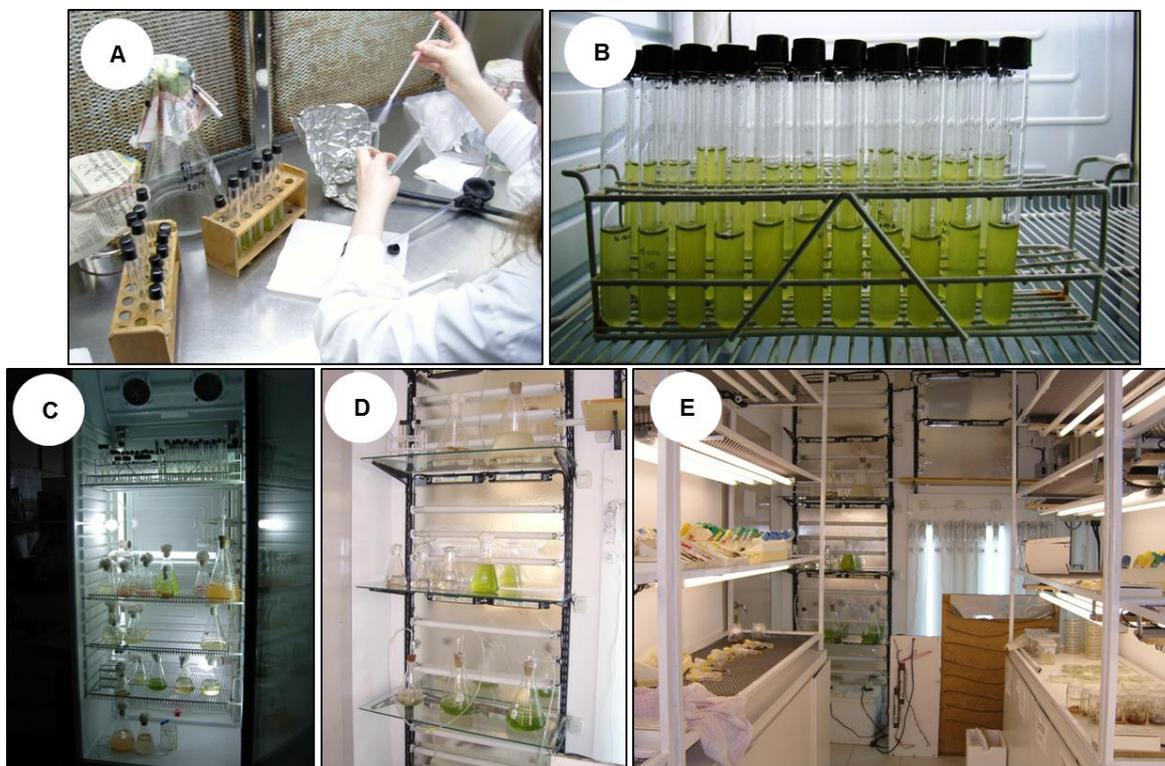


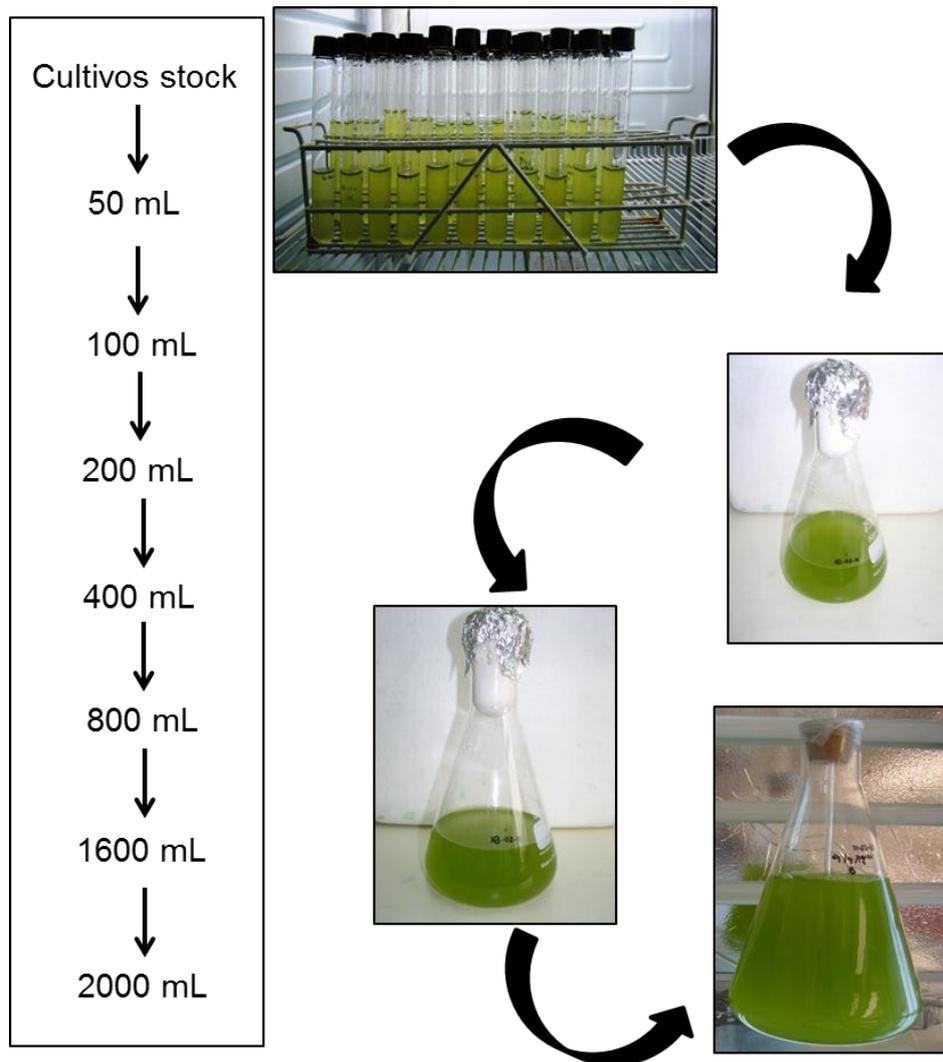
Figura 2.1: A) Repique de los cultivos. B) Cultivos stock C-E) Cámaras de cultivo.

## 2.5 Escalado de cultivos

Los inóculos empleados para los ensayos de crecimiento y análisis de lípidos (Capítulo 5), así como también los cultivos empleados en el ensayo en el fotobiorreactor (Capítulo 6) se iniciaron a partir de cultivos stock, de acuerdo con lo detallado en la Sección 2.4.

La obtención de los inóculos de mayor volumen se realizó mediante el escalado progresivo de cultivos, manteniendo a las células en fase exponencial (Fig. 2.2). Una vez transcurrida una semana de la transferencia de los cultivos stock a las condiciones experimentales, éstos se transfirieron desde los tubos de ensayo a Erlenmeyer de 250 mL, con el agregado en cada uno de ellos de 50 mL de medio de cultivo fresco (f/2 o SWES, según corresponda). Luego de transcurrir 2 ó 3 días, los cultivos se transfirieron a Erlenmeyer de 500 mL y se agregaron otros 50 mL de medio fresco, para alcanzar un volumen final de 100 mL. Luego de

2 días, a ese volumen se le agregaron 100 mL de medio fresco hasta alcanzar un volumen final de 200 mL. Se inició el pasaje de aireación continua, mediante el empleo de aireadores comerciales de peceras, conectados con mangueras plásticas tipo “caño cristal”, previamente lavadas con alcohol 70% (v/v) y puestas a secar en estufa a 60°C. Luego de 2-3 días, se transfirió el contenido de cada cultivo a Erlenmeyer de 2 L y se fue escalando progresivamente hasta llegar a los 2 L de cultivo. Para asegurar el mantenimiento de las células en fase exponencial, cada 3 ó 4 días se retiró un volumen de cultivo y se lo reemplazó con el mismo volumen de medio de cultivo fresco.



**Figura 2.2:** Escalado de cultivos.

## Capítulo 3 – Caracterización morfológica y molecular de la cepa nativa de *Nannochloropsis* en estudio

---

### 3.1 Introducción

La búsqueda de especies de microalgas oleaginosas nativas potencialmente útiles para la producción de biodiesel constituye uno de los mayores desafíos en la actualidad a nivel mundial. Desde el punto de vista del cultivo a gran escala, el empleo de cepas nativas es de gran ventaja, ya que éstas son más tolerantes tanto a las condiciones ambientales locales como a la contaminación, permitiendo así que el control de las condiciones de cultivo sea menos riguroso (Griffiths y Harrison 2009; Rodolfi *et al.* 2009).

El primer paso de este estudio es la identificación de la/las especie/s en cuestión (Leonardi *et al.* 2011). Los procedimientos tradicionales para identificar y caracterizar a las microalgas incluyen la observación morfológica y ultraestructural mediante microscopía óptica y electrónica. Sin embargo, en algunos casos, estos métodos pueden ser insuficientes o imprecisos (Karlson *et al.* 1996). Un ejemplo de ello lo constituyen las especies del género *Nannochloropsis*, debido a su pequeño tamaño (2-5  $\mu\text{m}$ ) y a sus características morfológicas simples (Maruyama *et al.* 1986; Gladu y Patterson 1995; Andersen *et al.* 1998)

El género *Nannochloropsis* pertenece a la Clase Eustigmatophyceae. Estas microalgas son picoplanctónicas y se encuentran ampliamente distribuidas en ambientes costeros, estuarinos, salobres y dulceacuícolas en todo el mundo (Hibberd 1980). Se caracterizan por la presencia de clorofila *a*, la ausencia de clorofilas *b* y *c*, y poseen carotenoides como pigmentos accesorios (Whittle y Casselton 1975; Volkman *et al.* 1993). Dentro de los carotenoides, los principales son violaxantina y vaucherioxantina, mientras que en menor proporción se presentan cantaxantina (Lubian 1982; Solovchenko *et al.* 2014), astaxantina y zeaxantina (Lubian 2000; Solovchenko *et al.* 2014).

El género comprende cinco especies marinas y una dulceacuícola. Las especies marinas son *N. oculata* (Droop) Hibberd (Hibberd 1981), *N. salina* Hibberd (Hibberd 1981), *N. gaditana* Lubian (Lubian 1982), *N. granulata* Karlson y

Potter (Karlson *et al.* 1996) y *N. oceanica* (Suda *et al.* 2002), mientras que la dulceacuícola es *N. limnetica* (Krienitz *et al.* 2000).

Además, de la estructura simple y el pequeño tamaño celular de las especies de *Nannochloropsis*, se suma la dificultad de fijar las células con los procedimientos de microscopía electrónica de transmisión convencionales (Hibberd 1981) y la ausencia de reproducción sexual. De esta forma, el concepto de especie filogenética resulta particularmente útil (Andersen *et al.* 1998) y la aplicación de técnicas moleculares es indispensable para lograr una correcta identificación. Diversas especies de *Nannochloropsis* han sido identificadas mediante el análisis de secuencias de ADN (Fawley y Fawley 2007), basado en marcadores nucleares (18S rADN) y cloroplásticos (*rcbL*) y en sets de genes ortogonales (Karlson *et al.* 1996; Krienitz *et al.* 1996; Andersen *et al.* 1998; Suda *et al.* 2002; Vieler *et al.* 2012; Cao *et al.* 2013; Wang *et al.* 2014).

También es importante destacar que, debido a la potencialidad de algunas especies de *Nannochloropsis* como materia prima para la producción de biodiesel, recientemente se han realizado numerosos estudios relacionados con la genómica y la transcriptómica y la ingeniería genética, con el fin de elucidar detalladamente los mecanismos moleculares y metabólicos involucrados en la biosíntesis de lípidos (Vieler *et al.* 2012; Radakovitz *et al.* 2012; Carpinelli *et al.* 2013; Wei *et al.* 2013; Hu *et al.* 2014; Li *et al.* 2014a; Li *et al.* 2014b; Starkenburg *et al.* 2014; Wang *et al.* 2014).

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos, los objetivos planteados en el presente Capítulo estuvieron orientados en lograr una correcta identificación de la cepa en estudio. Los mismos fueron: a) realizar un estudio detallado de la cepa con microscopía óptica y electrónica de transmisión, y b) caracterizar la cepa a nivel molecular mediante el análisis filogenético de los genes nuclear y cloroplástico, 18S rADN y *rbcl*, respectivamente.

En el marco de los objetivos planteados, se formula la siguiente hipótesis: La combinación de estudios morfológicos y moleculares en la cepa nativa de *Nannochloropsis* permite su correcta identificación a nivel específico.

## **3.2 Materiales y Métodos**

### **Caracterización morfológica**

#### **3.2.1 Condiciones de cultivo**

Las células de la cepa en estudio crecieron a 25°C, una intensidad lumínica de 100  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  provista por tubos fluorescentes Philips L-35, un fotoperiodo de 16:8 h de L:O, aireación continua (300-500  $\text{cm}^3 \text{ L}^{-1}$ ) y  $\text{CO}_2$  1-2% aplicado durante 2-3 horas diariamente. El medio de cultivo empleado fue f/2 y se preparó a partir de agua de mar, de acuerdo con el protocolo detallado en la Sección 2.3.1.

#### **3.2.2 Estudio con microscopio óptico**

Se realizaron observaciones con un microscopio óptico Leica DM200 con el fin de evaluar la morfología de *N. oceanica* CCALA 978, su estado fisiológico (coloración de los cultivos) y la presencia de lípidos en cultivos en diferentes etapas de crecimiento.

Volúmenes pequeños de muestras fueron tomados con pipeta Pasteur de cultivos en fase exponencial (2-7 días), en fase estacionaria (15 días) y en fase estacionaria tardía (45 días) y colocados sobre portaobjetos para su observación. También se efectuaron tinciones del material con Sudán IV, colorante específico para teñir lípidos. Se tomaron microfotografías y se realizaron mediciones del tamaño celular con un ocular micrométrico. Para ello se eligieron al azar 30 células y se determinó el diámetro celular medio y el desvío estándar.

#### **3.2.3 Estudio con microscopio electrónico de transmisión (MET)**

Se realizaron observaciones con un microscopio electrónico de transmisión con el objeto de analizar la ultraestructura de *N. oceanica* CCALA 978 y en especial la presencia de reservas lipídicas en fases exponencial y estacionaria de crecimiento. El material se fijó con una mezcla de glutaraldehído 3% y

paraformaldehído 2% en buffer cacodilato-Na 0,1M (pH 7,4), conteniendo sacarosa al 0,25 M. Esta fijación fue seguida por una serie de lavados con buffer Na-cacodilato 0,1 M, con disminución gradual de la concentración de sacarosa. Luego se realizó una segunda fijación con tetróxido de osmio en buffer Na-cacodilato 0,1 M. Posteriormente el material se deshidrató en series crecientes de acetona y finalmente se infiltró en resina Spurr durante 4 días. Las secciones fueron cortadas en un ultramicrotomo Reichert, teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo y observadas con un microscopio electrónico de transmisión JEOL 100CX-II operado a 80 Kv.

### **3.2.4 Estudio con microscopio confocal**

Se realizaron observaciones con un microscopio confocal de fluorescencia con el objeto de localizar lípidos neutros, tanto en la fase exponencial de crecimiento como en la estacionaria. Muestras de 250  $\mu$ L fueron tomadas de cultivos en ambas fases de crecimiento. Se agregaron 5  $\mu$ L de Rojo Nilo y luego de 30 minutos se observaron en un microscopio confocal de fluorescencia Leica DMIRE2 TCS SP2 SE.

### **3.2.5 Extracción y cuantificación de pigmentos**

La metodología para la extracción y cuantificación del contenido de pigmentos, se explica detalladamente en la Sección 4.2.3 del Capítulo 4.

## **Caracterización molecular y análisis filogenético**

Para la identificación molecular de la cepa en estudio, se seleccionaron los genes 18Sr ADN y *rbcL*, nuclear y cloroplástico respectivamente, de acuerdo con Suda *et al.* (2002). Este estudio se realizó en el Laboratorio de Genómica Evolutiva, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, bajo la dirección de la Dra. María Virginia Sánchez Puerta.

### 3.2.6 Condiciones de cultivo

Se empleó material proveniente de cultivos en fase exponencial, mantenidos a 25°C, una intensidad lumínica de 100  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , un fotoperíodo 16:8 h L: O, aireación continua (300-500  $\text{cm}^3 \text{L}^{-1}$ ) y 1-2% de  $\text{CO}_2$  aplicado durante 2-3 horas diariamente. Los cultivos se llevaron a cabo en medio f/2, detallado en la Sección 2.3.1. Las células se cosecharon por centrifugación a 3500 rpm y se almacenaron en un freezer a -80°C hasta su análisis.

### 3.2.7 Identificación Molecular

#### 3.2.7.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó empleando un kit de extracción de ADN genómico GE Healthcare Illustra Nucleon Phytopure (Buckinghamshire, United Kingdom). Los pasos seguidos se muestran en la Figura 3.1



**Figura 3.1:** Pasos de la extracción de ADN.

#### ***Ruptura de la pared celular***

1- Se agregaron tres volúmenes de nitrógeno líquido a 0,1 g de material fresco.

- 2- Se molió en mortero el material con nitrógeno líquido.
- 3- Se transfirió el material mediante el uso de espátula a un tubo de centrifuga.

### ***Lisis celular***

- 1- Se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de reactivo 1 del kit, asegurando que todos los ingredientes del reactivo estuviesen disueltos completamente. Debido a que la extracción puede contener pequeñas cantidades de ARN, se agregó una ARNasa de digestión bajo una concentración de  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ , después de la adición del reactivo 1. Se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 minutos.
- 2- Se mezcló vigorosamente con espátula.
- 3- Se agregaron 200  $\mu\text{L}$  del reactivo 2.
- 4- Se invirtió varias veces el tubo de centrifuga hasta obtener una mezcla homogénea.
- 5- Se incubó en baño de agua a  $65^\circ\text{C}$ . Los tubos se agitaron regularmente de forma manual durante la incubación.
- 6- Se colocaron las muestras en hielo durante 20 minutos.

### ***Extracción de ADN***

- 1- Se retiraron los tubos del hielo y se agregaron 400-500  $\mu\text{L}$  de cloroformo almacenado a  $-20^\circ\text{C}$ .
- 2- Se agregaron 80-100  $\mu\text{L}$  de la resina de extracción de ADN Phytopure. Inmediatamente después del agregado se agitó manualmente.
- 3- Se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 4- Se centrifugó a 1300 g durante 10 minutos.
- 5- Se transfirió, mediante el uso de pipeta, la fase superior que contiene el ADN a un nuevo tubo, sin alterar la suspensión de la resina.

### ***Precipitación del ADN***

- 1- Se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol frío.
- 2- Se agitó suavemente el tubo hasta lograr la precipitación de ADN.
- 3- Se centrifugó el pellet de ADN a 4000 g durante 5 minutos.
- 4- Se lavó el pellet de ADN con 500  $\mu\text{L}$  de etanol al 70%.
- 5- Se descartó el sobrenadante.
- 6- Se secó el pellet de ADN durante 10 minutos.
- 7- El ADN se resuspendió en 50  $\mu\text{L}$  de agua.

### 3.2.7.2 Selección de primers

Las subunidades pequeñas de los genes nuclear 18S rADN y cloroplástico *rbcl* fueron amplificadas mediante el empleo de los primers detallados en la Tabla 3.1.

**Tabla 3.1:** Primers empleados para la amplificación de los genes *rbcl* y 18S rADN.

Gen	Secuencia de Primers (5´- 3´)	Referencia
<i>rbcl</i>	F: GATGCAAACACTACACAATTAAGATACTG	Li <i>et al.</i> (2011)
	R: ATTTTGTTTCGTTTGTTAAATCCG	Li <i>et al.</i> (2011)
18S rDNA	F: CAAGTTTCTGCCCTATCAGCT	Li <i>et al.</i> (2011)
	R: ATTTTGTTTCGTTTGTTAAATCCG	Li <i>et al.</i> (2011)
	NS3a F: CAAGTTTCTGCCCTATCAGCT	Fawley <i>et al.</i> (2005)
	Primer A: CCGAATTCGTTCGACAACCTGGTTGATCCTGCCAGT	Medlin <i>et al.</i> (1998)
	Primer B: CCCGGGATCCAAGCTTGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC	Medlin <i>et al.</i> (1998)

### 3.2.7.3 Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Los genes nuclear y cloroplástico, 18S rADN y *rbcl*, respectivamente, fueron amplificados mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). La reacción se llevó a cabo en un termociclador Biometra TProfessional Basic empleando volúmenes de 24 µL. Los reactivos utilizados en la reacción fueron buffer 0,5x, nucleótidos fosfatados (dNTPs) Invitrogen, TAQ Polimerasa (Invitrogen Recombinante, Brasil) y agua filtrada MilliQ. Los volúmenes empleados de cada reactivo se muestran en la Tabla 3.2.

**Tabla 3.2:** Solución de reactivos de PCR utilizada para la amplificación de los genes *rbcl* y 18S rADN.

Reactivos	Volumen (µL)
Buffer	2,50
Cl <sub>2</sub> Mg	2,50
dNTPs	1,75
Primer 1	0,50
Primer 2	0,50
TAQ polimerasa	0,30
ADN templado	1,00
Agua MilliQ	14,95
Volumen Total	24,00

En primer lugar, se cargó el volumen de ADN en tubos de PCR y luego se agregaron los reactivos restantes. La enzima TAQ polimerasa se agregó en último lugar con el fin de evitar su desactivación.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 95°C durante 2 minutos, seguida de 30 ciclos de amplificación a 94°C durante 40 segundos, 52°C durante 40 segundos y 72°C durante 40 segundos, y una extensión final a 72°C durante 3 minutos.

#### **3.2.7.4 Electroforesis en gel de agarosa**

Para la preparación del gel se empleó agarosa (D1, Conda, Laboratorio Pronadisa). En primer lugar, se preparó una solución de 40 mL de agarosa en buffer 0,5x al 1%. Para ello, se pesaron 0,4 g de agarosa en balanza analítica y se agregaron al buffer. La solución se calentó en horno microondas durante unos minutos, agitando regularmente hasta lograr que la agarosa se disuelva completamente. Una vez que la solución se volvió homogénea, se retiró del microondas y se llenó la cuba electroforética.

Luego, se sembraron en las calles del gel 4 µL del producto de la PCR y 1 µL del marcador de peso molecular, constituido por glicerol y azul de bromofenol. Se aplicó un voltaje de 90V durante 40 minutos para la electroforesis. Transcurrido el tiempo, se tiñó el gel con bromuro de etilo durante 10 minutos y finalmente se reveló en un autorrevelador.

#### **3.2.7.5 Secuenciación de los productos 18S rADN y *rbcl***

Los productos de la amplificación fueron secuenciados mediante el método Sanger (Applied Biosystems 3730XL). Las secuencias fueron depositadas en GenBank con los números de acceso KF010153 y KF010154 para *rbcl* y 18S rADN, respectivamente.

#### **3.2.7.6 Búsqueda de secuencias de nucleótidos**

Para realizar los alineamientos, se realizó una búsqueda de las secuencias de nucleótidos de los genes 18S rADN y *rbcl* de las especies de *Nannochloropsis* disponibles en GenBank mediante la herramienta BLAST. Se seleccionaron

aquellas secuencias con formato PLUS-PLUS y con un alto porcentaje de cobertura (90%) y elevado valor E (0,99). Los números de acceso de la base de datos GenBank, los datos taxonómicos y los sitios de colección de las especies de *Nannochloropsis* empleadas en los alineamientos se observan en la Tabla 3.3.

**Tabla 3.3:** Datos taxonómicos, sitios de colección y números de acceso de GenBank de las especies y cepas de *Nannochloropsis* empleadas en los alineamientos para los genes *rbcL* y 18S rADN.

Especies	Cepas	Sitios de colección	Número de Acceso de GenBank	
			<i>rbcL</i>	18S rADN
<i>N. oceanica</i>	CCALA 978	Southwestern Ocean Atlantic Cost	KF010153	KF010154
<i>N. oculata</i>	CCAP 849	Skate Point, Isle of Cumbrae, Scotland, UK	AB052286	-
<i>N. oculata</i>	CCMP525	Skate Point, Isle of Cumbrae, Scotland, UK	HQ710609	AF045044
<i>N. oculata</i>	CCMP533	Lake of Tunis, Tunesia, North Africa	-	AY045045
<i>N. granulata</i>	MBIC10054	Pacific Ocean, 32°12' N, 147°23' E	AB052280	AB052272
<i>N. granulata</i>	BDH02	Unknown	KC 128502	KC128500
<i>N. granulata</i>	CCMP1662	Skagerrak, North Sea	-	AF045041
<i>N. granulata</i>		Skagerrak, North Sea		NGU38903
<i>N. limnetica</i>	KR1998	Arrowodd National Wildlife Refuge, Itasca Lake Park, Minnessota, USA	DQ977729	-
<i>N. limnetica</i>	JL1125	Arrowodd National Wildlife Refuge, Itasca Lake Park, Minnessota, USA	DQ977730	-
<i>N. limnetica</i>	DML1114	Arrowodd National Wildlife Refuge, Itasca Lake Park, Minnessota, USA	DQ977740	-
<i>N. limnetica</i>	AS39	Arrowodd National Wildlife Refuge, Itasca Lake Park, Minnessota, USA	DQ977741	DQ977726
<i>N. limnetica</i>	AS2168	Arrowodd National Wildlife Refuge, Itasca Lake Park, Minnessota, USA	DQ977739	-
<i>N. limnetica</i>	SAG1899	Lake Roter See, Mecklenburg-Vorpommern, Germany	AM421006	AF251496
<i>N. limnetica</i>	JL24	Arrowodd National Wildlife Refuge, Itasca Lake Park, Minnessota, USA	-	DQ977727
<i>N. gaditana</i>	MBIC10118	Shell Beach, Australia	AB052279	AB052269
<i>N. gaditana</i>	MBIC10123	Monkey Mia, Australia	AB05273	AB052271
<i>N. gaditana</i>	MBIC10418	Atlantic Ocean, Cape Town, South Africa	AB052735	AB052271
<i>N. gaditana</i>	Ferrara & Andreoli 2004	Comachio Lagoon, Ferrara, Italy	-	AF133819
<i>N. gaditana</i>	IVP	Unknown	-	AB473733
<i>N. gaditana</i>	CCAP849/5-CCMP1775	Cadiz Bay, Cadiz, Spain	-	AF067957
<i>N. gaditana</i>	CCMP526	Lagune di Quadilia, Morocco	-	AF045037
<i>N. gaditana</i>	B	Unknown	-	JF444989
<i>N. gaditana</i>	CCAP849/5-CCMP1775	Cadiz Bay, Cadiz, Spain	-	AF045036
<i>N. salina</i>	CCAP849/2	Skate Point, Isle of Cumbrae, Scotland, UK	AB052288	AF045046
<i>N. salina</i>	MBIC10063	Pacific Ocean, 41°28'N, 146°57'E	AB052287	AB052278

<i>N. oceanica</i>	MBIC10179	Red Sea, Eilat, Israel	AB052283	AB052275
<i>N. oceanica</i>	MBIC10176	Mediterranean Sea, Haifa, Israel	AB052272	AB052274
<i>N. oceanica</i>	MBIC10426	Red Sea, Eilat, Israel	AB052284	AB052276
<i>N. oceanica</i>	MBIC10440	Red Sea, Eilat, Israel	AB052285	AB052277
<i>N. oceanica</i>	MBIC10090	Pacific Ocean, Off Sanriku, Japan	AB052281	AB052273
<i>N. oceanica</i>	LAMB001	Unknown	HQ201773	-
<i>N. oceanica</i>	EUS001	Unknown	-	HQ710567
<i>N. oceanica</i>	CCAP211/46	Kuwait	-	AF045034
<i>N. oceanica</i>	CCAP211/78	Unknown	-	AF045035
<i>Nannochloropsis</i> sp.1	CCMP531	Qingdao, China	-	U41094
<i>Nannochloropsis</i> sp.2	CCMP505	Morehead City, USA	-	U41050
<i>Nannochloropsis</i> sp.	UTEX2379	Unknown	-	AY560119

### 3.2.7.7 Análisis filogenético y construcción de árboles filogenéticos

Los análisis filogenéticos fueron realizados separadamente para cada gen. Los análisis de Máxima Parsimonia (MP) se realizaron con el programa PAUP\*4b10 (Swofford *et al.* 2002). Para el análisis de MP, los caracteres fueron no ponderados y se usó la opción búsqueda *heurística* con el método de bisección y reconexión *branch-swapping* con la adición aleatoria de 10 repeticiones.

Los análisis de máxima verosimilitud (MV) fueron realizados con el programa GARLI 0,951 (Zwickl 2006), bajo el modelo General de tiempo reversible con los parámetros para sitios variables y tasa de heterogeneidad gamma-distribuida.

Como *outgroups* se eligieron *Pseudotraedriella* (EF044311), para el análisis basado en el gen 18S rADN y *Eustigmatus magnus* (AB280615), y *Vischeria helvetica* (HQ710612) para los análisis basados en el gen *rbcL*. Tanto para MP como para MV se realizaron réplicas de 100 *bootstraps*.

## 3.3. Resultados

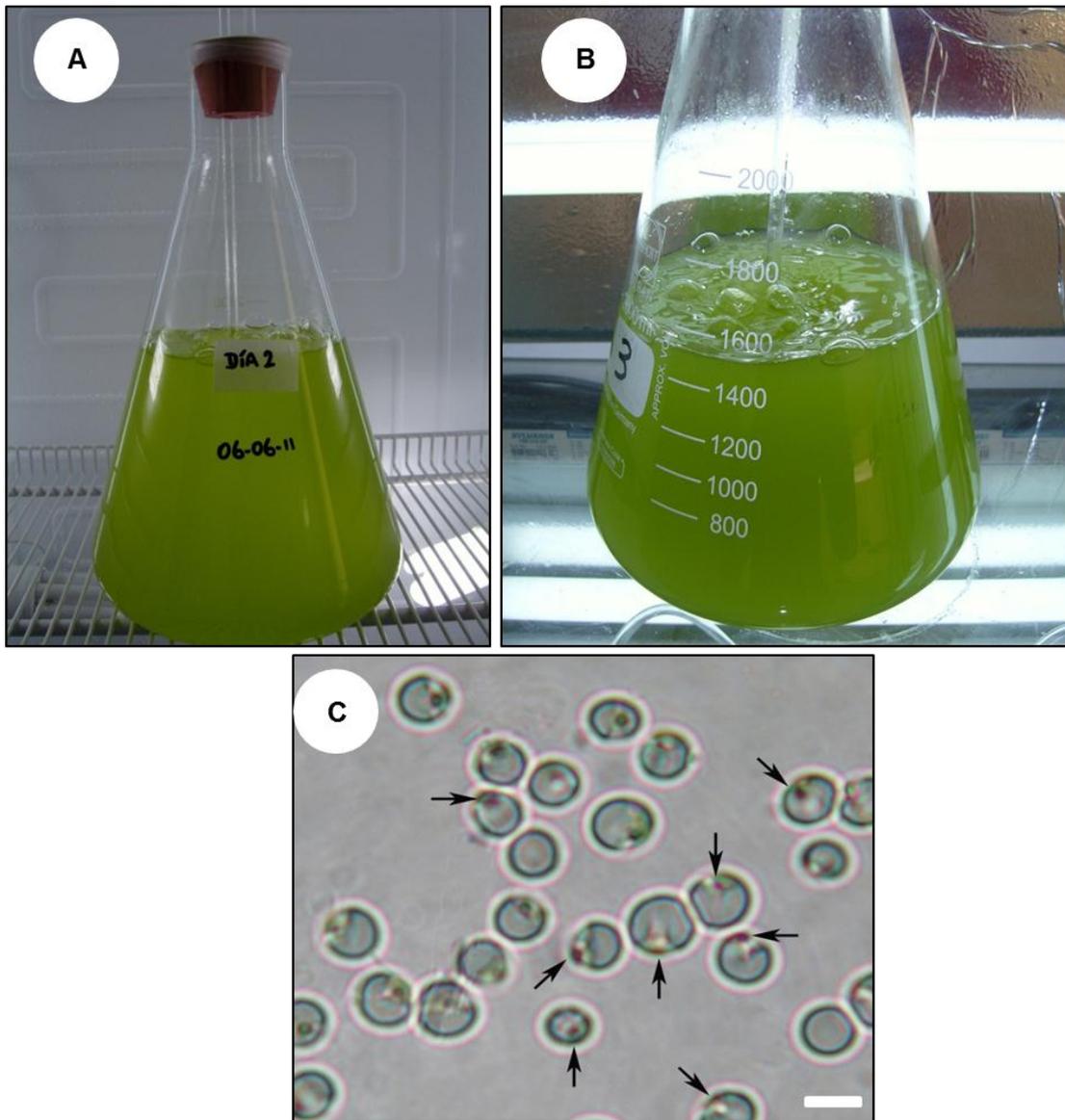
### Caracterización morfológica

#### 3.3.1 Estudio con microscopio óptico

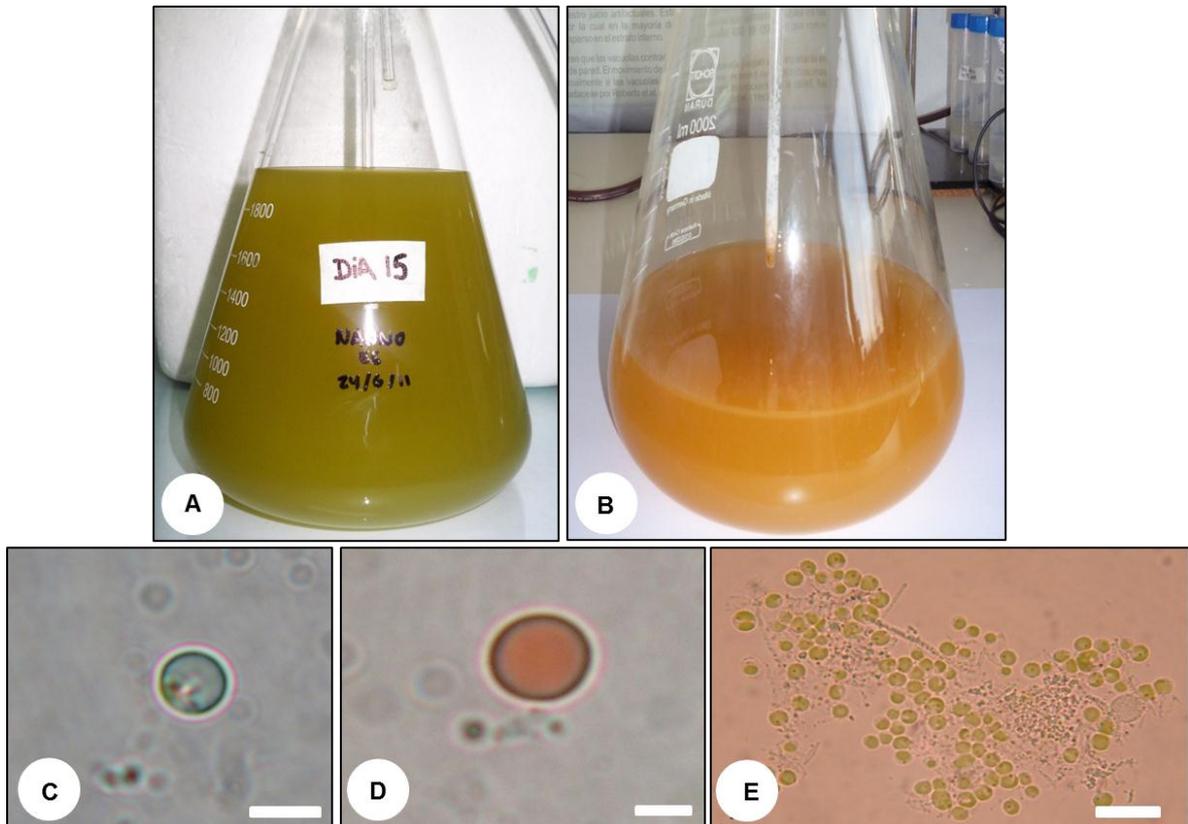
Al microscopio óptico, los cultivos de *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 se caracterizaron por presentar variaciones de color muy marcadas en las diferentes fases de crecimiento. En fase exponencial mostraron un color verde

intenso (Fig. 3.2 A-B). Las células presentaron forma esférica, con un tamaño promedio de  $2,66 \pm 0,24 \mu\text{m}$  de diámetro, pared celular gruesa, un cloroplasto parietal y un cuerpo rojo o estigma (Fig. 3.2 C). Las células teñidas con Sudan IV no evidenciaron presencia de lípidos. Conforme avanzó el crecimiento, los cultivos presentaron un cambio de coloración muy marcado, virando del color verde característico de la fase exponencial al verde amarillento en la fase estacionaria (Fig. 3.3 A) y naranja intenso, en la fase estacionaria tardía (Fig. 3.3 B). También se observó un ligero incremento de tamaño en fase estacionaria, alcanzando un promedio de  $3,17 \pm 0,24 \mu\text{m}$  de diámetro y similares características en relación a la pared celular y el estigma (Fig. 3.3 C). Las células en fase estacionaria tardía presentaron mayor tamaño ( $5,33 \pm 0,48 \mu\text{m}$  de diámetro) y al teñirlas con Sudan IV, se evidenció la presencia de lípidos (Fig. 3.3 D), siendo el cloroplasto imperceptible al microscopio óptico en este estadio. Además, durante esta fase se observaron agregados celulares microscópicos (Fig. 3.3 E).

El cambio en la coloración de las células en las distintas fases del cultivo estuvo relacionado con el cambio en las concentraciones de los pigmentos fotosintéticos. En la fase exponencial (día 7) los contenidos de clorofila *a* y carotenoides totales fueron de  $765,6 \pm 67,5 \times 10^{-3} \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $115 \pm 18,0 \times 10^{-3} \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. En la fase estacionaria (día 15) hubo un incremento en el contenido de ambos pigmentos, (clorofila *a*:  $1030 \pm 25,3 \times 10^{-3} \mu\text{g mL}^{-1}$  y carotenoides:  $350,3 \pm 40,7 \times 10^{-3} \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Durante la fase estacionaria tardía (día 45) los carotenoides totales incrementaron aún más, llegando a valores de  $630,3 \pm 16,07 \times 10^{-3} \mu\text{g mL}^{-1}$ , mientras que la clorofila *a* disminuyó notablemente,  $103,0 \pm 72,8 \times 10^{-3} \mu\text{g mL}^{-1}$ .



**Figura 3.2:** Cultivos de *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 en fase exponencial de crecimiento. **A-B)** Vista general de los cultivos con una coloración verde intensa (días 2 y 7 de crecimiento, respectivamente). **C)** Vista general de las células donde se observa la pared, el cloroplasto parietal y el estigma (flechas). Barra escala: 2,5  $\mu\text{m}$ .

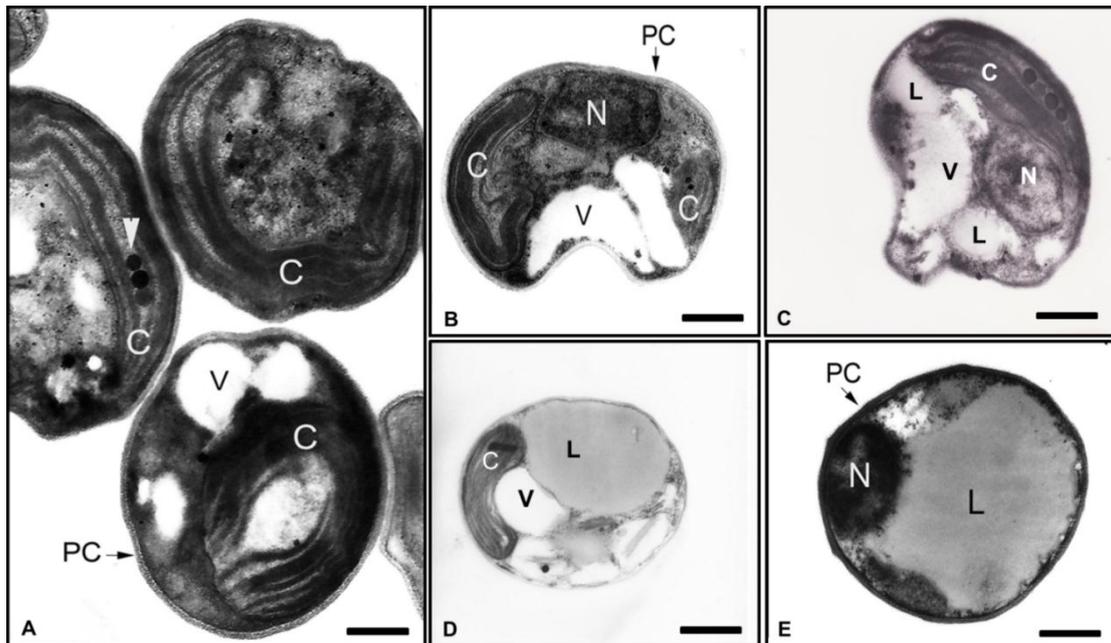


**Figura 3.3:** Vista general de cultivos de *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978. **A-B)** Cultivos en fase estacionaria con coloración verde amarillenta (día 15) y en fase estacionaria tardía con coloración naranja intenso (día 45), respectivamente. **C)** Observación de una célula en fase estacionaria al microscopio óptico. Barra escala: 3 µm. **D)** Observación de una célula en fase estacionaria tardía teñida con Sudan IV. Barra escala: 2,5 µm. **E)** Agregados celulares observados en fase estacionaria tardía. Barra escala: 15 µm.

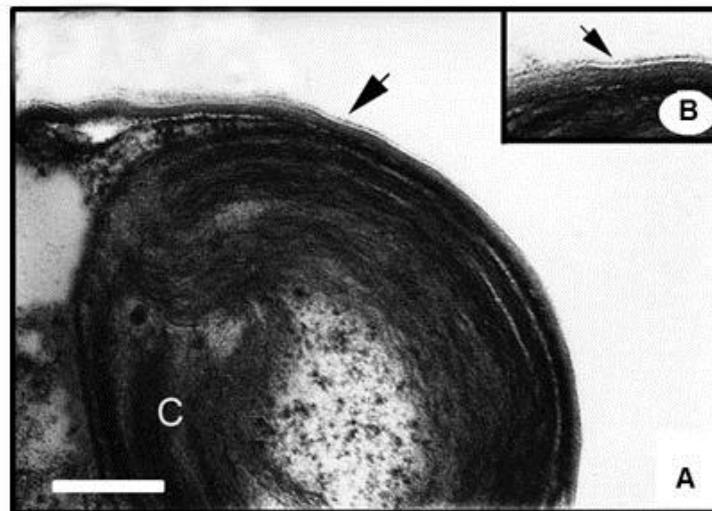
### 3.3.2 Estudio con microscopio electrónico de transmisión (MET)

Al MET, las células de *N. oceanica* CCALA 978 en fase de crecimiento exponencial, mostraron un cloroplasto parietal que ocupó gran parte del citoplasma y estuvo formado por lamelas tritilacoidales de disposición aproximadamente paralelas y glóbulos lipídicos. Además, se observó un núcleo de posición lateral y vacuolas (Fig. 3.4 A-C).

En fase estacionaria las células presentaron un cuerpo lipídico de mediana densidad electrónica (Fig. 3.4 D), que fue incrementando su tamaño conforme la fase estacionaria avanzó (Fig. 3.4 E). Durante esta fase se observó una notable disminución del tamaño del cloroplasto respecto de la fase exponencial. Es importante destacar que durante todas las fases de crecimiento las células presentaron una pared celular gruesa (Fig. 3.4 A-E), formada por una estructura trilaminar (Fig. 3.5 A-B).



**Figura 3.4:** Ultraestructura de *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978. **A-C)** Células en fase de crecimiento exponencial. La punta de flecha en A indica los glóbulos lipídicos intracloroplásticos. Barra escala: 0,7  $\mu\text{m}$ . **D-E)** Células en fase de crecimiento estacionaria. Notar el cuerpo lipídico de mediana densidad electrónica ocupando gran parte de la célula. C: cloroplasto; L: cuerpo lipídico; N: núcleo; PC: pared celular; V: vacuola. Barra escala: 1,25  $\mu\text{m}$ .

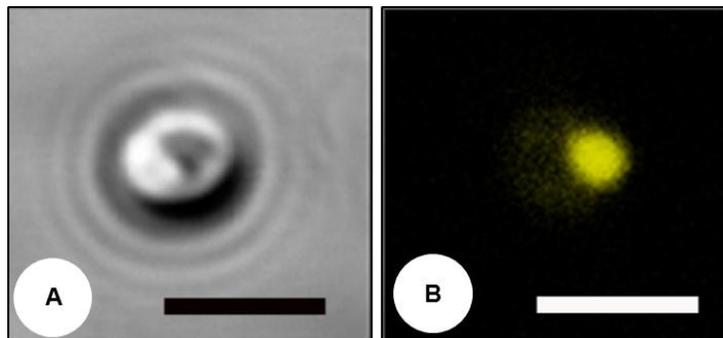


**Figura 3.5:** **A)** Observación ultraestructural de la pared celular de *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 (flecha). **B)** Detalle del estrato trilaminar (flecha). C: cloroplasto. Barra escala: 0,2  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.3 Estudio con microscopio confocal

La presencia de lípidos neutros en la fase estacionaria de crecimiento en *N. oceanica* CCALA 978 fue corroborada mediante la tinción con rojo Nilo y la observación con microscopio de fluorescencia confocal (Fig. 3.6). A una longitud

de onda de emisión de 580 nm, las gotas lipídicas se evidenciaron por su coloración dorada característica (Fig. 3.6 B).

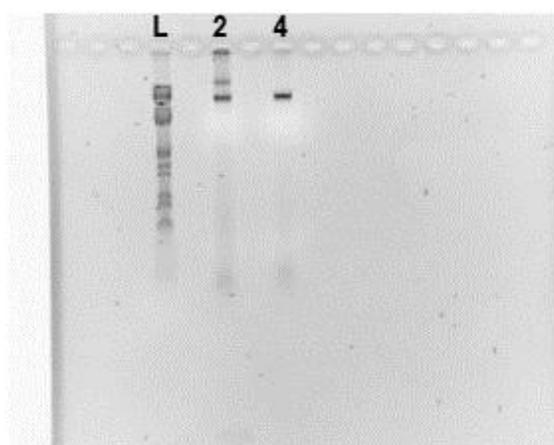


**Figura 3.6:** Observación de *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 al microscopio confocal. **A)** Contraste de fases. **B)** Fluorescencia. La coloración dorada indica un corpúsculo de lípidos neutros. Barra escala: 5  $\mu$ m.

## Caracterización molecular y análisis filogenético

Los estudios moleculares basados en los dos genes nuclear y cloroplástico, 18S rADN y *rbcl*, respectivamente, permitieron identificar a la cepa previamente denominada *Nannochloropsis oculata*, como *Nannochloropsis oceanica*.

El ADN fue amplificado exitosamente como se indica en la Figura 3.7, donde se puede ver el revelado del gel con las bandas oscuras en las líneas 2 y 4.



**Figura 3.7:** Producto de amplificación de las regiones que codifican para 18Sr ADN y *rbcl* separado en gel de agarosa L: control, 2,4: región amplificada.

Las regiones amplificadas luego fueron secuenciadas y la secuencia de nucleótidos correspondientes a los genes 18S rADN y *rbcL*, que se observan en las Figuras 3.8 y 3.9 respectivamente, fueron empleadas posteriormente en los alineamientos para el análisis filogenético.

```

1 TCATACGCTG TCTCAAAGAT TAAGCCATGC ACGTCTGAGA ATAAAGAGTT TTCTCTGAAT
61 CTGCGAATGG CTCATTATAT AGTTATAGT TTATTTGATA GTCCTTTACT ACTTGGATAA
121 CCGTAGTAAT TCTAGAGCTA ATACATGCAT CAACTCCCAA CTGCTTGTCG GACGGGATGT
181 ATTTATTAGA TAGAAACCAA TGCGGGGCAA CCCGGTATTG TGGTGAATCA TGATAACTTT
241 GCGGATCGCC GGCTTTTGCC AGCGACGAAT CATTCAAGTT TCTGCCCTAT CAGCTTTGGA
301 TGGTAGGGTA TTGGCCTACC ATGGCTCTAA CGGGTAACGG AGAATTGGGG TTCGATTCCG
361 GAGAGGGGAGC CTGAGAGACG GCTACCACAT CCAAGGAAGG CAGCAGGCGC GTAAATTACC
421 CAATCCTGAC ACAGGGAGGT AGTGACAATA AATAACAATG CCGGGGTTTA ACTCTGGCAA
481 TTGGAATGAG AACAATTTAA ATCCCTTATC GAGGATCAAT TGGAGGGCAA GTCTGGTGCC
541 AGCAGCCGCG GTAATCCAG CTCCAATAGC GTATACTAAA GTTGTTGCAG TAAAAAAGCT
601 CGTAGTTGGA TTTCTGGCAG GGACGGCTGG TCGGTTCCGA TAAGGGGCCG TACTATTGTT
661 GGTTCCCTGC ATCCTTGGGG AGAGCGATTC TGGCATTAAG TTGTTGGGGT CGGGATCCCT
721 ATCTTTTACT GTGAAAAAAT TAGAGTGTTT AAAGCAGGCT TAGGCCCTGA ATACATTAGC
781 ATGGAATAAT AAGATACGAC CTTGGTGGTC TATTTTGTG GTTTGCACGC CAAGGTAATG
841 ATTAATAGGG ATAGTTGGGG GTATTCGTAT TCAATTGTCA GAGGTGAAAT TCTTGGATT
901 ATGGAAGACG AACTACTGCG AAAGCATTTA CCAAGGATGT TTTCATTAAT CAAGAACGAA
961 AGTTAGGGGA TCGAAGATGA TTAGATACCA TCGTAGTCTT AACCATAAAC TATGCCGACT
1021 AGGGATCGGT GGGTGCATTG TAAGGCCCCA TCGGCACCTT ATGAGAAAAT AAAGTCTTTG
1081 GGTTCCGGGG GGAGTATGTT CGCAAGGCTG AAACCTAAAG AAATTGACGG AAGGGCACCA
1141 CCAGGAGTGG AGCCTGCGGC TTAATTTGAC TCAACACGGG GAAACTTACC AGGTCCAGAC
1201 ATAGTAAGGA TTGACAGATT GAGAGCTCTT TCTTGATTCT ATGGGTGGTG GTGCATGGCC
1261 GTTCTTAGTT GGTGGAGTGA TTTGTCTGTT TAATTCCGTT AACGAACGAG ACCCCCGCCT
1321 GCTAAATAGT ACTGGGAATG CTTAGCATTG CCAGAGACTT CTTAGAGGGA CTTTCGGCGC
1381 TAGGCCGAAG GAAGTTGGGG GCAATAACAG GTCTGTGATG CCCTTAGATG TCCTGGGGCC
1441 CACGCGCGCT AACTGATGC GTTCAACGAG TTATAACCT TGTCGGGAAG GACCGGGTAA
1501 TCTTGAAATG CGCATCGTGA TAGGGATAGA TTATTGCAAC TATTAATCTT GAACGAGGAA
1561 TCCTAGTAA ACGCGAGTCA TCAGCTCGCA TTGATTACGT CCCTGCCCTT TGACACACC
1621 GCCCGTCGCA CCTACCGATT GAATGATTCG GTGAAGCTTT CGGATTGCGC CACTGGCCTC
1681 GGTCGGCAGC GTGAGAAGTT ATCTAAACCT CATCATTTAG AGGAAGNGA AGTCGTAACA
1741 AGGTTTCCGT AGGTGAACCT

```

**Figura 3.8:** Secuencia de nucleótidos de la región amplificada del gen 18S rADN.

```

1 ATCACTCCAC AACCCAGGGGT TGATCCAATT GAAGCTGCGG CTGCCATCGC TGGTGAATCT
61 TCAACAGCTA CATGGACTGT AGTATGGACT GACTTATTAA CAGCTTGCGA TGTTTATCGA
121 GCAAAAGCTT ACAAAGTTGA TTCAGTTCCA GGTACTAGCG ACCAATACTT CGGTTACGTT
181 GCATACGAAT GTGATCTTTT TGAAGAAGGT TCAATTGCTA ACTTAACAGC TTCAATTATC
241 GGTAACGTAT TTGGATTCAA AGCTGTAAAA GCATTACGTC TTGAAGATAT GCGTATGCCT
301 TACGCTTACT TAAAAACATT CCAAGGTCCA GCTACTGGTG TGATTGTTGA ACGTGAGCGT
361 TTAGACAAAT TCGGACGTCC TTTATTAGGT GCAACTGTAA AACCTAAACT TGGTTTATCA
421 GGTAAAAACT ATGGACGTGT TGTATACGAA GGTTTAAAAG GTGGTTTAGA CTTCTTAAAA
481 GATGACGAAA ACATTAACCT TCAACCATTG ATGCGTTGGC GTGAACGTTT CTCGTACGTA
541 ATGGAAGGTG TTAATAGATC AGCTGCAGCT TCTGGTGAAG TAAAGGTTT TTACCTTAAC
601 GTTACTGCAG CAACTATGGA AGAAATGTAC GAACGTGCTG AATTTGCTAA ACTTGTGGT
661 TCAGTAATTA TCATGATCGA CTTAGTAATT GGTTACTCTG CAATTCAATC GATGGCTGTT
721 TGGTCTCGTA AGAATGATAT GATCCTTAC TTACACCGTG CAGGTAATC AGCATATGCT
781 CGTCAAAAGA ACCATGGTAT TAACTCCCGT GTAATTTGTA AATGGATGCG TATGGCTGGT
841 GTTGACCACA TCCATGCAGG TACAGTTGTA GGTAATTAG AAGGTGACCC TCTAATGGTT
901 AAAGGTTTCT ACAACGTATT ATTACAAACA TCACTAGATA TTAACCTACC ACAAGGGATC
961 TTCTTCGAAC AAGATTGGGC TTCTTAAAGA AAAACACTAC CTGTAGCTTC TGGTGGTATC
1021 CATTGTGGAC AAATGCACCA GTTACTTAAC TATCTAGGTG AAGACTGTGT ACTACAATTT
1081 GGTGGTGGTA CAATTGGTCA CCCTGATGGT ATCGCTTCTG GTGCGACTGC TAACCGCGTA
1141 GCTATGGAGT CAGTGCTTTT AGCTAAATAT GAAGGTAAAG ATTACATTAA CGAAGGACCA
1201 AAAATTTTAC GTGCGGCGGC AGAAAGTTGT GCGCCATTAC GTTCTGCTTT AGATCTTTGG
1261 AAAGATATTG CTTTCAACTA TACATCAACA GATACTGCTG ATTACATTGA AACTGCAACT
1321 AAACAGTAA

```

**Figura 3.9:** Secuencia de nucleótidos de la región amplificada del gen *rbcl*.

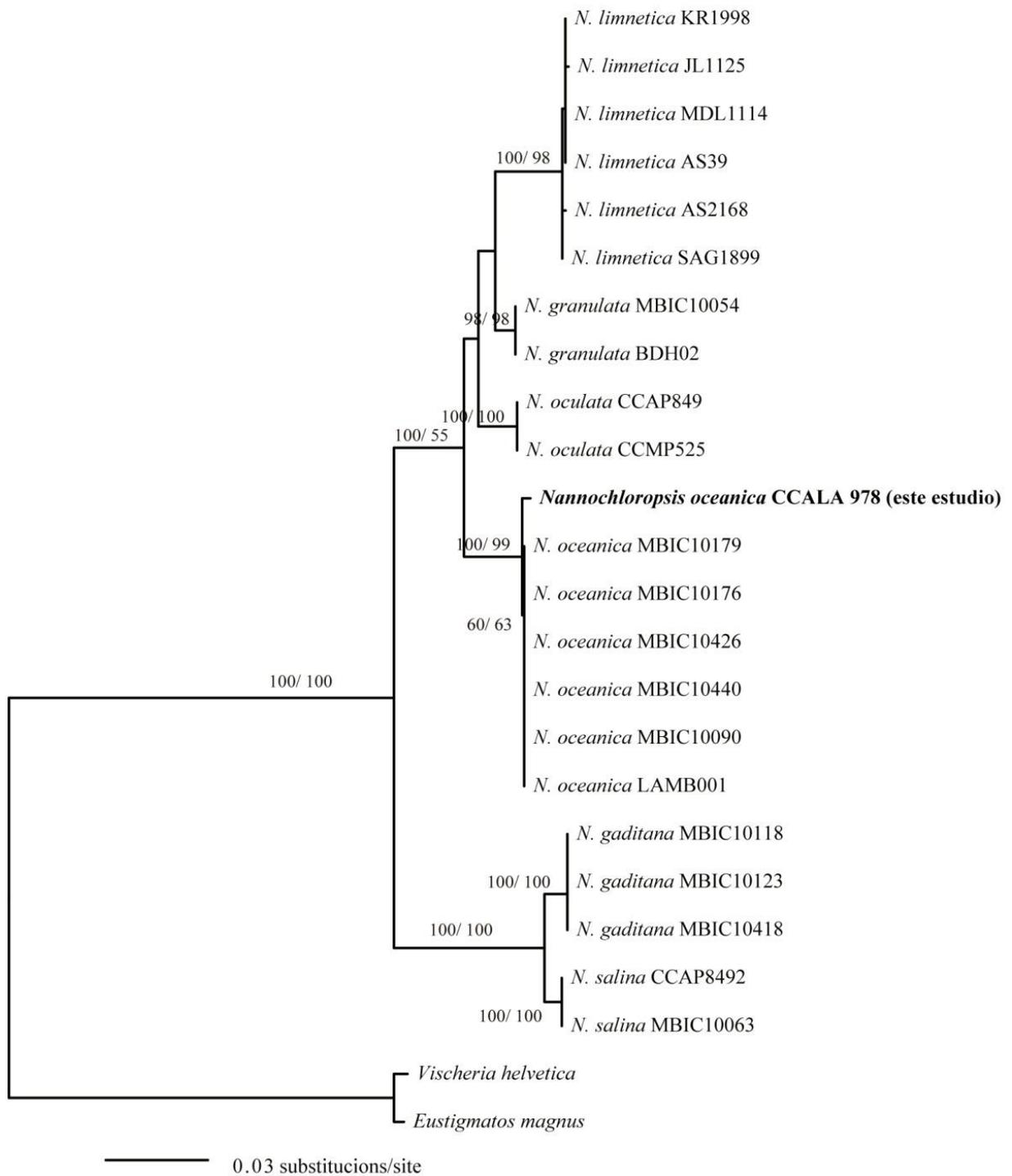
Los árboles de máxima verosimilitud obtenidos para los dos genes estudiados confirmaron que la cepa en estudio corresponde a *Nannochloropsis oceanica* (Fig. 3.10-11).

El set de datos para el gen cloroplástico *rbcl* incluyó 1389 nucleótidos y 23 taxa, mientras que el 18S rADN incluyó 1792 nucleótidos y 32 taxa. Los análisis filogenéticos basados en los genes *rbcl* y 18S rADN mostraron que el género *Nannochloropsis* es un grupo monofilético subdividido en dos clados: *N. salina* + *N. gaditana* (con un soporte *bootstrap* alto basado en los análisis de MV y MP para ambos genes) y *N. oculata* + *N. oceanica* + *N. limnetica* + *N. granulata* (con un soporte *bootstrap* moderado-alto basado en los mismos análisis para ambos genes). En el análisis para el gen *rbcl* se encontró que *N. oceanica* forma parte del grupo hermano de *N. limnetica* + *N. granulata* con una bajo soporte *bootstrap*, como se observa en la Figura 3.10; mientras que el análisis para el gen 18S rADN mostró que *N. oculata* es hermana de *N. oceanica* con un soporte de *bootstrap* moderado (Fig. 3.11).

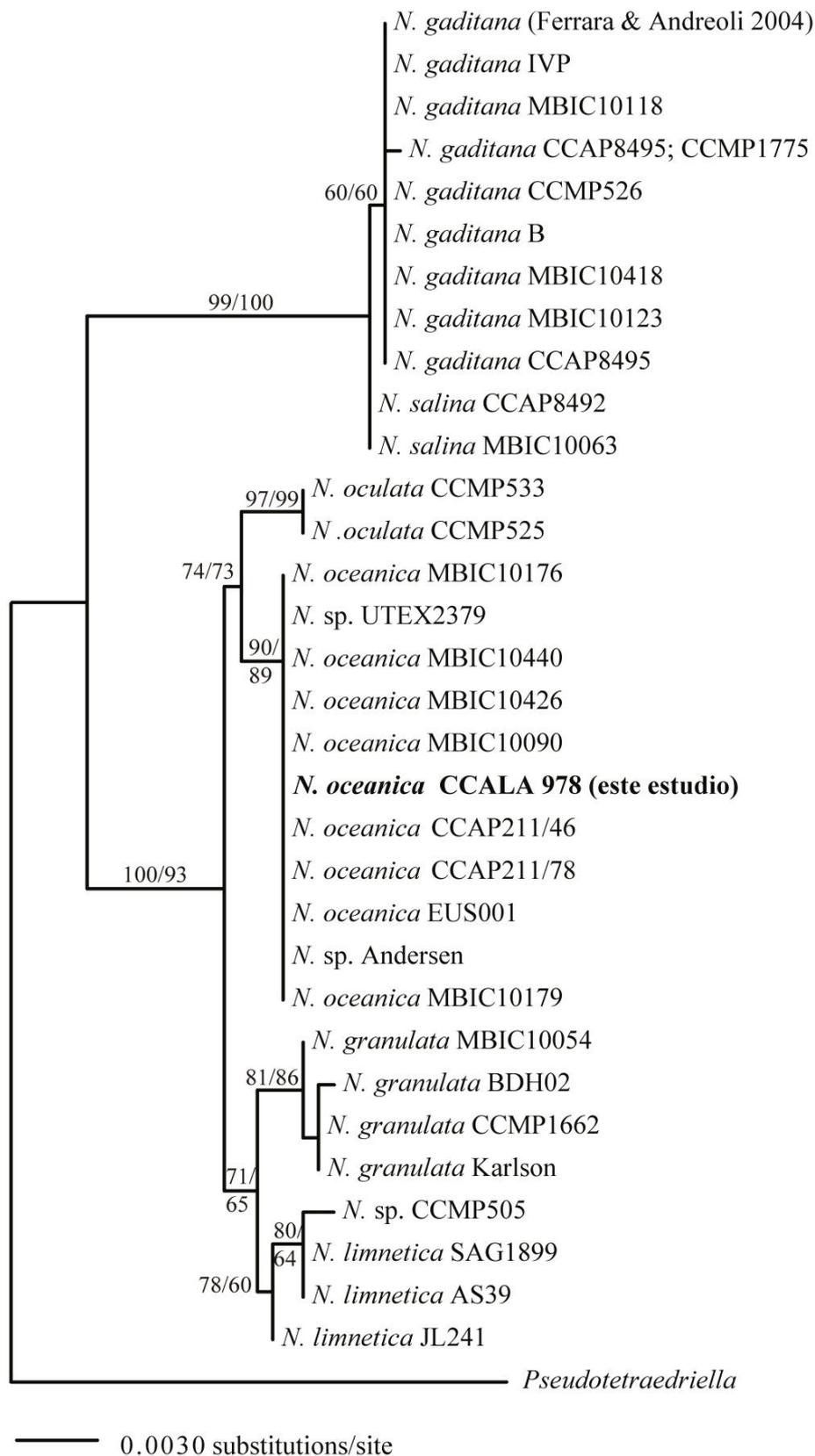
En todos los análisis filogenéticos, las secuencias de la cepa en estudio estuvieron comprendidas en el grupo de *N. oceanica*.

La secuencia de *rbcL* para *N. oceanica* CCALA 978 fue 99,7% idéntica a otras cepas de *N. oceanica*, aisladas en el Mar Rojo, Mar Mediterráneo, Israel, el Océano Pacífico y Japón (Tabla 3.3), mientras que fue 86,4-96,9% idéntica a cepas de otras especies del género. Sólo 4 cambios sinónimos fueron encontrados entre la cepa bajo estudio y las otras cepas de *N. oceanica*. Las secuencias de *rbcL* fueron idénticas para diferentes cepas de *N. oculata*, *N. granulata* y *N. salina*. Las matrices de similitud pueden ser consultadas en el anexo al final del presente capítulo (Tabla A3.1, matriz de similitud para el gen *rbcL*; Tabla A3.2, matriz de similitud para el gen 18S rADN).

Para aquellas especies de *Nannochloropsis* con más cepas secuenciadas, la variación intraespecífica fue comparable con *N. oceanica*: 99,8-99% de identidad con *N. limnetica* y 98,6-100 % con *N. gaditana*. La secuencia de 18S rADN para *N. oceanica* CCALA 978 mostró una identidad del 100% con otras cepas de *N. oceanica*, aisladas en el Mar Rojo, Mar Mediterráneo, Israel, el Océano Pacífico y Japón (Tabla 3.3) y de 98,5-99,6% con otras especies del género.



**Figura 3.10:** Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud (MV) basado en el gen cloroplástico *rbcL* (1389 nucleótidos) obtenido mediante Garli bajo el modelo GTR+I+G4 por JModelTest. El análisis de Máxima Parsimonia (MP) fue realizado con PAUP\*4b10. Los valores de *bootstrap* (100 réplicas) para MP (izquierda) y el análisis de MV (derecha) son provistos para valores >50%.



**Figura 3.11:** Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud (MV) basado en el gen nuclear 18S rADN (1792 nucleótidos) obtenido mediante Garli bajo el modelo GTR+I+G4 por JModelTest. El análisis de Máxima Parsimonia (MP) fue realizado con PAUP\*4b10. Los valores de *bootstrap* (100 réplicas) para MP (izquierda) y el análisis de MV (derecha) son provistos para valores >50%.

### 3.4 Discusión

Las características morfológicas de la cepa *N. oceanica* CCALA 978 observadas al microscopio óptico concuerdan con las descritas y reportadas por otros autores para la especie. Durante todas las fases de crecimiento las células de *N. oceanica* CCALA 978 presentaron forma esférica y un cuerpo rojo, el cual fue descrito como un estigma por Droop (1955) en *N. oculata*. Este orgánulo también fue observado en cultivos envejecidos de *N. gaditana* y *N. salina* por Lubian (1982). Además, pequeños cuerpos rojos fueron también descritos por Suda *et al.* (2002) en *N. oceanica* y por Cao *et al.* (2013) en *N. oceanica* var. *sinensis*. Sin embargo, éstos fueron raramente encontrados en *N. salina* y *N. gaditana*, y ausentes en *N. granulata* (Karlson *et al.* 1996).

Agregados celulares microscópicos similares a los observados en *N. oceanica* CCALA 978 durante la fase estacionaria tardía, fueron descritos por Rodolfi *et al.* (2003) en cultivos de *Nannochloropsis* sp. Karlson *et al.* (1996) sugirieron en *N. granulata* que después de un periodo de crecimiento activo, porciones de paredes celulares se liberan y forman los agregados celulares.

Con respecto a las características ultraestructurales de *N. oceanica* CCALA 978, éstas concuerdan con las descritas para el género por otros autores. Como se observó en la Figura 3.4, en fase exponencial el cloroplasto ocupó gran parte del citoplasma, mientras que en fase estacionaria éste mostró una reducción de tamaño considerable. Cambios en la ultraestructura de los cloroplastos, asociados a diferentes factores, fueron descritos en otras especies de *Nannochloropsis*. Por ejemplo, Fisher *et al.* (1998) informaron en *Nannochloropsis* sp. modificaciones tanto en el tamaño del cloroplasto como en el número de tilacoides, debido a la exposición a diferentes intensidades de luz. Por otra parte, Simionato *et al.* (2013) observaron una disminución en el tamaño de los cloroplastos de *N. gaditana* bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno.

Las observaciones al MET de células de *N. oceanica* CCALA 978 en fase estacionaria indicaron la presencia de cuerpos lipídicos. Estructuras similares fueron reportadas por otros autores en otras especies de *Nannochloropsis*. Por ejemplo: en *Nannochloropsis* sp., Fisher *et al.* (1998), Rodolfi *et al.* (2003) y Sukenik *et al.* (1989) denominaron a estas estructuras glóbulos de almacenamiento o cuerpos de acumulación, mientras que Fietz *et al.* (2005) las llamó gotas lipídicas en *N. limnetica*. Estructuras similares también fueron

observadas por Simionato *et al.* (2013) en *N. gaditana* y por Dong *et al.* (2013) en la cepa *N. oceanica* IMET1.

En *N. oceanica* CCALA 978, las observaciones al microscopio de fluorescencia confocal permitieron corroborar la presencia de lípidos neutros en estos cuerpos lipídicos, mediante la tinción con rojo Nilo, un fluorocromo específico para detectar esta clase de lípidos (Greenspan *et al.* 1985).

Con respecto a la pared celular de *N. oceanica* CCALA 978, es importante destacar que la misma mantuvo un espesor constante durante todas las etapas de crecimiento. El típico aspecto trilaminar observado se corresponde con el estrato externo trilaminar presente en las paredes celulares de cistos de *Haematococcus pluvialis* y cigotos de *Chlamydomonas* (Pickett-Heaps 1975; Damiani *et al.* 2006). Paredes celulares con características similares a las descritas en *N. oceanica* CCALA 978 fueron observadas en *N. salina* y *Nannochloropsis* sp. CCAP 849/7 por Gelin *et al.* (1996) y en *N. limnetica* por Krienitz *et al.* (2000). Estos autores indicaron la presencia de un biopolímero no hidrolizable denominado algaenano, de composición química similar a la esporopolenina, presente en los granos de polen de las plantas superiores (Guilford *et al.* 1988), el cual le confiere gran dureza a la pared.

Sin embargo, ciertas estructuras celulares descritas por otros autores en *Nannochloropsis* no fueron observadas en *N. oceanica* CCALA 978. Por ejemplo, los cuerpos refractarios en el citoplasma en *N. oceanica* (Suda *et al.* 2002), *N. limnetica* (Andersen *et al.* 1998; Krienitz *et al.* 2000) y en células jóvenes de *N. granulata* (Karlson *et al.* 1996). Tampoco se observaron las inclusiones granulares, pirenoides y una papila en la pared celular, descritos por Suda *et al.* (2002) y Cao *et al.* (2013) en *N. oceanica*. La papila de la pared celular también fue indicada en *N. oculata*, *N. gaditana* y *N. salina* y descrita como una estructura única de las Eustigmatophyceae, con función desconocida (Santos y Leedale 1995).

Con respecto al color de los cultivos, las variaciones observadas en la coloración durante las distintas fases de crecimiento pueden utilizarse como un indicador del estado fisiológico de las células y/o cultivos. Como se pudo comprobar en este estudio, estos cambios en la coloración están relacionados con la modificación de las concentraciones de los pigmentos que ocurre durante el crecimiento de *N. oceanica*. En la mayoría de las especies microalgales, conforme los cultivos envejecen, el contenido de clorofila disminuye, mientras que

el contenido de pigmentos carotenoides aumenta (Lubian y Establier 1983). Lubian y Establier (1982) han indicado que esta diferencia de color se evidencia con mayor intensidad en las especies de la clase Eustigmatophyceae, debido a la ausencia en este grupo de clorofilas *b* ó *c*. Estos cambios en la coloración también fueron observados por otros autores en otras especies de *Nannochloropsis*. Lubian (1982) mostró que los cultivos de *N. gaditana* cambiaron su coloración en función de la edad del cultivo, la intensidad de la luz incidente y la concentración de los nutrientes en el medio. En *N. oceanica* CCALA 978 los cambios de color en las células no solo se correspondieron con cambios en las concentraciones de pigmentos, sino que también se vieron reflejados en diferente grado de desarrollo del cloroplasto y de los glóbulos lipídicos.

Desde el punto de vista fisiológico, durante la fase de crecimiento exponencial no existen limitaciones de nutrientes. En esta etapa, la clorofila se sintetiza rápidamente y su concentración se mantiene en niveles adecuados que permiten realizar la fotosíntesis (Margalef 1974; Jeffrey 1980). Durante la fase estacionaria, cuando los nutrientes se convierten en limitantes o se agotan, la síntesis de clorofila disminuye o incluso se detiene y se incrementa la síntesis de los pigmentos carotenoides (Margalef 1974).

Con respecto a la identificación molecular de la especie en estudio, las secuencias de los genes nucleares y cloroplástico 18S rADN y *rbcL*, respectivamente, fueron utilizadas para su identificación (Karlson *et al.* 1996; Andersen *et al.* 1998; Krienitz *et al.* 2000; Suda *et al.* 2002). Los estudios moleculares basados en estos dos genes permitieron identificar a la cepa como *Nannochloropsis oceanica*.

Las secuencias de los genes para la cepa nativa fueron altamente similares a las de otras cepas de *N. oceanica*. La variación intraespecífica para el gen *rbcL* dentro de la especie *N. oceanica* fue comparable a la de otras especies del género (99,8-99,9% de identidad en *N. limnetica* y 98,6-100% en *N. gaditana*). Los análisis filogenéticos basados en los genes 18S rADN y *rbcL* de *N. oceanica* CCALA 978 resultaron en árboles filogenéticos con una topología similar con dos clados principales: *N. oculata* + *N. oceanica* + *N. limnetica* + *N. granulata* y *N. gaditana* + *N. salina* con altos valores de soporte *bootstrap*. Este resultado fue también observado por Andersen *et al.* (1998) (para el gen 18S rADN), Krienitz *et al.* (1996) (para el gen 18S rADN) y Suda *et al.* (2002) (para los genes 18S rADN y *rbcL*). Esta topología observada en los árboles filogenéticos es consistente con

una diferencia morfológica en los dos clados. Las especies dentro del grupo de *N. gaditana* y *N. salina* presentan forma cilíndrica, mientras que las especies del otro clado, que incluye a *N. oculata*, *N. oceanica*, *N. limnetica* y *N. granulata*, son esféricas u ovals (Hibberd 1981; Karlson *et al.* 1996).

### 3.5 Conclusiones

En este estudio, los análisis morfológico y ultraestructural con microscopios óptico y electrónico, junto con el análisis molecular a través de los genes nuclear y cloroplástico, 18S rADN y *rbcL* respectivamente, permitieron la correcta identificación a nivel específico de una cepa microalgal nativa de *Nannochloropsis*, aislada del Océano Atlántico Sur. La cepa previamente denominada *Nannochloropsis oculata* se identificó como *Nannochloropsis oceanica* (Eustigmatophyceae).

## **ANEXO**

**Tabla A3.1:** Matriz de similitud de las especies de *Nannochloropsis* para el gen *rbcL*. Los valores indicados en la fila 7 corresponden a la similitud de *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 con las restantes especies del género *Nannochloropsis*.

Cepa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	####																							
2	1,000	####																						
3	1,000	1,000	####																					
4	1,000	1,000	1,000	####																				
5	1,000	1,000	1,000	1,000	####																			
6	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	####																		
7	<b>0,997</b>	<b>0,997</b>	<b>0,997</b>	<b>0,997</b>	<b>0,997</b>	<b>0,997</b>	####																	
8	0,970	0,970	0,970	0,970	0,970	0,970	0,969	####																
9	0,970	0,970	0,970	0,970	0,970	0,970	0,969	1,000	####															
10	0,975	0,975	0,975	0,975	0,975	0,975	0,974	0,978	0,978	####														
11	0,975	0,975	0,975	0,975	0,975	0,975	0,974	0,978	0,978	1,000	####													
12	0,964	0,964	0,964	0,964	0,964	0,964	0,962	0,970	0,970	0,976	0,976	####												
13	0,962	0,962	0,962	0,962	0,962	0,962	0,961	0,969	0,969	0,975	0,975	0,999	####											
14	0,962	0,962	0,962	0,962	0,962	0,962	0,961	0,969	0,969	0,975	0,975	0,999	1,000	####										
15	0,962	0,962	0,962	0,962	0,962	0,962	0,961	0,969	0,969	0,975	0,975	0,999	1,000	1,000	####									
16	0,962	0,962	0,962	0,962	0,962	0,962	0,961	0,969	0,969	0,975	0,975	0,999	0,998	0,998	0,998	####								
17	0,961	0,961	0,961	0,961	0,961	0,961	0,960	0,968	0,968	0,974	0,974	0,998	0,999	0,999	0,999	0,999	####							
18	0,924	0,924	0,924	0,924	0,924	0,924	0,921	0,924	0,924	0,923	0,923	0,923	0,922	0,922	0,922	0,922	0,921	####						
19	0,924	0,924	0,924	0,924	0,924	0,924	0,921	0,924	0,924	0,923	0,923	0,923	0,922	0,922	0,922	0,922	0,921	1,000	####					
20	0,924	0,924	0,924	0,924	0,924	0,924	0,921	0,924	0,924	0,923	0,923	0,923	0,922	0,922	0,922	0,922	0,921	1,000	1,000	####				
21	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928	0,925	0,926	0,926	0,926	0,926	0,926	0,925	0,925	0,925	0,925	0,924	0,986	0,986	0,986	####			

<b>22</b>	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928	0,925	0,926	0,926	0,926	0,926	0,926	0,925	0,925	0,925	0,925	0,924	0,986	0,986	0,986	1,000	####		
<b>23</b>	0,866	0,866	0,866	0,866	0,866	0,866	0,865	0,871	0,871	0,872	0,872	0,875	0,874	0,874	0,874	0,876	0,875	0,858	0,858	0,858	0,859	0,859	####	
<b>24</b>	0,865	0,865	0,865	0,865	0,865	0,865	0,864	0,868	0,868	0,871	0,871	0,872	0,871	0,871	0,871	0,873	0,872	0,858	0,858	0,858	0,859	0,859	0,994	###

1- AB052283 *N. oceanica* MBIC10179 (Suda et al. 2002); 2- AB052284 *N. oceanica* MBIC10426 (Suda et al. 2002); 3- AB052285 *N. oceanica* MBIC10440 (Suda et al. 2002); 4- AB052281 *N. oceanica* MBIC10090 (Suda et al. 2002); 5- AB052282 *N. oceanica* MBIC10176 (Suda et al. 2002); 6- HQ201713 *N. oceanica* LAMB001 (Li et al. 2011); 7- ***N. oceanica* CCALA978 (este estudio)**; 8- AB052286 *N. oculata* CCAP849 (Suda et al. 2002); 9- HQ710609 *N. oculata* CCMP525 (Yang et al. 2012); 10- AB052280 *N. granulata* MBIC10054 (Suda et al. 2002); 11- KC128502 *N. granulata* BDH02 (no publicado); 12- AM421006 *N. limnetica* SAG1899 (Maistro et al. 2009); 13- DQ977729 *N. limnetica* KR1998 (Fawley y Fawley 2007); 14- DQ977741 *N. limnetica* AS39 (Fawley y Fawley 2007); 15- DQ977740 *N. limnetica* MDL1114 (Fawley y Fawley 2007); 16- DQ977739 *N. limnetica* AS2168 (Fawley & Fawley 2007); 17- DQ977730 *N. limnetica* JL1125 (Fawley y Fawley 2007); 18- AB052735 *N. gaditana* MBIC10418 (Suda et al. 2002); 19- AB052734 *N. gaditana* MBIC10123 (Suda et al. 2002); 20- AB052279 *N. gaditana* MBIC10118 (Suda et al. 2002); 21- AB052287 *N. salina* MBIC10063 (Suda et al. 2002); 22- AB052288 *N. salina* CCAP8492 (Suda et al. 2002); 23- HQ710612 *Vischeria helvética* (Suda et al. 2002); 24- AB280615 *Eustigmatos magnus* (Suda et al. 2002).

**Tabla A3.2:** Matriz de similitud de las especies de *Nannochloropsis* para el gen 18S rADN. Los valores de la fila 22 indican la similitud de *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 con las restantes especies del género *Nannochloropsis*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
1	###																																
2	1,000	####																															
3	0,993	0,993	####																														
4	0,993	0,993	1,000	####																													
5	0,993	0,993	1,000	1,000	####																												
6	0,993	0,993	0,996	0,996	0,996	####																											
7	0,993	0,993	0,995	0,995	0,995	0,999	####																										
8	0,993	0,993	0,995	0,995	0,995	0,999	1,000	####																									
9	0,993	0,993	0,995	0,995	0,995	0,999	0,999	0,999	####																								
10	0,994	0,994	0,999	0,999	0,999	0,997	0,997	0,997	0,996	####																							
11	0,985	0,985	0,983	0,983	0,983	0,983	0,984	0,984	0,983	0,985	####																						
12	0,985	0,985	0,983	0,983	0,983	0,983	0,984	0,984	0,983	0,985	1,000	####																					
13	0,984	0,984	0,983	0,983	0,983	0,983	0,983	0,983	0,983	0,984	0,999	0,999	####																				
14	0,984	0,984	0,983	0,983	0,983	0,983	0,983	0,983	0,983	0,984	0,999	0,999	1,000	####																			
15	0,984	0,984	0,983	0,983	0,983	0,983	0,983	0,983	0,983	0,984	0,999	0,999	1,000	1,000	####																		
16	0,984	0,984	0,983	0,983	0,983	0,983	0,983	0,983	0,983	0,984	0,999	0,999	1,000	1,000	1,000	####																	
17	0,984	0,984	0,983	0,983	0,983	0,983	0,983	0,983	0,983	0,984	0,999	0,999	1,000	1,000	1,000	1,000	####																
18	0,984	0,984	0,983	0,983	0,983	0,983	0,983	0,983	0,983	0,984	0,999	0,999	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	####															
19	0,984	0,984	0,983	0,983	0,983	0,983	0,983	0,983	0,983	0,984	0,999	0,999	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	####														
20	0,984	0,984	0,983	0,983	0,983	0,983	0,983	0,983	0,983	0,984	0,999	0,999	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	####													
21	0,984	0,984	0,983	0,983	0,983	0,983	0,983	0,983	0,983	0,984	0,999	0,999	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	####												
22	<b>0,996</b>	<b>0,996</b>	<b>0,994</b>	<b>0,994</b>	<b>0,994</b>	<b>0,994</b>	<b>0,995</b>	<b>0,995</b>	<b>0,994</b>	<b>0,995</b>	<b>0,986</b>	<b>0,986</b>	<b>0,985</b>																				
23	0,996	0,996	0,994	0,994	0,994	0,994	0,995	0,995	0,994	0,995	0,986	0,986	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	
24	0,996	0,996	0,994	0,994	0,994	0,994	0,995	0,995	0,994	0,995	0,986	0,986	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	
25	0,996	0,996	0,994	0,994	0,994	0,994	0,995	0,995	0,994	0,995	0,986	0,986	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	
26	0,996	0,996	0,994	0,994	0,994	0,994	0,995	0,995	0,994	0,995	0,986	0,986	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	
27	0,996	0,996	0,994	0,994	0,994	0,994	0,995	0,995	0,994	0,995	0,986	0,986	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	



## **Capítulo 4 – Optimización de métodos para determinar la densidad celular, el contenido de pigmentos fotosintéticos y los lípidos neutros en *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978**

---

### **4.1 Introducción**

El desarrollo de técnicas rápidas, eficientes, y no destructivas que permitan realizar un seguimiento del cultivo y evaluar su estado fisiológico resulta fundamental en el campo de la biotecnología microalgal (Gitelson *et al.* 2000; Borowitzka 2005). Estas técnicas son indispensables ya que proveen información útil para tomar decisiones respecto de las condiciones del cultivo y la determinación del tiempo de cosecha, la cual generalmente debe ser tomada en horas (Gitelson *et al.* 2000). Los errores en el momento de cosecha de un cultivo masivo pueden conducir a pérdidas significativas o totales en la producción del mismo (Gitelson *et al.* 2000).

Algunos de los principales criterios empleados en la selección de especies destinadas a utilizarse como materia prima para elaboración de biodiesel son: 1) la determinación de la velocidad de crecimiento; 2) el conocimiento del estado fisiológico del cultivo y 3) la determinación de la calidad y cantidad de los lípidos (Griffiths y Harrison 2009).

Como se describió en el capítulo anterior, las células de *N. oceanica* CCALA 978 presentan un tamaño pequeño, que varía desde 2 a 5  $\mu\text{m}$  en las diferentes etapas de crecimiento, y paredes celulares gruesas y muy resistentes durante todo el ciclo celular (Suda *et al.* 2002; Bongiovani *et al.* 2013). Ambas características morfológicas dificultan las estimaciones de la densidad celular, del contenido de pigmentos y la detección de lípidos neutros en esta especie.

La determinación de la densidad celular de los cultivos en crecimiento mediante el uso de microscopio óptico, en este género en particular, resulta tediosa y es un procedimiento que requiere mucho tiempo (Rocha *et al.* 2003; Madrid y Felice 2005). Por el contrario, el uso de la densidad óptica (OD) como estimador de densidad celular es uno de los métodos más efectivos, menos invasivos y que requiere de pequeños volúmenes para su determinación. Bajo este contexto, la obtención de un estimador de densidad celular, que reemplace los conteos al microscopio óptico, resulta una herramienta muy útil para

monitorear el crecimiento de *Nannochloropsis*. Por ejemplo, la medición *in situ* bajo una determinada longitud de onda puede ser una técnica efectiva para la estimación de densidades celulares cuando estos valores son ajustados a un modelo específico (Rocha *et al.* 2003).

Con respecto al contenido de pigmentos, la clorofila *a* es un buen estimador de biomasa (Serodio *et al.* 2009) y la variación en su concentración, así como también los cambios en la concentración de los carotenoides, son indicadores confiables del estado fisiológico del cultivo y por lo tanto, pueden ser empleados como un estimador indirecto del crecimiento celular.

Existen numerosas técnicas analíticas para la cuantificación de pigmentos, de manera que elegir la más adecuada para cada especie resulta de fundamental importancia. Para la extracción de pigmentos fotosintéticos se aplican diferentes métodos de disrupción de la pared celular, los cuales pueden ser físicos, químicos o una combinación de ambos (Henriquez *et al.* 2003). Los métodos químicos involucran el empleo de solventes, y su selección está determinada por el grado de afinidad que existe entre el solvente y el compuesto a ser extraído. Además de presentar poder de extracción, los solventes también tienen la capacidad de actuar en la lisis celular, favoreciendo así la extracción de un determinado compuesto.

En especies con paredes celulares gruesas y resistentes, como *Nannochloropsis oceanica*, la extracción mediante métodos convencionales, empleados en forma rutinaria para otras especies, no resulta eficiente (Henriquez *et al.* 2007). Por esta razón, la búsqueda de técnicas eficaces que permitan una buena estimación de pigmentos es indispensable.

Como se mencionó anteriormente, un aspecto clave a tener en cuenta en el momento de establecer la potencialidad de una especie como materia prima para la producción de biodiesel, es la determinación y estimación del contenido de lípidos neutros (Chisti 2007; Griffiths y Harrison 2009). El contenido de lípidos puede ser analizado mediante diversos métodos. Las técnicas convencionales de determinación de lípidos implican su extracción por medio de solventes, el fraccionamiento y la determinación gravimétrica. Algunos de los procedimientos tradicionales de extracción emplean ampollas de separación y mezclas en diferentes proporciones de cloroformo:metanol como el método de Folch (Folch *et al.* 1957), el método de Bligh y Dyer (Bligh y Dyer 1959), en uno o varios pasos (Axelsson y Gentili 2014) o solventes como éter etílico o hexano en equipos

soxhlet (Bi y He 2013; Li *et al.* 2008), entre otros. Si bien estas técnicas son necesarias y se emplean de manera habitual en los laboratorios, la principal desventaja que presentan es el tiempo de realización y la imposibilidad de utilizarlas en seguimientos de la acumulación diaria de lípidos. En tal sentido, son necesarias otras metodologías que permiten la obtención de resultados cuali y cuantitativos de manera rápida y empleando volúmenes pequeños de cultivos.

Actualmente, muchos estudios se han focalizado en la medición *in situ* del contenido de lípidos neutros empleando espectroscopía de fluorescencia molecular con fluorocromos como el rojo Nilo (Elsey *et al.* 2007; Chen *et al.* 2009). El rojo Nilo es un colorante fluorescente liposoluble empleado para detectar lípidos neutros (Cooksey *et al.* 1987). Comparado con otros fluorocromos, es fotoestable y su empleo representa una herramienta rápida y sencilla de detección (Fowler y Greenspan 1985). Este colorante ha sido utilizado en diferentes grupos de organismos: células animales (Genicot *et al.* 2005), bacterias (Izard y Limberger 2003), levaduras (Evans *et al.* 1985; Kimura *et al.* 2004), zooplancton (Alonso y Mayzaud 1999). Además, es ampliamente utilizado en diversas clases microalgales (Doan y Obbard 2011), como por ejemplo, Bacillariophyceae (Cooksey *et al.* 1987; McGinnis *et al.* 2007), Xanthophyceae (Eltgroth *et al.* 2005), Chrysophyceae (de la Jara *et al.* 2003), Phaeophyceae (Brzenzinski *et al.* 1993), Chlorophyceae (Lee *et al.* 1998; Elsey *et al.* 2007; Chen *et al.* 2009; Huang *et al.* 2009; Popovich *et al.* 2012; Damiani *et al.* 2014) y Eustigmatophyceae (Doan y Obbard 2010; Bongiovani *et al.* 2013).

Sin embargo, en algunas especies de algas, debido a la estructura y composición de sus paredes celulares, el ingreso del fluorocromo y su unión con los compuestos lipídicos intracelulares resulta difícil (Chen *et al.* 2009). Además, los lípidos neutros tienden a mantenerse en contacto con la fase acuosa celular y existen algunos polisacáridos en las paredes celulares que dificultan el ingreso del colorante. En *Nannochloropsis*, el grosor y la presencia de algaenanos en la pared celular (Gelin *et al.* 1998), constituyen una importante barrera que impide el ingreso eficiente del fluorocromo. Debido a estos inconvenientes, para lograr una buena penetración del fluorocromo y así poder incrementar la eficiencia del método, es necesario el desarrollo y/o la optimización de técnicas que involucran el uso de solventes combinados con distintos métodos de disrupción celular. En diversas especies de *Nannochloropsis* se han empleado diferentes solventes como el etanol, la acetona, la glicerina, el etilenglicol y el dimetilsulfóxido (DMSO)

para mejorar la difusión del flurocromo en el citoplasma (Castell y Mann 1994; Chen *et al.* 2009; Doan y Obbard 2011). Particularmente el DMSO es un solvente orgánico que contiene azufre, es incoloro, aprótico y altamente polar. Debido a estas características, este compuesto es miscible en agua y en otros solventes orgánicos polares y no polares.

Bajo este contexto, los objetivos del presente capítulo estuvieron focalizados en la optimización del monitoreo rápido y eficiente del estado fisiológico de los cultivos de *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978. Así, los objetivos específicos fueron: 1) obtener un modelo que permita estimar la densidad celular a partir de mediciones de densidad óptica a una determinada longitud de onda; 2) optimizar los métodos de extracción de pigmentos, y 3) optimizar los métodos de tinción con rojo Nilo que permitan una eficiente detección cualitativa y cuantitativa del contenido de lípidos neutros. Adicionalmente, se realizó una experiencia de crecimiento con el objeto de aplicar y verificar los métodos propuestos.

En base a los objetivos planteados, se formulan las siguientes hipótesis:

- 1) El empleo de la densidad óptica resulta un método efectivo para estimar la densidad celular en cultivos de *N. oceanica* CCALA 978 y permite monitorear su crecimiento en forma rápida.
- 2) El tratamiento previo de las células de *N. oceanica* CCALA 978 es efectivo para la extracción de pigmentos y la detección de lípidos neutros debido a su gruesa y resistente pared celular.
- 3) La determinación del contenido de clorofila *a* y las mediciones de la autofluorescencia de los cultivos de *N. oceanica* CCALA 978 pueden emplearse como indicadores indirectos de la actividad fotosintética de las células.
- 4) La optimización de las técnicas fluorimétricas con rojo Nilo permite una detección cuali y cuantitativa rápida del contenido de lípidos neutros en *N. oceanica* CCALA 978.

## 4.2 Materiales y Métodos

### 4.2.1 Condiciones de cultivo

*Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 fue cultivada en medio f/2, ajustando la salinidad a 30, de acuerdo con lo detallado en la Sección 2.3.1 del Capítulo 2. Diferentes experiencias fueron realizadas por triplicado en Erlenmeyer de 250 mL con un volumen de cultivo de 150 mL, a 25°C, una intensidad lumínica de 100  $\mu\text{mol fotón m}^{-1}\text{s}^{-1}$  provista por lámparas fluorescentes Philips, un fotoperíodo de 16:8 h de L:O y aireación continua (500-700  $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$ ).

Bajo estas condiciones, se obtuvieron diferentes densidades celulares durante las fases de crecimiento exponencial y estacionaria en cultivos con medio f/2 (completo).

Además, para evaluar los diferentes métodos, se realizaron dos experiencias bajo las condiciones ambientales descritas anteriormente: a) un inóculo fue resuspendido en 2L de medio completo durante 14 días (control) y cosechado por centrifugación (10 min a 3600 g) para el análisis lipídico cuantitativo y b) un inóculo fue resuspendido en 2L de medio completo, cosechado por centrifugación al final de la fase de crecimiento exponencial y transferido a 2L de medio sin nitrógeno durante 11 días (cultivo carente de N), y finalmente cosechado para su análisis cuantitativo. Cada dos días se midieron en ambos cultivos la densidad celular *in situ*, el contenido de clorofila *a* y las intensidades de fluorescencia con rojo Nilo.

### 4.2.2 Estimador de densidad celular

#### 4.2.2.1 Obtención de diluciones

A partir de cultivos homogeneizados, se realizaron diluciones por triplicado de acuerdo con la Tabla 4.1, con el objeto de determinar tanto la densidad celular como la densidad óptica de cada una de las muestras y así obtener las dos variables del modelo estimador.

**Tabla 4.1:** diluciones empleadas para la curva de calibrado (volumen final de 4 mL)

<b>Dilución</b>	<b>Volumen cultivo (mL)</b>	<b>Volumen Agua mar (mL)</b>
1	3,5	0,5
2	3,0	1,0
3	2,5	1,5
4	2,0	2,0
5	1,5	2,5
6	1,0	3,0
7	0,5	3,5

#### **4.2.2.2 Estimación de la densidad celular con cámara de recuento**

Se realizaron recuentos celulares de cada una de las diluciones con una cámara de Neubauer en un microscopio óptico Leica DM200.

La cámara de Neubauer presenta dos zonas ligeramente deprimidas con una cuadrícula de dimensiones conocidas. Ambas cuadrículas poseen 25 campos, de los cuales se emplearon para el conteo 5, los 4 campos ubicados en los vértices y el campo central. Se cubrió la zona de recuento de la cámara con un cubreobjeto y luego se introdujo con una micropipeta Sigma, 100  $\mu\text{L}$  de cada una de las diluciones, previamente fijadas con Lugol. Los recuentos se realizaron por triplicado, contando ambas áreas deprimidas de la cámara de Neubauer y obteniendo el número celular medio ( $N^{\circ}\text{cel mL}^{-1}$ ).

En base a la cantidad de células contadas y conociendo el volumen del líquido que admite el campo, se calculó la densidad celular (DC,  $\text{cel mL}^{-1}$ ) según el siguiente factor:

$$\text{DC} = (N^{\circ}\text{cel} / 0,02) \times 1000 \text{ (Ecuación 4.1)}$$

#### **4.2.2.3 Estimación de la densidad óptica con espectrofotómetro**

La medición de la transmitancia (T) a una longitud de onda a 540 nm de cada una de las diluciones se realizó en un espectrofotómetro SHIMATZU UV-VISIBLE modelo UV-1603. Luego, el porcentaje de transmitancia (T%) fue transformado en densidad óptica (DO) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{DO} = \log (100/T\%) \text{ (Ecuación 4.2)}$$

#### **4.2.2.4 Validación del modelo empleado como estimador de la densidad celular**

Con el objeto de verificar si el modelo puede ser usado como un estimador de la densidad celular, la relación lineal entre DO y DC fue validada con muestras tomadas al azar en las fases de crecimiento exponencial y estacionaria, estimando el número de células por conteo y a partir del modelo propuesto.

Los resultados obtenidos por ambos métodos se graficaron en un eje cartesiano y se compararon obteniendo la pendiente  $b_1$  y la ordenada al origen  $b_0$ , considerando los errores en ambos ejes (Massart *et al.* 1997). Los coeficientes de regresión se obtuvieron por minimización de las distancias ortogonales a la recta mediante las ecuaciones indicadas en Massart *et al.* (1997).

### **4.2.3 Optimización de métodos de extracción de pigmentos**

#### **4.2.3.1 Análisis de los métodos de extracción de pigmentos**

Se realizaron distintos métodos de extracción de clorofila *a* empleando diferentes solventes, tiempos de extracción y métodos de disrupción celular. Como solventes de extracción se usaron metanol absoluto y acetona:agua (9:1 v/v). Luego se realizaron los siguientes tratamientos: acetona y 24 h de extracción a temperatura ambiente (Acetona-24) (Strickland y Parsons 1968) y tres tratamientos combinados con metanol: Metanol y ultrasonido (Metanol-U), Metanol y congelado rápido y descongelado (CRD) (Metanol-CRD) y Metanol 24 h de extracción a temperatura ambiente (Metanol-24).

#### **Extracción con acetona 90%**

Para la extracción con acetona se filtraron 2,5 mL de muestra por triplicado a través de un filtro Whatman GF/C de 0,45  $\mu\text{m}$  de poro y 25 mm de diámetro. El filtro se secó con papel absorbente y se mantuvo refrigerado en sobre de papel de aluminio hasta la extracción. La extracción se realizó colocando los filtros en 6 mL de acetona al 90%, durante 24 horas, manteniendo los tubos protegidos de la luz.

## Extracción con metanol absoluto

Para la extracción con metanol absoluto se filtraron 6 mL de muestra por triplicado para cada tratamiento, siguiendo el mismo procedimiento aplicado para la acetona. La extracción se realizó colocando los filtros en 5 mL de metanol absoluto. Los extractos metanólicos se sometieron luego a los siguientes tratamientos: 1) ultrasonido durante 15 min, 2) congelado y descongelado rápido (CDR) y 3) 24 h de extracción a temperatura ambiente.

## Determinación de la concentración de pigmentos

Para la determinación de la concentración de clorofila *a* y carotenoides totales se obtuvieron los espectros de absorción entre las longitudes de onda de 430 nm y 750 nm, usando un espectrofotómetro SHIMATZU UV-VISIBLE modelo UV-1603, de los extractos previamente clarificados por filtración.

La estimación del contenido de clorofila *a*, se realizó mediante el empleo del algoritmo de Talling y Driver (1963):

$$C_{\text{clo } a} (\mu\text{g mL}^{-1}) = 13,9 \times (A_{665} - A_{750}) \text{ (Ecuación 4.3)}$$

Para estimar la concentración de carotenoides totales, se usó la ecuación propuesta por Strickland y Parsons (1968):

$$C_{\text{carot}} (\mu\text{g mL}^{-1}) = 4 \times (A_{480} - A_{750}) \text{ (Ecuación 4.4)}$$

Donde:

$A_{665}$ : absorbancia del extracto a 665 nm;

$A_{750}$ : absorbancia del extracto a 750 nm;

$A_{480}$ : absorbancia del extracto a 480 nm.

### 4.2.3.2 Análisis estadístico

Para evaluar la eficacia de los diferentes métodos de extracción para clorofila *a* y carotenoides totales, se realizó un Análisis de varianza (ANOVA) simple. Se aplicó el test de Bonferroni para evaluar el nivel de significancia. Las

comparaciones que mostraron un valor de  $p < 0,05$  fueron consideradas significativas.

## **Optimización de métodos espectrofluorométricos para la determinación *in situ* del contenido de lípidos neutros y la detección simultánea de clorofila *a***

### **4.2.4 Medición *in vivo* de clorofila *a***

Se realizaron mediciones espectrofluorimétricas *in situ* de clorofila *a*. Las muestras se tomaron por triplicado a partir de cultivos control en fases exponencial y estacionaria y de cultivos carentes de nitrógeno. Las muestras fueron diluidas 1:10 con medio f/2 para la detección fluorimétrica de clorofila *a*. La longitud de onda de excitación fue fijada en 430 nm para obtener el espectro de emisión en el rango de 600 a 750 nm. Se empleó un espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301PC, registrándose el máximo de la señal en 680nm.

### **4.2.5 Optimización de métodos de tinción con rojo Nilo**

#### **4.2.5.1 Mediciones de intensidad de fluorescencia**

Se realizó un escaneo previo de longitudes de onda de excitación y emisión, tanto para el estándar de lípidos neutros como para las muestras celulares teñidas con rojo Nilo. De acuerdo con el espectro obtenido, se seleccionaron 480 nm y 580 nm como longitudes de onda de excitación y emisión respectivamente para el análisis de lípidos neutros. La intensidad de fluorescencia (IF) fue medida empleando un espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301PC. Luego, la intensidad de fluorescencia relativa (IFR) se calculó como la diferencia entre la IF de las muestras teñidas y sus correspondientes blancos celulares. Con el objeto de optimizar los protocolos de tinción con rojo Nilo, se probaron diferentes tiempos de incubación y pre-tratamientos.

#### 4.2.5.2 Optimización del tiempo de incubación con rojo Nilo

Una solución de 5  $\mu\text{L}$  de rojo Nilo (9-dietilamino- 5H- benzo[a] fenoxacina-5-uno, Sigma CAS) en acetona ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) (Priscu *et al.* 1990) se agregó a 250  $\mu\text{L}$  de suspensión algal contenida en tubos de vidrio tipo Hatch. La mezcla se agitó en un vortex durante 1 minuto a 120 rpm. Las muestras con rojo Nilo se incubaron 7, 20, 30 y 40 minutos. Después del tiempo de incubación, 5 mL de agua MilliQ fueron adicionados a las suspensiones celulares teñidas y se analizaron mediante espectrofluorimetría.

Para estos *tests*, los blancos correspondientes fueron los siguientes: a) blanco-celular: 250  $\mu\text{L}$  de muestra algal + 5 mL de agua MilliQ, y b) blanco de rojo Nilo: 250  $\mu\text{L}$  de medio f/2 + 5  $\mu\text{L}$  de rojo Nilo y 5 mL de agua MilliQ. Se realizaron tres réplicas de cada tratamiento.

#### 4.2.5.3 Pre-tratamientos

Se llevaron a cabo dos pre-tratamientos. En el primero, 250  $\mu\text{L}$  de suspensión celular con 5  $\mu\text{L}$  de solución de rojo Nilo se calentaron a  $70^\circ\text{C}$  durante 10 min. En el segundo pre-tratamiento, 250  $\mu\text{L}$  ó 1000  $\mu\text{L}$  de cinco solventes orgánicos [acetona (Ac), metanol (Met), etanol (Et), dimetilsulfóxido (DMSO) o isopropanol (Iso)] se agregaron a 250  $\mu\text{L}$  de suspensión celular con 5  $\mu\text{L}$  de solución de rojo Nilo, para obtener dos concentraciones finales de 5% (v/v) y 20% (v/v), respectivamente. En todos los pre-tratamientos, las suspensiones fueron agitadas en un vortex durante 1 minuto a 120 rpm. Después de 30 minutos a temperatura ambiente ( $22^\circ\text{C}$ ) y en oscuridad, se agregaron 5 mL de agua MilliQ. Finalmente, las suspensiones celulares se analizaron mediante espectrofluorimetría.

Los siguientes blancos fueron empleados: a) blanco celular: 250  $\mu\text{L}$  de suspensión celular + 5 mL de agua MilliQ, y b) blanco rojo Nilo-Solvente: 250  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo f/2 + 5  $\mu\text{L}$  de solución de rojo Nilo + 250  $\mu\text{L}$  ó 1000  $\mu\text{L}$  de solventes, de acuerdo con la concentración final deseada, y 5 mL de agua destilada MilliQ. Se realizaron tres réplicas de cada pre-tratamiento.

## 4.3 Resultados

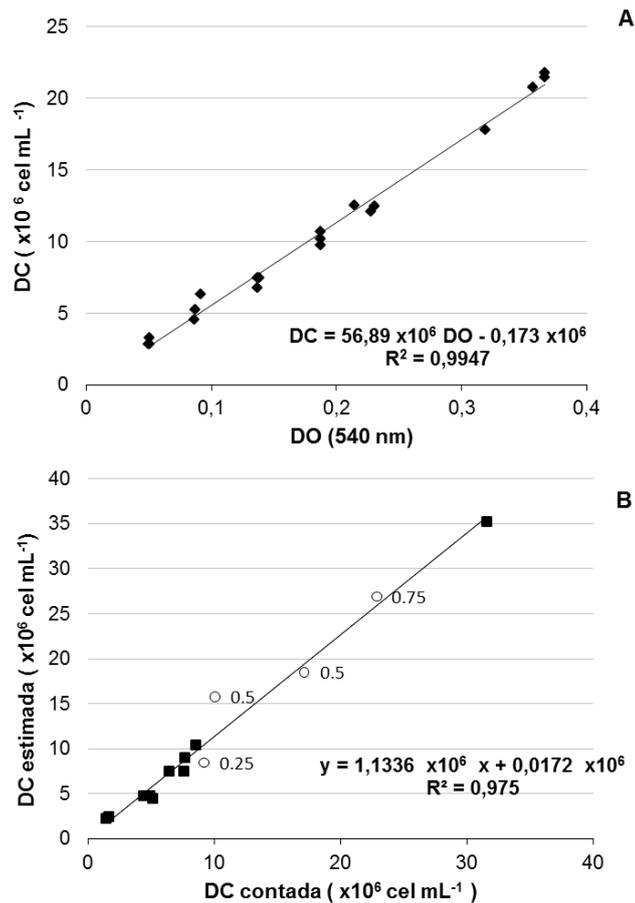
### 4.3.1 Modelo estimador de densidad celular

A partir de los valores de densidad celular (DC) y de densidad óptica (DO) se obtuvo la función que relaciona ambas variables, de tal manera que puede ser utilizada como un estimador de la concentración celular a partir de lecturas de densidad óptica a 540 nm. La Figura 4.1 A, muestra el modelo propuesto para *N. oceanica* CCALA 978. Se pudo observar una relación lineal entre la DO a 540 nm y la DC en el rango de  $3 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup> a  $21 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>, correspondientes a valores de DO de 0,05 a 0,35. El modelo fue obtenido usando 21 puntos para cubrir 7 niveles de concentración, correspondientes a las fases exponencial y estacionaria de cultivo en medio completo.

Se obtuvo la siguiente ecuación:

$$DC = 56,89 \times 10^6 DO - 0,173 \times 10^6 \quad (\text{Ecuación 4.5})$$

El modelo se confirmó mediante la obtención de la curva de validación con un set de datos. En la Figura 4.1 B se observa la curva de calibración con un set de 12 puntos. La recta fue obtenida mediante el método de regresión de distancia ortogonal. Tanto la pendiente ( $B_1=1,13 \times 10^6$ ) como la ordenada al origen fueron evaluadas ( $B_0=0,0171 \times 10^6$ ). El modelo fue aceptado con un  $F= 0,33$  y comparado con el valor tabulado  $F(0,05; 2,10)= 4,10$ .



**Figura 4.1: A)** Curva de calibración entre la densidad celular y densidad óptica a 540 nm de *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978, correspondiente a las fases exponencial y estacionaria en medio completo. **B)** Curva de validación. Los cuadrados negros representan muestras obtenidas en fase exponencial temprana y tardía, mientras que los círculos blancos representan muestras en fase estacionaria, diluidas al 25, 50 y 75%.

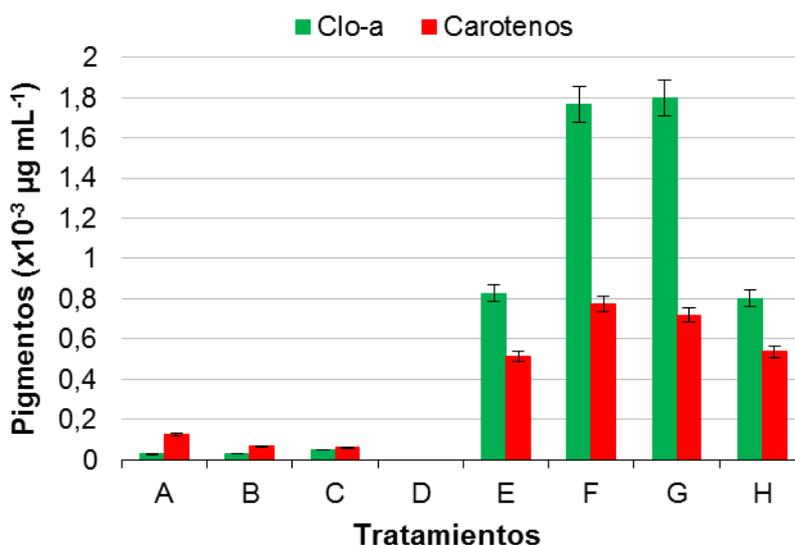
### 4.3.2 Optimización de métodos para la extracción de pigmentos

La Figura 4.2 muestra las concentraciones obtenidas de clorofila a (Clo-a) y carotenoides para los diferentes tratamientos aplicados.

Como se puede observar, la extracción con acetona combinada con cualquiera de los tratamientos fue significativamente menos efectiva que la extracción con metanol ( $p < 0,05$ ).

La extracción con metanol permitió obtener concentraciones más altas tanto para Clo-a como para los carotenoides totales ( $p < 0,05$ ). La cantidad de Clo-a no mostró diferencias significativas entre los tratamientos Met/4°C y Met/-18°C ( $p > 0,05$ ) y ambos fueron significativamente más altos que Met/C a temperatura ambiente ( $p < 0,05$ ). Para los carotenoides totales, los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos para Clo-a. Las concentraciones de carotenoides totales

bajo los tratamientos Met/4°C y Met/-18°C no mostraron diferencias significativas entre ellas ( $p > 0.05$ ), pero fueron significativamente más altas ( $p < 0,05$ ), comparadas con Met/C y Met/U.



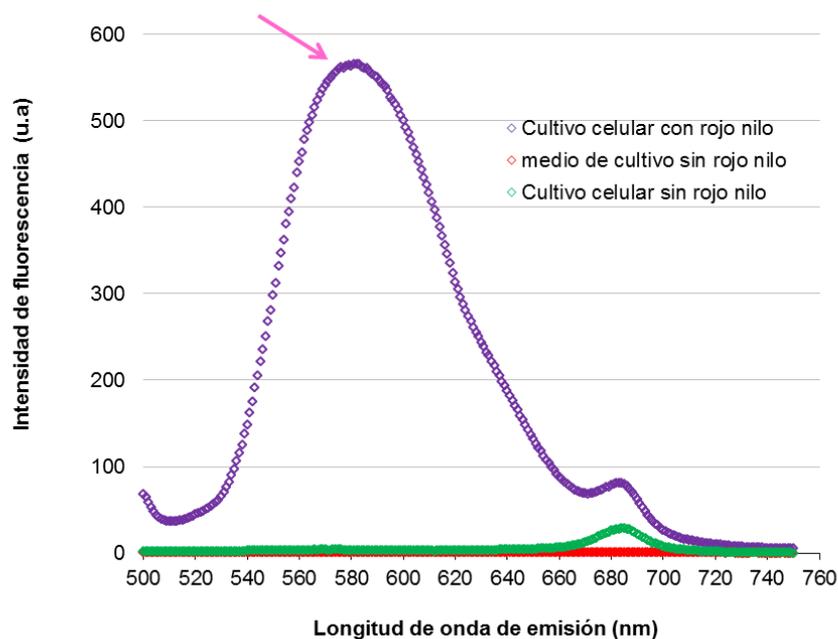
**Figura 4.2:** Concentración de pigmentos ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 obtenida en los diferentes tratamientos. A: Ac-Control; B: Ac/4°C; C: Ac/-18°C; D: Ac-U; E: Met-Control; F: Met/4°C; G: Met/-18°C; H: Met/U. Ac: acetona. Met: metanol. U: ultrasonido. Los datos representan la media  $\pm$  desvío estándar de tres réplicas.

### 4.3.3 Optimización de los métodos fluorimétricos para la determinación simultánea de lípidos neutros y clorofila a.

#### 4.3.3.1 Espectro de fluorescencia

En el espectro de emisión de fluorescencia de *N. oceanica* CCALA 978 (Fig. 4.3), se puede distinguir un pico de intensidad de fluorescencia (u.a, expresado en unidades arbitrarias), correspondiente a los lípidos neutros, a una longitud de onda de 580 nm (línea de rombos violetas) y un pico de señal, correspondiente a la autofluorescencia de Clo-a, a 680 nm. Como se observa en la Figura 4.3, las células de *N. oceanica* CCALA 978 sin tinción presentaron un bajo *background* de fluorescencia. Estas observaciones concuerdan con lo observado en el microscopio confocal de fluorescencia (Fig. 3.6, capítulo 3), donde las células presentaron una fluorescencia dorada, correspondiente a las gotas de lípidos neutros. Una vez establecidos los espectros de emisión de

muestras aleatorias, la longitud de onda de 580 nm fue la elegida para realizar el seguimiento de la acumulación de lípidos neutros.



**Figura 4.3:** Espectro de fluorescencia de células de *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 sin teñir con rojo Nilo (verde) y de células teñidas con rojo Nilo (violeta). La flecha indica la longitud onda de emisión de lípidos neutros.

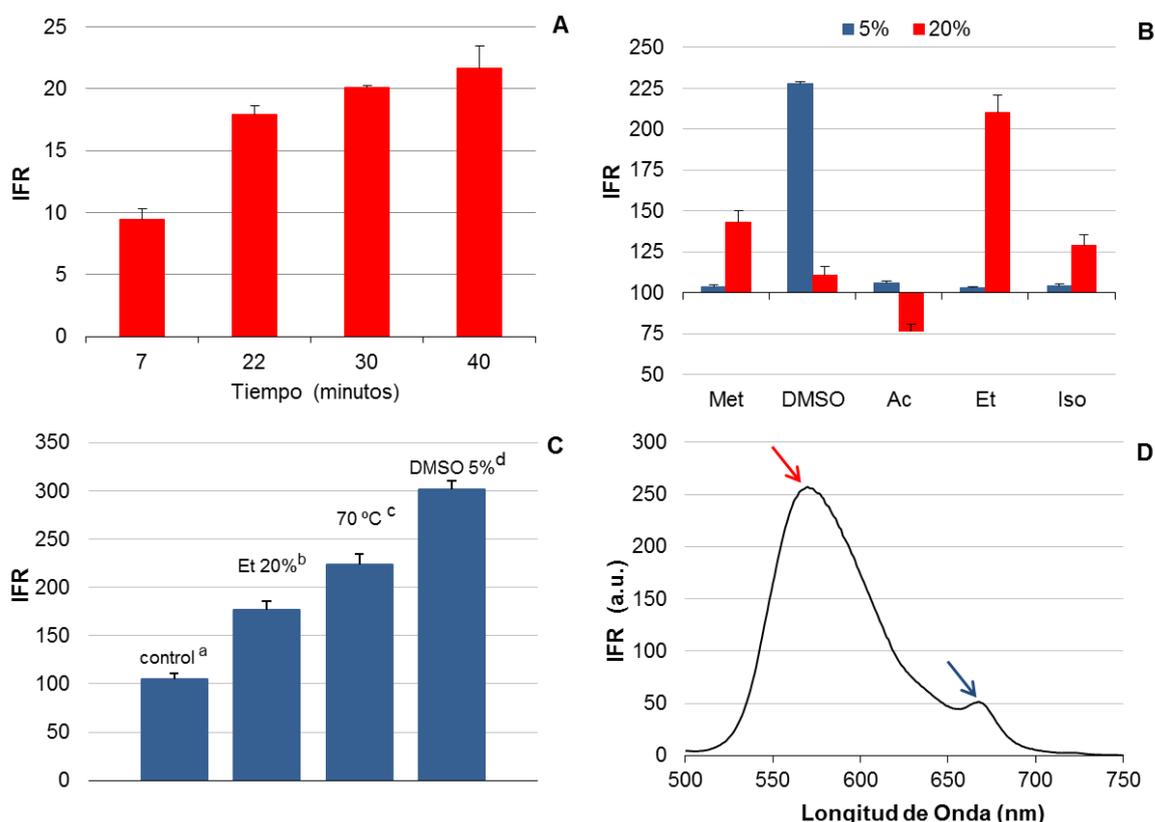
#### 4.3.3.2 Optimización del tiempo

En la Figura 4.4 A-D se pueden observar los diferentes métodos de optimización del tiempo y de los pre-tratamientos. En la Figura 4.4 A se presenta la intensidad de fluorescencia relativa (IFR) obtenida a distintos tiempos. Se observó que la IFR incrementó después de la adición de rojo Nilo, entre los 7 y 30 minutos ( $p < 0,05$ ); para estabilizarse después de los 30 minutos ( $p > 0,05$ ). Se eligió el tiempo de 30 minutos como el óptimo para obtener el registro de IFR.

#### 4.3.3.3 Optimización de los métodos de pre-tratamiento

Se probaron diferentes pre-tratamientos para la detección de lípidos neutros mediante el empleo de rojo Nilo (Fig. 4.4 B-C). Con excepción de Ac 20%, todos los pre-tratamientos incrementaron la señal de fluorescencia respecto del control (células no tratadas), particularmente Et 20% y DMSO 5%. Para este último, la IFR fue 12,5 veces más alta que en el control ( $p < 0,05$ ), mientras que para Et 20% fue 10 veces más alta ( $p < 0,05$ ). Luego, se compararon los pre-

tratamientos más eficientes (DMSO 5% y Et 20%) con una suspensión celular calentada a 70°C; obteniéndose los mejores resultados con DMSO 5% (Fig. 4.4 C). La Figura 4.4 D muestra el espectro de fluorescencia característico de células estresadas con privación de nitrógeno y tratadas con DMSO 5%. El espectro de emisión reveló dos picos, uno a 580 nm, característico de lípidos neutros y otro a 680 nm, correspondiente a la señal de autofluorescencia de Clo-*a*.



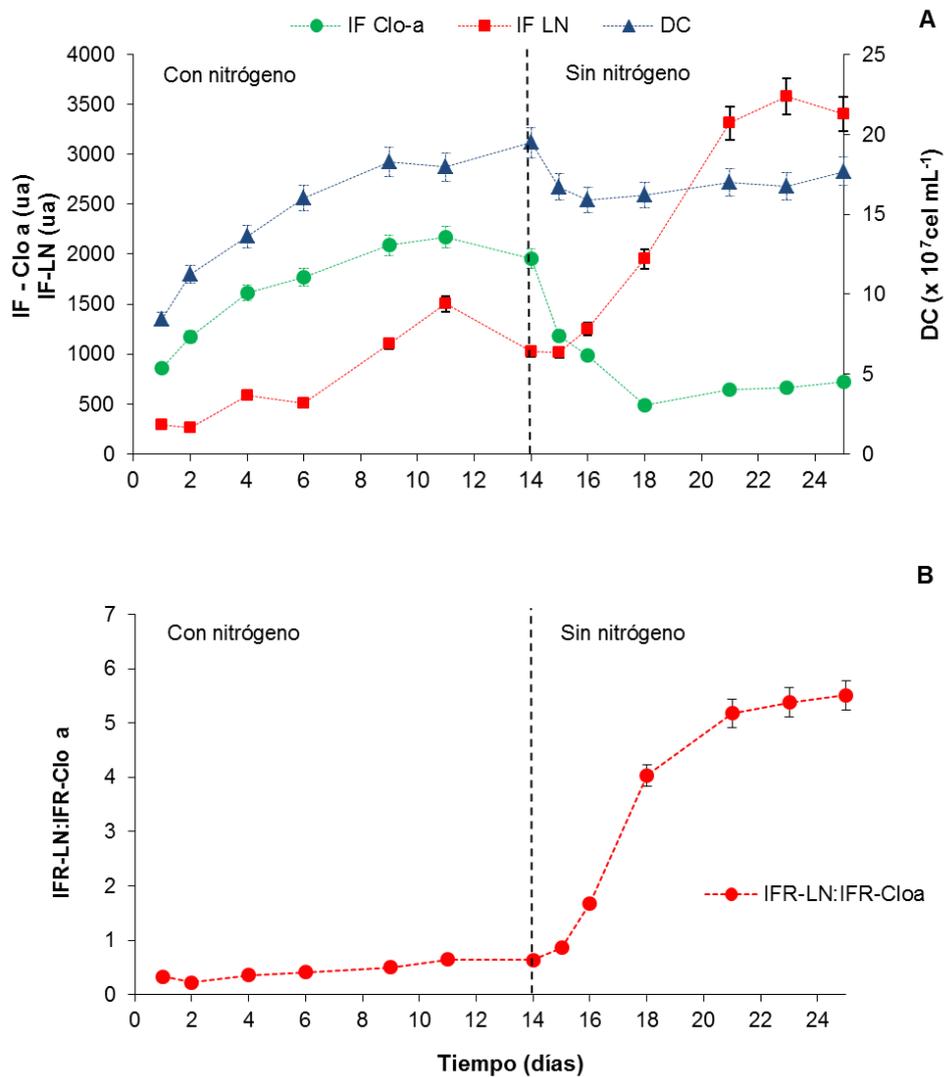
**Figura 4.4:** Optimización de diferentes métodos de tinción con rojo Nilo. **A)** Intensidad de fluorescencia relativa (IFR) de células teñidas con rojo Nilo durante diferentes tiempos de tinción (control: células no tratadas). **B)** IFR obtenida para los diferentes pre-tratamientos con dos concentraciones de acetona y metanol, 5% y 20%. Met: metanol; DMSO: dimetilsulfóxido; Ac: acetona; Et: etanol; Iso: isopropanol. **C)** IFR de los tratamientos control, Et 20%, DMSO 5%, y calentamiento a 70°C. **D)** Espectro de emisión de fluorescencia de *N. oceanica* CCALA 978 bajo condiciones de estrés. La flecha roja indica la longitud de onda de emisión de los lípidos neutros, mientras que la flecha azul indica la longitud de onda de la clorofila *a*. Los datos representan la media  $\pm$  desvío estándar de tres réplicas. Las diferentes letras como superíndices indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.4 Evaluación del estado del cultivo mediante la aplicación de los métodos seleccionados

Se realizaron mediciones *in situ* en un cultivo de *N. oceanica* CCALA 978 con el objeto de evaluar el estado del cultivo y la acumulación de lípidos neutros mediante la aplicación de la intensidad de fluorescencia.

La evolución de la densidad celular, la intensidad de fluorescencia de Clo-a (IF-Cloa) y la IFR de los lípidos neutros (IFR-LN) en *N. oceanica* CCALA 978 creciendo bajo condiciones control y de privación de nitrógeno se muestran en la Figura 4.5 A. La DC fue calculada mediante el modelo estimador obtenido en este estudio. Bajo condiciones control, la DC incrementó exponencialmente, alcanzando la fase de crecimiento estacionaria en el día 9, con un valor máximo de  $19 \times 10^7$  cel mL<sup>-1</sup>. La IF-Cloa mostró la misma tendencia que la DC, incrementándose de 800 a 2000 u.a, aproximadamente. Mientras que el rojo Nilo incrementó de 208 a 1500 u.a. Bajo condiciones de privación de nitrógeno, la DC decreció hasta un valor de  $17 \times 10^7$  cel mL<sup>-1</sup>, mientras que la IFR-Cloa mostró una caída al comienzo del estrés, alcanzando una señal más baja que la reportada para el control. La IFR-LN incrementó hasta un valor máximo de 3500 u.a.

Adicionalmente, se empleó la relación entre IFR-LN: IFR-Cloa en *N. oceanica* CCALA 978 como un índice de acumulación para determinar el tiempo de cosecha (Fig. 4.5 B). Esta relación no presentó diferencias significativas entre el inicio y el final de la etapa control ( $p > 0,05$ ), presentando valores menores a 1; mientras que durante el estrés incrementó significativamente desde 0,86 hasta 5,5, indicando así la acumulación de lípidos neutros. Si bien en esta experiencia la biomasa fue cosechada en el día 11 del estrés, el índice propuesto indicaría que la cosecha se podría realizar en el día 7, debido a que en ese punto de la curva de crecimiento se estabilizó la relación IFR-LN: IFR-Cloa.



**Figura 4.5: A)** Evolución de la densidad celular obtenida a partir de las mediciones de densidad óptica a 540 nm, de la intensidad de fluorescencia de clorofila a (IF-Cloa, Ex/Em: 430/670 nm) y de la intensidad de fluorescencia de los lípidos neutros (IF-LN, Ex/Em: 480/570 nm) bajo condiciones control y estrés. **B)** Evolución de la relación IF-LN:IF-Clo a. Los datos representan la media  $\pm$  desvío estándar de tres réplicas.

## 4.4 Discusión

La optimización de técnicas rápidas, sencillas y confiables que permitan determinar el crecimiento, el estado fisiológico del cultivo y la acumulación de lípidos neutros es de considerable importancia a la hora de tomar decisiones relacionadas con la cosecha en cultivos microalgales con fines energéticos.

En el presente trabajo se elaboró un modelo estimador de densidad celular a partir de lecturas de transmitancia a 540 nm en un espectrofotómetro en *N. oceanica* CCALA 978. Este modelo permite estimar la densidad celular con una

veracidad y precisión aceptables y reemplazar los recuentos con microscopio óptico. Rocha *et al.* (2003) encontraron que en *N. gaditana* las curvas de calibración entre la densidad celular y la densidad óptica son parámetros muy dependientes de las condiciones de cultivo, dado que tanto el tamaño como el peso de las células individuales varía. Consecuentemente, los autores mostraron que la linealidad sólo fue encontrada en la fase de crecimiento exponencial del cultivo. En este trabajo, la curva de calibrado para *N. oceanica* CCALA 978 guardó proporcionalidad lineal durante la fase de crecimiento exponencial, siendo mayor el error durante la fase estacionaria.

Griffiths *et al.* (2011) indicaron algunas estrategias para minimizar el error en la estimación de la densidad celular a partir de lecturas de densidad óptica. La primera es la selección de la longitud de onda que minimice la absorción por otros pigmentos fotosintéticos (para células microalgales donde la clorofila es el principal pigmento fotosintético, 750 nm ó 550 nm), y la segunda es la generación de una curva a lo largo de todas las fases de crecimiento. Varios valores de longitud de onda han sido empleados en la estimación de la densidad celular en diferentes cepas de *N. oculata* [680 nm, (Gu *et al.* 2012); 625 nm (Converti *et al.* 2009); 682 nm, (Chiu *et al.* 2009)]. Sin embargo, en ninguno de los casos se menciona si las curvas de calibrado fueron realizadas con respecto a todas las fases de crecimiento. Por su parte, Spolaore *et al.* (2006) emplearon la DO a 540 nm para la estimación de la DC en *N. oculata*, pero en este caso no se presentaron curvas de calibración. Rocha *et al.* (2003) mostraron en *N. gaditana* una curva de calibración de DC vs DO a 540 nm, pero sólo en la fase exponencial. En el presente estudio, la curva de calibración de DC vs DO en *N. oceanica* CCALA 978 fue estimada empleando los dos criterios mencionados: 1) una adecuada longitud de onda que minimice la interferencia de pigmentos (540 nm), y 2) cubriendo todas las fases de crecimiento, con el objetivo de minimizar el error en la cuantificación de la DC, de acuerdo a Griffiths *et al.* (2011).

Además, al ser el método espectrofotométrico un método no destructivo, presenta la ventaja de poder tomar varias réplicas de forma rápida y sencilla en el cultivo, obteniendo así estimaciones confiables y seguras.

Como se mencionó anteriormente, el conocimiento del estado fisiológico del cultivo microalgal es otro de los criterios a tener en cuenta. Con respecto a la optimización de métodos para la extracción de pigmentos, los resultados obtenidos indicaron que el metanol fue el solvente más efectivo para la extracción

de clorofila *a* y carotenoides totales en *N. oceanica* CCALA 978. Asimismo, el método de congelado y descongelado permitió obtener concentraciones más altas que el método físico con ultrasonido. La eficiencia de extracción de un solvente depende de su grado de reacción con el pigmento y de la hidratación y permeabilidad de la pared celular microalgal. Además, el tipo de solvente juega un rol importante en la lisis celular (Henriques *et al.* 2007). La utilización de metanol para la extracción de pigmentos ha sido empleada con éxito en varias especies de *Nannochloropsis* (Lubian y Establier 1983; Henriques *et al.* 2007), siendo más eficiente que la acetona por su polaridad más alta. Además, debido a la presencia de una pared resistente en las especies de *Nannochloropsis*, la utilización de un método de disrupción celular, permite extracciones más eficientes. Fietz *et al.* (2005), encontraron que las células de *N. limnetica*, en determinadas fases del crecimiento, presentaron paredes gruesas y poco permeables a la penetración de ciertos fijadores. En nuestro caso, como se detalló en el Capítulo 3, las células de *N. oceanica* CCALA 978 presentaron una pared gruesa y resistente durante todas las fases de crecimiento, de manera que el método de extracción con metanol resultó muy eficiente y permitió obtener buenos resultados.

El tercer aspecto a tener en cuenta, orientado a la elección de especies de microalgas oleaginosas, es la capacidad de acumular lípidos neutros. Algunas especies del género *Nannochloropsis* pueden alcanzar valores de lípidos totales entre 30-68% p.s bajo determinadas condiciones de cultivo (Suen *et al.* 1987; Renaud *et al.* 1991; Rodolfi *et al.* 2009; Pal *et al.* 2011), siendo los lípidos neutros la fracción predominante (Suen *et al.* 1987; Bondioli *et al.* 2012; Bongiovani *et al.* 2013). En tal sentido, la búsqueda y optimización de técnicas sencillas que permitan caracterizar y cuantificar de manera rápida la acumulación de lípidos neutros es indispensable cuando se debe monitorear un cultivo (Doan y Obbard 2011). Así, las técnicas que emplean rojo Nilo como fluorocromo para la tinción de células microalgales han sido ampliamente estudiadas en numerosas especies (Elsay *et al.* 2007; Chen *et al.* 2009). No obstante, es importante destacar, que estas técnicas deben ser optimizadas en función de las características particulares de cada especie.

En *N. oceanica* CCALA 978, las longitudes de onda de excitación y emisión empleadas fueron similares a las reportadas por otros autores en otras especies del género (Elsay *et al.* 2007). Sin embargo, Chen *et al.* (2009) encontraron longitudes de onda de excitación/emisión de 530/585 nm, respectivamente en

*Nannochloropsis* sp. Esto indica la necesidad de realizar un escaneo previo de muestras del cultivo de la especie en estudio, con el objeto de encontrar las longitudes de onda de excitación y emisión apropiadas y específicas. La eficiencia de los métodos de detección de lípidos neutros depende de varios factores, como por ejemplo, el tratamiento previo de la muestra y el tiempo de incubación con rojo Nilo (Pick y Rachutin-Zlogin 2012). En *N. oceanica* CCALA 978, la IFR se mantuvo estable después de 30 minutos de incubación y de un pre-tratamiento con DMSO 5%. Un tiempo similar de incubación, luego de la tinción con rojo Nilo, fue reportado por Elsey *et al.* (2007) para *Nannochloropsis* sp. Sin embargo, estos autores obtuvieron una intensidad máxima de emisión en un período de 30-40 minutos, después del agregado del fluorocromo, sin aplicar un pre-tratamiento. Por otro lado, Doan y Obbard (2011) encontraron en *Nannochloropsis* sp., que los mejores tiempos de tinción estuvieron entre los 5 y 10 minutos, empleando en este caso una combinación de glicerol y DMSO al 15%.

En cultivos estresados con carencia de nitrógeno se observó una disminución de la IFR de Clo-*a* y un incremento de la IFR de lípidos neutros. Estas observaciones fueron consistentes con la disminución de Clo-*a* y el incremento de lípidos totales en *Nannochloropsis* sp. creciendo bajo condiciones de estrés. Un comportamiento similar también fue observado en otras especies de microalgas (Popovich *et al.* 2012). La acumulación de lípidos ha sido relacionada principalmente con la concentración de nitrógeno en el medio, mientras que el crecimiento podría ser soportado por el almacenamiento intracelular de nitrógeno (Pruvost *et al.* 2009). Bajo deprivación de nitrógeno, la cosecha de *N. oceanica* CCALA 978 se realizó cuando la IFR-LN se mantuvo constante. Además, se observó que los lípidos neutros se acumularon tan rápido como la Clo-*a* alcanzó valores mínimos, mientras que la densidad celular se mantuvo constante (Fig. 4.5 A). De acuerdo con esto, tanto la IF-Cloa como la IF-LN mostraron una sensibilidad más alta a la falta de nitrógeno que la densidad celular. Así, la relación entre ambas intensidades puede ser empleada como un índice de acumulación para determinar el tiempo de cosecha en *N. oceanica* CCALA 978 (Fig. 4.5 B), el cual estuvo por encima de 1 bajo las condiciones de deprivación de nitrógeno.

## 4.5 Conclusiones

En cultivos microalgales con fines bioenergéticos, una definición precisa del período de acumulación de lípidos neutros es crucial para poder establecer el momento exacto de la cosecha. Este período varía con las distintas especies, las condiciones ambientales, la disponibilidad de nutrientes y las fases de crecimiento. En este Capítulo se presenta un modelo para estimar la densidad celular y un procedimiento de tinción con rojo Nilo para detectar *in situ* los lípidos neutros en *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978. Asimismo, mediciones de clorofila *a* y de fluorescencia con rojo Nilo permitieron obtener una estimación rápida y simultánea del momento de acumulación máxima de lípidos neutros y el menor tiempo requerido de cosecha de la biomasa. Es importante destacar que estas técnicas analíticas, además de permitir un rápido monitoreo de los cultivos, requieren de pequeñas cantidades de muestras y las mismas se realizan con equipamiento accesible.

## **Capítulo 5 –Evaluación del crecimiento, la biomasa, el contenido y la productividad de lípidos en *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 bajo diferentes condiciones ambientales y carencia de nitrógeno**

---

### **5.1 Introducción**

Como se indicó anteriormente, la búsqueda y selección de microalgas oleaginosas potencialmente útiles para la producción de biodiesel requiere de una exhaustiva evaluación de diversos aspectos relacionados con la biología y bioquímica de estos microorganismos, así como también con las condiciones de cultivo (Fidalgo *et al.* 1998; Hu *et al.* 2008). Así por ejemplo, la velocidad de crecimiento, el contenido de biomasa y de lípidos, la productividad lipídica, la proporción de lípidos neutros respecto de los lípidos totales y la composición de ácidos grasos son aspectos fundamentales a tener en cuenta en el momento de seleccionar una especie microalgal oleaginosa y diseñar estrategias de cultivos con fines bioenergéticos (Hu *et al.* 2008; Griffiths y Harrison 2009).

Una de las prioridades en estos estudios es la selección de cepas nativas robustas, es decir, que posean la habilidad de adaptarse a condiciones ambientales locales variables. Una cepa microalgal ideal debería ser resistente a la contaminación, tener velocidades de crecimiento altas, altos contenidos de biomasa, altos contenidos de lípidos y productividades lipídicas y un adecuado perfil de ácidos grasos para la obtención de biodiesel. La combinación de todos estos aspectos representa una gran ventaja para reducir los costos de producción, incrementar los rendimientos del proceso y favorecer la purificación del producto a obtener (Borowitzka 1992; Griffiths y Harrison 2009). Sin embargo, aún no se han hallado especies que presenten todos estos atributos en simultáneo. En la mayoría de las microalgas, las condiciones favorables de cultivo incrementan su crecimiento y la producción de biomasa. Sin embargo, el aumento del contenido de lípidos generalmente ocurre bajo condiciones de estrés (Rodolfi *et al.* 2009; Su *et al.* 2011). Por lo tanto, uno de los principales desafíos es lograr una alta producción de lípidos con adecuada cantidad de triglicéridos y una calidad de ácidos grasos adecuada para su uso como materia prima, sin disminuir de forma significativa la producción de biomasa. En tal sentido, algunas cepas de *Nannochloropsis* sp. han sido sugeridas como materia prima potencial para la producción de biodiesel, debido a su habilidad

de producir altos contenidos de lípidos con producción de biomasa relativamente alta (Rodolfi *et al.* 2009).

Así, el análisis del rango de las condiciones ambientales, como la temperatura, la luz, el fotoperiodo y los nutrientes, entre otros, que favorecen el crecimiento, el contenido de biomasa y la producción de lípidos es indispensable para evaluar la potencialidad de una determinada especie como fuente de materia prima bioenergética.

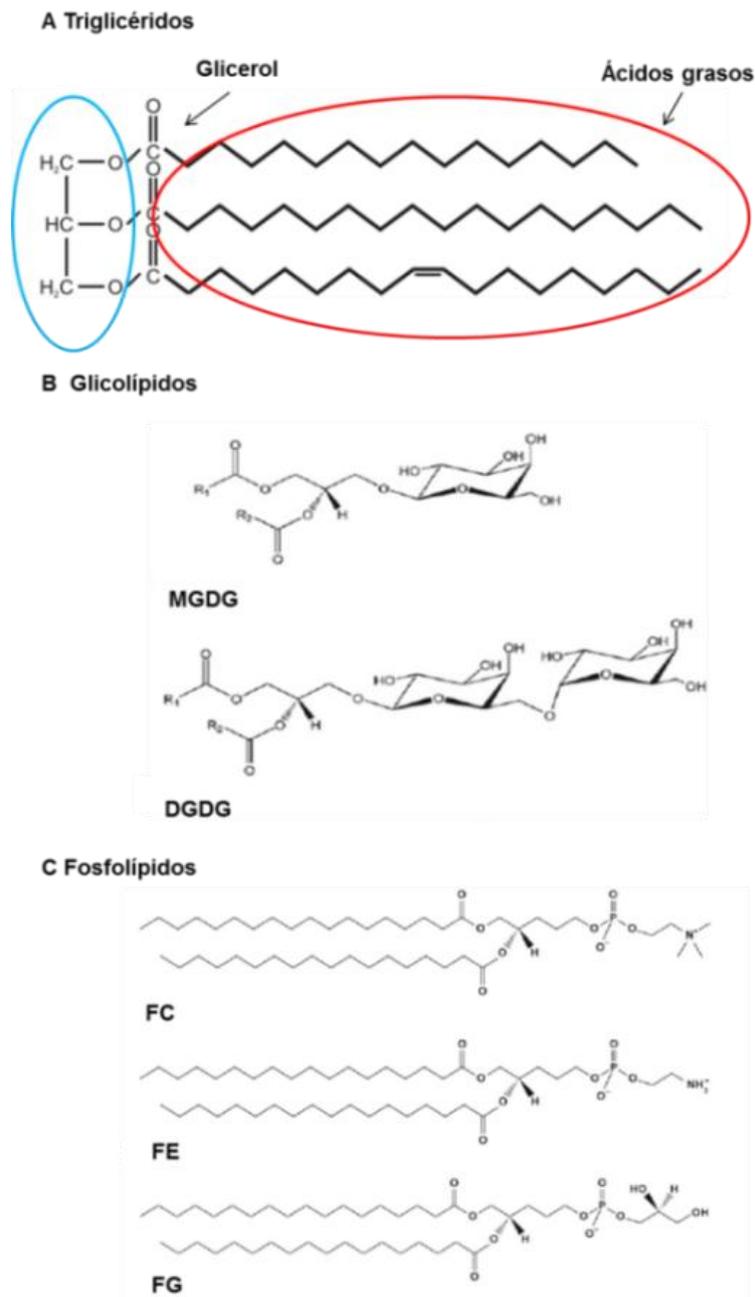
### 5.1.1 Lípidos

Una de las formas de clasificar a los lípidos es según su polaridad. De acuerdo a esta característica, los lípidos se dividen en dos grupos: polares y no polares o comúnmente denominados lípidos neutros. Dentro del primer grupo se encuentran los fosfolípidos (fosfoglicéridos) y glicolípidos (glicosilglicéridos) (Guschina y Harwood 2013), mientras que dentro del segundo están los acilglicéridos (mono, di y triacilglicerol o TAG), esteroides, ácidos grasos libres y ceras (Guschina y Harwood 2013). La fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilglicerol son los principales fosfolípidos identificados en la mayoría de las especies de microalgas, mientras que dentro de los glicolípidos, el monogalactosildiacilglicerol (MGDG) y el digalactosildiacilglicerol (DGDG) son los principales componentes (Guschina y Harwood 2013) (Fig. 5.1).

Ambos grupos de lípidos desempeñan diferentes funciones en las células. Los lípidos polares (LP) son componentes estructurales de las membranas y cumplen funciones específicas de membrana, entre otras (Guschina y Harwood 2013). Por otra parte, los lípidos no polares o lípidos neutros (LN) son productos de almacenamiento altamente energéticos que se acumulan en animales, plantas y algas como respuesta a determinadas condiciones (Merchant *et al.* 2012; Guschina y Harwood 2013). Éstos pueden ser fácilmente catabolizados para proveer la energía metabólica necesaria (Gurr *et al.* 2002; Gouveia y Olivera 2009).

Particularmente, los triglicéridos están formados por un esqueleto de glicerol con tres ácidos grasos esterificados a los átomos de carbono (Guschina y Harwood 2013) (Fig. 5.1) y, como se indicó anteriormente, representan la materia prima ideal para la producción de biodiesel. La cantidad y proporciones de los lípidos polares y neutros y la composición varían en función de las distintas condiciones ambientales

y estrategias de cultivo (Guschina y Harwood 2006; Roessler 1990) y de la especie y/o cepa en estudio (Hu *et al.* 2008).



**Figura 5.1:** Estructura molecular de los lípidos. **A)** Lípidos neutros (LN). **B)** Glicolípidos (GL). **C)** Fosfolípidos (FL). MGDG: monogalactosildiacilglicerol; DGDG: digalactosildiacilglicerol; FC: fosfatidilcolina; FE: fosfatidiletanolamina; FG: fosfatidilglicerol.

Por otra parte, los ácidos grasos son las moléculas que componen los lípidos y están formados por una cadena lineal hidrocarbonada. Éstos pueden ser saturados (AGS), monoinsaturados (AGM) o poliinsaturados (AGP) en función de la cantidad de dobles enlaces C=C, presentes en la cadena hidrocarbonada; los AGS no poseen dobles enlaces, mientras que los AGM poseen uno y los AGP presentan dos o más (Hu *et al.* 2008). Los principales ácidos grasos sintetizados en la mayoría de las

microalgas tienen cadenas de carbono que van desde los 16 a los 18 átomos, una composición similar a la de las plantas superiores (Ohlrogge y Browse 1995). Sin embargo, el perfil de los ácidos grasos varía con cada grupo algal (Hu *et al.* 2008). En *Nannochloropsis* los ácidos grasos saturados y monoinsaturados generalmente constituyen un 70-90% de la composición total, siendo los principales componentes los ácidos palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1) y oleico (C18:1). Los AGP están presentes en menor proporción y su componente principal es el ácido eicosapentaenoico (C20:5n3) (Hu *et al.* 2008).

La composición y las propiedades de los ácidos grasos individuales de la materia prima a emplear influyen directamente en la calidad del biodiesel, por ejemplo, en el número de cetano, las propiedades de flujo en frío, la estabilidad oxidativa, la viscosidad, el índice de yodo y la lubricidad (Knothe 2005). Por esta razón, una caracterización detallada del perfil de los ácidos grasos de la materia prima, y en especial de la fracción neutra, resulta indispensable. La composición de los ácidos grasos de los lípidos totales de diferentes especies de microalgas, incluyendo *Nannochloropsis*, ha sido ampliamente reportada en la literatura (Leonardi *et al.* 2011; Wang y Wang 2012). Sin embargo, estudios detallados de las fracciones lipídicas, y en particular de los lípidos neutros, bajo diferentes condiciones de cultivo, son escasos. En tal sentido, sólo se han informado los perfiles de lípidos neutros y lípidos polares en una cepa de *Nannochloropsis* sp. F&M-M24 (Bondioli *et al.* 2012) y en dos cepas de *N. oceanica*, para unas pocas condiciones ambientales (Pal *et al.* 2011; Dong *et al.* 2013; Xiao *et al.* 2013).

### **5.1.2 Factores físicos y químicos que afectan el crecimiento y la producción de lípidos en el género *Nannochloropsis***

Las condiciones ambientales en las que crece un cultivo microalgal tienen un efecto significativo sobre su crecimiento y su composición bioquímica (Fidalgo *et al.* 1998; Hu *et al.* 2008). Una determinada especie o cepa puede mostrar variaciones en su metabolismo de acuerdo con diferentes condiciones o estímulos físicos o químicos a la que es expuesta, como por ejemplo: temperatura, intensidad lumínica, fotoperíodo, salinidad, dióxido de carbono y concentración de nutrientes (Hu *et al.* 2008). Estos factores no sólo afectan la fotosíntesis y la productividad de biomasa, sino que también afectan las vías y la actividad del metabolismo celular y, así, la

composición celular (Hu 2014). Por lo tanto, desde el punto de vista de los cultivos microalgales con fines bioenergéticos, resulta indispensable conocer el efecto de estas variables sobre el crecimiento y la producción de lípidos en una determinada especie. En *Nannochloropsis* en particular, el énfasis de las investigaciones se ha puesto principalmente en factores físicos tales como la temperatura y la intensidad de luz (Pal *et al.* 2011; Simionato *et al.* 2011; Van Wageningen *et al.* 2012; Solovchenko *et al.* 2014) y factores químicos, como la deficiencia de nitrógeno (Pal *et al.* 2011; Van Vooren *et al.* 2012; Simionato *et al.* 2013).

### 5.1.2.1 Temperatura

La temperatura es un factor importante que regula el crecimiento de las microalgas. Cada especie y/o cepa en particular posee un rango óptimo de temperatura donde el crecimiento se maximiza (Van Wageningen *et al.* 2012). *Nannochloropsis* ha sido descrito como un género que se adapta mejor a temperaturas de climas templados. Su crecimiento óptimo se ha reportado en un promedio de 20-30°C, disminuyendo por encima de 30°C (James *et al.* 1989; Converti *et al.* 2009; Van Wageningen *et al.* 2012). De acuerdo con estos autores, las velocidades de crecimiento se incrementan conforme aumenta la temperatura hasta 30°C (Van Wageningen *et al.* 2012) y este incremento, además, está acompañado de un concomitante aumento de la productividad de biomasa (Converti *et al.* 2009).

Por otra parte, la temperatura es una variable que influye sobre el contenido de lípidos y la composición de ácidos grasos (Gouveia 2013). Uno de los cambios comunes que ocurren como resultado de la variación de esta variable es la modificación en el grado de insaturación de los lípidos (Harwood 1998). En líneas generales, una disminución de la temperatura genera una reducción en el contenido de lípidos y un incremento del grado de insaturación de los ácidos grasos, mientras que el aumento de esta variable produce tendencias inversas en la composición (Hu *et al.* 2008). La modificación de la composición de los ácidos grasos por efecto de la temperatura ha sido estudiada en *Nannochloropsis* sp. por James *et al.* (1989), en *N. oculata* por Converti *et al.* (2009) y en *N. salina* por Van Wageningen *et al.* (2012).

### 5.1.2.2 Intensidad de luz

La luz es el principal factor que influye sobre el crecimiento autotrófico de las microalgas y tiene profundos efectos sobre la fisiología, el metabolismo y la productividad de biomasa. Los procesos de aclimatación y adaptación a las variaciones de intensidad de luz incluyen cambios a varios niveles: en la síntesis y degradación de los componentes de los fotosistemas (Torzillo y Vonshak 2014), en las reacciones bioquímicas y en la absorción de nutrientes (Terry *et al.* 1983; Curtis y Megard 1987; Meseck *et al.* 2005), en el contenido de lípidos y en el grado de insaturación de los lípidos (Thompson *et al.* 1990; Fabregas *et al.* 2004).

En *Nannochloropsis* se ha estudiado el efecto de la intensidad lumínica sobre el crecimiento bajo diferentes condiciones y estrategias de cultivo, demostrando que, en líneas generales, la velocidad de crecimiento y producción de biomasa aumenta bajo condiciones de alta intensidad de luz (Sukenik *et al.* 1989; Fabregas *et al.* 2004; Pal *et al.* 2011; Simionato *et al.* 2011; Van Wageningen *et al.* 2012). Además, se ha indicado que *Nannochloropsis* presenta capacidad de fotoadaptación frente a cambios en la intensidad de luz mediante la modificación del contenido de pigmentos fotosintéticos y de la estructura del aparato fotosintético (Sukenik *et al.* 1989; Fisher *et al.* 1998).

Por otra parte, la luz es una de las principales variables que afecta el metabolismo de los lípidos microalgales y, por lo tanto, la composición lipídica (Harwood 1998). La influencia de la intensidad de luz sobre el contenido de lípidos y su composición ha sido estudiada en algunas especies de *Nannochloropsis* (Sukenik *et al.* 1989, Fabregas *et al.* 2004; Pal *et al.* 2011; Simionato *et al.* 2011; Van Wageningen *et al.* 2012). Las respuestas de las distintas cepas de *Nannochloropsis* frente a las estrategias lumínicas empleadas en los cultivos son muy variadas. Por ejemplo, en *Nannochloropsis* sp. creciendo bajo condiciones de fotoperiodo (Sukenik *et al.* 1989, 1993) y en *N. oceanica* CCALA 804 creciendo bajo condiciones de luz continua (Pal *et al.* 2011), los autores encontraron similares respuestas en el contenido de lípidos frente a la intensidad de luz aplicada. En ambas especies se observó un aumento en el contenido de lípidos en respuesta a la intensidad de luz creciente, acompañado de un incremento de AGS y AGM y la concomitante disminución del contenido de AGP. Por otra parte, en *N. gaditana* Simionato *et al.* (2011) indicaron que la intensidad de luz *per se* no causó una acumulación de lípidos, mientras que Fabregas *et al.* (2004) informaron en cultivos semicontinuos de

*Nannochloropsis* sp. una disminución en la cantidad de lípidos totales en función del incremento de la intensidad de esta variable.

### **5.1.2.3 Fotoperíodo**

Los informes acerca de los efectos del fotoperíodo sobre el crecimiento y la dinámica de lípidos en especies de *Nannochloropsis* son escasos, ya que la mayoría de los estudios en este género han sido llevados a cabo bajo condiciones de luz continua lo cual, desde el punto de vista de cultivos a gran escala, no resulta realista ni redituable. Wahidin *et al.* (2013) encontraron que la velocidad de crecimiento se incrementa con el aumento de la duración de las horas de luz en *Nannochloropsis* sp., mientras que el contenido de lípidos muestra variaciones entre 25-30% p.s bajo diferentes regímenes de fotoperíodo (12:12; 18:6; 24:0 h L:O), alcanzando el valor más alto bajo el fotoperíodo 18:6 h L:O. Hasta el momento, en cepas de *N. oceanica* no se han reportado estudios referidos al efecto de esta variable ambiental sobre el crecimiento y la dinámica y composición de los lípidos.

### **5.1.2.4 Deficiencia de nitrógeno**

Después del carbono, el nitrógeno es el nutriente más importante que contribuye a la producción de biomasa (Grobbelaar 2014; Hu 2014). Éste es un componente esencial de las proteínas estructurales y funcionales de una célula, cuyo contenido varía desde el 1% a más del 10% (Grobbelaar 2014). La deficiencia de este elemento no sólo tiene efectos sobre el crecimiento microalgal sino también sobre la productividad de biomasa, la actividad fotosintética y la composición bioquímica de la célula.

La limitación de nitrógeno ocurre de manera natural en los cultivos conforme progresa el crecimiento (llamada deprivación progresiva) o bien puede ocurrir de manera súbita, mediante la transferencia de cultivos en crecimiento activo a medios carentes de nitrógeno (llamada deprivación súbita) (Van Vooren *et al.* 2012).

La deprivación progresiva de nitrógeno ha sido estudiada en diferentes cepas *Nannochloropsis oculata* (Hodgson *et al.* 1991; Renaud *et al.* 1991; Van Vooren *et al.* 2012). Estos autores demostraron que en fase estacionaria, las células de *N. oculata* presentaron mayor cantidad de lípidos respecto de cultivos en fase exponencial. En la cepa de *N. oceanica* IMET1 se ha reportado que la deficiencia

progresiva de nitrógeno a largo plazo (23 días) causó un incremento en los lípidos totales y neutros de hasta ca. 69 y 48% ps, respectivamente (Xiao *et al.* 2013). Por otra parte, la deprivación súbita de nitrógeno es una de las estrategias mayormente empleadas para inducir la síntesis y acumulación de lípidos neutros y se aplica en dos etapas. La primera etapa se lleva a cabo en condiciones de nitrógeno suficiente y su objetivo es lograr la producción de alta biomasa, mientras que la segunda se desarrolla en medio de cultivo carente de nitrógeno y está destinada a inducir e incrementar la acumulación de estos lípidos. La deprivación súbita ha sido empleada en el cultivo de diferentes especies de *Nannochloropsis* (Sforza *et al.* 2010; Bondioli *et al.* 2012; Van Vooren *et al.* 2012; Simionato *et al.* 2013), mientras que en *N. oceanica* CCALA 804 ha sido reportada en combinación con estrés salino y lumínico por Pal *et al.* (2011), con rendimientos de lípidos neutros de 20-25% ps. Además, estos últimos autores reportaron los valores más altos de productividad lipídica hasta el momento para *N. oceanica* bajo condiciones de deprivación de nitrógeno y luz continua.

Con respecto a la composición de los ácidos grasos, en cultivos de *Nannochloropsis* con deprivación progresiva de nitrógeno, se ha observado un aumento del contenido de los AGS y AGM y una reducción de los AGP (Xiao *et al.* 2013), mientras que el efecto de la deprivación súbita de nitrógeno sobre la composición de los ácidos grasos no ha sido informado hasta el momento para *N. oceanica*.

Por lo tanto, en función de los antecedentes expuestos, los objetivos del presente capítulo fueron analizar el efecto de diferentes condiciones ambientales y la carencia de nitrógeno sobre el crecimiento, la producción de biomasa, el contenido de lípidos y la composición de ácidos grasos en cultivos de *N. oceanica* CCALA 978. Se plantearon las siguientes hipótesis:

A) El aumento de la temperatura y la cantidad de horas de luz en cultivos de *N. oceanica* CCALA 978:

- ✓ Favorecen el crecimiento,
- ✓ Incrementan el contenido de lípidos totales y neutros,
- ✓ Reducen el grado de insaturación de los ácidos grasos.

B) El aumento de la intensidad lumínica en cultivos de *N. oceanica* CCALA 978:

- ✓ Favorece el crecimiento,
- ✓ Incrementa el contenido de lípidos totales y lípidos neutros,

- ✓ Reduce el grado de insaturación de los ácidos grasos;

C) La carencia de nitrógeno y las altas intensidades de luz en cultivos de *N. oceanica* CCALA 978:

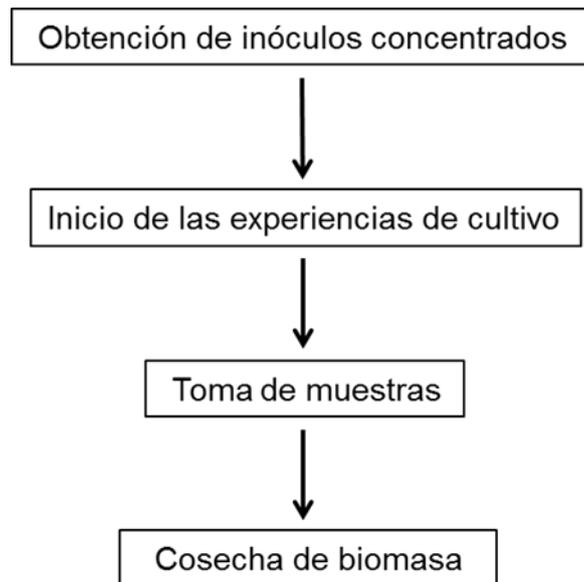
- ✓ Incrementan el contenido de lípidos totales y lípidos neutros,
- ✓ Reducen el grado de insaturación de los ácidos grasos.

Así, en primer lugar se analizó el efecto combinado de la temperatura y el fotoperiodo sobre la velocidad de crecimiento, la producción y la productividad de biomasa, el contenido de lípidos totales y de las fracciones lipídicas, las productividades lipídicas y la composición de los ácidos grasos, con énfasis en la fracción de lípidos neutros. Luego, se evaluó el efecto del incremento de la intensidad de luz sobre los mismos parámetros. Posteriormente, se analizó el efecto de la carencia de nitrógeno a dos intensidades de luz sobre las mismas variables. Por último, se infirió la calidad del biodiesel a partir de la composición de los ácidos grasos de la fracción neutra de acuerdo con los estándares internacionales.

## **5.2 Materiales y Métodos**

### **5.2.1 Metodología experimental**

Las experiencias de cultivo se realizaron de acuerdo con el siguiente esquema:



**Figura 5.2:** Metodología experimental seguida durante las experiencias de cultivo realizadas.

### ***Obtención de inóculos***

Los inóculos para iniciar las experiencias de crecimiento se obtuvieron a partir de cultivos stock de acuerdo con lo detallado en la Sección 2.4.

### ***Inicio de las experiencias de cultivo***

Las experiencias de cultivo se iniciaron mediante diluciones de inóculos concentrados con medio f/2 fresco, hasta alcanzar una concentración inicial de  $1 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup> y un volumen de 2L de cultivo de acuerdo con lo detallado en la Sección 2.5 del capítulo 2. Las experiencias se realizaron en Erlenmeyer de vidrio, previamente acondicionados de acuerdo con lo explicado en la Sección 2.2. El aire y el CO<sub>2</sub> fueron aplicados mediante el uso de mangueras plásticas conectadas a aireadores y a un tubo de CO<sub>2</sub> comprimido. Las experiencias tuvieron una duración de 15 días.

### ***Toma de muestras***

Durante las diferentes experiencias de crecimiento se tomaron muestras regularmente a lo largo del cultivo con el fin de determinar la densidad celular (cel mL<sup>-1</sup>), la concentración de clorofila *a* y carotenoides totales ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), la biomasa

(peso seco, mg L<sup>-1</sup>) y la evolución del contenido de lípidos neutros mediante la tinción con rojo Nilo (IFR, u.a).

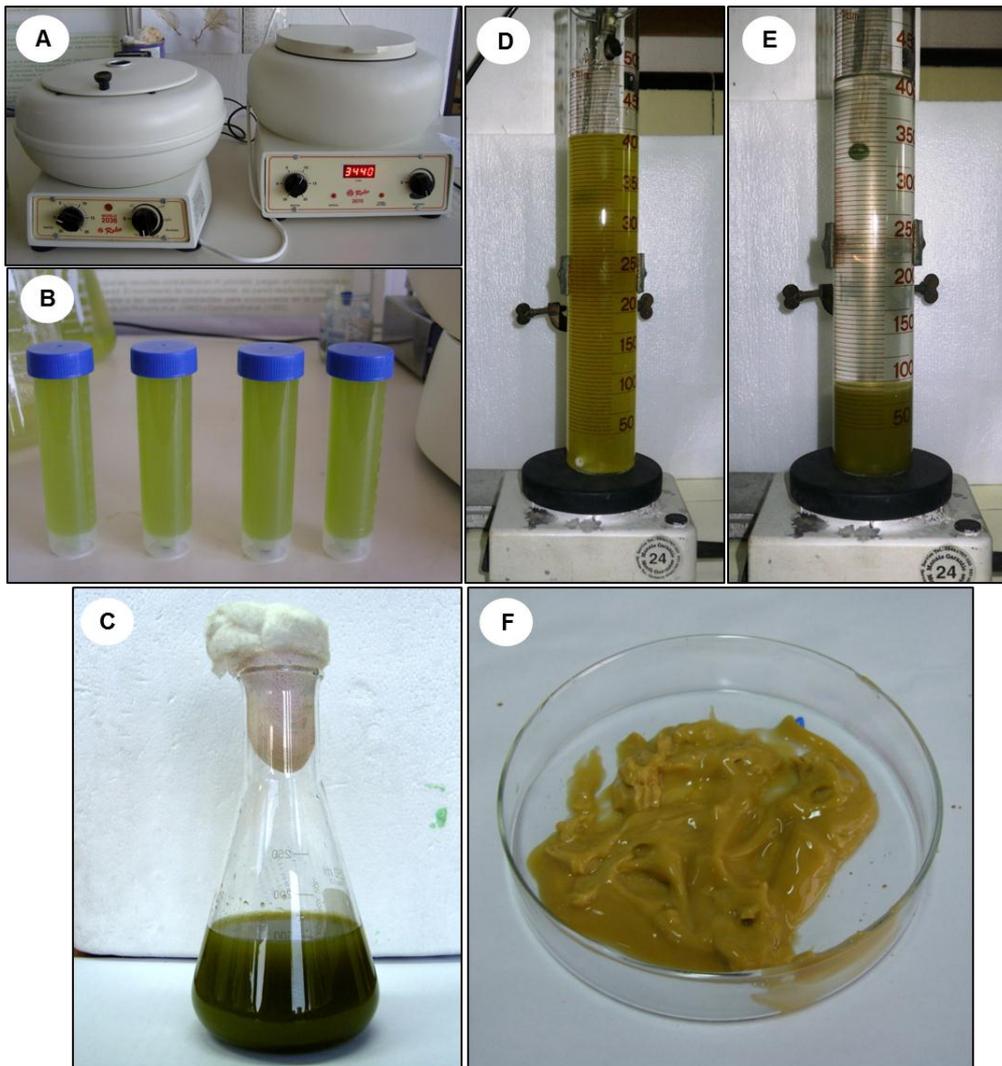
Para la densidad celular se tomaron alícuotas de 1-2 mL diariamente, mientras que para los parámetros restantes las alícuotas se tomaron cada 2 ó 3 días. Los volúmenes de las muestras fueron de 4 mL para pigmentos, 3 mL para lípidos neutros y clorofila a y 5-10 mL para peso seco de biomasa (de acuerdo con la densidad del cultivo).

Las muestras se tomaron con pipetas de vidrio graduadas y previamente acondicionadas de acuerdo con lo explicado en la Sección 2.2. Para cada uno de los parámetros, las muestras fueron tomadas por triplicado.

### **Cosecha de biomasa**

La biomasa fue cosechada al finalizar las experiencias de cultivo mediante centrifugación a 3500 rpm con una centrífuga de mesada Rolco 2000 durante 20 minutos (Fig. 5.3 A-C). Debido al pequeño tamaño de *N. oceanica* CCALA 978, en algunos casos fue necesario emplear el método de cosecha por floculación, mediante el agregado de NaOH 2N (Fig. 5.3 D-F). Se agregaron alícuotas de NaOH de 0,5 mL hasta la estabilización del pH. Una vez alcanzado un pH estable, se continuó agregando NaOH hasta la floculación del cultivo.

La biomasa cosechada se lavó 3 veces con agua destilada y se almacenó en freezer a -20°C para ser empleada en el análisis de lípidos.



**Figura 5.3:** A-B) Cosecha de biomasa de *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 mediante centrifugación. C) Biomasa centrifugada. D-E) Cosecha de biomasa mediante floculación con NaOH 2N. F) Biomasa floculada.

## 5.2.2 Condiciones experimentales de cultivo

Se llevaron a cabo experiencias de cultivo en *N. oceanica* CCALA 978 bajo diferentes condiciones ambientales y carencia de nitrógeno. Los cultivos se realizaron en medio f/2 preparado a partir de agua de mar de acuerdo con lo explicado en la Sección 2.3 y mantenido a una salinidad de 30 en todas las experiencias realizadas.

### **5.2.2.1 Efecto de la temperatura y el fotoperíodo**

Se realizaron experiencias en medio f/2 a temperaturas de 15 y 25°C y bajo dos fotoperíodos, 12:12 y 16:8 h de luz: oscuridad (L:O). La intensidad de luz se mantuvo a  $100 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , aportada por tubos fluorescentes (Philips), ubicados en posición horizontal. Se aplicó aireación constante, con un caudal de  $300\text{-}500 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$  y  $\text{CO}_2$  al 1% durante 2-3 horas diarias. Luego de 14 días, la biomasa se cosechó y se almacenó a  $-20^\circ\text{C}$  hasta el análisis de lípidos.

### **5.2.2.2 Efecto de la intensidad de luz**

*N. oceanica* CCALA 978 se cultivó en medio f/2 a  $25^\circ\text{C}$ , un fotoperíodo de 16:8 h de L:O y dos intensidades de luz, 100 y  $300 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . La luz fue aportada por tubos fluorescentes (Philips) ubicados en posición horizontal. Se emplearon las mismas condiciones de aireación y  $\text{CO}_2$  indicadas en la Sección 5.2.2.1. Luego de 14 días, la biomasa se cosechó y se almacenó a  $-20^\circ\text{C}$  hasta el análisis de lípidos.

### **5.2.2.3 Efecto de la carencia de nitrógeno y de la intensidad de luz**

Para estas experiencias, *N. oceanica* CCALA 978 se cultivó en medio f/2 a  $25^\circ\text{C}$ , un fotoperíodo 16:8 h de L:O y a dos intensidades de luz: 100 y  $300 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Se emplearon las mismas condiciones de aireación y  $\text{CO}_2$  indicadas en la Sección 5.2.2.1. Al final de la fase exponencial, la biomasa se cosechó y se resuspendió en medio f/2 sin nitrógeno (N-). Luego de 14 días, la biomasa se cosechó y se almacenó a  $-20^\circ\text{C}$  hasta el análisis de lípidos.

## Análisis de crecimiento

### 5.2.3 Cuantificación de la velocidad de crecimiento, producción y productividad de biomasa

#### 5.2.3.1 Determinación de la velocidad de crecimiento

Para calcular la velocidad de crecimiento se siguió la técnica gráfica de recuentos sucesivos (Guillard 1973). En esta técnica, las densidades celulares ( $N$ = número de células  $\text{mL}^{-1}$ ) son volcadas en un gráfico con escala semilogarítmica, en donde se eligen los valores correspondientes a la fase de crecimiento exponencial. Estas densidades transformadas logarítmicamente ( $Y = \log_{10} N$ ) se tratan por el método de mínimos cuadrados para hallar la regresión de  $Y$  en función del tiempo ( $t$ ), siendo la pendiente de la recta la constante de crecimiento ( $k_{10}$ ).

Obteniendo este último valor fue posible calcular los siguientes parámetros:

a) Velocidad de crecimiento ( $k$ ): indica el número de divisiones celulares por día y se calculó según Guillard (1973):

$$k \text{ (divisiones día}^{-1}\text{, div d}^{-1}\text{)} = 3,322 k_{10} \text{ (Ecuación 5.1)}$$

en donde el valor 3,322 representa el factor de conversión de  $\log_{10}$  a  $\log_2$ ;

b) Tiempo de duplicación ( $T_d$ ): expresa el tiempo que tarda la célula en duplicarse y se calculó a partir de la siguiente ecuación (Smayda 1983)

$$T_d \text{ (horas)} = (1/k) 24 \text{ (Ecuación 5.2)}$$

#### 5.2.3.2 Determinación de biomasa

La biomasa microalgal se determinó a partir del peso seco (ps), expresado en  $\text{mg L}^{-1}$  siguiendo el protocolo de Chini Zitelli *et al.* (2003). Para ello, las alícuotas de cultivo fueron tomadas cada 2 ó 3 días a lo largo de las experiencias de crecimiento. Se emplearon filtros de fibra de vidrio tipo GF/C de  $0,2 \mu\text{m}$  de poro y 25 mm de diámetro (Munktell) previamente acondicionados con agua destilada, secados en

estufa a 60°C durante toda la noche y pesados en balanza analítica. Una vez tomado el peso inicial, se filtraron las alicuotas de cultivo. Posteriormente, los filtros se lavaron 3 veces con 10 mL de agua destilada para remover las sales y se colocaron nuevamente en estufa de secado a 60°C durante toda la noche. Al día siguiente se tomó el peso final. La biomasa ( $\text{mg L}^{-1}$ ) se obtuvo de la diferencia entre el peso seco final ( $ps_f$ ) y el peso inicial ( $ps_i$ ). Las muestras se tomaron por triplicado.

### **5.2.3.3 Productividad de biomasa**

La productividad de biomasa se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$P_B (\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}) = (ps_f - ps_i) / T_d \text{ (Ecuación 5.3)}$$

donde  $P_B$  es la productividad de biomasa expresada en  $\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ,  $ps_f$  y  $ps_i$  son el peso seco final e inicial ( $\text{mg L}^{-1}$ ) respectivamente y  $T_d$  es el tiempo de cultivo.

### **5.2.4 Determinación del contenido de pigmentos**

Para la determinación del contenido de clorofila *a* y carotenoides totales, muestras de cultivo por triplicado fueron tomadas cada 2 ó 3 días a lo largo de las experiencias de crecimiento. En ambos casos, el procedimiento de extracción se realizó empleando metanol absoluto con previo congelado de la muestra a -20°C durante una noche (para mayores detalles ver Sección 4.2.3, Capítulo 4).

## **Análisis lipídico**

### **5.2.6 Detección de lípidos neutros mediante espectrofluorimetría**

La detección cuali y cuantitativa de lípidos neutros se realizó mediante la tinción con rojo Nilo con DMSO 5%, de acuerdo con lo descrito en la Sección 4.3.3 (Capítulo 4). Para la determinación de la cinética de acumulación se tomaron muestras por triplicado cada 2 ó 3 días.

## **5.2.7 Extracción, fraccionamiento de lípidos totales y caracterización del perfil de ácidos grasos**

El análisis de lípidos incluyó tres etapas. Una primera etapa de extracción de lípidos totales realizada al finalizar cada ensayo; una segunda etapa de fraccionamiento de lípidos totales en lípidos neutros (LN), glicolípidos (GL) y fosfolípidos (FL); y una tercera etapa de metilación y caracterización del perfil de los lípidos totales y las correspondientes fracciones lipídicas.

### **5.2.7.1 Extracción de lípidos totales**

La extracción de lípidos totales se realizó siguiendo el protocolo modificado de Folch (1957) asistido por ultrasonido de acuerdo con Converti *et al.* (2009). Las células de *N. oceanica* CCALA 978 fueron cosechadas por centrifugación a 3500 rpm durante 15-25 minutos.

La biomasa cosechada fue liofilizada en un liofilizador (Rificor modelo LAB3C). Entre 150 y 200 mg de biomasa liofilizada se colocaron en tubos de centrífuga de vidrio con 4 mL de una solución de cloroformo: metanol (2:1 v/v). La mezcla fue tratada con sonicador (Sonorex) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego, el material se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante, compuesto de solventes y lípidos, fue separado del pellet y depositado en una ampolla de decantación. Esta serie de pasos se repitió dos o tres veces hasta la obtención de un extracto transparente. Al extracto total se le adicionaron 16 mL de solución de NaCl (0,9%) para crear un sistema bifásico. La fase inferior fue recuperada y depositada en viales de vidrio acondicionados. Se utilizó Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro para secuestrar el contenido acuoso que pudiera haber quedado en el material tratado. Una vez filtradas, las muestras fueron llevadas a sequedad bajo corriente de nitrógeno y luego se pesaron en balanza analítica. Las extracciones se hicieron por cuadruplicado.

### **5.2.7.2 Fraccionamiento de lípidos totales en lípidos neutros, glicolípidos y fosfolípidos**

El fraccionamiento de lípidos totales en lípidos neutros (LN), glicolípidos (GL) y fosfolípidos (FL) se realizó usando un cartucho Sep-Pack de silica de 1000 mg (J. T. Baker Inc., Phillipsburg, N. J.), de acuerdo con Berge *et al.* (1995). Este procedimiento involucró cinco pasos: 1) lavado inicial del cartucho con 30 mL de cloroformo; 2) incorporación al cartucho de un volumen de 5 mL de solución de cloroformo:lípidos conteniendo aproximadamente 30 mg de lípidos totales; 3) recuperación de lípidos neutros por elución del adsorbente con 15 mL de una solución cloroformo:ácido acético (9:1 v/v); 4) recuperación de glicolípidos por elución con 20 mL de una solución de acetona:metanol (9:1 v/v); 5) recuperación de los fosfolípidos por elución con 20 mL de metanol. Cada una de las fracciones fue recogida en viales de vidrio cónicos previamente acondicionados y pesados. Las fracciones se evaporaron hasta sequedad bajo corriente de nitrógeno y luego se pesaron con balanza analítica. Los solventes empleados fueron de grado analítico.

### **5.2.7.3 Determinación del perfil de los ácidos grasos**

Los lípidos totales y los extractos lipídicos obtenidos en cada uno de los procedimientos anteriores fueron transmetilados, usando el método descrito por Morrison y Smith (1964). De esta manera, se obtuvieron los metilésteres de los ácidos grasos que posteriormente fueron resueltos por cromatografía gaseosa. Para este procedimiento se trabajó con un máximo de entre 25 y 30 mg de lípidos, por muestra. En cada uno de los viales se adicionaron 2 mL de KOH 10% en metanol y se agitaron durante 1 minuto con vórtex. El oxígeno de los viales fue eliminado bajo corriente de nitrógeno. Luego, los viales fueron colocados en baño térmico a 80°C durante 45 minutos. El material insaponificable fue extraído mediante la incorporación de 2 mL de éter de petróleo dos veces. A continuación, se efectuó la adición de 0,5 mL de HCL, en baño de hielo, para la liberación de los AG que se encuentran formando parte de los jabones potásicos. Se incorporaron 2 mL de éter de petróleo y se agitó posteriormente en vortex. Luego, se separó la fase superior (que contiene los ácidos grasos) y se depositó en un vial cónico de vidrio previamente acondicionado. El éter de petróleo fue evaporado bajo corriente de nitrógeno. La metilación de los AG se realizó mediante incorporación de 1,5 mL de

trifluoruro de boro (BF<sub>3</sub>) al 14% en metanol (Sigma Adrich), incubando el material en baño de agua a 80°C durante 30 minutos. Los ésteres de AG fueron extraídos por medio del agregado de 2 mL de éter de petróleo. La mezcla se agitó en vórtex y se dejó reposar hasta formación de un sistema bifásico. Este paso se realizó dos veces. La fase superior (que contiene los metilésteres) fue separada en viales de vidrio acondicionados y llevada a sequedad bajo corriente de nitrógeno. En algunos casos, antes de llevar a sequedad se adicionó Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se filtró el material para eliminar el agua que hubiera podido quedar en las muestras. Los ácidos grasos fueron retomados con 0,5 o 1 mL de hexano cromatográfico en tubos eppendorf, dependiendo de la cantidad de lípidos utilizados originalmente para la metilación.

Para la resolución de los ésteres metilados se utilizó un cromatógrafo Hewlett Packard® 6890 equipado con una columna capilar DB-FFAP (100 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 µm de espesor de film). Los ácidos grasos presentes en las distintas muestras fueron determinados manualmente mediante el programa HP3398A GC Chemstation. La identificación de los ácidos grasos se realizó por comparación con un patrón estándar conocido Supelco 37 componente FAME mix (Sigma-Aldrich). La composición de los perfiles fue calculada como porcentaje de área en relación con la sumatoria de áreas de todos los ácidos grasos detectados. Los metilésteres en proporciones inferiores a 0,01 % fueron informados como no detectables (nd). Los análisis de lípidos totales y fracciones lipídicas fueron realizados por cuadruplicado.

### 5.2.8 Productividad lipídica

Las productividades de lípidos totales (P<sub>LT</sub>) y lípidos neutros (P<sub>LN</sub>) se calcularon de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$P_{LT} \text{ (mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}\text{)} = [\text{biomasa (mg L}^{-1}\text{)} \times C_{LT} \text{ (g g}^{-1}\text{)}] / t \text{ (d)} \text{ (Li et al. 2008)}$$

(Ecuación 5.4)

$$P_{LN} \text{ (mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}\text{)} = [\text{biomasa (mg L}^{-1}\text{)} \times C_{LN} \text{ (g g}^{-1}\text{)}] / t \text{ (d)} \text{ (Damiani et al. 2014)}$$

(Ecuación 5.5),

donde P<sub>LT</sub> y P<sub>LN</sub> son las productividades de lípidos totales y neutros, respectivamente, biomasa es el peso seco estimado de acuerdo con lo descrito en

la Sección 5.2.3.2 de este capítulo,  $C_{LT}$  y  $C_{LN}$  son los contenidos de lípidos totales y lípidos neutros por gramo de biomasa, respectivamente, y  $t$  es el tiempo de acumulación estimado a partir de la cinética de los lípidos neutros, de acuerdo con lo explicado en la Sección 4.3.3 (Capítulo 4).

## **5.2.9 Evaluación de la calidad de los aceites para la producción de biodiesel**

El índice de Yodo (IY) y el número de cetano (NC) se infirieron a partir de la composición de los métilésteres de la fracción de lípidos neutros. El IY es una medida de la insaturación total en una mezcla de ácidos grasos. Un índice de Yodo muy elevado indica que el compuesto es muy sensible a los procesos de hidrólisis o polimerización. Según la norma Europea, se acepta un IY de hasta 120 g  $I_2/100g$  en las materias primas utilizadas para elaborar biodiesel. En este estudio, el índice de Yodo fue calculado de acuerdo con Firestone (2010).

El NC es un parámetro de la calidad de un combustible relacionado con el tiempo de ignición y la calidad de la combustión (Ramos *et al.* 2009). Cuanto más elevado es el número de cetano, menor es el retraso de la ignición y mejor es la calidad de combustión. Por el contrario, aquellos carburantes con un bajo número de cetano requieren mayor tiempo para que ocurra la ignición y después queman muy rápidamente. Según el estándar europeo, el valor deseable de NC debe ser mayor o igual a 51. En este estudio, el número de cetano fue calculado de acuerdo con Francisco *et al.* (2010).

En cuanto al contenido de ésteres de ácido linoleico y de otros AG de mayor insaturación (con más de 4 dobles enlaces), la norma Europea (y la Argentina que se basa en esta última) establecen valores máximos debido a que estos compuestos están relacionados con la estabilidad del biodiesel. Para el contenido de ácido linoleico y el contenido de AG con más de 4 dobles enlaces, la norma europea establece un máximo de 12 y 1%, respectivamente.

## 5.2.10 Análisis estadístico

El análisis de las diferencias entre los diferentes parámetros de crecimiento, los valores de lípidos totales, las fracciones lipídicas y los porcentajes de ácidos grasos se realizó mediante Análisis de la Varianza, ANOVA doble y simple, mediante el empleo del Software estadístico INFOSTAT, versión 2008 (De Rienzo *et al.* 2008). Para testear la significancia de las diferencias se usó el test de Fisher. En todos los casos, las comparaciones con  $p < 0,05$  se consideraron significativas.

## 5.4 Resultados

### 5.4.1 Crecimiento, biomasa y contenido de lípidos en *N. oceanica* CCALA 978

#### 5.4.1.1 Efecto de la temperatura y el fotoperiodo

#### Velocidad de crecimiento, producción y productividad de biomasa y cinética de pigmentos fotosintéticos

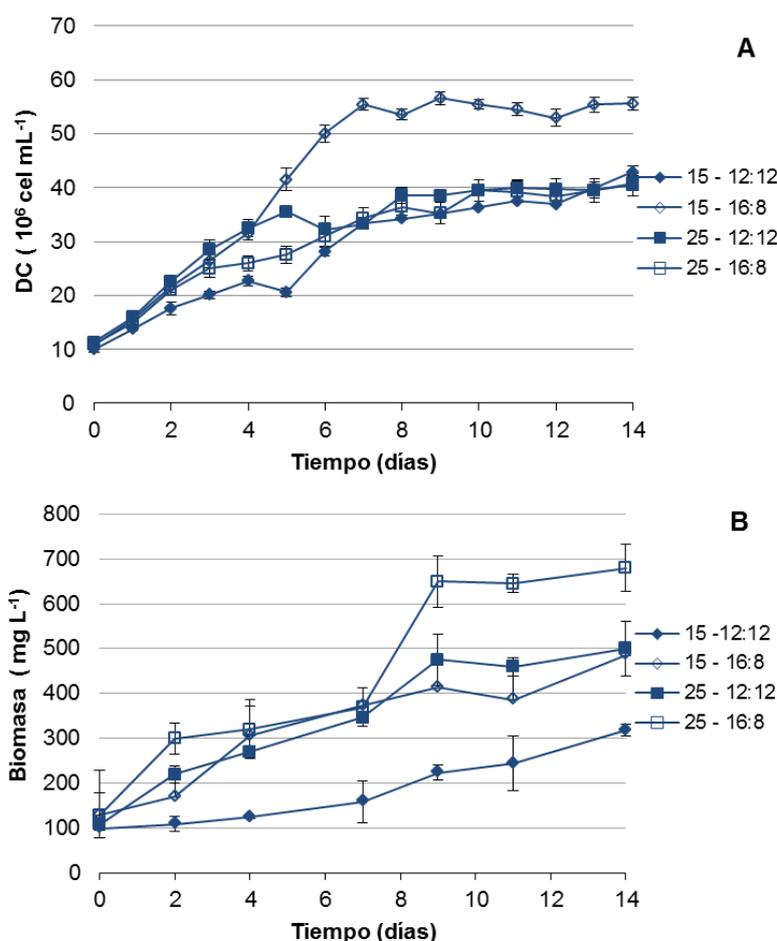
En la Tabla 5.1 se presentan los valores de crecimiento, producción y productividad de biomasa obtenidos a partir de cultivos de *N. oceanica* CCALA 978 sometidos a dos temperaturas (15° y 25°C), dos fotoperíodos (12:12 y 16:8 h de L:O) y a 100  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidad de luz. Las velocidades de crecimiento incrementaron significativamente ( $p < 0,05$ ) a 25°C y en ambos fotoperíodos (ca. 0,45-0,46  $\text{div d}^{-1}$ ). A 15°C se observó un incremento significativo de la velocidad de crecimiento en el fotoperíodo 16:8 h de L:O (Tabla 5.1).

En todas las condiciones de cultivo, el incremento de la densidad celular fue similar hasta el día 4 de cultivo (Fig. 5.4 A). Sin embargo, a partir de este día, la densidad celular del cultivo a 15°C y 16:8 L:O presentó un mayor incremento, alcanzando un valor máximo de ca.  $55 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$  (Fig. 5.4 A). A 15°C la fase estacionaria comenzó el día 7, mientras que a 25°C ésta comenzó los días 8 y 10 en los fotoperíodos 12:12 y 16:8 h de L:O, respectivamente. Con respecto a la biomasa (Fig. 5.4 B), ésta mostró un incremento sostenido a lo largo de todo el cultivo bajo

las cuatro condiciones estudiadas, alcanzando los valores más altos de producción (ca. 680 mg L<sup>-1</sup>) y de productividad (ca. 35 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) de biomasa a 25°C y un fotoperíodo de 16:8 L:O.

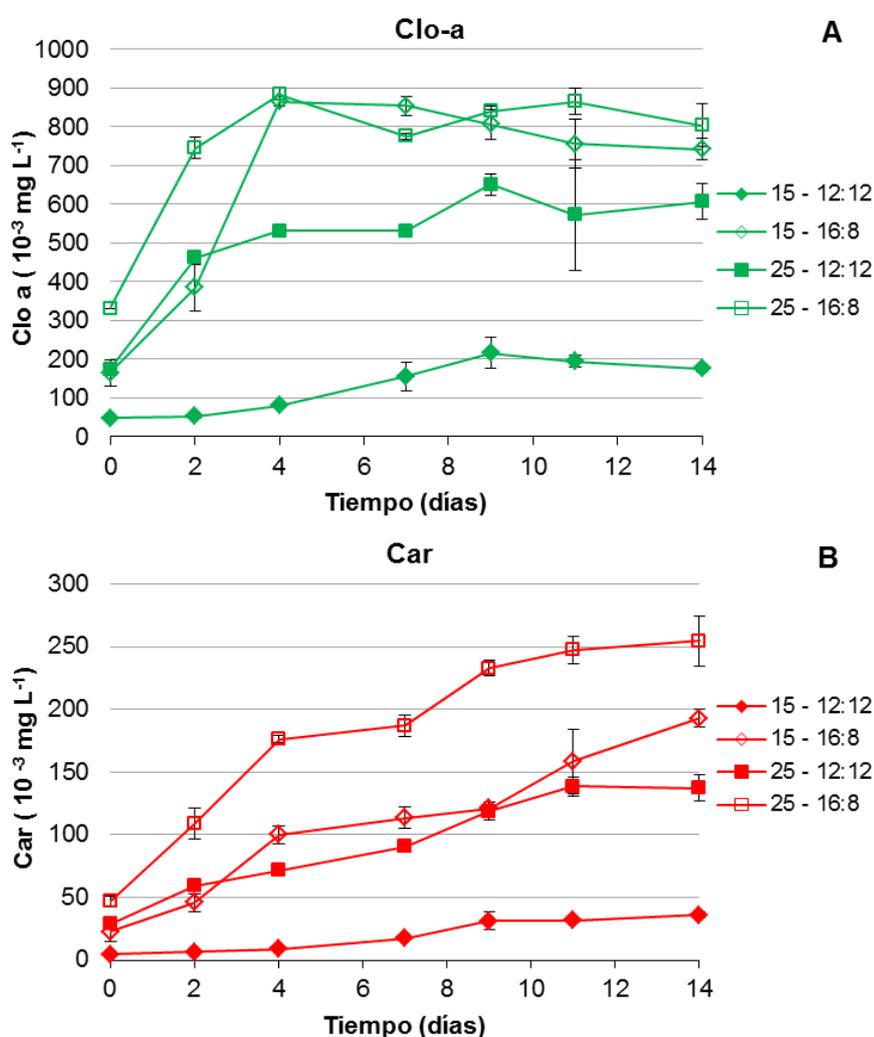
**Tabla 5.1:** Velocidad de crecimiento ( $k$ , div d<sup>-1</sup>), tiempo de duplicación ( $T_d$ , h), densidad celular máxima (DCM, 10<sup>6</sup> cel mL<sup>-1</sup>), biomasa máxima (BM, mg L<sup>-1</sup>) y productividad de biomasa (PB, mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) de *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 a las temperaturas (T) de 15 y 25°C, los fotoperíodos (F) de 12:12 y 16:8 h de L:O y 100  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Los valores expresados representan el promedio  $\pm$  error estándar de tres réplicas. Valores seguidos de letras distintas en una misma columna son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ )

T	F	$k$	$T_d$	DCM	BM	PB
15	12:12	0,29 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	82,0	42,9 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	318 $\pm$ 23 <sup>a</sup>	18,2 $\pm$ 4,4 <sup>a</sup>
	16:8	0,39 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	60,0	55,6 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>	487 $\pm$ 23 <sup>b</sup>	25,7 $\pm$ 4,4 <sup>ab</sup>
25	12:12	0,46 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	55,5	39,5 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	500 $\pm$ 23 <sup>b</sup>	28,1 $\pm$ 3,5 <sup>ab</sup>
	16:8	0,45 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	52,1	40,5 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	680 $\pm$ 23 <sup>c</sup>	34,8 $\pm$ 3,5 <sup>b</sup>



**Figura 5.4:** **A)** Curvas de crecimiento de *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 a 100  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 15° y 25°C y fotoperíodos de 12:12 y 16:8 h de L:O. **B)** Cinética de biomasa (mg L<sup>-1</sup>). Los valores representan el promedio  $\pm$  desvío estándar de tres réplicas.

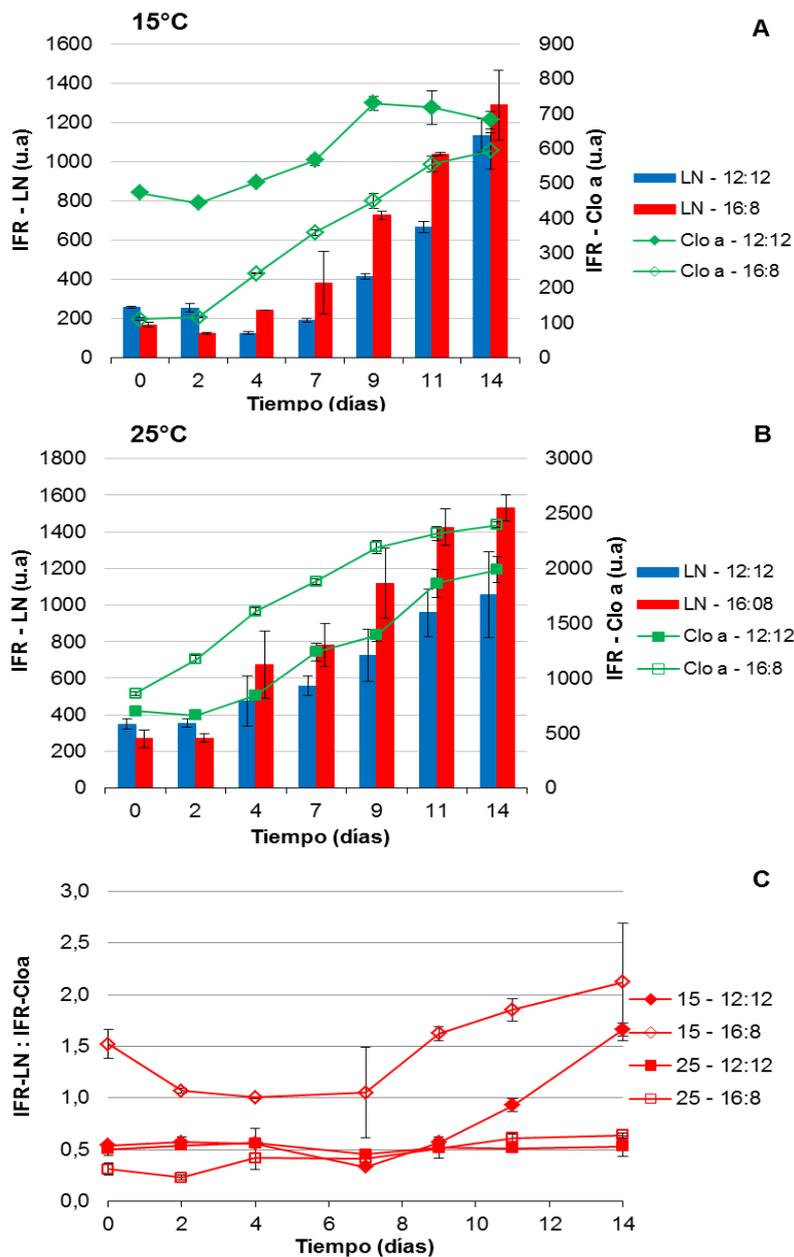
Con respecto a la cinética de los pigmentos fotosintéticos, las concentraciones más altas de Clo-a se alcanzaron en el fotoperiodo de mayor horas de luz (16:8 L:O), para ambas temperaturas (Fig. 5.5 A). La concentración de Clo-a incrementó sostenidamente hasta el día 4 en el fotoperiodo 16:8 L:O (ca.  $900 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$ , tanto a  $15^\circ\text{C}$  como a  $25^\circ\text{C}$ ), para luego estabilizarse. Mientras que, en el fotoperiodo 12:12 L:O, se observó un incremento de Clo-a hasta el día 9, a ambas temperaturas (Fig. 5.5 A). Los carotenoides totales incrementaron a lo largo del cultivo en todas las condiciones estudiadas (Fig. 5.5 B). Al igual que la Clo-a, los contenidos de carotenoides totales más altos, ca. 200 y  $250 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$ , se alcanzaron con el fotoperiodo 16:8 L:O en ambas temperaturas.



**Figura 5.5:** Cinética de pigmentos fotosintéticos en *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 a  $100 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ,  $15$  y  $25^\circ\text{C}$ , y fotoperiodos de 12:12 y 16:8 h de L:O. **A)** Contenido de clorofila a. **B)** Contenido de carotenoides totales. Los valores representan los promedios  $\pm$  desvío estándar de tres réplicas.

## Mediciones *in situ* por fluorimetría de lípidos neutros y de clorofila *a*

La cinética de acumulación de los lípidos neutros y de la clorofila *a* se muestra en la Figura 5.6 A-C. Los valores más altos de intensidad de fluorescencia relativa (IFR) se obtuvieron a 25°C y 16:8 h de L:O (Fig. 5.6 B). La cinética de la acumulación de lípidos neutros fue diferente en las dos temperaturas empleadas. A 15°C, se observó un incremento sostenido de la acumulación de lípidos neutros a partir del día 7 hasta el día 14 en ambos fotoperiodos (Fig. 5.6 A). A 25°C, la acumulación de lípidos neutros se evidenció a partir del día 4 en ambos fotoperiodos (Fig. 5.6 B). A esta temperatura, no se encontraron diferencias significativas entre los valores de IFR a partir del día 9, tanto a 12:12 como 16:8 h L:O. Sin embargo, la relación IFR-LN:IFR-Cloa a 25°C y en ambos fotoperiodos (Fig. 5.6 C) no mostró la tendencia de acumulación de lípidos neutros observada en la Figura 5.6 B, ya que el índice se mantuvo por debajo de 1 durante todo el periodo de cultivo. A 15°C la relación IFR-LN:IFR-Cloa estuvo por encima de 1 a partir del día 11 en el fotoperíodo 16:8 h L:O y desde el comienzo del cultivo en el fotoperíodo 12:12 h L:O.



**Figura 5.6:** Acumulación de lípidos neutros en *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 a 100  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 15 y 25°C, y fotoperíodos de 12:12 y 16:8 h de L:O. **A-B)** Cinética de acumulación de lípidos neutros y de clorofila a expresadas como intensidad de fluorescencia relativa (IFR, u.a). **C)** Cinética de acumulación de lípidos neutros expresada como relación IFR-LN: IFR-Cloa. Los valores representan el promedio  $\pm$  desvío estándar de tres réplicas.

## Contenido de lípidos totales y de las fracciones lipídicas y productividad lipídica

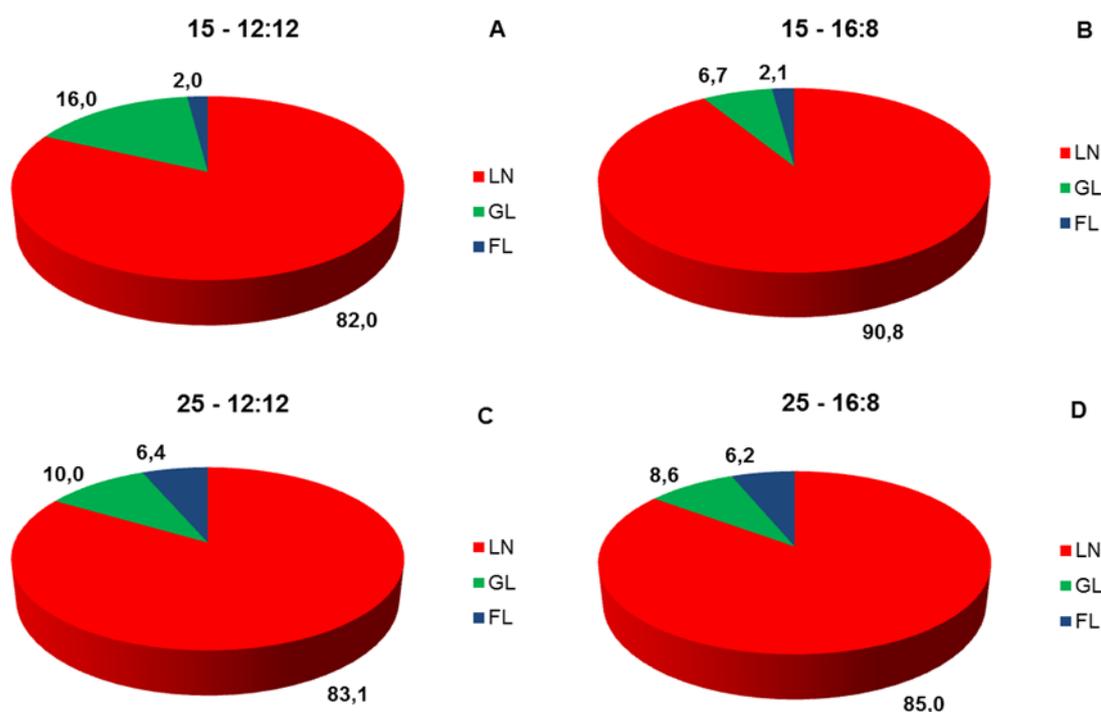
En la Tabla 5.2 se observan los contenidos de lípidos totales, fracciones lipídicas y las productividades de lípidos totales y lípidos neutros. Se observó un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) en el contenido de lípidos totales y lípidos neutros en función del fotoperíodo en ambas temperaturas, obteniéndose los mayores valores de LT (ca. 33 y 34% ps) y de LN (ca. 29 y 29% ps) a 15 y 25°C,

respectivamente, y 16:8 h de L:O. Sin embargo, no se hallaron diferencias significativas en los contenidos de lípidos ( $p > 0,05$ ) con el incremento de la temperatura. Los LN representaron un 82 - 91% de los LT (Fig. 5.7 A- D). Las mayores productividades lipídicas de LT y LN se obtuvieron a 25°C y 16:8 h L:O, alcanzando valores de ca. 46 y 43 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabla 5.2).

El contenido de glicolípidos disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) en función de la temperatura en el fotoperiodo 12:12 h L:O y en función del fotoperiodo a 15°C (Tabla 5.2), representando 7-16% del total de lípidos (Fig. 5.7 A-D). Con respecto al contenido de fosfolípidos, éstos aumentaron significativamente ( $p < 0,05$ ) a 25°C en ambos fotoperiodos (Tabla 5.2), representando menos del 7% del total de los lípidos (Fig. 5.7 C-D).

**Tabla 5.2:** Contenido de lípidos totales y de las fracciones lipídicas (expresados como porcentaje de peso seco, % ps) y productividades de lípidos totales y lípidos neutros (en mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) de *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978, a 100 μmol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, 15 y 25°C, y fotoperiodos de 12:12 y 16:8 h de L:O. Los valores representan el promedio de 3-4 réplicas ± error estándar, para el contenido de lípidos totales, y el promedio de 2 réplicas ± error estándar, para el contenido de las fracciones lipídicas (% ps). T: temperatura; F: fotoperiodo; LT: lípidos totales; LN: lípidos neutros; GL: glicolípidos; FL: fosfolípidos. Valores seguidos de letras distintas en una misma columna son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

T	F	LT	Fracciones lipídicas			Productividad lipídica	
			LN	GL	FL	LT	LN
15	12:12	24,0 ± 2,1 <sup>a</sup>	19,9 ± 0,9 <sup>a</sup>	3,8 ± 1 <sup>c</sup>	0,5 ± 0,1 <sup>a</sup>	10,8 ± 2,9 <sup>a</sup>	8,0 ± 0,7 <sup>a</sup>
	16:8	31,4 ± 1,5 <sup>bc</sup>	28,9 ± 0,9 <sup>b</sup>	2,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	21,8 ± 2,0 <sup>b</sup>	20,0 ± 0,7 <sup>b</sup>
25	12:12	28,3 ± 1,5 <sup>ab</sup>	23,0 ± 0,9 <sup>a</sup>	2,8 ± 0,1 <sup>ab</sup>	1,8 ± 0,1 <sup>b</sup>	28,0 ± 2,0 <sup>b</sup>	23,0 ± 0,7 <sup>b</sup>
	16:8	33,7 ± 1,5 <sup>c</sup>	28,6 ± 0,9 <sup>b</sup>	2,9 ± 0,1 <sup>b</sup>	2,2 ± 0,1 <sup>b</sup>	45,9 ± 2,0 <sup>c</sup>	43,0 ± 0,7 <sup>c</sup>



**Figura 5.7: A-D)** Proporciones relativas de las fracciones lipídicas (expresadas como % de lípidos totales) de *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 a 100  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 15 y 25°C, y fotoperíodos de 12:12 y 16:8 h de L:O. LN: lípidos neutros; GL: glicolípidos; FL: fosfolípidos.

#### 5.4.1.2 Efecto de la intensidad de luz

#### Velocidad de crecimiento, producción y productividad de biomasa y contenido de pigmentos fotosintéticos

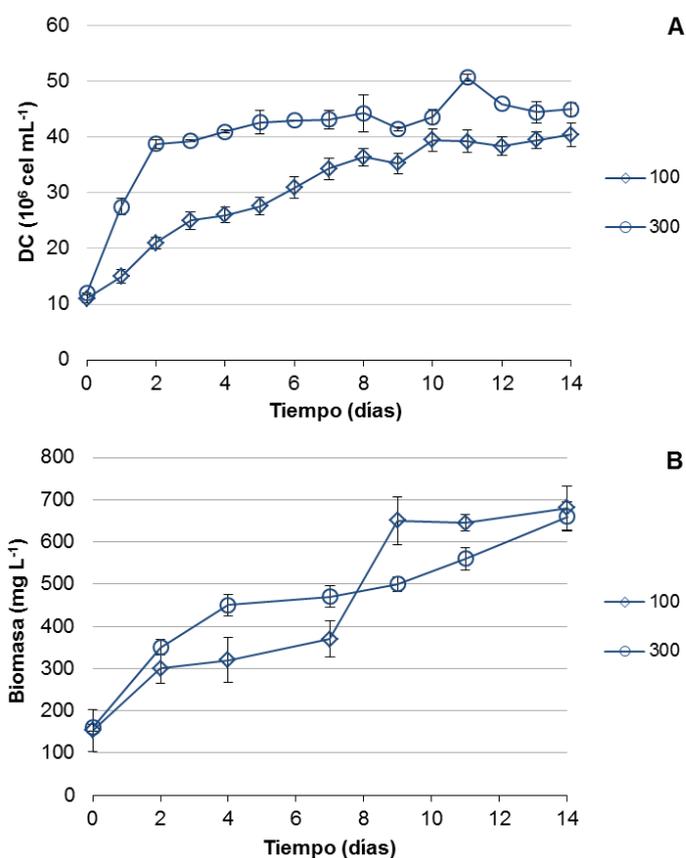
Teniendo en cuenta los mayores valores de contenidos de lípidos obtenidos y que las productividades de lípidos totales y lípidos neutros más altas se registraron a 25°C, 16:8 h de L:O y 100  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , se realizaron experiencias de cultivo bajo estas condiciones y con una mayor intensidad de luz (300  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Los valores de velocidad de crecimiento, de producción y productividad de biomasa de *N. oceanica* CCALA 978 obtenidos bajo las condiciones de cultivo indicadas previamente se observan en la Tabla 5.3. Las velocidades de crecimiento y densidades celulares más altas ( $p < 0,05$ ) se registraron a 300  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , con valores de 0,85  $\text{div d}^{-1}$  y de ca.  $46 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ , respectivamente (Tabla 5.3 y Fig. 5.8 A). A 300  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , la fase estacionaria de crecimiento comenzó a partir del día 2 (Fig. 5.8 A), mientras que a 100  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , ésta comenzó el día 10 (Fig. 5.8 A). Sin embargo, no se hallaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en

los valores de producción y productividad de biomasa entre ambas intensidades de luz. Se observó un incremento sostenido de la biomasa a lo largo del periodo de cultivo (Fig. 5.8 B), obteniéndose valores máximos de ca. 680 y 660 mg L<sup>-1</sup> a los 100 y 300 μmol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabla 5.3).

**Tabla 5.3:** Velocidad de crecimiento ( $k$ , div d<sup>-1</sup>), tiempo de duplicación ( $T_d$ , h), densidad celular máxima (DCM, 10<sup>6</sup> cel mL<sup>-1</sup>), biomasa máxima (BM, mg L<sup>-1</sup>) y productividad de biomasa (PB, mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) de *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 a 25°C, 16:8 h L:O y a dos intensidades de luz (IL) de 100 y 300 μmol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Los valores expresados representan el promedio ± error estándar de tres réplicas. Valores seguidos de letras distintas en una misma columna son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

IL	$k$	$T_d$	DCM	BM	PB
100	0,45 ± 0,01 <sup>a</sup>	52	40,5 ± 0,8 <sup>a</sup>	680,0 ± 25,9 <sup>a</sup>	34,8 ± 2,5 <sup>a</sup>
300	0,85 ± 0,01 <sup>b</sup>	28	46,4 ± 0,8 <sup>b</sup>	660,0 ± 25,9 <sup>a</sup>	35,7 ± 2,5 <sup>a</sup>

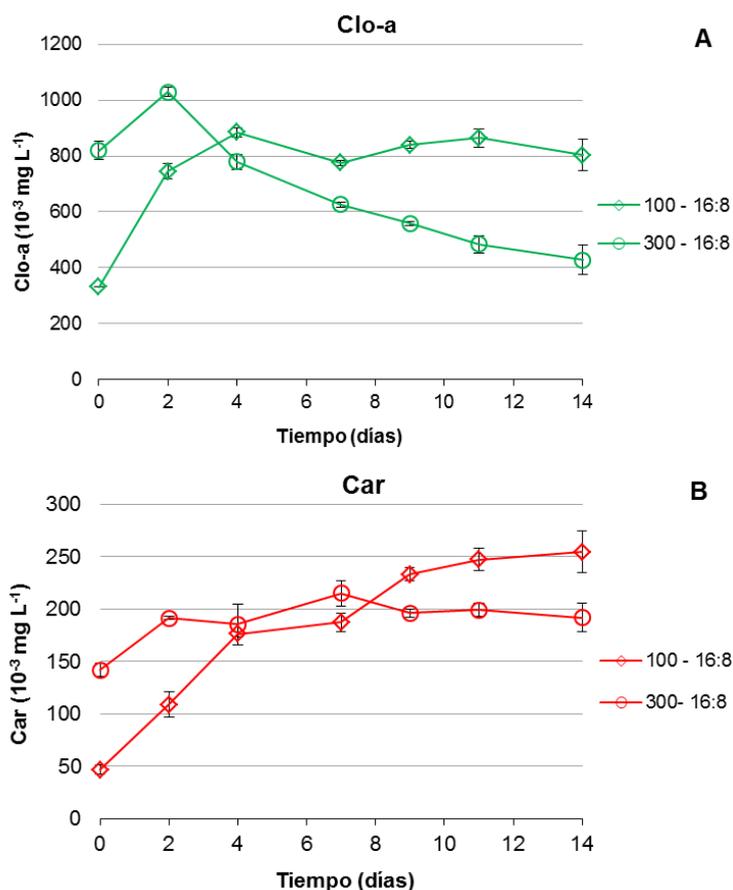


**Figura 5.8:** **A)** Curvas de crecimiento de *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 a 25°C, 16:8 h L:O y dos intensidades de luz, 100 y 300 μmol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. **B)** Cinética de biomasa (mg L<sup>-1</sup>). Los valores representan el promedio ± desvío estándar de tres réplicas.

La cinética del contenido de clorofila a y carotenoides totales a lo largo del periodo de cultivo se muestra en la Figura 5.9 A-B. A 300 μmol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, la

concentración de Clo-a incrementó hasta el día 2 (ca.  $1000 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$ ), luego su concentración disminuyó marcadamente hasta alcanzar ca.  $400 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$  el día 14 (Fig. 5.9 A). A  $100 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , la concentración de Clo-a incrementó durante los cuatro primeros días de cultivo y luego se estabilizó en un promedio de ca.  $800 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$  (Fig. 5.9 A).

Con respecto a la concentración de carotenoides totales (Fig. 5.9 B), se observó un incremento sostenido a lo largo de todo el periodo de cultivo, alcanzándose los valores más altos (ca.  $250 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$ ) a la menor intensidad de luz ( $p < 0,05$ ).



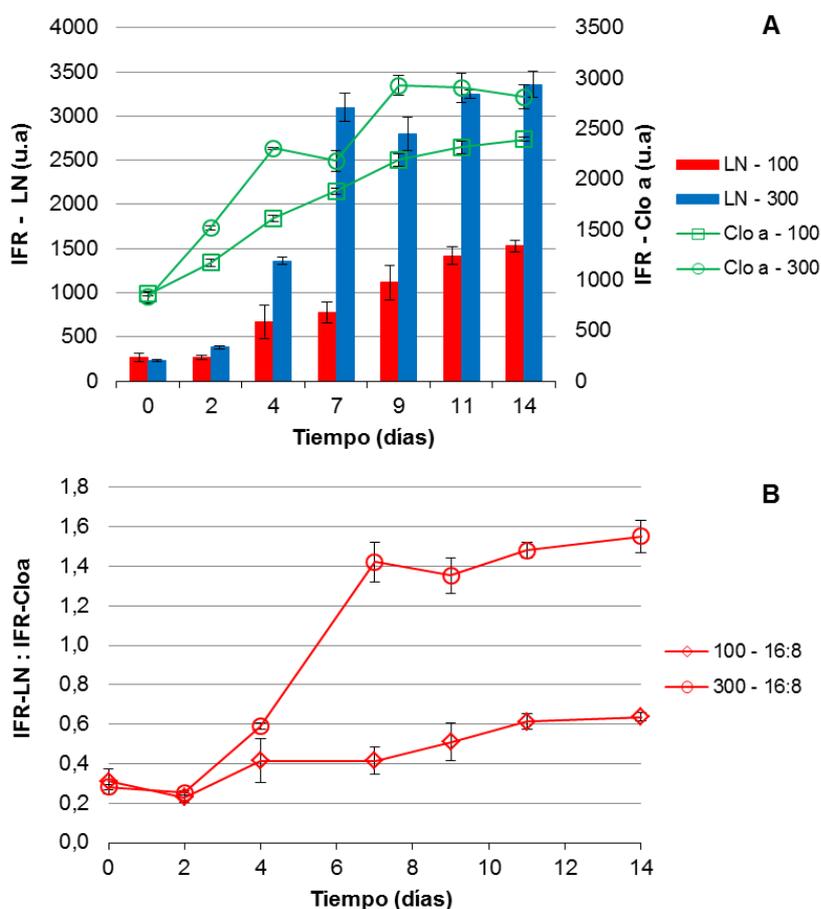
**Figura 5.9:** Cinética de pigmentos fotosintéticos de *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 a 25°C, 16:8 h L:O y dos intensidades de luz, 100 y 300  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . **A)** Contenido de clorofila a. **B)** Contenido de carotenoides totales. Los valores representan los promedios  $\pm$  desvío estándar de tres réplicas.

### Mediciones *in situ* por fluorimetría de lípidos neutros y de clorofila a

La cinética de acumulación de los lípidos neutros de *N. oceanica* CCALA 978 se observa en la Figura 5.10 A-B. Las IFR más altas se alcanzaron a 300  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Fig. 5.10 A). Se observó un aumento en la acumulación de lípidos neutros a

partir del día 4 a ambas intensidades de luz (Fig. 5.10 A). A partir del día 7 ( $300 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y del día 9 ( $100 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) no se hallaron diferencias significativas entre los valores de IFR, registrándose un incremento del contenido de lípidos neutros de 2,2 veces respecto del día 4.

En la Figura 5.10 B, se muestra el incremento de lípidos neutros expresado como la relación IFR-LN:IFR-Cloa. Se observó que a  $300 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , la relación alcanzó valores por encima de 1 el día 5 de cultivo, mientras que a  $100 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  la relación siempre se mantuvo por debajo de 1.



**Figura 5.10:** Acumulación de lípidos neutros en *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 a  $25^{\circ}\text{C}$ , 16:8 h L:O y dos intensidades de luz, 100 y  $300 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . **A)** Cinética de acumulación de lípidos neutros y de clorofila a expresadas como intensidad de fluorescencia relativa (IFR, u.a). **B)** Cinética de acumulación de lípidos neutros expresada como relación IFR-LN: IFR-Cloa. Los valores representan el promedio  $\pm$  desvío estándar de tres réplicas.

## Contenido de lípidos totales y de las fracciones lipídicas y productividad lipídica

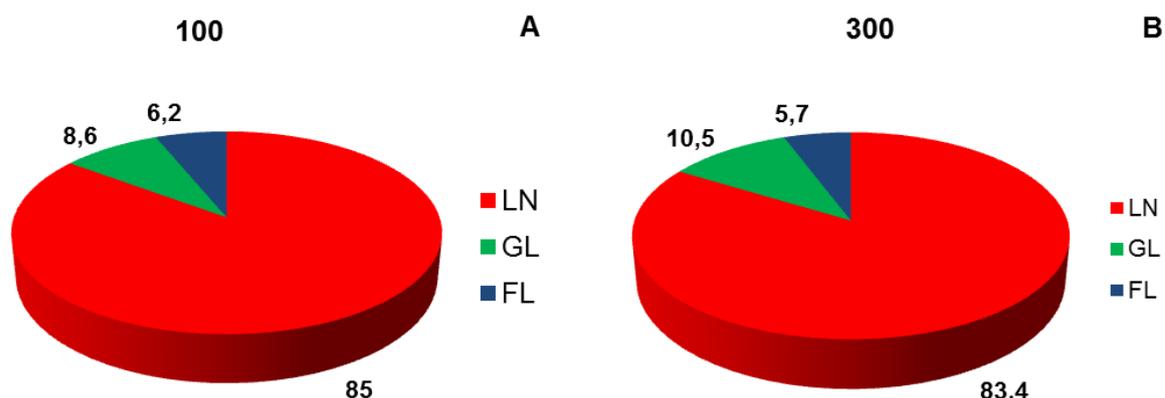
La Tabla 5.4 muestra el contenido de lípidos totales, de las fracciones lipídicas y de las productividades lipídicas de *N. oceanica* CCALA 978 a  $25^{\circ}\text{C}$ , 16:8 h

L:O y dos intensidades de luz (100 y 300  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). No se observó un incremento significativo ( $p>0,05$ ) del contenido de lípidos totales con el incremento de la intensidad de luz. La misma tendencia se registró en el contenido de lípidos neutros ( $p>0,05$ ), los cuales representaron un ca. 83-85% de los LT (Fig. 5.11 A-B). Tampoco se encontraron diferencias significativas ( $p<0,05$ ) en las productividades de LT y LN entre ambas intensidades de luz (Tabla 5.4)

Con respecto al contenido de glicolípidos y fosfolípidos, no se encontraron diferencias significativas entre las condiciones testeadas ( $p>0,05$ ), representando entre ca. 9-10% y ca. 6% de los LT, respectivamente (Fig. 5.11 A-B).

**Tabla 5.4:** Contenido de lípidos totales y de las fracciones lipídicas (expresado como porcentaje de peso seco, % ps) y productividades de lípidos totales y neutros ( $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) de *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978, a 25°C, 16:8 h L:O y dos intensidades de luz de 100 y 300  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Los valores representan el promedio de 3-4 réplicas  $\pm$  error estándar, para el contenido de lípidos totales, y el promedio de 2 réplicas  $\pm$  error estándar, para el contenido de las fracciones lipídicas (% ps). IL: intensidad lumínica; F: fotoperiodo; LT: lípidos totales; LN: lípidos neutros; GL: glicolípidos; FL: fosfolípidos. Valores seguidos de letras distintas en una misma columna son significativamente diferentes ( $p<0,05$ ).

IL	LT	Fracciones lipídicas			Productividad lipídica	
		LN	GL	FL	LT	LN
100	33,7 $\pm$ 1,95 <sup>a</sup>	28,6 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	2,9 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	2,2 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	45,9 $\pm$ 2,7 <sup>a</sup>	43,0 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>
300	30,9 $\pm$ 1,95 <sup>a</sup>	25,9 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	3,2 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	1,8 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	48,3 $\pm$ 2,7 <sup>a</sup>	40,9 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>



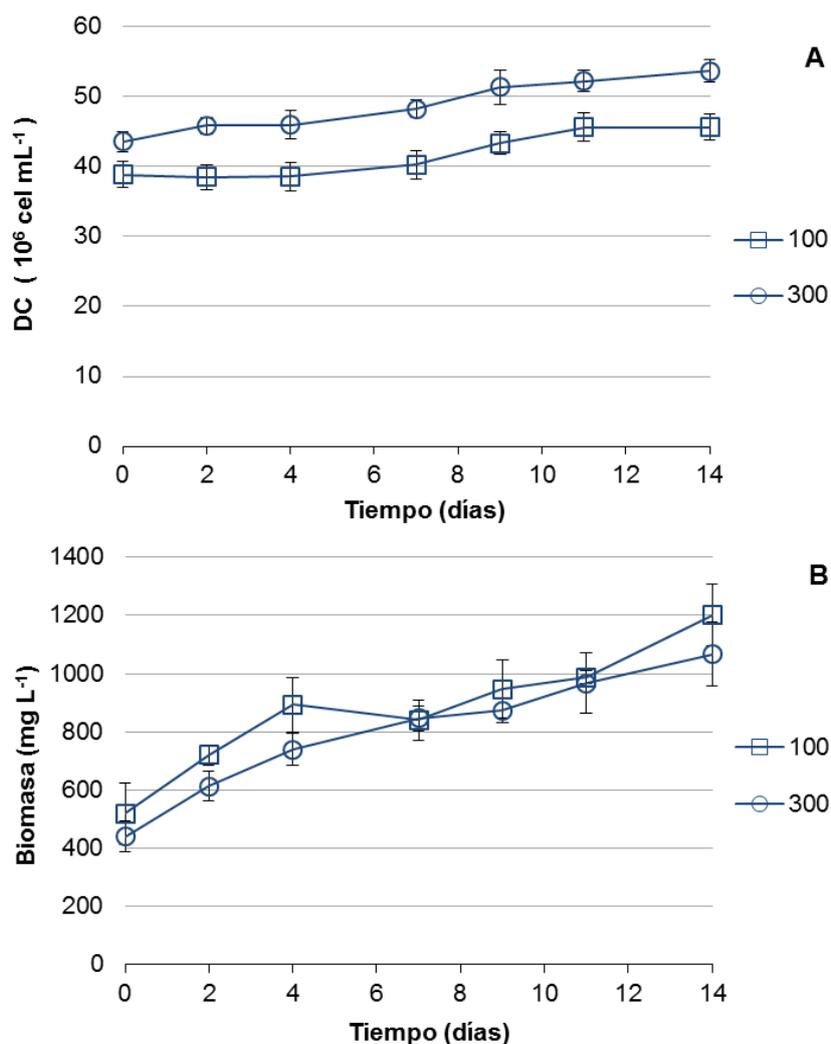
**Figura 5.11: A-B)** Proporciones relativas de las fracciones lipídicas (expresadas como % de lípidos totales) de *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 a dos intensidades lumínicas, 100 y 300  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . LN: lípidos neutros; GL: glicolípidos; FL: fosfolípidos.

### 5.4.1.3 Efecto de la carencia de nitrógeno y de la intensidad de luz

#### Velocidad de crecimiento, producción y productividad de biomasa y contenido de pigmentos fotosintéticos

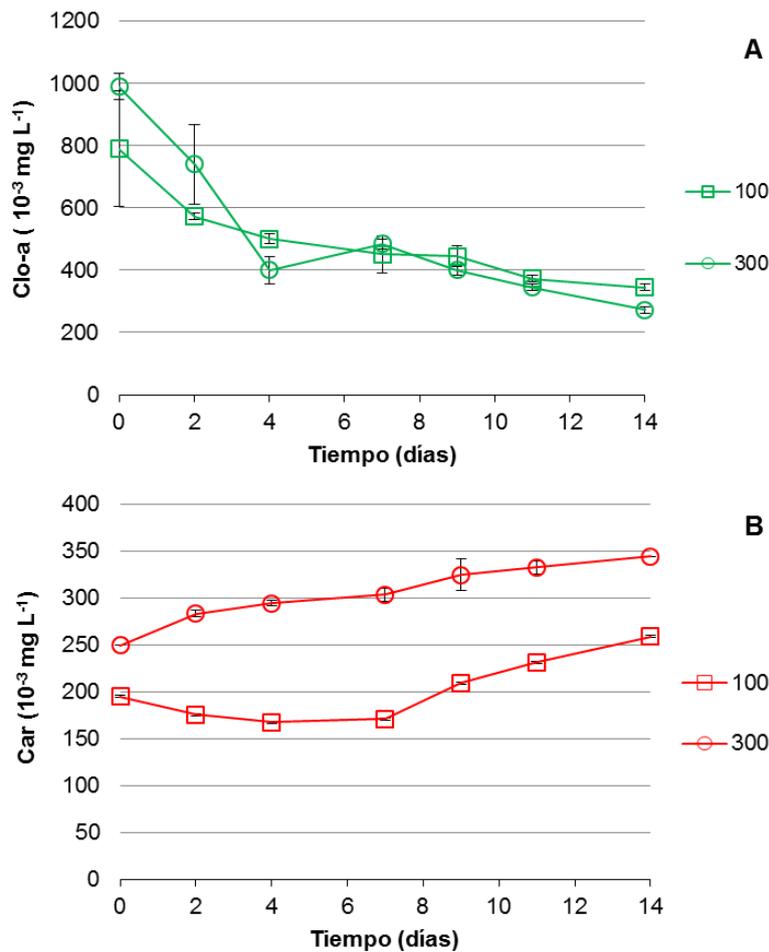
Con el objeto de incrementar el contenido de lípidos, cultivos de *N. oceanica* creciendo a 25°C, 16:8 h de L:O y a las dos intensidades de luz, 100 y 300  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ , se cosecharon los días 10 y 2 de la fase exponencial, respectivamente, y se resuspendieron en medio de cultivo f/2 carente de nitrógeno (N-).

En la Figura 5.12 A-B se observan las curvas de crecimiento y la cinética de biomasa obtenidas en cultivos de *N. oceanica* CCALA 978 creciendo en medio carente de nitrógeno a ambas intensidades de luz. Bajo condiciones de estrés, se observó un leve incremento de las densidades celulares a lo largo de todo el periodo de cultivo, a ambas intensidades de luz (Fig. 5.12A). En esta etapa se alcanzaron velocidades mínimas de crecimiento de ca. 0,02 y 0,035  $\text{div d}^{-1}$  a 100 y 300  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , respectivamente. Con respecto a la cinética de biomasa, se observó un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) a lo largo de toda la experiencia (Fig. 5.12 B), llegando a valores de producción de biomasa de ca. 1200 y 1000  $\text{mg L}^{-1}$  y de productividad de biomasa de 55,7 y 44,8  $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$  a 100 y 300  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , respectivamente.



**Figura 5.12: A)** Curvas de crecimiento de *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 creciendo a 25°C, 16:8 h L:O, bajo condiciones de estrés (N-) y dos intensidades de luz, 100 y 300  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . **B)** Cinética de biomasa ( $\text{mg mL}^{-1}$ ). Los valores representan el promedio de tres réplicas  $\pm$  desvío estándar.

Con respecto a la cinética del contenido de pigmentos fotosintéticos bajo condiciones de estrés, a ambas intensidades de luz se observó una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) del contenido de Clo-a, alcanzando valores de ca.  $350\text{-}370 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$  a 300 y  $100 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ , respectivamente (Fig. 5.13 A). El contenido de carotenoides totales, incrementó en ausencia de nitrógeno, alcanzando el valor más alto (ca.  $350 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$ ) a  $300 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Fig. 5.13 B).

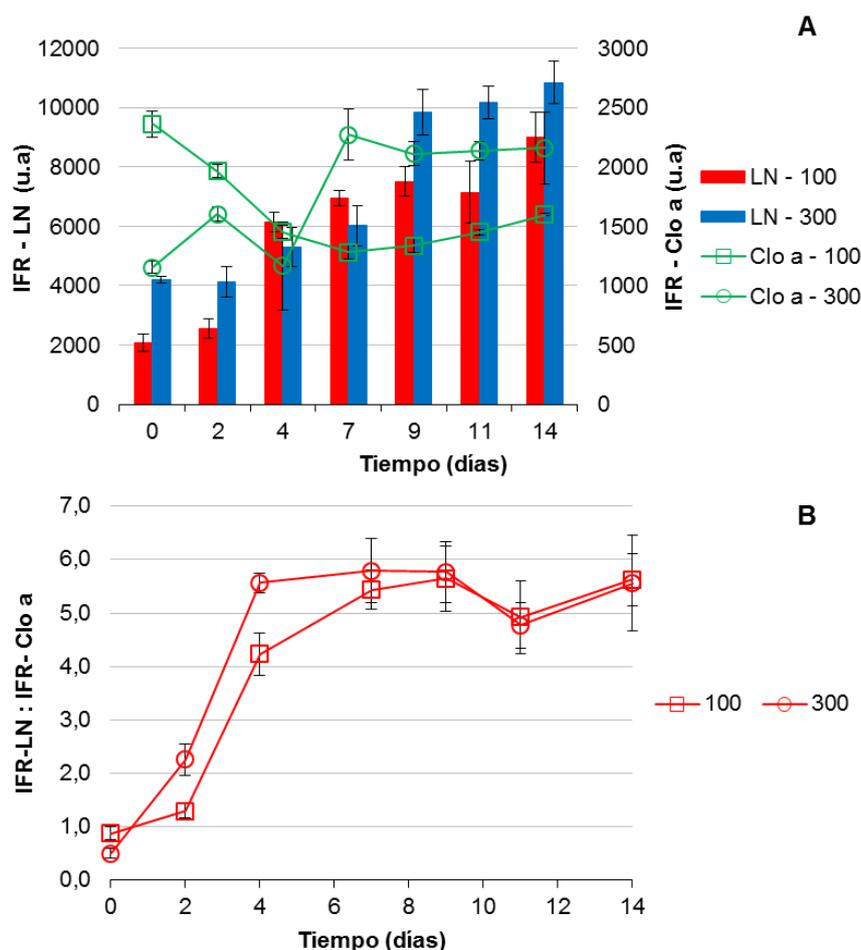


**Figura 5.13:** Cinética de pigmentos fotosintéticos de *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 creciendo a 25°C, 16:8 h L:O, bajo condiciones de estrés (N-) y dos intensidades de luz, 100 y 300  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . **A)** Contenido de clorofila a. **B)** Contenido de carotenoides totales. Los valores representan los promedios  $\pm$  desvío estándar de tres réplicas.

### Mediciones *in situ* por fluorimetría de los lípidos neutros y de la clorofila a

En la Figura 5.14 A-B se muestra la cinética de acumulación de lípidos neutros de *N. oceanica* CCALA 978 creciendo a 25°C, 16:8 h L:O, bajo condiciones de carencia de nitrógeno (N-) y dos intensidades de luz. Se observó un incremento significativo de la IFR (Fig. 5.14 A), registrándose un aumento de la acumulación de lípidos neutros a partir del día 2 hasta el día 9 en ambas intensidades de luz (Fig. 5.14 A).

La relación IFR-LN:IFR-Cloa incrementó significativamente entre los días 2 y 4, independientemente de las intensidades de luz, superando en ambos casos el valor 5 (Fig. 5.14 B).



**Figura 5.14:** Acumulación de lípidos neutros en *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 creciendo a 25°C, 16:8 h L:O, bajo condiciones de estrés (N-) y dos intensidades de luz, 100 y 300  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . **A)** Cinética de acumulación de LN expresada como IFR (u.a). **B)** Cinética de acumulación de LN expresada como relación IFR-LN: IFR-Clo a. Los valores representan el promedio  $\pm$  desvío estándar de tres réplicas.

### Contenido de lípidos totales y de las fracciones lipídicas y productividad lipídica

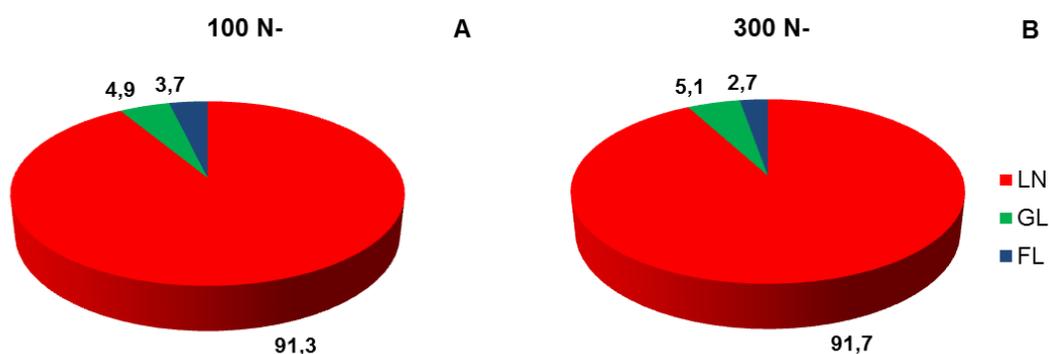
En cultivos carentes de nitrógeno el contenido de lípidos totales y lípidos neutros, incrementó significativamente ( $p < 0,05$ ) en relación con los cultivos con medio completo (N+), alcanzando valores de ca. 36% ps y ca. 33% ps, respectivamente (Tablas 5.4 y 5.5). Los lípidos neutros representaron un 92% de los lípidos totales en ambas intensidades (Fig. 5.15 A-B). Sin embargo, las productividades de lípidos totales y lípidos neutros no presentaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) con respecto a los cultivos N+ (Tablas 5.4 y 5.5). Bajo condiciones de estrés, la productividad de LT alcanzó valores de ca. 48 y 45  $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ , a 100 y 300  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , respectivamente (Tabla 5.5), mientras que en las

productividades de lípidos neutros los valores fueron de ca. 44 y 41 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, a 100 y 300 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabla 5.5).

Además, bajo carencia de nitrógeno, no se observaron diferencias significativas (p>0,05) en los contenidos de LT y LN entre ambas intensidades de luz. Con respecto al contenido de glicolípidos y fosfolípidos, tampoco se encontraron diferencias significativas entre las dos condiciones testeadas (p>0,05), representando ca. 5% y entre ca. 3-4% de los LT, respectivamente (Fig. 5.15 A-B).

**Tabla 5.5:** Contenidos (porcentaje de peso seco, % ps) y productividades (mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) de lípidos totales (LT) y neutros (LN) en *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 creciendo en medio de cultivo carente de nitrógeno y dos intensidades de luz, 100 y 300 μmol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Los valores representan el promedio de 3-4 réplicas ± error estándar, para el contenido y la productividad de LT, y el promedio de 2 réplicas ± error estándar, para el contenido y la productividad de LN. IL: intensidad de luz. Valores seguidos de letras distintas en una misma columna son significativamente diferentes (p<0,05).

IL	LT	LN	Productividad lipídica	
			LT	LN
100	35,7 ± 2,7 <sup>b</sup>	32,5 ± 0,8 <sup>b</sup>	48,0 ± 3,5 <sup>a</sup>	43,8 ± 1,0 <sup>a</sup>
300	36,2 ± 2,4 <sup>b</sup>	32,6 ± 0,8 <sup>b</sup>	45,1 ± 3,1 <sup>a</sup>	40,6 ± 1,0 <sup>a</sup>



**Figura 5.15: A-B)** Proporciones relativas de las fracciones lipídicas (% de lípidos totales) en *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 creciendo a 25°C, 16:8 h L:O, bajo condiciones de estrés (N-) y a dos intensidades de luz, 100 y 300 μmol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. LN: lípidos neutros; GL: glicolípidos; FL: fosfolípidos.

### 5.4.2 Efecto de las diferentes condiciones ambientales y la carencia de nitrógeno sobre la composición de los ácidos grasos en *N. oceanica* CCALA 978

Los contenidos de las distintas clases de ácidos grasos en los lípidos totales y los lípidos neutros de *N. oceanica* CCALA 978 creciendo bajo las condiciones de

cultivo indicadas en las Secciones 5.4.1.1 y 5.4.1.2 se observan en las Figuras 5.16 A-D y 5.17 A-B, respectivamente.

Los ácidos grasos saturados (AGS) y monoinsaturados (AGM), considerando ambos, representaron entre el 90 y 96% del total de los ácidos grasos en los lípidos totales y las fracciones de lípidos neutros, bajo todas las condiciones estudiadas.

Con el aumento de la temperatura (25°C) y de la cantidad de horas de luz (16:8 h L:O), se evidenció un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) del contenido de AGS en los lípidos totales (LT) y en la fracción de lípidos neutros (LN), con un valor máximo de ca. 47% a 25°C y 16:8 h L:O (Fig. 5.16 A-D). Al incrementar la intensidad de luz a 300  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  se observó un comportamiento similar de los AGS, tanto en LT como en LN, registrándose valores máximos de ca. 51% (Fig. 5.17 A-B).

Con respecto a los AGM, éstos constituyeron la fracción mayoritaria a 15°C (en ambos fotoperíodos) y a 25°C (fotoperíodo 12:12 L:O), tanto en los LT como en los LN (Fig. 5.16 A-D). En la fracción de LN se registró un incremento significativo de su contenido a 15°C en ambos fotoperíodos respecto de 25°C, alcanzando valores de ca. 55% (12:12 L:O) y ca. 53% (16:8 L:O) (Fig. 5.16 C-D). El incremento en la cantidad de horas de luz disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) el contenido de AGM-LN a ambas temperaturas (Fig. 5.16 C-D), mientras que la mayor intensidad de luz (300  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) causó una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) del contenido de AGM en los LT y LN (Fig. 5.17 A-B).

Por lo tanto, teniendo en cuenta las variables ambientales testeadas en las experiencias de cultivo, los contenidos de AGS-LN aumentaron, mientras que los contenidos de AGM-LN disminuyeron en función de las temperatura e intensidad lumínica más altas y con el fotoperíodo de 16:8 h L:O (Fig. 5.16 C-D y 5-17 B).

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGP) fueron la fracción minoritaria en todas las condiciones de cultivo testeadas, alcanzando un valor máximo en los LT de ca. 10% a 15°C y 12:12 h L:O (Fig. 5.16 A-B) y de ca. 9% a 100  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Fig. 5.17 A). El mayor contenido de AGP-LN (ca. 8%) se alcanzó a 25°C, 100  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y 16:8 h L:O (Fig. 5.16 D), sin mostrar un comportamiento claro en función de la temperatura y el fotoperíodo. Mientras que a 300  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , se observó una disminución del contenido de AGP en los LT y LN (Fig. 5.17 A-B).

Los principales ácidos grasos presentes en los lípidos totales y en la fracción de lípidos neutros de *N. oceanica* CCALA 978 creciendo en las condiciones de cultivo indicadas en las Secciones 5.4.1.1 y 5.4.1.2 se observan en las Figuras 5.16 E-H y 5.17 C-D, respectivamente.

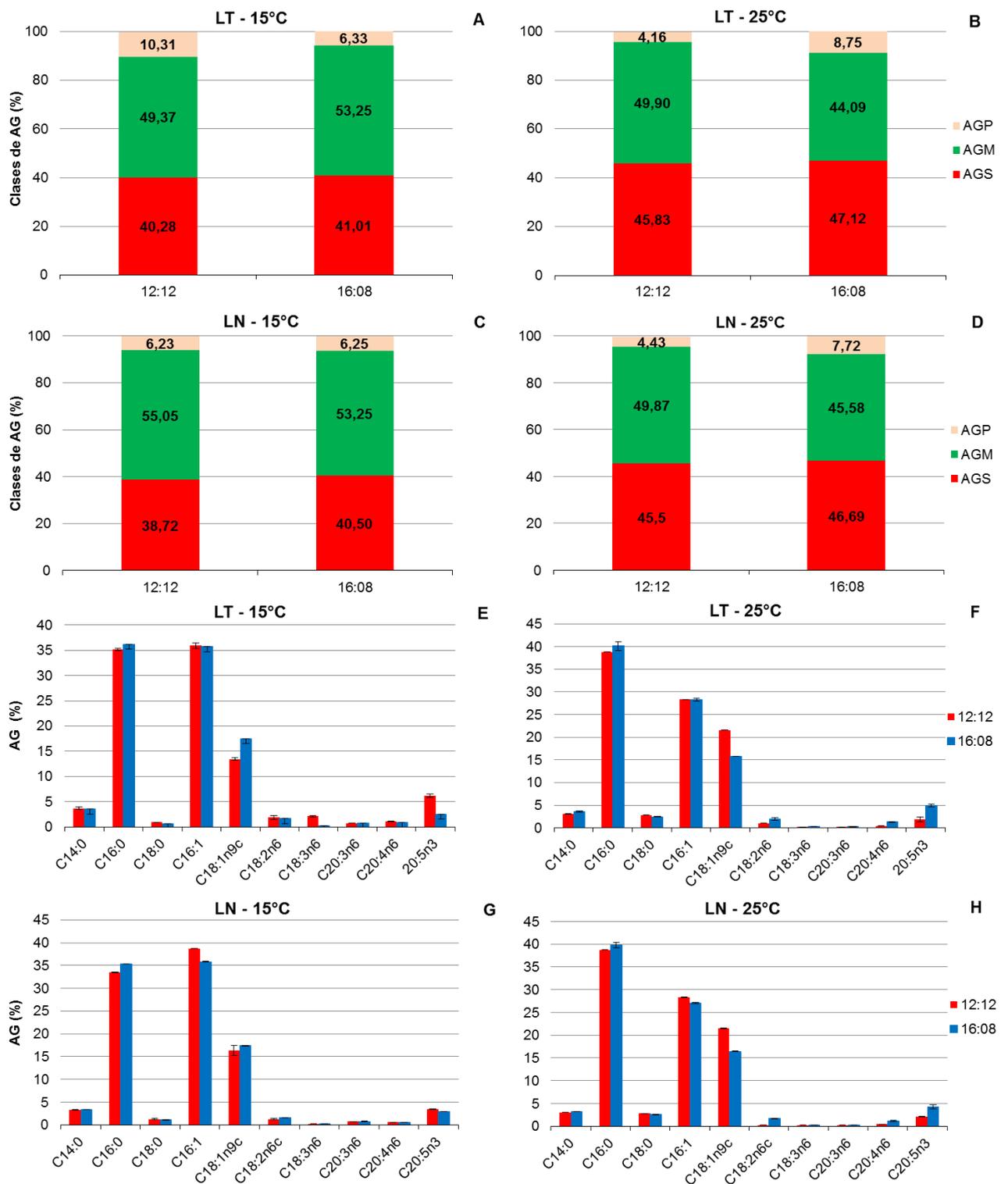
Los perfiles completos de los lípidos totales y de sus fracciones (lípidos neutros, glicolípidos y fosfolípidos) se presentan en las Tablas A5.1-A5.7 en el anexo al final del presente capítulo. Se identificaron un total de 15 ácidos grasos (AG) en los lípidos totales y en los lípidos neutros. Como se puede observar, la composición de los ácidos grasos fue similar en todas las condiciones de cultivo testeadas, tanto en los lípidos totales como en los lípidos neutros; siendo los ácidos grasos mayoritarios el palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), oleico (C18:1n9c) y eicosapentaenoico (C20:5n3).

El ácido palmítico (C16:0), componente mayoritario de los AGS, tanto en los LT como en los LN, incrementó de manera significativa ( $p < 0,05$ ) en función de la mayor temperatura, la mayor intensidad lumínica y la mayor duración de las horas de luz empleados. Los contenidos más altos de C16:0-LT y C16:0-LN (ca. 43%) se hallaron a  $300 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y 16:8 h L:O (Fig. 5.17 C-D). Los ácidos mirístico (C14:0) y esteárico (C18:0), componentes minoritarios de esta clase, se encontraron por debajo del 4 % en todas las condiciones ambientales testeadas (Fig. 5.16 E-H y 5.17 C-D).

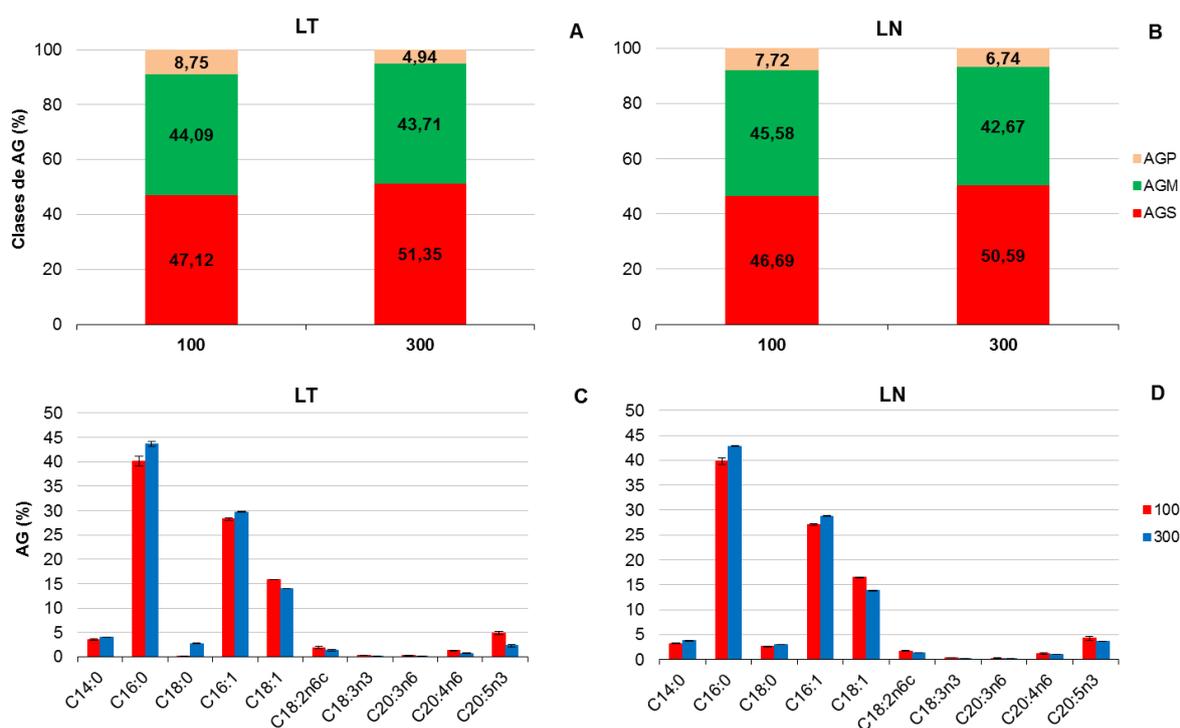
Dentro de los AGM, el ácido palmitoleico (C16:1) fue el más abundante en todas las condiciones de cultivo en los LT y LN. Se observó una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) del mismo con la temperatura más alta empleada y la mayor duración de las horas de luz (Fig. 5.16 E-H). Los valores más altos de C16:1 en los LN (ca. 38%) se alcanzaron a  $15^{\circ}\text{C}$  y 12:12 h de L:O (Fig. 5.16 G). El ácido oleico (C18:1n9c) fue el segundo AGM mayoritario tanto en los LT como en los LN, alcanzando valores de ca. 13-21% en LT y LN, observándose el mayor contenido (ca. 21%) en los LN a  $25^{\circ}\text{C}$  y 12:12 L:O (Fig. 5.16 H).

El ácido eicosapentaenoico (C20:5n3), fue el principal componente de los AGP en LT y LN (Fig. 5.16 E-H) no superando el 5% bajo las condiciones probadas. En la fracción de LN, su contenido disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) en respuesta a la mayor intensidad de luz utilizada ( $300 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (Fig. 5.17 D), mientras que su respuesta a la temperatura y al fotoperiodo no fue clara bajo las condiciones de cultivo empleadas.

En la Tabla 5.6, se puede observar a modo de resumen la respuesta de cada clase de AG y de los principales ácidos grasos a la temperatura, el fotoperiodo y la intensidad de luz.



**Figura 5.16:** Clases y principales ácidos grasos en *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 creciendo a  $100 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , dos temperaturas (15 y 25°C) y dos fotoperiodos (12:12 y 16:8 h de L:O). **A-D)** Clases de ácidos grasos en los lípidos totales y en los lípidos neutros. **E-H)** Principales ácidos grasos en los lípidos totales y en los lípidos neutros. Los valores representan los promedios  $\pm$  desvío estándar de 4 réplicas. AG: ácidos grasos; AGS: ácidos grasos saturados; AGM: ácidos grasos monoinsaturados; AGP: ácidos grasos poliinsaturados; LT: lípidos totales; LN: lípidos neutros.



**Figura 5.17:** Clases y principales ácidos grasos en *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 creciendo a 25°C, 16:8 h de L:O y dos intensidades de luz (100 y 300  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). **A-B)** Clases de ácidos grasos en los lípidos totales y en los lípidos neutros. **C-D)** Principales ácidos grasos en los lípidos totales y en los lípidos neutros. Los valores representan los promedios  $\pm$  desvío estándar de 4 réplicas. AG: ácidos grasos; AGS: ácidos grasos saturados; AGM: ácidos grasos monoinsaturados; AGP: ácidos grasos poliinsaturados; LT: lípidos totales; LN: lípidos neutros.

**Tabla 5.6:** Resumen de las tendencias de las clases de ácidos grasos y de los principales ácidos grasos en los lípidos totales y neutros bajo las condiciones de temperatura, fotoperiodo e intensidad de luz testeadas. LT: lípidos totales, LN: lípidos neutros; AG: ácidos grasos; AGS: ácidos grasos saturados; AGM: ácidos grasos monoinsaturados; AGP: ácidos grasos poliinsaturados. T: temperatura; F: fotoperiodo; I: intensidad de luz.

Clase AG	T más alta	F más largo	I más alta
AGS-LT	aumento	aumento	aumento
AGS-LN	aumento	aumento	aumento
AGM-LT	no claro	no claro	disminución
AGM-LN	disminución	disminución	disminución
AGP-LT	no claro	no claro	disminución
AGP-LN	no claro	aumento	disminución
<b>AG</b>			
C16:0-LT	aumento	aumento	aumento
C16:0-LN	aumento	aumento	aumento
C16:1-LT	disminución	disminución	aumento
C16:1-LN	disminución	disminución	Igual
C18:1-LT	no claro	no claro	disminución
C18:1-LN	no claro	no claro	disminución
C20:5n3-LT	no claro	no claro	disminución
C20:5n3-LN	no claro	no claro	disminución

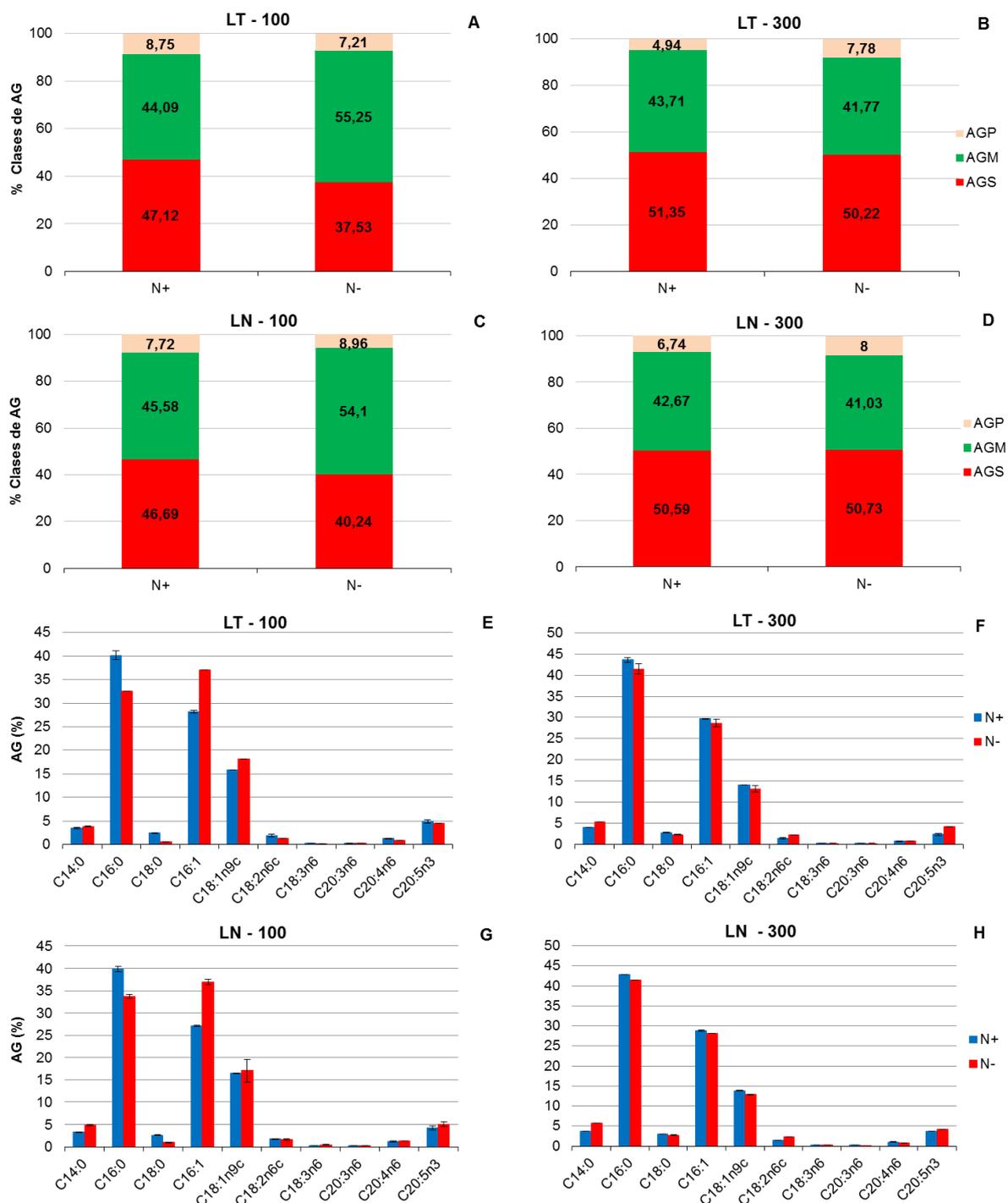
Las clases de ácidos grasos y los principales AG en los LT y LN de cultivos creciendo en medio completo (N+) y medio carente de nitrógeno (N-), se presentan en la Figura 5.18 A-H.

La composición de los ácidos grasos bajo condiciones de carencia de nitrógeno fue similar a la indicada para la condición N+, tanto en los lípidos totales como en los lípidos neutros, registrándose los mismos ácidos grasos mayoritarios: palmítico, palmitoleico, oleico y eicosapentaenoico (Fig. 5.18 E-H).

Los AGM fueron mayoritarios en los lípidos totales bajo condiciones de N- a  $100 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , alcanzando un ca. 55% (Fig. 5.18 A). El ácido palmitoleico fue el componente principal (ca. 37%) (Fig. 5.18 E). Sin embargo, a  $300 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , los AGS fueron los mayoritarios (ca. 50%) bajo carencia de nitrógeno (Fig. 5.18 B), representando el ácido palmítico un 41% (Fig. 5.18 F). Con respecto a los AGP, sus porcentajes fueron menores del 9% en todas las condiciones testeadas (Fig. 5.18 A-B) y disminuyeron significativamente ( $p < 0,05$ ) en respuesta a la carencia de nitrógeno a  $100 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Fig. 5.18 A-B). El ácido eicosapentaenoico fue el ácido graso poliinsaturado dominante (ca. 2-5%), en todas las condiciones (Fig. 5.18 E-F).

En los lípidos neutros, las clases de ácidos grasos mostraron una tendencia y composición similares a la observada en los LT. Bajo deprivación de nitrógeno, se observó una dominancia de AGS (ca. 50%) a  $300 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , siendo los AGM dominantes a  $100 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (ca. 54%) (Fig. 5.18 C-D). Dentro de esta fracción de lípidos neutros, los ácidos grasos de C-16 y C-18 representaron un 80-96 % del total de los ácidos grasos. El ácido palmítico (C16:0) fue el AGS mayoritario (ca. 33-43%) en todas las condiciones (Fig. 5.18 G-H). El porcentaje de este ácido aumentó con la mayor intensidad de luz, mientras que disminuyó con la deprivación de nitrógeno ( $p < 0,05$ ). El ácido palmitoleico (C16:1) fue el AGM mayoritario, con valores de ca. 28-37% a  $300$  y  $100 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , respectivamente, y su contenido aumentó con la carencia de nitrógeno a  $100 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Fig. 5.18 G). El porcentaje de AGP nunca excedió el 9% y estuvo principalmente representado por el EPA (C20:5n3) en todas las condiciones probadas (ca. 3,5-5%) (Fig. 5.18 G-H). Así, la combinación de la carencia de nitrógeno con un incremento de la intensidad de luz, producen una leve tendencia al aumento en los porcentajes de AGS y disminución del porcentaje de AGM. Además, la carencia de nitrógeno incrementa el porcentaje de AGP.

En la Tabla 5.7 se puede observar a manera de resumen la respuesta de las clases de AG y de los principales ácidos grasos a la deficiencia de nitrógeno y la intensidad de luz.



**Figura 5.18:** Clases y principales ácidos grasos en *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 creciendo en medio de cultivo completo (N+) y carente de nitrógeno (N-), a 25°C, 16:8 h L:O y dos intensidades de luz (100 y 300  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). **A-D)** Clases de ácidos grasos en los lípidos totales y en los lípidos neutros **E-H)** Principales ácidos grasos en los lípidos totales y en los lípidos neutros., Los valores representan los promedios  $\pm$  desvío estándar de 4 réplicas. AG: ácidos grasos; AGS: ácidos grasos saturados; AGM: ácidos grasos monoinsaturados; AGP: ácidos grasos poliinsaturados; LT: lípidos totales; LN: lípidos neutros.

**Tabla 5.7:** Resumen de las tendencias de las clases de ácidos grasos y de los principales ácidos grasos en los lípidos totales y neutros bajo la condición de carencia de nitrógeno. LT: lípidos totales, LN: lípidos neutros; AG: ácidos grasos; AGS: ácidos grasos saturados; AGM: ácidos grasos monoinsaturados; AGP: ácidos grasos poliinsaturados. T: temperatura; F: fotoperiodo; I: intensidad de luz

<b>Clase AG</b>	<b>Carencia de nitrógeno e intensidad de luz alta</b>
AGS-LT	no claro
AGS-LN	no claro
AGM-LT	no claro
AGM-LN	no claro
AGP-LT	no claro
AGP-LN	aumento
<b>AG</b>	
C16:0-LT	disminución
C16:0-LN	disminución
C16:1-LT	no claro
C16:1-LN	no claro
C18:1-LT	no claro
C18:1-LN	no claro
C20:5n3-LT	aumento
C20:5n3-LN	aumento

### 5.4.3 Calidad del biodiesel inferida a partir de la composición de los ácidos grasos de los aceites obtenidos

Las propiedades del biodiesel fueron inferidas a partir de la composición de los ácidos grasos de las fracciones de lípidos neutros (Tabla 5.8). Las mismas se encontraron dentro de los estándares europeos de biodiesel (EN 14214-14213). Los valores de índice de Yodo (ca. 42 – 54 g<sub>I<sub>2</sub></sub>/100g), se encontraron muy por debajo del límite máximo establecido de 120 g I<sub>2</sub>/100g. Con respecto al número de cetano, sus valores (ca. 60-64), estuvieron por encima de 51, el valor mínimo indicado por el estándar. Los porcentajes de ácido linoleico (ca 0,18 - 0,45%) se encontraron muy por debajo del máximo permitido (< 12%), mientras que los contenidos de AGP nunca sobrepasaron el 9%. Con respecto a los ácidos grasos con más de 4 dobles enlaces en su cadena hidrocarbonada, el porcentaje varió entre 1,7 y 6,3% bajo todas las condiciones evaluadas, por encima del valor máximo establecido por el estándar.

**Tabla 5.8:** Calidad del biodiesel inferida a partir de la composición de ácidos grasos de la fracción de lípidos neutros en *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 bajo las diferentes condiciones de cultivo. IY: índice de Yodo; NC: número de cetano; % AGP: porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados;  $\geq 4$  d.e: ácidos grasos poliinsaturados con 4 ó más dobles enlaces.

	IY	NC	% Ac linolénico	% AGP $\geq 4$ d.e
<i>N. oceanica</i> CCALA 978	42,4 - 54,0	60 - 64	0,18 – 0,45	1,7 – 6,3
Límites EN14213-14214	$\leq 120$	$\geq 51$	$\leq 12$	$\leq 1$

## 5.4 Discusión

### Crecimiento, producción y productividad de biomasa, contenido de lípidos y productividad lipídica en *N. oceanica* CCALA 978

Como se indicó en la introducción general, la velocidad de crecimiento, la producción y productividad de biomasa son parámetros que se deben tener en cuenta para evaluar la potencialidad de una determinada especie con fines bioenergéticos (Griffiths y Harrison 2009). En el presente estudio, las velocidades de crecimiento de *N. oceanica* CCALA 978 variaron entre 0,29 y 0,85 div d<sup>-1</sup>, incrementándose en función de la temperatura más alta, la mayor cantidad de horas de luz y la intensidad de luz más alta, verificando las hipótesis previamente establecidas. Estos valores se hallaron dentro del rango de las velocidades de crecimiento reportadas para diversas especies del género cultivadas en medio f/2 (0,03 - 0,81 div d<sup>-1</sup>), bajo diferentes condiciones y estrategias de cultivo (Sukenik *et al.* 1989; Converti *et al.* 2009; Huerlimann *et al.* 2010; Sforza *et al.* 2010; Pal *et al.* 2011; Griffiths *et al.* 2012). Al igual que en *N. oceanica* CCALA 978, las mayores velocidades de crecimiento en el género *Nannochloropsis* se han reportado, en general, a intensidades de luz alta (200-700  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), tanto bajo condiciones de fotoperíodo como de luz continua (Sukenik *et al.* 1989; Sforza *et al.* 2010; Pal *et al.* 2011). Una velocidad de crecimiento similar a la máxima reportada en *N. oceanica* CCALA 978 fue indicada por Pal *et al.* (2011) para la cepa *N. oceanica* CCALA 804 (0,81 div d<sup>-1</sup>). Sin embargo, en este caso, los cultivos estuvieron sometidos a una intensidad lumínica más alta (700  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) que la empleada en el presente estudio y luz continua.

Por otra parte, en *N. oceanica* CCALA 978 no se registraron diferencias en la producción de biomasa con respecto a las dos intensidades de luz empleadas, alcanzando valores máximos de (660-680 mg L<sup>-1</sup> a 25°C, 100 y 300  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y 16:8 L:O), mientras que tanto el incremento de la temperatura como de la duración de las horas de luz favorecieron la producción de biomasa. El mismo comportamiento se observó con la productividad de biomasa. Sin embargo, los valores de producción y productividad de biomasa fueron mucho más bajos que los indicados por Pal *et al.* (2011) para la cepa *N. oceanica* CCALA 804 (8,1 g L<sup>-1</sup> y 1,1 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, respectivamente), quienes la cultivaron bajo condiciones de luz continua. Es ampliamente conocido que los ciclos de luz/oscuridad en la mayoría de las especies conducen a tasas de crecimiento y rendimientos de biomasa más bajos, en comparación con los obtenidos con luz continua (Janssen *et al.* 2000). Teniendo en cuenta que en *N. oceanica* CCALA 978 a 300  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  se alcanzaron velocidades de crecimiento similares a las indicadas en *N. oceanica* CCALA 804, pero producciones y productividades de biomasa menores, se infiere que la intensidad de luz utilizada probablemente no haya sido suficiente para maximizar el rendimiento de biomasa con el fotoperíodo empleado en la cepa en estudio, proponiendo estudios a intensidad de luz mayores.

Hasta el momento, no se han indicado reportes acerca de la variación del crecimiento en función del fotoperíodo y de la temperatura en la especie *N. oceanica*. Converti *et al.* (2009) observaron un incremento de la velocidad de crecimiento en *N. oculata* en función de la temperatura (15 y 25°C), indicando valores mucho más bajos (0,06-0,13 div d<sup>-1</sup>) que los encontrados en *N. oceanica* CCALA 978 a las mismas temperaturas. Por su parte, Wahidin *et al.* (2013) encontraron en *Nannochloropsis* sp, a intensidades relativamente bajas (50/100  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) la velocidad de crecimiento se incrementa conforme aumenta la cantidad de horas de luz aplicadas, con valores que oscilaron entre 0,34 y 0,49 d<sup>-1</sup>. Así, en *N. oceanica* CCALA 978 se observó un incremento de la velocidad de crecimiento y de la producción y productividad de biomasa con la mayor temperatura empleada y la mayor cantidad de horas de luz, mientras que la intensidad de luz alta empleada sólo favoreció el crecimiento sin incremento de la producción de biomasa.

El contenido y la dinámica de los pigmentos fotosintéticos ofrecen información acerca del estado fisiológico de un cultivo microalgal (Serodio *et al.* 2009). Los mayores contenidos de clorofila *a* (Clo-*a*) en *N. oceanica* CCALA 978 se alcanzaron

a  $300 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  y un fotoperíodo de 16:8 h L:O. Sin embargo, bajo estas condiciones, la concentración de Clo-*a* declinó tempranamente, en coincidencia con el inicio de la fase estacionaria, mientras que a  $100 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  se mantuvo relativamente estable durante la fase estacionaria (tanto a  $25^\circ\text{C}$  como a  $15^\circ\text{C}$  y ambos fotoperíodos). Esta disminución sostenida de Clo-*a* a  $300 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , podría deberse a una fotoadaptación del aparato fotosintético frente a una intensidad de luz más alta. Un comportamiento similar ha sido previamente descrito en *Nannochloropsis* sp. por Fisher *et al.* (1998) y Sukenik *et al.* (1989). Ambos autores informaron que la fotoaclimatación de esta especie frente a intensidades lumínicas altas se lleva a cabo mediante la reorganización del aparato fotosintético y la disminución del contenido de clorofila *a*. En *N. oceanica* CCALA 978, los contenidos volumétricos estables de clorofila *a* durante la fase estacionaria indicarían que las células mantienen su capacidad fotosintética y de asimilación de fotosintatos, aún a la intensidad de luz más alta, donde se observó una disminución temprana de Clo-*a*, sin llegar a valores de cero. Pal *et al.* (2011) indicaron en *N. oceanica* CCALA 804 un comportamiento similar al observado en la cepa en estudio. Estos autores reportaron una disminución del contenido de clorofila *a* a la intensidad de luz más alta ( $700 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), mientras que a la intensidad de luz más baja ( $170 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), la concentración de Clo-*a* se mantuvo constante en la fase estacionaria. Además, informaron que los contenidos volumétricos de Clo-*a* a la intensidad de luz más alta fueron ligeramente menores que a la intensidad de luz más baja, pero se mantuvieron constantes a lo largo de la fase estacionaria, a diferencia del comportamiento observado en los contenidos volumétricos a la mayor intensidad lumínica en *N. oceanica* CCALA 978. Sin embargo, es importante recordar que los cultivos de *N. oceanica* CCALA 804 fueron sometidos a luz continua. Por otra parte, las tendencias del contenido volumétrico de Clo-*a* en *N. oceanica* CCALA 978 estuvieron acompañadas de un incremento sostenido de los carotenoides totales en todas las condiciones evaluadas. Desde el punto de vista fisiológico, los carotenos cumplen funciones de fotoprotección y su incremento en respuesta a la intensidad de luz más alta y un fotoperíodo de 16:8 h de L:O en *N. oceanica* CCALA 978, estaría relacionado con su rol antioxidativo y con la participación en la captura del exceso de luz (Solovchenko 2012).

Por otra parte, como se detalló anteriormente, el contenido de lípidos producidos por las microalgas es otro de los criterios a tener en cuenta en el

momento de seleccionar una especie como materia prima para la producción de biodiesel (Griffiths y Harrison 2009). En *N. oceanica* CCALA 978 el contenido de lípidos totales osciló entre ca. 24 y 34 % ps bajo las diferentes condiciones testeadas. Éstos valores pueden considerarse altos en comparación con los registrados en otras especies microalgales, pudiendo definirse a *N. oceanica* CCALA 978 como una cepa oleaginosa. Los contenidos de lípidos incrementaron en respuesta a la mayor cantidad de horas de luz (16:8 L:O), sin mostrar variaciones en respuesta al aumento de la intensidad de luz. Valores altos de lípidos totales también se han indicado para otras cepas de *N. oceanica*, creciendo en medio f/2 y con intensidades de luz relativamente bajas. Así, por ejemplo, Dong *et al.* (2013) reportaron ca. 37% ps de LT en *N. oceanica* IMET1 creciendo a  $100 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y un fotoperíodo de 14:10 h L:O, mientras que Xiao *et al.* (2013) informaron contenidos de LT más altos (ca. 45% ps) para la misma cepa creciendo a intensidad de luz más baja ( $59 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y luz continua, ambos en un mayor período de cultivo. El comportamiento de los LT en función de la intensidad de luz de *N. oceanica* CCALA 978 fue diferente del indicado por Pal *et al.* (2011) y Sukenik *et al.* (1989) quienes reportaron un aumento de lípidos como resultado del incremento de la intensidad de luz en *N. oceanica* CCALA 804 (creciendo a 170 y  $700 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y luz continua) y en *Nannochloropsis* sp. (creciendo a 35, 290 y  $590 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y un fotoperíodo de 12:12 h L:O), respectivamente. Teniendo en cuenta esta disparidad de resultados en relación a la intensidad de luz y el contenido de lípidos, nuevas experiencias de cultivo con intensidades lumínicas mayores de  $300 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  deberían realizarse en *N. oceanica* CCALA 978 para poder arribar a una conclusión acerca de este aspecto. Adicionalmente, es importante destacar que se descarta el uso de luz continua, empleada en la mayoría de los estudios de las diferentes especies *Nannochloropsis*, por tratarse de una situación poco realista desde el punto de vista de cultivos a gran escala. Por otra parte, el efecto de la variación del fotoperíodo y la temperatura sobre el contenido de lípidos no ha sido informado hasta el momento en otras cepas de *N. oceanica*, mientras que Converti *et al.* (2009) observaron en *N. oculata* un aumento del contenido de lípidos totales conforme la temperatura incrementó de 15 a 25°C. Los resultados indicados por estos autores no coinciden con los obtenidos en la cepa en estudio, donde los contenidos de LT no mostraron variaciones en respuesta al aumento de las mismas temperaturas (15 y 25°C). Adicionalmente, Wahidin *et al.* (2013) estudiaron la influencia del fotoperíodo y la intensidad de la luz sobre el crecimiento y la

producción de lípidos en *Nannochloropsis* sp. y encontraron que los máximos valores de lípidos totales (ca. 30% ps) se alcanzaron bajo condiciones ambientales similares (23°C, 100  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y 18:6 h L:O) a las empleadas en este estudio. Además, estos autores encontraron una correlación directa entre las máximas velocidades de crecimiento y los valores máximos de lípidos totales, comportamiento no observado en *N. oceanica* CCALA 978.

Con respecto al contenido de lípidos neutros en *N. oceanica* CCALA 978, éstos fueron la fracción mayoritaria bajo las condiciones testeadas, superando el 80% en todos los casos. Al igual que los lípidos totales, incrementaron en función de la mayor cantidad de horas de luz, sin mostrar variaciones en función de la intensidad de luz y la temperatura empleadas. Es importante resaltar que el valor más alto obtenido (ca. 28,6 % ps) fue mucho mayor que el indicado para otra cepa de *N. oceanica* IMET1 (ca. 15% ps) creciendo con medio f/2, a una intensidad lumínica de 59  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y luz continua, representando en este caso sólo un 31,4 % de los LT (Xiao *et al.* 2013). Las variaciones en los contenidos de lípidos neutros en respuesta a la temperatura, el fotoperiodo y a la intensidad de luz no han sido informadas hasta el momento para otras cepas de *N. oceanica*. Por su parte, Sukenik *et al.* (1989) indicaron en *Nannochloropsis* sp. creciendo con un fotoperíodo de 12:12 h L:O, que conforme se incrementó la intensidad de luz (35, 290 y 590  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), el porcentaje de carbono asimilado que derivó a la síntesis de triglicéridos aumentó de 36 a 50%, sin informar contenidos de TAG. Teniendo en cuenta todos estos resultados, se podría inferir que la intensidad de luz de 300  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  empleada en *N. oceanica* CCALA 978, no ha sido suficientemente elevada como para maximizar el contenido de TAG, destacando la necesidad de evaluar el comportamiento de esta fracción lipídica en respuesta a intensidades de luz más elevadas.

De acuerdo a Klok *et al.* (2014), desde el punto de vista fisiológico, se pueden postular tres hipótesis con respecto a la síntesis de TAG y su acumulación frente a condiciones adversas, como la alta temperatura, la alta intensidad de luz y la privación de nitrógeno: 1) la síntesis de TAG permitiría capturar energía y carbono en forma continua, los cuales podrían ser usados cuando las condiciones favorables son reestablecidas; 2) la síntesis de TAG funcionaría como un “sumidero” de electrones, ya que las microalgas bajo condiciones adversas se enfrentan a un exceso de NADPH que en condiciones normales sería empleado para el crecimiento celular; y 3) los cuerpos lipídicos donde se acumulan los TAG funcionarían como un

depósito temporario de compuestos de los plástidos, almacenándolos cuando el tamaño y la estructura de los cloroplastos se reducen.

En relación a la dinámica de la acumulación de lípidos neutros observada a partir de la IFR en *N. oceanica* CCALA 978, se detectaron señales de fluorescencia de LN relativamente bajas durante los días iniciales de cultivo, características de la fase exponencial, es decir en células en activo crecimiento (Sforza *et al.* 2010; Simionato *et al.* 2011), mientras que durante la fase estacionaria la IFR de lípidos neutros incrementó. Sin embargo, el inicio de la acumulación de lípidos neutros fue diferente a las temperaturas e intensidades lumínicas evaluadas. A 15°C (ambos fotoperiodos), la acumulación de LN comenzó a partir del día 7 de cultivo extendiéndose hasta el día 14, mientras que a 25°C (ambos fotoperiodos) el período de acumulación fue menor, iniciándose el día 4. De acuerdo con estos resultados, se puede inferir que las células de *N. oceanica* CCALA 978 a bajas temperaturas necesitarían un periodo más prolongado de tiempo para comenzar a acumular lípidos, mientras que la temperatura más alta actuaría como un inductor temprano de la acumulación de lípidos. Con respecto al fotoperiodo, la tendencia del índice fue la misma para ambas temperaturas, indicando que, al menos en las condiciones testeadas, no tuvo efecto sobre el tiempo de acumulación. Cuando se evaluó el efecto de la intensidad de luz, se observó que tanto a 100 como a 300  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , los lípidos neutros se acumularon a partir del día 4. Sin embargo, las células cultivadas a la intensidad más baja continuaron acumulando lípidos por más días (hasta el día 9 de cultivo), al igual que lo observado por Simionato *et al.* (2011) en *Nannochloropsis gaditana* quienes indicaron, a partir de valores gravimétricos y lecturas de intensidad de fluorescencia, que el incremento de la intensidad de luz *per se* no causa un aumento del contenido de lípidos, sino que ocasiona un período de acumulación más acotado.

Si bien los mayores contenidos gravimétricos de LN se alcanzaron a 25°C, 100  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y 16:8 h L:O, la relación IFR-LN:IFR-Cloa se mantuvo por debajo de 1 a lo largo de todo el periodo de cultivo, aún cuando la IFR-LN mostró un incremento evidente (comportamiento también observado a 15°C). Esto se debió a que los valores de IFR de Clo-a, en las condiciones de cultivo empleadas, fueron más altos y se incrementaron al mismo ritmo que los valores de IFR-LN. Este fenómeno también ha sido descrito y estudiado por Solomon *et al.* (1986) en *Nannochloropsis salina*. Además, el incremento de la IFR de la clorofila *a* en *N. oceanica* CCALA 978 fue congruente con el aumento de los contenidos volumétricos

de Clo-a, demostrando su capacidad fotosintética y que las células aún podían continuar destinando los fotosintatos asimilados a la acumulación de lípidos. Por el contrario, cuando se analizó el efecto del incremento de la intensidad de luz, si bien la IFR-Clo-a a  $300 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  aumentó durante los días iniciales de cultivo, ésta presentó valores más bajos que la IFR-LN, causando el incremento de la relación IFR-LN:IFR-Cloa por encima de 1 desde los días iniciales de cultivo.

Otro de los criterios evaluados fueron las productividades de lípidos totales y lípidos neutros. La productividad de lípidos es un indicador importante de la potencialidad de una determinada especie como materia prima para la producción de biodiesel (Griffiths y Harrison 2009) y depende directamente de los contenidos de biomasa, de lípidos y del tiempo de acumulación de éstos últimos. Diferentes mecanismos conducen a una productividad lipídica alta en las microalgas, los cuales son característicos de cada cepa o especie en particular. Por ejemplo, puede darse por combinación de biomasa alta con contenidos relativamente bajos de lípidos o baja producción de biomasa con contenidos lipídicos altos, siempre acumulados en un período relativamente corto de tiempo (Griffiths *et al.* 2012). El género *Nannochloropsis* ha mostrado un amplio rango de productividades lipídicas, que varían entre 38 y  $410 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , bajo diversas condiciones y estrategias de cultivo (Mata *et al.* 2011; Pal *et al.* 2011). En *N. oceanica* CCALA 978, los valores más altos de productividad de lípidos totales (ca. 46 y  $48 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), se registraron a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , un fotoperíodo de 16:8 h de L:O, sin mostrar diferencias significativas en respuesta al aumento de la intensidad de luz. Estos valores fueron mucho más bajos que el reportado por Pal *et al.* (2011) para *N. oceanica* CCALA 804 ( $410 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) cultivada a mayor intensidad lumínica ( $700 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) y con luz continua. No obstante, como se ha mencionado anteriormente, la luz continua representa una condición poco realista desde los puntos de vista funcional y económico en cultivos con fines bioenergéticos. En *N. oceanica* CCALA 978 el incremento en la productividad de LT se debió al incremento de la biomasa en función de la temperatura y el fotoperíodo, y al menor tiempo de acumulación de lípidos, ya que los contenidos de lípidos totales no mostraron variación en respuesta a estas variables.

Hasta el momento no se han indicado productividades de lípidos neutros en otras cepas de *N. oceanica* creciendo con medio f/2 completo. Sin embargo, el conocimiento de este parámetro resulta de fundamental importancia, ya que los

lípidos neutros constituyen la materia prima ideal para la obtención de biodiesel por transesterificación (Hu *et al.* 2008). Los mayores valores de productividad de LN en *N. oceanica* CCALA 978 fueron de ca. 42-43 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, y se obtuvieron bajo las mismas condiciones indicadas para los valores más altos de productividad de lípidos totales.

Con el objeto de incrementar la acumulación de lípidos, se evaluó en última instancia el efecto de la carencia súbita de nitrógeno sobre los contenidos de biomasa y lípidos y la productividad de lípidos. La deprivación de nitrógeno es una de las estrategias usualmente empleada para inducir la acumulación de lípidos y ha sido propuesta por Leu y Boussiba (2014) para la explotación biotecnológica a gran escala de algunas especies de *Nannochloropsis*. La deficiencia de nitrógeno generalmente causa una disminución o paralización del crecimiento celular y, por lo tanto, de la producción de biomasa en las microalgas (Sukenic *et al.* 1989). En *N. oceanica* CCALA 978, en cultivos carentes de nitrógeno, no se evidenció una fase de crecimiento exponencial bajo las dos intensidades lumínicas empleadas, registrándose los menores valores de velocidades de crecimiento. Sin embargo, se registró un incremento en la producción y productividad de biomasa con respecto a la etapa de crecimiento en medio f/2 completo (N+). Este incremento en la producción de biomasa podría estar relacionado en parte con el aumento de tamaño celular registrado en *N. oceanica* CCALA 978 en fase estacionaria (para mayores detalles ver Sección 3.3.1, capítulo 3). Además, este incremento en la biomasa también podría atribuirse a la capacidad que poseen algunas cepas de emplear el nitrógeno almacenado intracelularmente (Pal *et al.* 2011; Solovchenko *et al.* 2014). Estos autores indicaron que las células de *Nannochloropsis* fueron capaces de dividirse al menos una vez en ausencia de nitrógeno y relacionaron el incremento de biomasa con un aumento en la cantidad de lípidos. Así, un leve aumento de la densidad celular fue registrado bajo estrés de nitrógeno en *N. oceanica* CCALA 978. Además, es importante destacar que, en *N. oceanica* CCALA 978 los niveles de clorofila *a* nunca alcanzaron el valor cero en la experiencia realizada con carencia de nitrógeno, indicando capacidad fotosintética, al igual que lo observado por Dong *et al.* (2013) en *N. oceanica* IMET1, cultivada bajo deprivación progresiva de nitrógeno.

En cultivos con carencia de nitrógeno, se observó la mayor acumulación de carotenos totales (ca. 250-300 µg mL<sup>-1</sup>) en *N. oceanica* CCALA 978 a ambas intensidades de luz, soportando así las hipótesis indicada por Solovchenko *et al.*

(2011, 2014) en *N. oceanica* CCALA 804. Estos autores asociaron la dinámica simultánea de disminución de la clorofila *a* y el aumento de carotenoides totales con la acumulación de lípidos. Ya que la fotosíntesis continuó llevándose a cabo en *N. oceanica* CCALA 978, aún bajo carencia de nitrógeno, de acuerdo con los contenidos volumétricos de Clo-*a*, puede sugerirse que la acumulación de lípidos ocurriría *de novo*, es decir a partir del nuevo carbono asimilado y redireccionada hacia la biosíntesis, como ha sido indicado por Dong *et al.* (2013) en *N. oceanica* IMET1, bajo deprivación progresiva de nitrógeno.

Tanto el contenido de lípidos totales como de lípidos neutros en *N. oceanica* CCALA 978 incrementaron significativamente durante la carencia de nitrógeno, alcanzando valores máximos, de ca. 36% ps (LT) y ca. 32 % ps (LN), independientemente de las intensidades de luz empleadas. Es decir, que en *N. oceanica* CCALA 978 la combinación de carencia de nitrógeno e incremento de la intensidad de luz no tuvo un efecto de potenciar la acumulación de lípidos. Xiao *et al.* (2013) reportaron en *N. oceanica* IMET1 contenidos de LT y LN de hasta ca. 69 y 48 % ps, respectivamente en cultivos con deficiencia progresiva de nitrógeno. Sin embargo, estos valores fueron obtenidos en un periodo de tiempo más prolongado (23 días de cultivo) y con luz continua.

En *N. oceanica* CCALA 978 la acumulación de lípidos neutros se evidenció claramente por el incremento de la relación IFR-LN:IFR-Cloa a ambas intensidades de luz, donde el índice estuvo por encima de 1 desde el día 2 de cultivo. La IFR-Cloa, si bien incrementó, lo hizo en menor medida que los lípidos neutros, aún cuando los contenidos volumétricos de Clo-*a* disminuyeron sostenidamente durante la etapa de carencia de nitrógeno. Además, la acumulación se evidenció fuertemente en los primeros 4 días de carencia de nitrógeno, sin que el incremento de intensidad de luz causara acumulación más temprana de LN. Este comportamiento fue congruente con las tendencias observadas en los valores gravimétricos bajo estas condiciones.

Con respecto a las productividades de LT y LN, no se observó un incremento de las mismas durante la carencia de nitrógeno en relación con los valores alcanzados en cultivos N+. Xiao *et al.* (2013) no mencionan valores de productividad en la cepa *N. oceanica* IMET1. Sin embargo, Pal *et al.* (2011) reportaron valores máximos de productividad de lípidos totales de 360 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> en *N. oceanica* CCALA 804 en cultivos con carencia súbita de nitrógeno, trabajando bajo condiciones de luz continua y 700 μmol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

## Composición de ácidos grasos en *N. oceanica* CCALA 978 bajo diferentes condiciones de cultivo

La calidad de los ácidos grasos de la fracción neutra, es decir, la longitud de sus cadenas, el grado de insaturación y las proporciones de las clases de ácidos grasos, determinarán la calidad del biodiesel a obtener (Griffiths y Harrison 2009; Knothe 2005).

Hasta el momento, la información disponible acerca de la composición de ácidos grasos para las diferentes especies del género *Nannochloropsis* está focalizada en su gran mayoría en los lípidos totales, encontrándose poca información respecto de la composición detallada de lípidos neutros. Autores como Sukenik *et al.* (1989), Pal *et al.* (2011,2013), Bondioli *et al.* (2012), Simionato *et al.* (2013) y Xiao *et al.* (2013) abordan de manera somera la composición de esta fracción bajo diferentes condiciones de cultivo.

En *N. oceanica* CCALA 978 los perfiles de ácidos grasos fueron similares bajo todas las condiciones de cultivo evaluadas. Éstos fueron consistentes con los reportados para otras cepas de *N. oceanica* (Pal *et al.* 2011; Dong *et al.* 2013; Xiao *et al.* 2013) y para otras especies de *Nannochloropsis* (Sukenik *et al.* 1989; Renaud *et al.* 1991; James *et al.* 1995; Zuchova y Aizdaicher 1995; Rodolfi *et al.* 2009; Bondioli *et al.* 2012). Además, en *N. oceanica* CCALA 978 las proporciones y contenidos de las clases de ácidos grasos de los lípidos neutros (LN) y su composición mostraron una tendencia similar a la de los lípidos totales (LT), siendo los ácidos palmítico, palmitoleico, oleico y eicosapentaenoico (EPA) los ácidos grasos mayoritarios en las distintas clases. Esto se debe a que bajo las condiciones estudiadas, los LN representaron casi la totalidad de los LT.

En líneas generales, se ha indicado que en el género *Nannochloropsis* el grado de insaturación de los ácidos grasos en los lípidos totales decrece con el incremento de la intensidad de luz (Sukenik *et al.* 1989; Pal *et al.* 2011), el incremento de la temperatura (Van Wageningen *et al.* 2012) y la deficiencia progresiva (Xiao *et al.* 2013) y súbita de nitrógeno (Simionato *et al.* 2013). En *N. oceanica* CCALA 978 se observó un comportamiento similar del grado de insaturación de ácidos grasos, tanto en los lípidos totales como en los lípidos neutros, en respuesta a las variables ambientales, mientras que las tendencias observadas durante la carencia de nitrógeno no fueron claras.

Con respecto a la intensidad de luz, Sukenik *et al* (1989) (en LT) y Pal *et al.* (2011) (en LT) indicaron que cuando las células de *Nannochloropsis* crecen a intensidades de luz menores de 200  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , presentan contenidos más altos de AGP, mientras que las intensidades de luz mayores causan la tendencia opuesta, es decir, cantidades más altas de AGS y AGM. En *N. oceanica* CCALA 978 el contenido de AGS (tanto en los LT como en los LN) aumentó en respuesta a la intensidad de luz más alta, en coincidencia con los resultados indicados por Sukenik *et al.* (1989) y Pal *et al.* (2011) y presentó porcentajes similares a los indicados por Pal *et al.* (2011) en *N. oceanica* CCALA 804. Además, el ácido palmítico, principal componente de esta clase tanto en LT y LN, presentó el mismo comportamiento. Así, bajo una condición de estrés, como la intensidad de luz moderada-alta, las cepas de *N. oceanica* CCALA 978 fueron capaces de acumular aproximadamente el 40-50% de los ácidos grasos totales como saturados. Por su parte, el incremento en el contenido de AGS estuvo acompañado por la disminución de los AGM (tanto en LN como en LT) en función de la intensidad de luz más alta, contrario a lo reportado por Sukenik *et al.* (1989) y Pal *et al.* (2011). El patrón descrito por Sukenik *et al.* (1989) en *Nannochloropsis* sp. (590  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) y por Pal *et al.* (2011) para *N. oceanica* CCALA 804 (700  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) indicó un incremento de los AGM en función de las intensidades de luz más altas. Mientras que el ácido palmitoleico, su principal componente, siguió la misma tendencia que su clase en *N. oceanica* CCALA 978.

Adicionalmente, a las dos intensidades de luz empleadas en este estudio, los AGP (tanto en LT como en LN) fueron las clases minoritarias, alcanzando porcentajes de ca. 4-10%. Estos valores fueron más bajos que los reportados por Pal *et al.* (2011) para *N. oceanica* CCALA 804 (ca. 15-23 % de AGP-LT, a 170 y 700  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  y luz continua) y por Sukenik *et al.* (1989) para *Nannochloropsis* sp. (ca. 40% en LT y ca. 15% en LN, 590  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , 12:12 h L:O). Con respecto al EPA, su contenido en *N. oceanica* CCALA 978 no superó el ca. 5%, similar al indicado por Sukenik *et al.* (1989) y mucho más bajo que el reportado por Pal *et al.* (2011) para *N. oceanica* CCALA 804 (ca. 11-18%). Por lo tanto, de acuerdo con la información obtenida, se concluye que es necesario analizar el efecto de la intensidad de luz sobre la composición de los ácidos grasos para cada especie y/o cepa en particular.

Sukenik (1999) ha indicado en *Nannochloropsis* sp. que el incremento en la cantidad de ácidos grasos de cadena corta, como los C-16 o C-18, está asociado

con la formación de TAG en respuesta a distintos tipos de estrés. Por su parte, Pal *et al.* (2013) reportaron en *N. oceanica* CCALA 804 una disminución del contenido de EPA a altas intensidades de luz, con un incremento del palmitato y oleato, reflejando la acumulación de TAG. En *N. oceanica* CCALA 978, el incremento de los ácidos palmítico y palmitoleico, con la concomitante disminución de EPA, en respuesta a la alta intensidad lumínica y a la mayor duración de las horas de luz fue congruente con el aumento de lípidos neutros, reforzando así lo propuesto por Sukenik (1999).

Con respecto al efecto de la temperatura sobre la composición de los ácidos grasos, hasta el momento el número de trabajos en el género es muy reducido y particularmente en *N. oceanica* no han sido reportados para LT y LN. James *et al.* (1989) informaron la composición de los ácidos grasos de LT en *Nannochloropsis* sp. cultivada en un rango de temperaturas de 15-35°C, no mostrando un comportamiento claro de las clases de ácidos grasos y de sus ácidos grasos en función del incremento de la temperatura. Sin embargo, si se comparan sólo los resultados obtenidos en *N. oceanica* CCALA 978 a 15 y 25°C con los valores medios reportados para las mismas temperaturas por James *et al.* (1995), se observa que en *Nannochloropsis* sp. los AGS y AGM (lípidos totales) disminuyeron a 25°C, es decir, mostraron una tendencia inversa a la indicada en *N. oceanica* CCALA 978. Por su parte, los porcentajes promedio de AGP en *Nannochloropsis* sp. aumentaron a 25°C respecto de 15°C, mientras que en *N. oceanica* CCALA 978 los AGP mostraron el comportamiento opuesto en función de la temperatura más alta (a ambos fotoperiodos testeados). Los cambios observados por James *et al.* (1989) estuvieron asociados principalmente con variaciones en los contenidos de los ácidos grasos mayoritarios en cada clase, ácidos palmítico (ca. 20-27%), palmitoleico (ca. 30-31%) y eicosapentaenoico (ca. 19-24%), al igual que en *N. oceanica* CCALA 978. Por otra parte, el comportamiento de los ácidos grasos en *N. oceanica* CCALA 978 fue coincidente con el informado por Van Wagenen *et al.* (2012) para *N. salina*, cultivada en un rango de 13-32°C y 150  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (fotoperiodo no especificado). Estos autores indicaron que conforme disminuyó la temperatura, el grado de insaturación aumentó, asociando este comportamiento a una adaptación fisiológica de las células, necesaria para mantener la fluidez de las membranas celulares. Los porcentajes de C16:0 (ca. 35-45 %), de C16:1 (ca. 35%), C18:1 (ca. 5%) y C20:5n3 (15-10%) y la tendencia del incremento de insaturación conforme la temperatura disminuye de estos ácidos en los lípidos totales indicados por Van

Wagenen *et al.* (2012) fueron similares a los hallados para *N. oceanica* CCALA 978 en este trabajo, con excepción de los porcentajes de ácidos oleico. Este ácido en *N. salina* no mostró diferencias en el rango de temperaturas testeadas y su contenido fue mucho más bajo que los reportados para la cepa en estudio. De acuerdo con las investigaciones realizadas hasta el momento en el género *Nannochloropsis*, se concluye que no se pueden realizar generalizaciones del efecto de la temperatura sobre la composición de los ácidos grasos individuales.

Con respecto a la deprivación de nitrógeno, Pal *et al.* (2011) y Simionato *et al.* (2013) informaron en *N. oceanica* CCALA 804 (en los LT) y en *N. gaditana* (en los TAG) un incremento de los ácidos grasos de cadena corta (C-16 y C-18 en los AGS y AGM) y una disminución de EPA. En *N. oceanica* CCALA 978, los contenidos de AGS y AGM hallados en cultivos carentes de nitrógeno, estuvieron en concordancia con los indicados por Pal *et al.* (2011). Bajo estas condiciones, en *N. oceanica* CCALA 978 los AGS-LT siguieron la misma tendencia de incremento indicada por Pal *et al.* (2011) en respuesta a la deprivación y a la intensidad de luz más alta. Sin embargo, contrariamente a lo indicado por Pal *et al.* (2011), en la cepa en estudio se registró el porcentaje de AGM-LN más alto (ca. 54%) a la menor intensidad de luz ( $100 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Además, en *N. oceanica* CCALA 978 los contenidos de ácidos palmitoleico y oleico mostraron un comportamiento inverso en función de la carencia de nitrógeno a ambas intensidades de luz, al igual que la clase de AGM, es decir aumentaron a  $100 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , mientras que a  $300 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  disminuyeron su contenido. Así, la combinación de deprivación de nitrógeno y alta intensidad de luz no ocasionó mayor acumulación AGM en *N. oceanica* CCALA 978, en coincidencia con el comportamiento observado en el contenido de LN.

## **Propiedades del biodiesel inferidas a partir del perfil de ácidos grasos de la fracción de lípidos neutros**

El biodiesel se define como los mono-acil ésteres de ácidos grasos y se produce mediante una reacción de transesterificación (Knothe 2005). Las diferencias en la longitud de la cadena y la posición y número de enlaces insaturados son dos de las propiedades más importante de un ácido graso individual que pueden afectar profundamente las propiedades del biodiesel. Debido a que la estructura de los

ácidos grasos no es modificada por el proceso de transesterificación, la composición de la materia prima refleja la composición de los ésteres de ácidos grasos que componen el biodiesel (Knothe 2005).

Basados en el perfil de los metil ésteres de ácidos grasos de la fracción neutra, el índice de Yodo (IY) y el número de cetano, dos parámetros de calidad, fueron inferidos en *N. oceanica* CCALA 978.

El índice de Yodo es una medida de la insaturación total de los ácidos grasos (Ramos *et al.* 2009). Los valores de índice de Yodo oscilaron entre 42 y 54  $\text{gl}_2/100\text{g}$ , muy por debajo del límite máximo de 120  $\text{gl}_2/100\text{g}$  establecido por el estándar EN 14214. Estos valores fueron más bajos que los informados por Bondioli *et al.* (2012) y Griffiths *et al.* (2012) para dos cepas de *Nannochloropsis* sp.

El número de cetano es una medida de las propiedades de ignición de un combustible, está relacionado con el tiempo de ignición, es decir, el tiempo que transcurre entre la inyección del combustible y el comienzo de su combustión. Cuanto más alto es el número de cetano, más corto es el tiempo de ignición y la combustión del combustible de mayor calidad (Knothe 2003, 2006; Ramos *et al.* 2009). Los aceites ricos en C16:0 y C18:1 y baja cantidad de ácidos poliinsaturados poseen alto número de cetano (Knothe 2003). En *N. oceanica* CCALA 978, este parámetro varió entre 60 y 64, por encima del límite mínimo de 51 establecido por el estándar de calidad europeo EN14214. Este valor se debió a los contenidos significativos de C16:0, C16:1 y C18:1 junto con los bajos porcentajes de C18:2n6 y C18:3n3. Además, hay una relación inversa entre el IY y el NC, es decir, un índice de Yodo bajo está relacionado con valores de número de cetano alto (Ramos *et al.* 2009). Así, debido a la baja cantidad de AGP, los altos valores de NC encontrados en el presente estudio fueron congruentes con los bajos valores de IY encontrados en *N. oceanica* CCALA 978.

Los AGM son considerados la materia prima ideal para la producción de biodiesel debido a que proveen un balance razonable entre las propiedades de flujo en frío, la estabilidad oxidativa y las propiedades de combustión (Knothe 2009). En *N. oceanica* CCALA 978 los porcentajes de AGM estuvieron entre ca. 41-55% del total de ácidos grasos en la fracción de lípidos neutros, con una dominancia (ca. 25-40 %) del ácido palmitoleico (C16:1), el cual no es común en aceites de plantas superiores.

Con respecto al contenido ácido linolénico y AGP con más de 4 dobles enlaces, el estándar europeo EN 14214 establece un máximo de 12% de ácido

linolénico y un máximo de 1% de metil ésteres con más de 4 dobles enlaces. Los aceites con altas proporciones de AGP y altos porcentajes de ácido linolénico tienen una estabilidad oxidativa pobre debido al gran número de dobles enlaces susceptibles a la autooxidación (Stansell *et al.* 2011). En *N. oceanica* CCALA 978 los contenidos de ácido linolénico (C18:3n3) fueron menores a 0,5% en todas las condiciones testeadas, permaneciendo por debajo del límite de 12% establecido por el estándar europeo de calidad EN14214. Si bien el contenido de este ácido estuvo dentro de los límites, el contenido de ácidos poliinsaturados con más de 4 dobles enlaces (ca. 4%) excedió el límite de 1% establecido por el estándar de calidad; lo que indicaría una baja estabilidad oxidativa de los aceites. Según Griffiths *et al.* (2012), la baja estabilidad oxidativa puede mejorarse mediante el uso de aditivos o mezclas. Mientras que Bondioli *et al.* (2012) han sugerido dos opciones para disminuir el contenido de AGP: i) dilución con aceites vegetales o animales; y ii) separación del biodiesel mediante destilación fraccionada, donde la concentración de AGP puede ser reducida a valores cercanos a cero.

Por lo tanto, de acuerdo con las propiedades inferidas, se puede concluir que la fracción de lípidos neutros de *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 cumple con los estándares europeos en relación con el índice de Yodo, el número de cetano y el contenido de ácido linolénico, mientras que el contenido de AGP con más de 4 dobles enlaces excede el límite establecido por el estándar de calidad. Si bien la Argentina ha adoptado los estándares de calidad para biodiesel establecidos por la norma europea, cabe aclarar que estos son los más rigurosos comparados con los exigidos por otras regulaciones, no encontrándose valores límites para el contenido de AGP en otras normas internacionales.

## 5.5 Conclusiones

En este capítulo, se analizaron el crecimiento, la producción y productividad de biomasa, el contenido y la productividad de lípidos totales y lípidos neutros y la composición de los ácidos grasos en *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978, representando ésta una importante contribución al conocimiento del comportamiento de la especie en estudio frente a distintas variables ambientales y a la carencia de nitrógeno.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede considerar a la cepa nativa *N. oceanica* CCALA 978 una microalga oleaginosa y robusta. La velocidad de crecimiento y la producción y productividad de biomasa incrementaron con la mayor temperatura (25°C) y la mayor cantidad de horas de luz (16:8 h L:O) empleadas, mientras que la intensidad de luz alta (300  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) sólo favoreció el crecimiento.

Con respecto al contenido de lípidos, la mayor cantidad de horas de luz aplicadas y la carencia de nitrógeno fueron las variables que incrementaron el contenido de lípidos totales, alcanzando el valor máximo de ca. 36% ps, bajo la estrategia de privación de nitrógeno. Los lípidos neutros, materia prima ideal para la producción de biodiesel, representaron entre el 82 y 91% de los lípidos totales bajo todas las condiciones de cultivo evaluadas. La carencia de nitrógeno condujo a los valores máximos de TAG (ca. 32% ps), independientemente de la intensidad lumínica empleada, indicando así, que al menos en el rango de las intensidades de luz utilizadas, la combinación de privación de nitrógeno junto con la alta intensidad de luz no fue un factor de estrés que maximice la producción de lípidos neutros. Además, cabe destacar que el comportamiento de la composición de la fracción de LN y LT sugiere que no es necesario el fraccionamiento de los lípidos antes de utilizarlos como materia prima para la elaboración de biodiesel.

Las productividades lipídicas obtenidas en *N. oceanica* CCALA 978 fueron menores que las indicadas en la literatura para otras cepas del género, las cuales se cultivaron con mayores intensidades lumínicas y luz continua. Sin embargo, ésta última condición se considera poco realista desde los puntos de vista funcional y económico en cultivos con fines bioenergéticos.

Con respecto a la calidad de la materia prima obtenida, los ácidos grasos saturados y monoinsaturados en *N. oceanica* CCALA 978 representaron un 90-96%, tanto en los lípidos totales como en los neutros, en todas las condiciones evaluadas, constituyendo los ácidos grasos polinsaturados la clase minoritaria. Se destaca el alto contenido de AGM (ca. 45-55%), los cuales le confieren al biodiesel un balance razonable entre las propiedades de flujo en frío, la estabilidad oxidativa y las propiedades de combustión. Adicionalmente, el índice de Yodo, el número de cetano y el contenido de ácido linolénico estuvieron dentro de los límites establecidos por el estándar de calidad europeo EN14214. Todos estos resultados indican que los lípidos neutros de *N. oceanica* CCALA 978 se presentan como una materia prima adecuada para la producción de biodiesel.

Así, la información obtenida en *N. oceanica* CCALA 978 sirve de base para implementar nuevas estrategias de cultivos con fines bioenergéticos, tendientes a incrementar la biomasa y los contenidos y productividades lipídicas, condiciones indispensables para lograr un proceso potencialmente rentable.

## **ANEXO**

**Tabla A5.1:** Composición de ácidos grasos de lípidos totales y fracciones lipídicas de CCALA 978 bajo las siguientes condiciones: **15°C, fotoperíodo 12:12 h L:O, intensidad lumínica promedio de 100  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ , nitrógeno completo.** LT: lípidos totales; LN: lípidos neutros; GL: glicolípidos; FL: fosfolípidos. Los valores representan las medias  $\pm$  desvío estándar de cuatro réplicas.

<b>AG</b>	<b>Lípidos totales</b>	<b>Fracciones lipídicas</b>		
		<b>LN</b>	<b>GL</b>	<b>FL</b>
<b>AGS</b>				
<b>C6:0</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C8:0</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C10:0</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C11:0</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C12:0</b>	0,12 (0,01)	0,12(0,01)	0,22(0,00)	nd
<b>C13:0</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C14:0</b>	3,67 (0,27)	3,28(0,02)	8,82(0,29)	3,58(0,40)
<b>C15:0</b>	0,29 (0,01)	0,26(0,02)	0,43(0,03)	0,37(0,03)
<b>C16:0</b>	35,15 (0,19)	35,50(0,13)	33,39(0,31)	23,75(1,54)
<b>C17:0</b>	0,19 (0,01)	0,18(0,03)	0,13(0,01)	0,39(0,02)
<b>C18:0</b>	0,92 (0,03)	1,27(0,19)	2,87(0,33)	14,30(6,09)
<b>C20:0</b>	nd	0,11(0,00)	nd	nd
<b>C21:0</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C22:0</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C24:0</b>	nd	nd	nd	nd
<b>AGM</b>				
<b>C14:1</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C15:1</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C16:1</b>	35,93 (0,57)	38,73(3,02)	24,66(1,14)	7,79(1,40)
<b>C17:1</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C18:1n9t</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C18:1n9c</b>	13,44 (0,27)	16,33(1,11)	5,76(0,03)	17,83(0,66)
<b>C20:1</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C22:1n9</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C24:1</b>	nd	nd	nd	nd
<b>AGP</b>				
<b>C18:2n6t</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C18:2n6c</b>	2,11 (0,05)	1,28(0,16)	1,23(0,00)	7,36(0,78)
<b>C18:3n6</b>	0,25 (0,01)	0,25(0,02)	0,20(0,01)	0,53(0,04)
<b>C18:3n3</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C20:2</b>	0,30 (0,03)	nd	nd	1,28(0,60)
<b>C20:3n6</b>	0,72 (0,02)	0,72(0,02)	0,22(0,01)	0,91(0,09)
<b>C22:1n9</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C20:4n6</b>	1,08 (0,03)	0,56(0,01)	3,13(0,09)	7,98(0,33)
<b>C20:5n3</b>	6,19 (0,30)	3,41(0,03)	18,36(0,14)	13,58(5,09)
<b>C22:2</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C22:6n3</b>	nd	nd	nd	nd
<b>AGS(%)</b>	40,28 (0,18)	38,72(4,36)	45,75(0,30)	42,75(7,29)
<b>AGM(%)</b>	49,37 (0,72)	55,05(4,13)	30,42(1,14)	25,62(2,06)
<b>AGP(%)</b>	10,31 (0,79)	6,23(0,23)	23,13(0,21)	31,63(5,23)

**Tablas A5.2:** Composición de ácidos grasos de lípidos totales y fracciones lipídicas de *N. oceanica* CCA 978 bajo las siguientes condiciones: **15°C, fotoperíodo 16:8 h L:O, intensidad lumínica promedio de 100  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ , nitrógeno completo.** LT: lípidos totales; LN: lípidos neutros; GL: glicolípidos; FL: fosfolípidos. Los valores representan las medias  $\pm$  desvío estándar de cuatro réplicas.

AG	Lípidos totales	Fracciones lipídicas		
		LN	GL	FL
<b>AGS</b>				
<b>C6:0</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C8:0</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C10:0</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C11:0</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C12:0</b>	0,28 (0,02)	0,22 (0,01)	2,89 (0,01)	2,89 (0,07)
<b>C13:0</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C14:0</b>	3,56 (0,03)	3,37 (0,04)	5,71 (0,01)	8,20 (0,10)
<b>C15:0</b>	0,26 (0,01)	0,29 (0,00)	nd	0,41 (0,05)
<b>C16:0</b>	36,18 (0,03)	35,34 (0,04)	29,35 (0,02)	20,67(0,08)
<b>C17:0</b>	0,14 (0,01)	0,22 (0,01)	nd	0,38 (0,04)
<b>C18:0</b>	0,59 (0,01)	1,07 (0,01)	1,93 (0,01)	0,65 (0,02)
<b>C20:0</b>	nd	nd	nd	Nd
<b>C21:0</b>	nd	nd	nd	Nd
<b>C22:0</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C23:0</b>	nd	nd	nd	nd
<b>AGM</b>				
<b>C14:1</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C15:1</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C16:1</b>	35,74 (0,04)	35,85 (0,06)	24,20 (0,04)	11,73(0,19)
<b>C17:1</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C18:1n9t</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C18:1n9c</b>	17,51 (0,01)	17,40 (0,07)	4,06 (0,03)	7,64 (0,02)
<b>C20:1</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C22:1n9</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C24:1</b>	nd	nd	nd	nd
<b>AGP</b>				
<b>C18:2n6t</b>	nd	nd	nd	0,17 (0,02)
<b>C18:2n6c</b>	1,68 (0,02)	1,60 (0,01)	1,55 (0,01)	2,92 (0,01)
<b>C18:3n6</b>	0,20 (0,00)	0,18 (0,00)	nd	0,48 (0,02)
<b>C18:3n3</b>	nd	nd	nd	0,17 (0,01)
<b>C20:2</b>	0,23 (0,02)	0,23 (0,01)	nd	Nd
<b>C20:3n6</b>	0,80 (0,00)	0,77 (0,01)	nd	0,43 (0,00)
<b>C20:4n6</b>	0,90 (0,01)	0,55 (0,00)	1,55 (0,01)	8,44 (0,07)
<b>C20:5n3</b>	2,52 (0,02)	2,92 (0,02)	28,74 (0,03)	34,80(0,22)
<b>C22:2</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C22:6n3</b>	nd	nd	nd	nd
<b>AGS(%)</b>	41,01 (0,05)	40,50 (0,10)	39,89 (0,05)	33,21(0,35)
<b>AGM(%)</b>	53,25 (0,03)	53,25 (0,14)	28,27 (0,07)	19,37(0,21)
<b>AGP(%)</b>	6,33 (0,03)	6,25 (0,05)	31,84 (0,06)	47,42(0,34)

**Tablas A5.3:** Composición de ácidos grasos de lípidos totales y fracciones lipídicas de *N. oceanica* CCA 978 bajo las siguientes condiciones: **25°C, fotoperíodo 12:12 h L:O**, **intensidad lumínica promedio de 100  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ , nitrógeno completo**. LT: lípidos totales; LN: lípidos neutros; GL: glicolípidos; FL: fosfolípidos. Los valores representan las medias  $\pm$  desvío estándar de cuatro réplicas.

AG	Lípidos totales	Fracciones lipídicas		
		LN	GL	FL
<b>AGS</b>				
C6:0	nd	nd	nd	nd
C8:0	nd	nd	nd	nd
C10:0	nd	nd	nd	nd
C11:0	nd	nd	nd	nd
C12:0	0,36 (0,50)	0,10 (0,00)	nd	0,16 (0,01)
C13:0	nd	nd	nd	nd
C14:0	3,09 (0,03)	3,06 (0,02)	4,92 (0,00)	3,88 (0,01)
C15:0	0,35 (0,00)	0,34 (0,00)	0,30 (0,00)	0,69 (0,02)
C16:0	38,78 (0,01)	38,77 (0,06)	40,48 (0,02)	nd
C17:0	0,25 (0,01)	0,24 (0,00)	nd	nd
C18:0	2,79 (0,00)	2,79 (0,02)	1,97 (0,04)	1,12 (0,02)
C20:0	0,21 (0,01)	0,20 (0,01)	nd	nd
C21:0	nd	nd	nd	nd
C22:0	nd	nd	nd	nd
C23:0	nd	nd	nd	nd
<b>AGM</b>				
C14:1	nd	nd	nd	0,32 (0,01)
C15:1	nd	nd	nd	nd
C16:1	28,34 (0,01)	28,35 (0,09)	19,94 (0,04)	13,67 (0,08)
C17:1	nd	nd	nd	nd
C18:1n9t	nd	nd	nd	nd
C18:1n9c	21,56 (0,01)	21,51 (0,10)	3,17 (0,02)	13,77 (0,03)
C20:1	nd	nd	nd	nd
C22:1n9	nd	nd	nd	nd
C24:1	nd	nd	nd	nd
<b>AGP</b>				
C18:2n6t	0,24 (0,01)	0,24 (0,00)	nd	0,93 (0,01)
C18:2n6c	1,05 (0,03)	1,08 (0,01)	1,25 (0,03)	7,37 (0,03)
C18:3n6	0,19 (0,01)	0,20 (0,00)	nd	0,81 (0,01)
C18:3n3	0,15 (0,01)	0,15 (0,01)	nd	0,32 (0,01)
<b>C20:2</b>				
C20:3n6	0,20 (0,00)	0,21 (0,00)	nd	nd
C20:4n6	0,43 (0,00)	0,43 (0,00)	1,63 (0,02)	6,38 (0,02)
C20:5n3	1,90 (0,50)	2,11 (0,02)	26,34 (0,02)	16,89 (0,03)
C22:2	nd	nd	nd	nd
C22:6n3	nd	nd	nd	nd
<b>AGS(%)</b>	45,83 (0,50)	45,50 (0,04)	46,67 (0,03)	37,31 (0,10)
<b>AGM(%)</b>	49,90 (0,02)	49,87 (0,02)	23,12 (0,03)	29,49 (0,07)
<b>AGP(%)</b>	4,16 (0,47)	4,43 (0,03)	29,22 (0,00)	33,20 (0,05)

**Tablas A5.4:** Composición de ácidos grasos de lípidos totales y fracciones lipídicas de *N. oceanica* CCALA 978 bajo las siguientes condiciones: **25°C, fotoperíodo 16:8 h L:O** , **intensidad lumínica promedio de 100  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ , nitrógeno completo.** LT: lípidos totales; LN: lípidos neutros; GL: glicolípidos; FL: fosfolípidos. Los valores representan las medias  $\pm$  desvío estándar de cuatro réplicas.

AG	Lípidos totales	Fracciones lipídicas		
		LN	GL	FL
<b>AGS</b>				
<b>C6:0</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C8:0</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C10:0</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C11:0</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C12:0</b>	0,11 (0,01)	0,11(0,00)	nd	nd
<b>C13:0</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C14:0</b>	3,56 (0,15)	3,23(0,05)	9,39(0,43)	7,06(0,06)
<b>C15:0</b>	0,36 (0,00)	0,36(0,00)	0,61(0,03)	0,46(0,01)
<b>C16:0</b>	40,15 (39,83)	39,83(0,60)	53,33(1,07)	35,24(3,90)
<b>C17:0</b>	0,34 (0,01)	0,36(0,00)	nd	nd
<b>C18:0</b>	2,46 (0,09)	2,58(0,06)	2,13(0,11)	8,35(0,80)
<b>C20:0</b>	0,19 (0,02)	0,22(0,01)	nd	nd
<b>C21:0</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C22:0</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C23:0</b>	nd	nd	nd	nd
<b>AGM</b>				
<b>C14:1</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C15:1</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C16:1</b>	28,24 (0,29)	27,11(0,12)	23,75(0,22)	11,49(1,73)
<b>C17:1</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C18:1n9t</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C18:1n9c</b>	15,85 (0,01)	16,47(0,11)	7,02(0,20)	17,95(0,31)
<b>C20:1</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C22:1n9</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C24:1</b>	nd	nd	nd	nd
<b>AGP</b>				
<b>C18:2n6t</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C18:2n6c</b>	1,89 (0,29)	1,70(0,08)	1,14(0,00)	3,76(0,30)
<b>C18:3n6</b>	0,27 (0,02)	0,29(0,02)	nd	nd
<b>C18:3n3</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C20:2</b>	0,24 (0,00)	0,11(0,00)	nd	nd
<b>C20:3n6</b>	0,24 (0,04)	0,26(0,02)	nd	nd
<b>C20:4n6</b>	1,30 (0,09)	1,17(0,10)	0,17(0,01)	12,75(0,03)
<b>C20:5n3</b>	4,93 (0,35)	4,24(0,41)	3,66(0,06)	8,08(0,07)
<b>C22:2</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C22:6n3</b>	nd	nd	nd	nd
<b>AGS(%)</b>	47,12 (1,26)	46,69(0,65)	65,46(1,56)	49,93(3,35)
<b>AGM(%)</b>	44,09 (0,29)	45,58(0,09)	30,77(0,41)	29,44(1,98)
<b>AGP(%)</b>	8,75 (0,93)	7,72(0,56)	3,76(1,96)	20,63(5,30)

**Tablas A5.5:** Composición de ácidos grasos de lípidos totales y fracciones lipídicas de *N. oceanica* CCALA 978 bajo las siguientes condiciones: **25°C, fotoperíodo 16:8 h L:O** , **intensidad lumínica promedio de 100  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{seg}^{-1}$** , **carencia de nitrógeno**. LT: lípidos totales; LN: lípidos neutros; GL: glicolípidos; FL: fosfolípidos. Los valores representan las medias  $\pm$  desvío estándar de cuatro réplicas.

AG	Lípidos totales	Fracciones lipídicas		
		LN	GL	FL
<b>AGS</b>				
<b>C6:0</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C8:0</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C10:0</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C11:0</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C12:0</b>	0,10 (0,00)	0,19 (0,02)		
<b>C13:0</b>				
<b>C14:0</b>	3,86 (0,02)	4,86 (0,15)	5,60 (0,13)	3,43 (0,56)
<b>C15:0</b>	0,28 (0,00)	0,33 (0,01)	nd	nd
<b>C16:0</b>	32,54 (0,01)	33,68 (0,45)	41,10 (3,42)	35,03 (0,23)
<b>C17:0</b>	0,13 (0,00)	0,24 (0,03)	nd	nd
<b>C18:0</b>	0,62 (0,02)	0,94 (0,03)	7,88 (0,82)	8,88 (0,36)
<b>C20:0</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C21:0</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C22:0</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C23:0</b>	nd	nd	nd	nd
<b>AGM</b>				
<b>C14:1</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C15:1</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C16:1</b>	37,07 (0,02)	36,94 (0,65)	16,11 (0,84)	12,62 (0,82)
<b>C17:1</b>		0,10 (0,00)		
<b>C18:1n9t</b>	18,18 (0,02)	17,11 (2,55)	12,47 (0,97)	19,90 (0,12)
<b>C18:1n9c</b>				
<b>C20:1</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C22:1n9</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C24:1</b>	nd	nd	nd	nd
<b>AGP</b>				
<b>C18:2n6t</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C18:2n6c</b>	1,36 (0,02)	1,62 (0,10)	2,77 (0,23)	17,99 (0,18)
<b>C18:3n6</b>	0,17 (0,01)	0,45 (0,03)	3,29 (0,98)	nd
<b>C18:3n3</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C20:2</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C20:3n6</b>	0,29 (0,02)	0,25 (0,03)	nd	nd
<b>C20:4n6</b>	0,84 (0,00)	1,33 (0,03)	2,86 (0,49)	nd
<b>C20:5n3</b>	4,55 (0,00)	5,01 (0,53)	5,29 (1,00)	2,15 (0,09)
<b>C22:2</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C22:6n3</b>	nd	nd	nd	nd
<b>AGS(%)</b>	37,53 (0,02)	40,24 (0,45)	54,58 (4,33)	47,34 (0,43)
<b>AGM(%)</b>	55,25 (0,04)	54,10 (3,25)	28,58 (0,22)	35,52 (0,70)
<b>AGP(%)</b>	7,21 (0,03)	8,96 (0,55)	14,84 (0,80)	20,14 (0,27)

**Tabla A5.6:** Composición de ácidos grasos de lípidos totales y fracciones lipídicas de *N. oceanica* CCA 978 bajo las siguientes condiciones: **25°C, fotoperíodo 16:8 h L:O, intensidad lumínica promedio de 300  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ , nitrógeno completo.** LT: lípidos totales; LN: lípidos neutros; GL: glicolípidos; FL: fosfolípidos. Los valores representan las medias  $\pm$  desvío estándar de cuatro réplicas.

AG	Lípidos totales	Fracciones lipídicas		
		LN	GL	FL
<b>AGS</b>				
C6:0	nd	nd	nd	nd
C8:0	nd	nd	nd	nd
C10:0	nd	nd	nd	nd
C11:0	nd	nd	nd	nd
C12:0	0,14 (0,00)	0,13(0,00)	0,16(0,02)	nd
C13:0	nd	nd	nd	nd
C14:0	4,04 (0,04)	3,74(0,03)	6,19(0,08)	5,58 (0,15)
C15:0	0,34 (0,00)	0,36(0,02)	0,37(0,00)	0,20 (0,04)
C16:0	43,61 (0,51)	42,85(0,07)	36,34(0,15)	27,37 (0,23)
C17:0	0,25 (0,05)	0,28(0,01)	nd	nd
C18:0	2,73 (0,05)	2,97(0,02)	2,42(0,03)	1,09 (0,05)
C20:0	0,22 (0,01)	0,23(0,00)	nd	nd
C21:0	nd	nd	nd	nd
C22:0	nd	nd	nd	nd
C23:0	nd	nd	nd	nd
<b>AGM</b>				
C14:1	nd	nd	nd	nd
C15:1	nd	nd	nd	nd
C16:1	27,91 (0,08)	28,84(0,13)	20,48(1,39)	10,40 (0,10)
C17:1	nd	nd	nd	nd
C18:1n9t	nd	nd	nd	nd
C18:1n9c	14,00 (0,01)	13,82(0,12)	7,28(0,62)	18,53 (0,05)
C20:1	nd	nd	nd	nd
C22:1n9	nd	nd	nd	nd
C24:1	nd	nd	nd	nd
<b>AGP</b>				
C18:2n6t	0,18 (0,00)	0,13(0,00)	nd	nd
C18:2n6c	1,37 (0,13)	1,39(0,00)	2,40(0,04)	13,73 (0,16)
C18:3n6	0,19 (0,02)	0,23(0,00)	0,24(0,04)	0,51 (0,05)
C18:3n3	nd	nd	nd	nd
C20:2	nd	nd	nd	nd
C20:3n6	0,19 (0,01)	0,26(0,00)	nd	nd
C20:4n6	0,70 (0,07)	1,04(0,01)	4,82(0,39)	4,11 (0,06)
C20:5n3	2,30 (0,29)	3,66(0,05)	19,3(1,90)	18,63 (0,29)
C22:2	nd	nd	nd	nd
C22:6n3	nd	nd	nd	nd
<b>AGS(%)</b>	51,35 (0,60)	50,59(0,04)	45,48(0,37)	34,23 (0,24)
<b>AGM(%)</b>	43,71 (0,08)	42,67(0,03)	27,75(1,99)	28,93 (0,09)
<b>AGP(%)</b>	4,94 (0,52)	6,74(0,06)	26,76(2,28)	36,97 (0,39)

**Tabla A5.7:** Composición de ácidos grasos de lípidos totales y fracciones lipídicas de *N. oceanica* CCALA 978 bajo las siguientes condiciones: **25°C, fotoperíodo 16:8 h L:O** , **intensidad lumínica promedio de 300  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{seg}^{-1}$** , **carencia de nitrógeno**. LT: lípidos totales; LN: lípidos neutros; GL: glicolípidos; FL: fosfolípidos. Los valores representan las medias  $\pm$  desvío estándar de cuatro réplicas.

<b>AG</b>	<b>Lípidos totales</b>	<b>Fracciones lipídicas</b>		
		<b>LN</b>	<b>GL</b>	<b>FL</b>
<b>AGS</b>				
<b>C6:0</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C8:0</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C10:0</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C11:0</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C12:0</b>	0,23 (0,02)	0,25 (0,00)	0,33 (0,00)	nd
<b>C13:0</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C14:0</b>	5,29 (0,65)	5,72 (0,03)	4,88 (0,11)	3,82 (0,01)
<b>C15:0</b>	0,48 (0,01)	0,49 (0,01)	0,40 (0,04)	0,27 (0,01)
<b>C16:0</b>	41,57 (1,21)	41,42 (0,01)	42,16 (0,03)	27,51 (0,03)
<b>C17:0</b>	0,28 (0,01)	0,24 (0,00)	nd	nd
<b>C18:0</b>	2,23 (0,08)	2,73 (0,04)	6,05 (0,02)	1,29 (0,02)
<b>C20:0</b>	0,15 (0,01)	0,13 (0,00)	nd	nd
<b>C21:0</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C22:0</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C23:0</b>	nd	nd	nd	nd
<b>AGM</b>				
<b>C14:1</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C15:1</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C16:1</b>	28,64 (0,91)	28,17 (0,01)	18,56 (0,10)	11,29 (0,03)
<b>C17:1</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C18:1n9t</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C18:1n9c</b>	13,13 (0,74)	12,86 (0,02)	8,05 (0,02)	18,91 (0,09)
<b>C20:1</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C22:1n9</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C24:1</b>	nd	nd	nd	nd
<b>AGP</b>				
<b>C18:2n6t</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C18:2n6c</b>	2,22 (0,04)	2,27 (0,02)	2,18 (0,00)	11,96 (0,06)
<b>C18:3n6</b>	0,16 (0,01)	0,28 (0,00)	nd	0,69 (0,01)
<b>C18:3n3</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C20:2</b>	0,27 (0,01)	0,29 (0,01)	nd	nd
<b>C20:3n6</b>	0,22 (0,01)	0,13 (0,01)	nd	nd
<b>C20:4n6</b>	0,76 (0,01)	0,84 (0,00)	1,57 (0,10)	6,12 (0,16)
<b>C20:5n3</b>	4,17 (0,01)	4,19 (0,03)	15,82 (0,10)	19,31 (0,01)
<b>C22:2</b>	nd	nd	nd	nd
<b>C22:6n3</b>	nd	nd	nd	nd
<b>AGS(%)</b>	50,22 (1,30)	50,73 (0,03)	53,82 (0,09)	31,10 (0,02)
<b>AGM(%)</b>	41,77 (1,59)	41,03 (0,02)	26,61 (0,11)	30,83 (0,11)
<b>AGP(%)</b>	7,78 (0,04)	8,00 (0,02)	19,57 (0,05)	38,07 (0,13)

## Capítulo 6 – Cultivo de *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 en fotobiorreactor

---

### 6.1 Introducción

Los sistemas de cultivo microalgales varían de acuerdo con la cepa a utilizar y con el bioproducto de interés a obtener (Borowitzka 1999). En términos generales existen dos principales estrategias de cultivos: sistemas cerrados (fotobiorreactores) y sistemas abiertos tipo *raceway* (Aciare y Riquelme 2008; Sánchez *et al.* 2011). La modalidad operativa de los fotobiorreactores presenta numerosas ventajas, como la minimización de la contaminación, el control de las variables ambientales (temperatura, luz, pH, concentración de CO<sub>2</sub>), la menor pérdida de CO<sub>2</sub> y la prevención de la evaporación de agua (Singh y Sharma 2012; Acien-Fernandez *et al.* 2013; Chini Zitelli *et al.* 2013a). Una gran variedad de microalgas han sido testeadas con estos sistemas bajo condiciones reproducibles (Aciare y Riquelme 2008). La característica más importante de los fotobiorreactores es la obtención de concentraciones celulares y productividades de biomasa altas, convirtiéndolos en instrumentos adecuados para la generación de inóculos funcionales para mayores volúmenes de cultivo. Los sistemas abiertos son menos productivos comparados con los sistemas cerrados (Chisti 2011). Sin embargo, su operación, mantenimiento, construcción y escalabilidad son aspectos más económicos en comparación con los fotobiorreactores (Spolaore *et al.* 2006b).

Actualmente, la explotación a nivel comercial de microalgas está focalizada fundamentalmente en la producción de compuestos de alto valor agregado (Borowitzka 2013a). Las principales especies de microalgas que se cultivan comercialmente para tal fin son *Spirulina* (cianobacteria) y *Chlorella*, ambas cultivadas para la producción de compuestos nutraceuticos, y *Haematococcus pluvialis* y *Dunaliella salina*, para la producción de astaxantina y  $\beta$ -carotenos, respectivamente. Los distintos diseños empleados para la explotación de estas microalgas han sido adaptados con fines bioenergéticos. Si bien existen numerosas investigaciones a nivel mundial, el cultivo a gran escala de microalgas orientado a la obtención de biocombustibles aún requiere de investigación y desarrollo a largo plazo para lograr una tecnología económicamente viable

(Benemann *et al.* 2012), ya que la producción comercial de biodiesel a partir de aceites microalgales aún no es factible debido a la falta de sustentabilidad del proceso.

En la actualidad muchas investigaciones se han orientado hacia el cultivo en dos fases, el cual combina una primera etapa de producción de biomasa en fotobiorreactores, con el fin de obtener inóculos adecuados para volúmenes mayores y una segunda etapa de producción de aceites en piletas tipo *raceway*, en donde los cultivos son sometidos a distintos tipos de estrés tendientes a generar TAG (Chini Zittelli *et al.* 2013a).

Tsoling *et al.* (1996) han indicado una serie de criterios que deben tenerse en cuenta al momento de diseñar un fotobiorreactor para lograr una eficiente producción de biomasa. Entre ellos se encuentra la realización de un diseño que a) permita una iluminación uniforme de la superficie del cultivo y la transferencia eficiente de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>, y b) impida que las células microalgales se adhieran a la superficie del fotobiorreactor, permitiendo así la rápida y eficiente limpieza y esterilización del dispositivo. El mezclado es un factor muy importante, ya que éste favorece el intercambio gaseoso, evita la sedimentación de las células y la formación de gradientes de concentración de nutrientes y fundamentalmente permite que todas las células puedan acceder a las zonas iluminadas en el fotobiorreactor (Ogbonna y Tanaka 2000; Ugwu *et al.* 2002). Los avances realizados en el diseño de estas unidades de cultivo, principalmente en lo relativo a la disponibilidad de luz y sistemas de mezclado, han optimizado significativamente la fotosíntesis y la producción de biomasa y la mayoría de ellos se emplea para investigación o aplicaciones a pequeña escala (Carvalho *et al.* 2006; Lehr y Posten 2009; Tredici *et al.* 2010). En tal sentido, se han desarrollado distintos tipos de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas, los cuales se clasifican de acuerdo con su diseño en columnares, tubulares vertical u horizontal, planos y helicoidales (Singh y Sharma *et al.* 2012; Chini Zitelli *et al.* 2013 a,b). Sin embargo, los altos costos de operación y capital han limitado su aplicación comercial. Aún se requieren mejoras significativas en el diseño de fotobiorreactores a gran escala con respecto a los materiales y a los sistemas de control automatizado (Lerh y Posten 2009; Tredici 2010; Chini Zitelli *et al.* 2013b).

Distintas especies de *Nannochloropsis* han sido cultivadas en diferentes tipos de fotobiorreactores, bajo una amplia gama de estrategias de cultivo y condiciones ambientales, lo cual dificulta una comparación en términos de

crecimiento, producción de biomasa y de lípidos entre las diferentes especies y las condiciones de cultivo empleadas (Chini Zittelli *et al.* 1999, 2000, 2003; Zou y Richmond 1999; Chen-Wu *et al.* 2001; Richmond y Chen-Wu 2001; Rodolfi *et al.* 2009; Briassoulis *et al.* 2010; Quinn *et al.* 2012).

En tal sentido, el objetivo del presente estudio fue realizar una experiencia preliminar de cultivo en un fotobiorreactor columnar de 25 L de capacidad con el objeto de evaluar el comportamiento de *N. oceanica* CCALA 978 bajo condiciones controladas.

Así, en función de los antecedentes expuestos anteriormente, se plantearon las siguientes hipótesis de trabajo:

A) El crecimiento de *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 se optimiza en fotobiorreactores columnares debido a la homogeneización del cultivo, lograda por el sistema de mezclado y a una mejor disponibilidad de radiación.

B) El empleo de un medio de cultivo más económico que el utilizado en experiencias de laboratorio y de fácil preparación, se presenta como una alternativa viable para la obtención de inóculos adecuados para mayores volúmenes de cultivo.

## 6.2 Materiales y métodos

### 6.2.1 Fotobiorreactor

El cultivo se realizó en un fotobiorreactor de 25 litros de capacidad, marca Figmay (Fig. 6.1). El mismo está construido de vidrio borosilicato, posee 70 cm de alto, con un diámetro interno de 25 cm y un diámetro externo de 26 cm. Posee una tapa bridada con 5 bocas roscadas y una central para agitador que permite la agitación en un sistema completamente estanco. Presenta velocidades de agitación que van desde 10 a 90 rpm, robinetes para venteo de oxígeno, doble entrada para aire y CO<sub>2</sub> en forma simultánea, válvulas de descarga, termómetro electrónico y tablero electrónico de comando. Además, posee cuatro tubos fluorescentes de luz blanca fría dispuestos verticalmente alrededor del biorreactor, que proveen una intensidad lumínica máxima de 100  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

El fotobiorreactor se ubicó en una cámara de cultivo, con temperatura controlada, la que fue verificada diariamente mediante un termómetro de máximos y mínimos.



**Figura 6.1:** Cultivo de *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 en un fotobiorreactor columnar de 25L de capacidad.

### 6.2.2 Obtención del inóculo

El inóculo empleado para la experiencia de cultivo en el fotobiorreactor se inició a partir de cultivos stock mantenidos de acuerdo con lo detallado en la Sección 2.4 y la obtención de los inóculos de mayor volumen se realizó mediante el escalado sucesivo de cultivos, de acuerdo con la Sección 2.5. Una vez alcanzado el volumen de 2L, se continuó el escalado hasta llegar a un volumen final de 8L, con una densidad celular de  $40 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>.

### 6.2.3 Cultivo en fotobiorreactor

Para el inicio de la experiencia (día cero), se agregaron en el fotobiorreactor 8L de medio estéril SWES, preparado de acuerdo con lo indicado en la Sección 2.3.2. La incorporación del inóculo se realizó luego de que el medio de cultivo alcanzara 25°C. La concentración inicial del mismo fue de  $20 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>, en un volumen final de 16L. Se empleó un fotoperiodo de 16:8 h L:O y una

intensidad lumínica de  $100 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . La aireación fue continua, con una caudal de  $300\text{-}500 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ . Se agregó diariamente  $\text{CO}_2$  al 2% durante 3 horas, a partir de iniciado el período de luz. Se empleó una velocidad de agitación de 60 rpm durante toda la experiencia con el propósito de mantener las condiciones del cultivo lo más homogéneas posibles, es decir, para que las células presenten una adecuada disponibilidad de nutrientes, temperatura uniforme, absorción de luz,  $\text{CO}_2$  y eliminación de  $\text{O}_2$ . El control de los valores de temperatura, pH y  $\text{O}_2$  disuelto del cultivo se realizó diariamente. La duración del cultivo fue de 28 días, seleccionando el tiempo de cosecha de acuerdo con la acumulación de los lípidos neutros detectada con la técnica de rojo Nilo.

#### **6.2.4 Toma de muestras**

Durante la experiencia de cultivo se tomaron muestras regularmente con el fin de determinar la densidad celular ( $\text{cel mL}^{-1}$ ), la concentración de clorofila a ( $\text{mg L}^{-1}$ ), la producción de biomasa (peso seco,  $\text{mg L}^{-1}$ ), la cinética de acumulación de lípidos neutros mediante la tinción con rojo Nilo (IFR, u.a) y la cinética de consumo de nitrógeno ( $\mu\text{M}$ ). Para determinar la densidad celular se tomaron alícuotas de 1-2 mL diariamente, mientras que para la estimación de los restantes parámetros las alícuotas se tomaron cada 2 ó 3 días. Los volúmenes de las muestras fueron de 4 mL para clorofila a, 3 mL para lípidos neutros, 5-10 mL para peso seco de biomasa (de acuerdo con la densidad del cultivo) y 15 mL para la determinación de nitratos. Para cada uno de los parámetros, las muestras fueron tomadas por cuadruplicado.

#### **6.2.5 Cosecha de biomasa**

Al finalizar la experiencia, la biomasa fue cosechada por centrifugación a 3500 rpm con una centrífuga de pie Presvac, Modelo DP-2065R Plus. La biomasa cosechada se lavó 3 veces con un volumen triple agua destilada y se almacenó en freezer a  $-20^\circ\text{C}$  para ser empleada en el análisis de lípidos.

## **6.2.6 Cuantificación de la velocidad de crecimiento, la producción y productividad de biomasa**

Las determinaciones de la velocidad de crecimiento, del peso seco y la productividad de biomasa se realizaron de acuerdo con los protocolos detallados en la Sección 5.2.3.

## **6.2.7 Cuantificación de nitratos disueltos**

La cuantificación de la concentración de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) disueltos en el medio de cultivo se realizó mediante el método de reducción en columna de Cd/Cu, de acuerdo con el protocolo indicado por Strickland y Parsons (1972). Esta determinación se realiza para evaluar la capacidad de consumo de *N. oceanica* CCALA 978 a escala de fotobiorreactor.

## **6.2.5 Análisis lipídico**

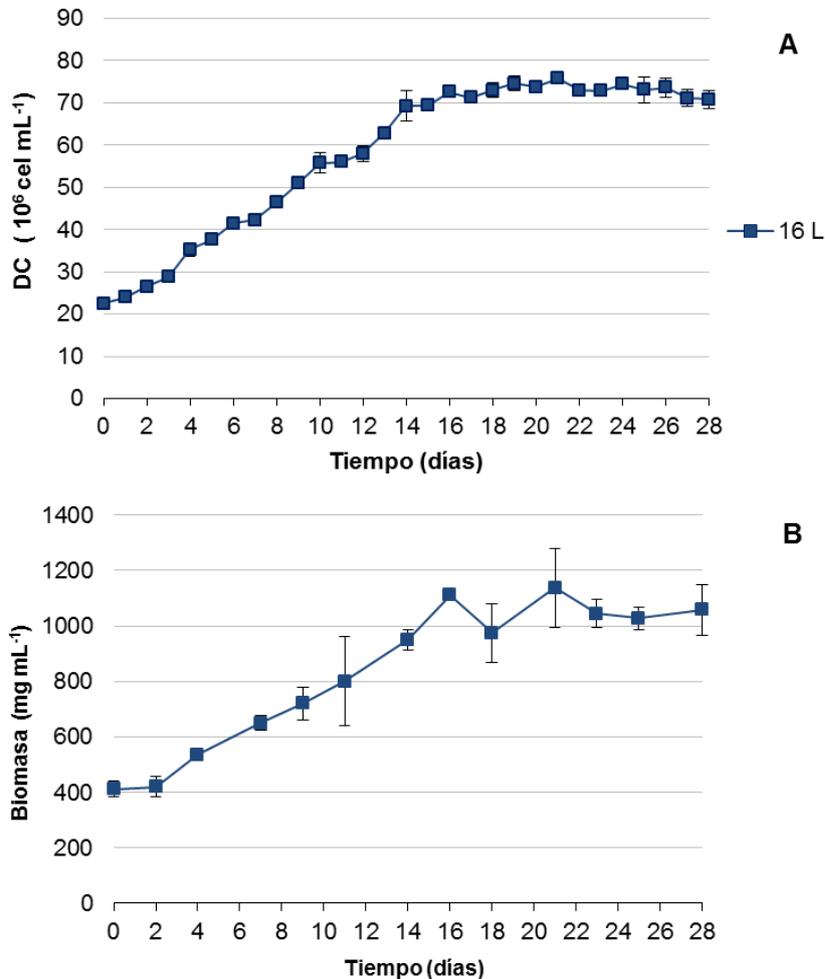
La determinación de la cinética de acumulación de lípidos neutros se realizó de acuerdo con el protocolo detallado en la Sección 5.2.6. La extracción de los lípidos totales, su fraccionamiento en lípidos neutros, glicolípidos y fosfolípidos, la transmetilación de las fracciones y posterior cromatografía gaseosa se llevaron a cabo mediante los procedimientos explicados en la Sección 5.2.7.

## **6.3 Resultados**

### **6.3.1 Crecimiento, producción y productividad de biomasa, contenido de clorofila y cinética del consumo de nitrógeno**

La densidad celular y el contenido de biomasa de *N. oceanica* CCALA 978 cultivada en un fotobiorreactor columnar se observan en la Figura 6.2 A-B. La

velocidad de crecimiento de *N. oceanica* CCALA 978 fue de  $0,14 \pm 0,02 \text{ div d}^{-1}$ . La fase estacionaria comenzó el día 16 del cultivo, alcanzando un valor promedio de  $73 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$  (Fig. 6.2 A). La biomasa incrementó en forma sostenida hasta el día 16, obteniéndose un valor de  $1,10 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$  (Fig. 6.2 B) y una productividad de  $44,8 \pm 1,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . A partir del día 17 hasta el día 28 la producción de biomasa se mantuvo en ca.  $1 \text{ g L}^{-1}$ .

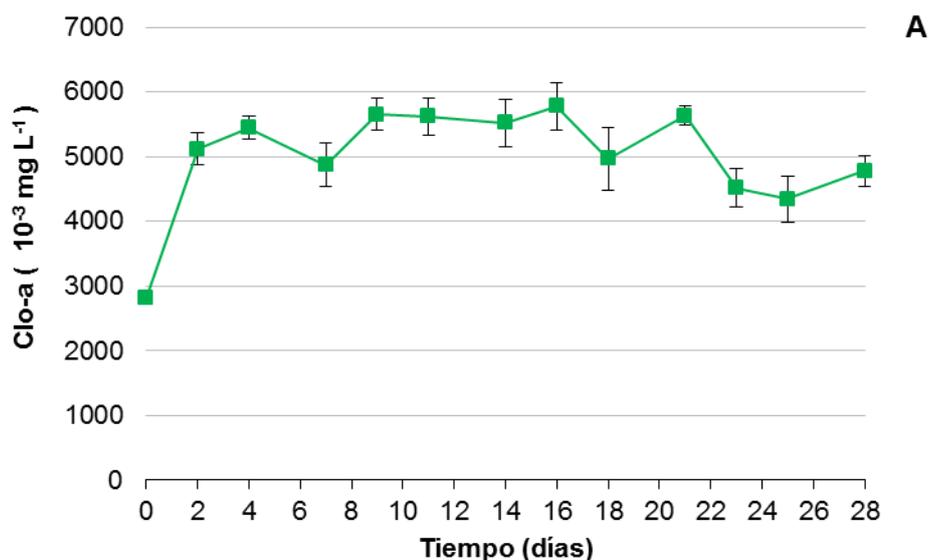


**Figura 6.2:** Crecimiento de *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 en un fotobiorreactor columnar (Volumen de cultivo: 16L). **A)** Curva de crecimiento ( $\text{cel mL}^{-1} \times 10^6$ ). **B)** Cinética de biomasa ( $\text{mg L}^{-1}$ ). Los valores representan el promedio  $\pm$  desvío estándar de cuatro réplicas.

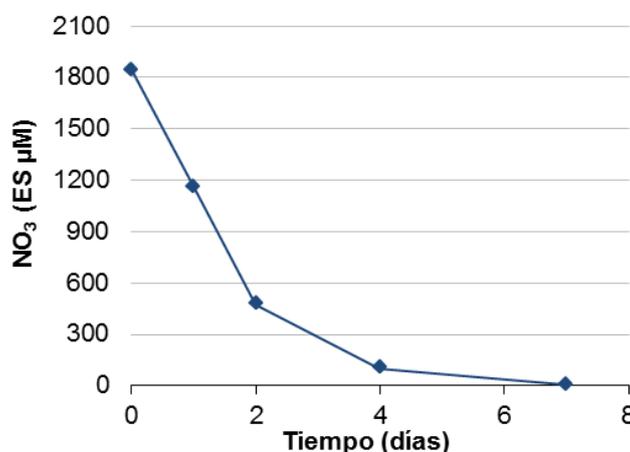
La cinética de clorofila *a* de *N. oceanica* CCALA 978 cultivada en el fotobiorreactor se observa en la Figura 6.3. El contenido de Clorofila *a* incrementó marcadamente durante los cuatro días iniciales de cultivo, manteniéndose luego relativamente estable, por encima de los ca.  $5000 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$ , hasta el día 21 de cultivo, luego del cual se observó una ligera disminución.

Con respecto al contenido de nitratos disueltos en el medio de cultivo, se observó una disminución abrupta durante los primeros cuatro días, desde un valor

inicial de ca. 1800  $\mu\text{M}$  a ca.100  $\mu\text{M}$ ; alcanzando valores no detectables al séptimo día de cultivo (Fig. 6.4).



**Figura 6.3:** Cinética del contenido de clorofila *a* en *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978. Los valores representan el promedio  $\pm$  desvío estándar de cuatro réplicas.

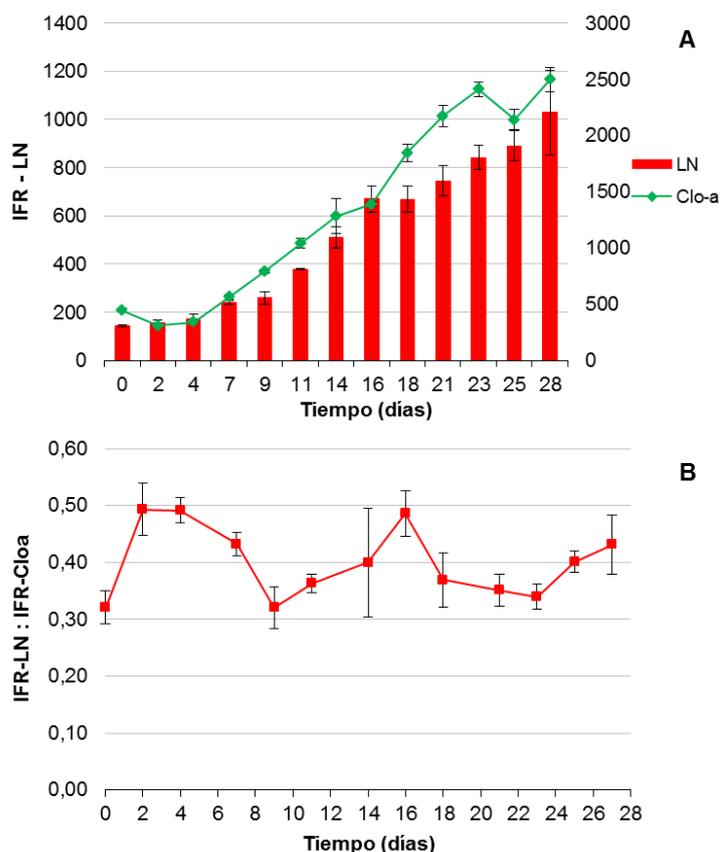


**Figura 6.4:** Concentración de nitratos disueltos a lo largo del cultivo.

### 6.3.2 Cinética de acumulación de lípidos neutros

La cinética de acumulación de lípidos neutros, las lecturas de IFR de clorofila *a* y el índice de IFR-LN:IFR-Cloa se observan en la Figura 6.5 A-B. La acumulación de lípidos neutros se evidenció a partir del día 9, con un leve incremento hasta el día 23 de cultivo, a partir del cual no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). Con respecto a la intensidad de fluorescencia de Clo-*a*, se observó un incremento sostenido a lo largo de todo el cultivo (Fig. 6.5

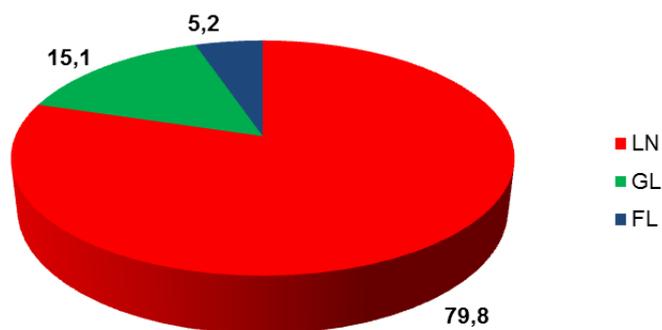
A). La relación IFR-LN:IFR-Cloa se mantuvo por debajo de 0,5 durante todo el periodo de cultivo.



**Figura 6.5:** *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 cultivada en un fotobiorreactor columnar. **A)** Cinética de acumulación de lípidos neutros y de clorofila *a* expresados como intensidad de fluorescencia relativa. **B)** Relación IFR-LN:IFR-Cloa. Los valores representan el promedio  $\pm$  desvío estándar de cuatro réplicas.

### 6.3.3 Contenido de lípidos totales y fracciones lipídicas

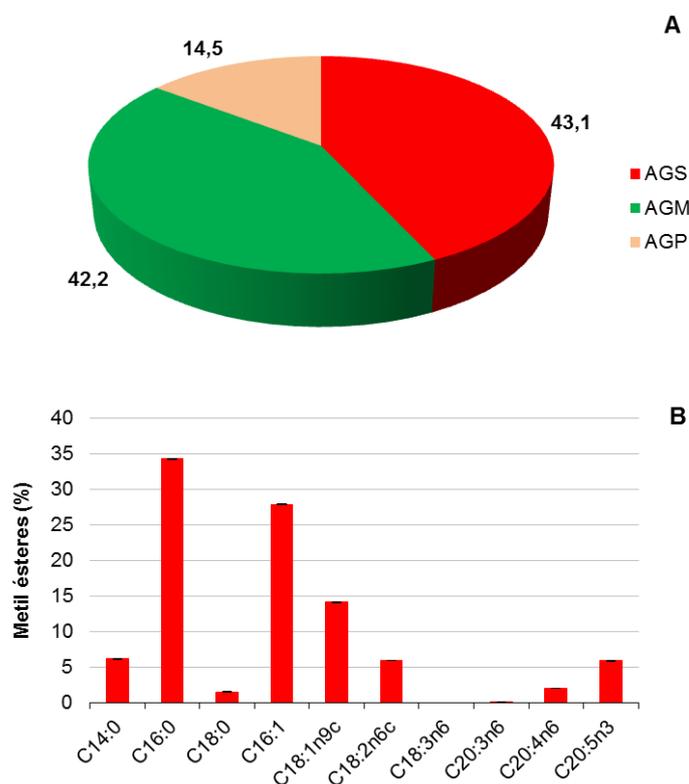
Los contenidos de lípidos totales y lípidos neutros fueron de  $25,7 \pm 1,3\%$  ps y  $21,1 \pm 0,01\%$  ps, respectivamente, con productividades de  $20,2 \pm 1,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  (LT) y  $16,5 \pm 1,3 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  (LN). Los lípidos neutros representaron el 80% de los lípidos totales (Fig. 6.6). Los contenidos de glicolípidos y fosfolípidos fueron de  $4,0 \pm 0,3\%$  ps y de  $1,4 \pm 0,1\%$  ps, respectivamente, representando los lípidos polares ca. 20% de los lípidos totales (Fig. 6.6).



**Figura 6.6:** Proporciones relativas de las fracciones lipídicas (expresadas como % de lípidos totales) de *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 cultivada en un fotobiorreactor columnar. LN: lípidos neutros; GL: glicolípidos; FL: fosfolípidos.

### 6.3.4 Composición de los ácidos grasos

En la fracción de lípidos neutros, los AGS y AGM fueron las clases mayoritarias en *N. oceanica* CCALA 978 (Fig. 6.7 A), con valores de ca. 43 y 42 %, respectivamente, mientras que los AGP representaron ca. 14%. Con respecto a la composición de los ácidos grasos, el palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), oleico (C18:1n9c) y eicosapentaenoico (C20:5n3) fueron los ácidos predominantes (Fig. 6.7 B). El ácido palmítico fue el AGS mayoritario (ca. 35%). Los ácidos palmitoleico y oleico, AGM, presentaron valores de ca. 30% y ca. 15%, respectivamente, mientras que el ácido eicosapentaenoico representó ca. 6% dentro de los AGP. Los perfiles completos de las tres fracciones lipídicas se presentan en la Tabla A6.1 del anexo ubicado al final del presente capítulo.



**Figura 6.7:** Clases y principales de ácidos grasos en *N. oceanica* CCALA 978 cultivada en un fotobiorreactor columnar. **A)** Clases de ácidos grasos en la fracción de lípidos neutros. **B)** Principales ácidos grasos en la fracción de lípidos neutros. Los valores representan el promedio  $\pm$  desvío estándar de cuatro réplicas. AGS: ácidos grasos saturados; AGM: ácidos grasos monoinsaturados; AGP: ácidos grasos poliinsaturados.

## 6.5 Discusión

Se realizó una experiencia preliminar de cultivo de *N. oceanica* CCALA 978 en un fotobiorreactor columnar con el objeto de evaluar su comportamiento. Se utilizó un medio de cultivo denominado SWES (*seawater + soil extract + salts*), el cual a diferencia del f/2, es de elaboración sencilla y menos costoso, debido a que no requiere de la incorporación de vitaminas ni buffers y presenta molaridades de sales elevadas.

El cultivo de *N. oceanica* CCALA 978 en medio SWES presentó una extensión de la fase exponencial (16 días), en relación con las experiencias de cultivo en laboratorio con medio f/2. Esta prolongación de la fase exponencial podría estar relacionada con el mayor contenido de nitratos (aproximadamente el doble) que posee el medio SWES con respecto al f/2, aún cuando a partir del día 7 se observó un consumo total de los nitratos disueltos en el medio de cultivo en el fotobiorreactor. Las células de *N. oceanica* CCALA 978 tendrían la capacidad

de utilizar el nitrógeno intracelular, como ha sido indicado para otras cepas de *N. oceanica* por Pal *et al.* (2011) y Solovchenko *et al.* (2014) y para otras especies de microalgas (Tonon *et al.* 2002; Pruvost *et al.* 2009 y Zhu *et al.* 2011). Sin embargo, este crecimiento sostenido estuvo acompañado por velocidades de crecimiento muy bajas ( $0,14 \text{ div d}^{-1}$ ), alcanzando un valor máximo de biomasa de ca.  $1 \text{ g L}^{-1}$ . Estos resultados estarían indicando que la intensidad de luz provista por el fotobiorreactor, teniendo en cuenta su diámetro (25 cm) y el volumen del cultivo, no fue suficiente para obtener una máxima actividad fotosintética. Además, en cultivos microalgales densos, como el de *N. oceanica* CCALA 978, si bien se logró una buena homogeneización a través del sistema de mezclado utilizado, la penetración de la luz también pudo haber sido impedida por la sombra generada por las propias células (Solomon 1986), ya que en algunos cultivos microalgales se ha estimado que la luz sólo penetra en 1-2 mm más allá de la superficie, de manera que la zona fótica representa sólo una pequeña fracción (10-30%) del volumen total del cultivo (Contrera Flores *et al.* 2003). Mayores valores de producción y productividades de biomasa fueron reportados en otras especies de *Nannochloropsis* creciendo con intensidades de luz más altas y con otros diseños de fotobiorreactores (Zoy y Richmond 1999; Richmond y Chen-Wu 2001; Sandnes *et al.* 2005; Rodolfi *et al.* 2009). Particularmente, Sandnes *et al.* (2005) informaron para otra cepa de *N. oceanica* valores máximos de producción de biomasa ( $4 \text{ g L}^{-1}$ ) y de productividad de biomasa ( $0,7 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), muy superiores a los registrados en este estudio. Sin embargo, en este caso, los cultivos se realizaron en fotobiorreactores tubulares de 3 cm de diámetro, con una intensidad de luz de  $1030 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  y luz continua. Rodolfi *et al.* (2009) cultivaron a *Nannochloropsis* sp. F&M-M24 en un fotobiorreactor plano con una fuente de luz continua, provista desde ambos lados y a dos intensidades lumínicas, 115 y  $230 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Estos autores obtuvieron productividades de biomasa que oscilaron entre  $0,61$  y  $1,45 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , observando un incremento de la productividad bajo la intensidad de luz más alta. Por su parte, Zou y Richmond (1999) y Richmond y Cheng-Wu (2001) han indicado intensidades de luz óptimas para el crecimiento de *Nannochloropsis* sp. en biorreactores a cielo abierto de 500 a  $2100 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . De acuerdo a Javanmardian y Palsson (1991), altas densidades celulares solo son posibles mediante una combinación de alta intensidad de luz, una trayectoria de la luz pequeña (1-5 cm) y un mezclado

vigoroso. De la misma forma, Contreras-Flores *et al.* (2003) recomiendan utilizar rutas luminosas de menos de 10 cm en cualquier tipo de fotobiorreactor.

La acumulación de oxígeno disuelto también puede representar un obstáculo para el crecimiento de las microalgas. Altos niveles de oxígeno disuelto en el medio de cultivo causan inhibición de la fotosíntesis (Camacho *et al.* 1999). Sin embargo, en este estudio los valores de oxígeno disuelto (0,4 - 5,7 mg L<sup>-1</sup>) siempre se encontraron muy por debajo de los indicados como letales. Además, el pH fue otro parámetro controlado y mantenido a 7-8.

Si bien el principal objetivo de este estudio fue evaluar el crecimiento y la producción de biomasa de *N. oceanica* CCALA 978, con el objeto de utilizarla como inóculo para mayores volúmenes de cultivos en piletas tipo *raceway*, también se evaluó la producción lipídica y la calidad de la materia prima obtenida en medio SWES. Con respecto al contenido de lípidos, éstos fueron inferiores a los reportados en laboratorio con medio f/2, bajo las mismas condiciones de cultivo, registrándose un valor máximo de lípidos totales y neutros de ca. 26 y 21% ps, respectivamente. Estos resultados estuvieron en concordancia con las señales de fluorescencia de LN registradas y el índice IFR-LN:IFR-Cloa, el cual se mantuvo por debajo de 0,5 durante los 28 días de cultivo. Paralelamente con ello, se observó un incremento marcado del contenido de clorofila *a* durante los primeros días de cultivo, el cual se mantuvo relativamente estable prácticamente hasta el final de la experiencia, al igual que lo observado en el contenido volumétrico de este pigmento. Estos resultados claramente indican que luego de 28 días de cultivo, las células de *N. oceanica* CCALA 978 no lograron estresarse. Como se mencionó anteriormente, el empleo del medio de cultivo SWES, con alto contenido de nitrógeno, prolongaría la fase exponencial de crecimiento, retrasando así la acumulación de lípidos. Con respecto a otras cepas de *N. oceanica* creciendo en fotobiorreactores, no han sido informados hasta el momento contenidos de lípidos y productividades lipídicas (Sandnes *et al.* 2005).

La composición de ácidos grasos en *N. oceanica* CCALA 978 creciendo en el fotobiorreactor con medio SWES se correspondió con la indicada para la misma cepa creciendo en medio f/2 en laboratorio. Los AGS y AGM se encontraron en similares proporciones, mientras que los AGP representaron ca. 14 % en la fracción de lípidos neutros. Sin embargo, en esta experiencia se obtuvo un contenido de glicolípidos más alto que el reportado en experiencias de laboratorio (ca. 15%) y una cantidad de ácido ecosapentaenoico relativamente alta en esta

fracción (ca. 11%) (Tabla 6.1), lo cual reforzaría la idea de que el medio SWES permite un crecimiento sostenido por mayor tiempo, en desmedro de la acumulación de lípidos.

De acuerdo con la información obtenida en esta experiencia preliminar de cultivo de *N. oceanica* CCALA 978 en un fotobiorreactor columnar, se desprende que: a) se logró alcanzar un inóculo adecuado para volúmenes funcionales de 300 litros en piletas tipo *raceway* y b) para lograr mejores rendimientos de biomasa, con el objeto de utilizarla como inóculo para mayores volúmenes de cultivo, resulta indispensable emplear intensidades de luz más altas que la utilizada en este estudio, que permitan un ingreso y distribución homogéneos de la luz en toda la superficie del cultivo.

## 6.6 Conclusiones

Se realizó una experiencia de crecimiento de *N. oceanica* CCALA 978 en un fotobiorreactor columnar, los resultados indican que el medio SWES utilizado en el cultivo favoreció un crecimiento sostenido de la cepa, permitiendo obtener inóculos adecuados para volúmenes funcionales de 300 litros en cultivos en dos etapas. Los cultivos podrían ser cosechados al final de la fase exponencial en el fotobiorreactor, con el fin de obtener inóculos fisiológicamente activos. Con ello se lograría 1) un incremento inicial de biomasa en el *raceway* y 2) una disminución de los tiempos de transferencia en el proceso de escalado. Sin embargo, para maximizar la producción de biomasa del inóculo, para mayores volúmenes de cultivo, la intensidad de luz empleada y el diseño del fotobiorreactor constituyeron un obstáculo. Con el objeto de obtener una mejor utilización de la luz incidente y una máxima actividad fotosintética para incrementar la producción de biomasa, se plantea la necesidad de realizar nuevas experiencias con mayores intensidades lumínicas ( $1500 - 2000 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y en fotobiorreactores planos o tubulares, cuyo reducido espesor permite una eficiente disponibilidad de la luz.

También se desprende de este estudio que el medio de cultivo no influye significativamente en la composición de los ácidos grasos de los lípidos acumulados.

Es importante resaltar que este estudio ha sido una experiencia preliminar de cultivo, siendo indispensable el empleo de un modelo estadístico y su correspondiente diseño experimental para arribar a conclusiones precisas acerca del crecimiento de *N. oceanica* CCALA 978 en fotobiorreactores.

## **ANEXO**

**Tabla A6.1:** Composición de ácidos grasos de *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 cultivada en un fotobiorreactor columnar. LN: lípidos neutros; GL: glicolípidos; FL: fosfolípidos; AG: ácidos grasos, AGS: ácidos grasos saturados; AGM: ácidos grasos monoinsaturados; AGP: ácidos grasos poliinsaturados. Los valores representan el promedio  $\pm$  desvío estándar de cuatro réplicas.

AG	Fracciones lipídicas		
	LN	GL	FL
<b>AGS</b>			
<b>C6:0</b>	nd	nd	nd
<b>C8:0</b>	nd	nd	nd
<b>C10:0</b>	nd	nd	nd
<b>C11:0</b>	nd	nd	nd
<b>C12:0</b>	0,35 (0,01)	nd	0,40 (0,03)
<b>C13:0</b>	nd	nd	nd
<b>C14:0</b>	6,19 (0,08)	5,11 (0,03)	9,05 (0,10)
<b>C15:0</b>	0,40 (0,00)	0,28 (0,01)	0,44 (0,01)
<b>C16:0</b>	34,24 (0,04)	33,99 (0,01)	44,69(0,17)
<b>C17:0</b>	0,39 (0,00)	0,18 (0,00)	nd
<b>C18:0</b>	1,55 (0,02)	1,46 (0,07)	3,29 (0,05)
<b>C20:0</b>	nd	nd	nd
<b>C21:0</b>	nd	nd	nd
<b>C22:0</b>	nd	nd	nd
<b>C23:0</b>	nd	nd	nd
<b>AGM</b>			
<b>C14:1</b>	nd	nd	nd
<b>C15:1</b>	nd	nd	nd
<b>C16:1</b>	27,85 (0,07)	9,43 (0,05)	18,00(0,13)
<b>C17:1</b>	nd	nd	nd
<b>C18:1n9t</b>	nd	nd	nd
<b>C18:1n9c</b>	14,11 (0,07)	18,14 (0,09)	5,32 (0,15)
<b>C20:1</b>	nd	nd	nd
<b>C22:1n9</b>	nd	nd	nd
<b>C24:1</b>	nd	nd	nd
<b>AGP</b>			
<b>C18:2n6t</b>	nd	nd	nd
<b>C18:2n6c</b>	5,93 (0,03)	11,23 (0,01)	3,65 (0,13)
<b>C18:3n6</b>	nd	0,56 (0,03)	nd
<b>C18:3n3</b>	0,26 (0,01)	nd	nd
<b>C20:2</b>	0,34 (0,00)	nd	nd
<b>C20:3n6</b>	0,10 (0,00)	0,26 (0,02)	nd
<b>C20:4n6</b>	2,05 (0,02)	6,26 (0,01)	1,59 (0,06)
<b>C20:5n3</b>	5,90 (0,04)	11,66 (0,21)	13,57(0,09)
<b>C22:2</b>	nd	nd	nd
<b>C22:6n3</b>	nd	nd	nd
<b>AGS(%)</b>	43,13 (0,11)	41,02 (0,04)	57,87(0,22)
<b>AGM(%)</b>	42,27 (0,05)	27,57 (0,06)	50,01(0,06)
<b>AGP(%)</b>	14,59 (0,09)	29,97 (0,24)	18,80(0,19)

## Síntesis y Conclusiones Generales

En los últimos años las microalgas han recibido considerable atención en el sector energético, como un recurso de biomasa alternativo y potencial para la producción de biodiesel de tercera generación, para complementar o eventualmente reemplazar los combustibles fósiles. En esta Tesis se evaluó el potencial de una cepa marina nativa del género *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) como materia prima para la producción de biodiesel.

La cepa en estudio se identificó como *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978, a través de su caracterización morfológica y molecular. El empleo de cepas nativas posee la ventaja de que las especies se encuentran adaptadas a las condiciones locales, característica importante en el momento de llevar a cabo cultivos a cielo abierto.

En segundo término, los estudios apuntaron a la optimización del monitoreo rápido y eficiente del estado fisiológico de los cultivos de *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978. Teniendo en cuenta el pequeño tamaño de la especie, la obtención de un modelo para estimar la densidad celular a partir de mediciones de densidad óptica resultó un método efectivo para monitorear su crecimiento en forma rápida. Además, debido a la gruesa y resistente pared celular de *N. oceanica* CCALA 978, la técnica de metanol combinado con el congelado-descongelado rápido de las muestras para la determinación de la concentración de pigmentos fotosintéticos y el uso del fluorocromo rojo Nilo asistido con dimetilsulfóxido para la detección rápida del contenido de lípidos neutros, resultaron dos métodos efectivos. Adicionalmente, mediciones de clorofila *a* y de fluorescencia con rojo Nilo permitieron obtener una estimación rápida y simultánea del momento de acumulación máxima de lípidos neutros y el menor tiempo requerido para la cosecha de la biomasa.

El análisis del efecto de distintas condiciones ambientales (temperatura [15°C y 25°C], intensidad de luz [100 y 300  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ] y fotoperiodo [12:12 h y 16:8 h de luz y oscuridad) y de la carencia de nitrógeno sobre parámetros de crecimiento, producción y productividad de biomasa, cantidad y productividad lipídica y la composición de los ácidos grasos en *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978, representaron una importante contribución al conocimiento del comportamiento de la especie en estudio. El efecto de las variables ambientales sobre el crecimiento indicó que a mayor temperatura (25° C), mayor intensidad de

luz ( $300 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) y con un fotoperíodo de 16:8 h L:O, *N. oceanica* CCALA 978 mostró un aumento de la velocidad de crecimiento ( $0,85 \text{ div d}^{-1}$ ). Sin embargo, la producción de biomasa ( $680 \text{ mg L}^{-1}$ ), no presentó diferencias significativas en respuesta a las dos intensidades de luz utilizadas. Por lo tanto, con el objeto de incrementar el rendimiento de biomasa, se plantea la necesidad de realizar nuevas experiencias de cultivo con intensidades de luz superiores a las empleadas en este estudio.

El contenido de lípidos totales (LT) fue en general alto bajo todas las condiciones ambientales empleadas (24-34% peso seco de biomasa [ps]), conteniendo una alta proporción de los lípidos neutros (LN), materia prima ideal para la producción de biodiesel, los cuales representaron entre el 82 y 91% de los LT. Sin embargo, los mayores contenidos lipídicos se obtuvieron, cuando las células crecieron en un medio de cultivo carente de nitrógeno (LT: 36% ps y LN: 32% ps), independientemente de la intensidad lumínica empleada. Esto indicaría que en el rango de las intensidades de luz utilizadas, la combinación de privación de nitrógeno junto con la alta intensidad de luz no fue un factor de estrés que maximice la producción de lípidos neutros. Bajo estas condiciones se obtuvieron productividades de LT y LN de  $48 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  y  $43 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , respectivamente. Por lo tanto, con el objeto de incrementar las productividades lipídicas, se plantea la necesidad de llevar a cabo nuevas estrategias de cultivo tendientes a maximizar el contenido de lípidos y reducir su tiempo de acumulación.

En términos generales, los resultados obtenidos hasta el momento son promisorios. Sin embargo, resulta indispensable profundizar los estudios del comportamiento de *N. oceanica* CCALA 978 en cultivo, focalizados en la maximización de la producción de biomasa y las productividades lipídicas. Así, como experiencias a futuro, también se tendrán en cuenta la implementación de cultivos en modo continuo, actualmente propuestos por varios autores para incrementar los rendimientos de biomasa y lípidos, pero aún no explorados en detalle en el género *Nannochloropsis*.

Con respecto a la composición de los ácidos grasos en la materia prima obtenida, es importante indicar que los perfiles de ácidos grasos fueron similares en todas las condiciones de cultivo probadas, tanto en los lípidos totales como en los lípidos neutros, siendo los principales ácidos grasos el ác. palmítico (C16:0), el ác. palmitoleico (C16:1), el ác. oleico (C18:1n9c) y el ác. eicosapentaenoico

(C20:5n3). Los ácidos grasos saturados (AGS) y monoinsaturados (AGM) fueron las clases mayoritarias dentro de los LN, bajo todas las condiciones testeadas, representando entre el 90-96% de los ácidos grasos totales. Los AGS aumentaron a 25°C, 16:8 h L:O y 300  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , mientras que los AGM disminuyeron en respuesta a estas variables. Es destacable el alto contenido de AGM (ca. 45-55%), los cuales le confieren al biodiesel un balance razonable entre las propiedades de flujo en frío, la estabilidad oxidativa y las propiedades de combustión. Los ácidos grasos poliinsaturados (AGP) fueron la fracción minoritaria en todas las condiciones de cultivo testeadas.

En relación a los parámetros de calidad del aceite, el índice de Yodo, el número de cetano y el contenido de ácido linolénico estuvieron dentro de los límites establecidos por los estándares de calidad europeo EN14214. El contenido de ácidos poliinsaturados con más de 4 dobles enlaces excedió el límite de 1% establecido por el estándar de calidad. Sin embargo, la baja estabilidad oxidativa podría mejorarse mediante el uso de aditivos o mezclas con otros aceites. Los resultados obtenidos permiten inferir que los aceites de *N. oceanica* CCALA 978 se presentan como una materia prima adecuada para la producción de biodiesel.

En la experiencia de cultivo de *N. oceanica* CCALA 978 en el fotobiorreactor columnar, el medio SWES favoreció un crecimiento sostenido de la cepa, alcanzando un valor de biomasa de 1,11 g L<sup>-1</sup>. Este valor de biomasa representa un inóculo adecuado para volúmenes funcionales de 300 litros en cultivos en dos etapas. Sin embargo, la intensidad de luz empleada y el diseño del fotobiorreactor constituyeron un impedimento para maximizar la producción de biomasa. Por lo tanto, con el objeto de incrementar los rendimientos de biomasa, y con el fin utilizarla como inóculo para mayores volúmenes de cultivo en piletas tipo *raceway*, se plantea la necesidad de realizar nuevas experiencias de cultivo con mayores intensidades lumínicas (1500 - 2000  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y otros diseños de fotobiorreactores (planos o tubulares), que permitan una eficiente disponibilidad de la luz.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la presente Tesis, se concluye que la cepa nativa oleaginosa *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978 constituye una fuente potencialmente útil de aceites para procesos de producción de biodiesel. Además, la información derivada en este trabajo representa el punto de partida para la implementación de nuevas estrategias de cultivos de la especie con fines bioenergéticos en nuestro país.

## Referencias

- Abd El Baky H. H., El-Baroty G. S., Bouaid A. (2014). Lipid induction in *Dunaliella salina* culture aerated with various levels CO<sub>2</sub> and its biodiesel production. *J. Aquac. Res. Development*. 5: 2-6.
- Acien-Fernandez F.G., Fernandez Sevilla J.M., Molina Grima E. (2013). Photobioreactors for the production of microalgae. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 12: 131-151.
- Ahmad A. L., Yasin N. H., Derek C. J. C., Lim J. K. (2011). Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: a review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 15: 584-593.
- Alonzo F., Mayzaud P. (1999). Spectrofluorometric quantification of neutral and polar lipids in zooplankton using Nile red. *Mar. Chem.* 67: 289–301.
- Andersen R., Brett R., Potter D., Sexton J. (1998). Phylogeny of the Eustigmatophyceae based upon 18S rDNA, with emphasis on *Nannochloropsis*. *Protist.* 149: 61-74.
- Atabani A.E., Irfan A.B., Masjuki H.H., Chong W.T., Mahlia T.M.I., Lee Teong K. (2013). Investigation of physical and chemical properties of potential edible and non-edible feedstocks for biodiesel production, a comparative analysis. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 21:749–755.
- Autino H. C. (2009). Desgomado. En: Block J. M., Arellano D. B. (Eds.) *Temas Selectos en Aceites y Grasas, Vol 1-Procesamiento*. pp 97-142.
- Axelsson M., Gentili F. (2014). A single-step method for rapid extraction of total lipids from green microalgae. *PLOS one.* 9: 1-6.
- Balat M. (2011). Potential alternatives to edible oils for biodiesel production—a review of current work. *Energ. Convers. Manag.* 52: 1479–1492.
- Balat M., Balat H. (2010). Progress in biodiesel processing. *Appl. Energy.* 87: 1815-1835.
- Benemann J. R. (2000). Hydrogen production by microalgae. *J. Appl. Phycol.* 12:291-300.
- Benemann J., Woertz I., Lundquist T. (2012). Life cycle assessment for microalgae oil production. *Disrupt. Sci. Technol.* 1:68–78.
- Berge J.P., Gouygou J.P., Dubacq J.P., Durand P. (1995). Reassessment of lipid composition of the diatom *Skeletonema costatum*. *Phytochem.* 39: 1017-1021.
- Bhaskar T., Bhavya B., Singh R., Naik D.V., Kumar A., Goyal H. (2011). Thermochemical conversion of biomass to biofuels. En: Pandey A., Larroche C., Ricke S.C., Dussap C-G., Gnansounou E. (Eds). *Biofuels: alternative feedstock and conversion processes*. Elsevier, Amsterdam, pp 51-77.
- Bi Z., He B. (2013). Characterization of microalgae for the purpose of biofuels production. *Trans. ASABE.* 56: 1529-1539.
- Bligh E.G., Dyer W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911–915.
- Bondioli P., Della Bella L., Rivolta G., Chini Zittelli G., Bassi N., Rodolfi L., Casini D., Prussi M., Chiaramonti D., Tredici M. R. (2012). Oil production by the marine microalgae *Nannochloropsis* sp. F&M-M24 and *Tetraselmis suecica* F&M-M33. *Biores. Technol.* 114: 567-672.
- Bongiovani N., Popovich C., Martinez A.M., Freije H., Constenla D., Leonardi P. (2013). In vivo measurements to estimate culture status and neutral lipid accumulation in *Nannochloropsis oculata* CCALA 978: implications for biodiesel oil studies. *Algal. Stud.* 142: 3-16.

- Bongiovani N., Sánchez Puerta M.V., Popovich C., Leonardi P. (2014). Molecular and phylogenetic identification of an oil-producing strain of *Nannochloropsis oceanica* (Eustigmatophyceae) isolated from the southwestern Atlantic coast (Argentina). *Rev. Biol. Mar. Oceanog.* 49: 615-623.
- Borowitzka M. (1992). Algal biotechnology products and processes: matching science and economics. *J. Appl. Phycol.* 4: 267-279.
- Borowitzka M. (1999). Economic evaluation of microalgal processes and products. En: Cohen Z. (Ed.) *Chemicals from microalgae*. Taylor & Francis, London. pp. 387-409.
- Borowitzka M. (2005). Carotenoid production using microorganisms. En: Cohen Z, Ratledge C (Eds.) *Single cell oils*. AOCS Press, Champaign, Illinois. pp 124-137.
- Borowitzka M. (2010). Algae oils for biofuels: chemistry, physiology, and production. En: Cohen Z., Ratledge C. (Eds.) *Single cell oils. Microbial and algal oils*. AOCS Press, Champaign, Illinois. pp 271-289.
- Borowitzka M. (2013)a. High- value products from microalgae: their development and commercialization. *J. Appl. Phycol.* 25:743-756.
- Borowitzka M. (2013)b. Energy from microalgae: a short history. En: Borowitzka M., Moheimani N. R. (Eds.) *Algae for Biofuels and Energy*. Springer, The Netherlands. pp 1-15.
- Borowitzka M.; Moheimani N. (2013). Sustainable biofuels from algae. *Mitig. Adapt. Strateg. Glob. Change.* 18:13-25.
- BP (2013). British Petroleum: Statistical review of World Energy.
- Brennan L., Owende P. (2010). Biofuels from microalgae – a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sustain. Energy. Rev.* 14: 557-77.
- Briassoulis D., Panagakakis P., Chionidis M., Tzenos D., Lalos A., Tsinos C., Berberidis K., Jacobsen A. (2010). An experimental helical-tubular photobioreactor for continuous production of *Nannochloropsis* sp. *Biores. Technol.* 101: 6768-6777.
- Brzezinski M., Reed D., Amsler C. (1993). Neutral lipids as major storage products in zoospores of the giant-kelp *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyceae). *J. Phycol.* 29: 16-23.
- Camacho F., Ación F.G., Sánchez J.A., García F., Molina E. (1999). Prediction of dissolved oxygen and carbon dioxide concentration profiles in tubular photobioreactors for microalgal culture. *Biotechnol. Bioeng.* 62: 71-85.
- Canoira L., Alcantara R., Garcia-Martinez J., Carrasco J. (2006). Biodiesel from Jojoba oil wax: transesterification with methanol and properties as a fuel. *Biomass Bioenerg.* 30:76-81.
- Cantrell K.B., Ducey T., Ro K.S., Hunt P.G. (2008). Livestock waste-to-bioenergy generation opportunities. *Biores. Technol.* 99: 7941-7953.
- Cao S., Zhang X., Fan X., Qiao H., Liang C., Xu D., Mou S., Wang W., Ye N. (2013). Phylogeny and characterization of *Nannochloropsis oceanica* var. *sinensis* var. nov. (Eustigmatophyceae), a new oleaginous alga from China. *Phycologia.* 52: 573-577.
- Carpinelli E.C., Telatin A., Vitulo N., Forcato C., D'Angelo M., Schiavon R., Vezzi A., Giacometti G.M., Morosinotto T., Valle G. (2013). Chromosome scale genome assembly an transcriptome profiling of *Nannochloropsis gaditana* in nitrogen depletion. *Molec. Plant.* 6: 323-335.
- Carvalho A. P., Meireles L. A., Malcata F. X. (2006). Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnol. Prog.* 22: 1490-1506.

- Castell L.L., Mann R. (1994). Optimal staining of lipids in bivalve larvae with Nile red. *Aquaculture*. 119: 89–100.
- Chen W., Zhang C., Song L., Sommerfield, M., Hu, Q. (2009). A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *J. Microbiol. Meth.* 77: 41-47.
- 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: 35–49.
- Chini Zitelli G., Rodolfi L., Bassi N., Biondi N., Tredici M.R. (2013)b. Photobioreactors for microalgal biofuel production. En: Borowitzka M. A., Moheimani N. R. (Eds.) *Algae for biofuels and energy, developments in applied phycology 5*. Springer. The Netherlands. pp. 115-131.
- Chini Zittelli G., Biondi N., Rodolfi L., Tredici M.R (2013)a. En: Richmond A., Hu Q. (Eds.) *Photobioreactors for mass production of microalgae*. En: *Handbook of microalgae culture: Applied Phycology and Biotechnology*. Wiley-Blackwell. London, United Kingdom. pp. 225-266.
- Chini Zittelli G., Lavista F., Bastiniani A., Rodolfi L., Vincenzini M., Tredici M. (1999). Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp., cultures in outdoor tubular photobioreactor. *J. Biotechnol.* 70: 299-312.
- Chini Zittelli G., Pastorelli R., Tredici M.R. (2000). A modular flat panel photobioreactor (MFPP) for indoor mass cultivation of *Nannochloropsis* sp. under artificial illumination. *J. Appl. Phycol.* 12: 521–526.
- Chini Zittelli G., Rodolfi L., Tredici, M.R. (2003). Mass cultivation of *Nannochloropsis* sp. in annular reactors. *J. Appl. Phycol.* 15: 107–114.
- Chisti Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25: 294–306.
- Chisti Y. (2008). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol.* 26: 126-131.
- 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. *Biores. Technol.* 100: 833-838.
- Contreras Flores C., Peña castro J.M., Flores Cotera L.B., Canizares Villanueva R.O. (2003). Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia*. 28: 450-456.
- Converti A., Casazza A.A., Ortiz E.Y., Perego P., Del Borgui M. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chorella vulgaris* for biodiesel production. *Chem. Eng. Process.* 48: 1146-1151.
- Cooksey K.E., Guckert J.B., Williams S., Callis, P.R. (1987). Fluorometric determination of the neutral lipid content of microalgal cells using Nile red. *J. Microbiol. Meth.* 6: 333–345.
- Costa J. A. V., De Morais M. G. (2011). The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. *Biores. Technol.* 102: 2-9.
- Curtis P. J., Megard R. O. (1987). Interactions among irradiance, oxygen evolution and nitrite uptake by *Chlamydomonas* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 23: 608-613.
- Damiani M., Leonardi P., Pieroni O., Cáceres E. (2006). Ultrastructure of the cyst wall of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae): wall development and behavior cyst germination. *Phycol.* 45: 616-623.

- Damiani M., Popovich C., Constenla D., Martínez A. M., Doria E., Longoni P., Cella R., Nielsen E., Leonardi P. (2014). Triacylglycerol content, productivity and fatty acid profile in *Scenedesmus acutus* PVUW12. *J. Appl. Phycol.* 26: 1423-1430.
- Damiani M.C., Popovich C.A., Constenla D., Leonardi P.I. (2010). Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as biodiesel feedstock. *Biores. Technol.* 101: 3801–3807.
- De la Jara A., Mendoza H., Martel A., Molina C., Nordstron L., de la Rosa V., Diaz R. (2003). Flow cytometric determination of lipid content in a marine dinoflagellate, *Cryptothecodinium cohnii*. *J. Appl. Phycol.* 15: 433–438.
- de Vries S.C., van de Ven G.W.J., van Ittersum M.K., Giller K.E. (2010). Resource use efficiency and environmental performance of nine major biofuel crops, processed by first-generation conversion techniques. *Biomass Bioenerg.* 34: 588-601.
- Demirbas A. (2009). Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energy Convers. Managem.* 50: 14-34.
- Demirbas A., Demirbas M. F. (2010). *Algae Energy: Algae as a new source of biodiesel.* Springer. 204 pp.
- Demirbas M. F; Balat M., Balat H. (2009). Potential contribution of biomass to the sustainable energy development. *Energ. Convers. Manage.* 50: 1746-1760.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. (2008). InfoStat, versión 2008. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Doan T., Obbard J.P. (2011). Improved Nile Red staining of *Nannochloropsis* sp. *J. Appl. Phycol.* 23: 895-901.
- Dong H.P., Williams E., Whang D., Zhang X., Hsia R., Jenck A., Halden R., Li J., Cheng F. Place A. R. (2013). Responses of *Nannochloropsis oceanica* IMET1 to long-term nitrogen starvation and recovery. *Plant Physiol.* 162: 1110- 1126.
- Dote Y., Sawayama S., Inoue S., Minowa T., Yokoyama S-Y. (1994). Recovery of liquid fuel from hydrocarbon-rich microalgae by thermochemical liquefaction. *Fuel.* 73: 1855-1857.
- Dragone G, Fernandes B, Vicente A, Teixeira JA. (2010). Third generation biofuels from microalgae. En: Vilas A.M. (Ed) Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology. Badajoz: Formatex Research Center. pp. 1355-1366.
- Droop M. (1955). Some new supra-littoral Protista. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom.* 34: 233-245.
- Durrett T., Benning, C., Ohlrogge, J. (2008). Plant triacylglycerols as feedstocks for the production of biofuels. *Plant Journal.* 54: 593–607.
- Emil A., Zahira Y., Siti K.K., Manal I., Jumat S. (2009). Characteristic and composition of *Jatropha curcas* and its potential as biodiesel feedstock. *Eur. J. Sci. Res.* 29: 396-403.
- Elsley D., Jameson D., Raleigh B., Cooney M.J. (2007). Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids. *J. Microbiol. Meth.* 68: 639-642.
- Eltgroth M.L., Watwood, R.L. and Wolfe, G.V. (2005). Production and cellular localization of neutral long-chain lipids in the haptophyte algae *Isochrysis galbana* and *Emiliania huxleyi*. *J. Phycol.* 41: 1000–1009.
- Evans C.T., Ratledge C., Gilbert S.C. (1985). A rapid screening method for lipid accumulating yeast using a replica-printing technique. *J. Microbiol. Meth.* 4: 203–210.
- Fabregas J., Maseda A., Dominguez A., Otero A. (2004). The cell composition of *Nannochloropsis* sp., changes under irradiances in semicontinuous culture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20: 31-35.

- Falkowski P.G., Raven J.A. (1997). Aquatic photosynthesis. London: Blackwater Science. pp 375.
- Fawley K., Fawley M. (2007). Observations on the diversity and ecology of freshwater *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) with descriptions of new taxa. *Protist*. 158: 325-336.
- Ferreira M., Coutinho P., Seixas P., Fábregas J., Otero A. (2009). Enriching rotifers with “premium” microalgae. *Nannochloropsis gaditana*. *Mar. Biotechnol.* 11: 585-595.
- Fietz S., Bließ 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: 780-790.
- Firestone D. (2010). Official methods and recommended practices of AOCS. Illinois: The American Oil Chemist’s Society, AOCS, Champaign, IL.
- Fisher T., Berner T., Iluz D., Dubinsky Z. (1998). The kinetics of the photoacclimation response of *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae): a study of changes in ultrastructure and PSU density. *J. Phycol.* 34: 318-324.
- Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497–509.
- Francisco E.C., Neves D.B., Jacob-Lopes E., Franco T.T. (2010). Microalgae as feedstock for biodiesel production: carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85: 395–403
- Gelin F., Boogers I., Noordeloos A.A.M., Sinninghe Damsté J.S., Riegman R., de Leeuw J.W. (1997). Resistant biomacromolecules in marine microalgae of the classes Eustigmatophyceae and Chlorophyceae: Geochemical implications. *Org. Geochem.* 26: 659-675.
- Genicot G., Leroy J.L.M.R., Van Soom A. (2005). The use of a fluorescent dye, Nile red, to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes. *Theriogenology*. 63: 1181–1194.
- Ghirardi M.L., Zhang L., Lee J.W., Flynn T., Seibert M., Greenbaum E. (2000). Microalgae: a green source of renewable H<sub>2</sub>. *Trends Biotechnol.* 18: 506–511.
- Gitelson A., Grits Y., Etzion D., Ning Z., Richmond A. (2000). Optical properties of *Nannochloropsis* sp. and their application to remote estimation of cell mass. *Biomol. Eng.* 69: 516-525.
- Gladu P.K., Patterson G.W. (1995). Some biochemical characteristics of UTEX 2341, a marine eustigmatophyte identified previously as *Chlorella minutissima* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 31: 774–777.
- Gomez L.D., Clare G.S., McQueen-Mason J. (2008). Sustainable liquid biofuels from biomass: the writing’s on the walls. *New Phytol.* 178: 473-485.
- Gouveia L., Oliveira A.C. (2009). Microalgae as a raw material for biofuels production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 269–274.
- Greenspan P., Fowler S.D. (1985). Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red. *J. Lipid Res.* 26: 781–788.
- Griffiths M. J., & Harrison S. T. (2009). Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J. Appl. Phycol.* 21: 493-507.
- Griffiths M.J., Garcin C., van Hille R.P., Harrison S.T.L. (2011). Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *J. Microbiol. Meth.* 84: 119-123.

- 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: 989-1001.
- Grobbelaar J.U. (2014). Inorganic algal nutrition. En: Richmond A., Hu Q. (Eds.) Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology. Wiley-Blackwell. United Kingdom. pp 123-133.
- Gu N., Lin Q., Li G. Qin G., Lin J., Huang L. (2012). Effect of salinity change on biomass and biochemical composition of *Nannochloropsis oculata*. *J. World Aquacult. Soc.* 43: 97-106.
- Guilford W. J., Schneider D. M., Labovitz J., Opella S. J. (1998). High resolution solid state <sup>13</sup>C NMR spectroscopy of sporopollenin from different plants taxa. *Plant Physiol.* 86: 134-136.
- Guillard R. R. L. (1973). Division rates. En: Stein J. R. (Ed.) Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge University Press, Cambridge. United Kingdom. pp. 289-311.
- Gurr M. I., Harwood J. L., Frayn K. N. (2002). Lipid biochemistry. Oxford: Blackwell Science. pp 247
- Guschina I. A., Harwood J. L. (2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog. Lipid Res.* 2: 160-186.
- Guschina I.A., Harwood J.L. (2013). Algal lipids and their metabolism. En: Borowitzka M.A., Moheimani N.R. (Eds.) Algae for biofuels and energy, developments in applied phycology. Springer. The Netherlands. pp. 17-36.
- Hankamer B., Lehr F., Rupprecht J. Mussgnug J.H., Posten C., Kruse O. (2007) Photosynthetic biomass and H<sub>2</sub> production: from bioengineering to bioreactor scale up. *Physiol. Plantarum.* 131:10–21.
- Harwood J. L., Guschina I. A. (2009). The versatility of algae and their lipid metabolism. *Biochimie.* 91: 679-684.
- Harwood J.L. (1998). Membrane lipids in algae. En: Siegenthaler P.A., Murata N. (Eds.) Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. pp. 53–64.
- Henley W. J., Major K. M., Hironaka J. L. (2002). Response to salinity and heat stress in two halotolerant Chlorophyte algae. *J. Phycol.* 38: 757-766.
- Henriques M., Silva A., Rocha J. (2007). Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. En Méndez-Vilas, (Ed.) Wiley-VCH, pp. 586-593.
- Hibberd D. (1980). Eustigmatophytes. En: Cox E. (Ed.) Phytoflagellates: developments in marine biology. Elsevier, New York, pp 319–334.
- Hibberd D. J. (1981). Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes Eustigmatophyceae and Tribophyceae (synonym Xanthophyceae). *Bot. J. Linnean Soc.* 82: 93-119.
- Hirano A., Ueda R., Hirayama S., Ogushi Y. (1997). CO<sub>2</sub> fixation and ethanol production with microalgal photosynthesis and intracellular anaerobic fermentation. *Energy.* 22: 137–142.
- Hodgson P, Henderson R, Sargent J, Leftley J. (1991). Patterns of variation in the lipid class and fatty acid composition of *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) during batch culture. *J. Appl. Phycol.* 3: 169–181.
- Hu J., Wang D., Li J., Jing G., Ning K., Xu J. (2014). Genomewide identification of transcription factors and transcription-factor binding sites in oleaginous microalgae *Nannochloropsis*. *Nature. Scientific Report.* 4: 5454-5464.

- Hu Q. (2014). Environmental effects on cell composition. En: Richmond A., Hu Q. (Eds.) Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology. Wiley-Blackwell. United Kingdom. pp. 114-122.
- 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. *The Plant J.* 54: 621-639.
- Huang G., Chen G., Chen F. (2009). Rapid screening method for lipid production in algae based on Nile red fluorescence. *Biomass Bioenerg.* 33: 1386-1392.
- 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: 245-257.
- IEA, 2009. Bioenergy: A sustainable and reliable energy source. A review of status and prospects.
- Illman A.M., Scragg A.H., Shales S.W. (2000). Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme Microb. Technol.* 27: 631-635.
- Izard J., Limberger R.J. (2003). Rapid screening method for quantitation of bacterial cell lipids from whole cells. *J. Microbiol. Meth.* 55: 411-418.
- Jacobson M. Z. (2009). Review of solutions to global warming, air pollution, and energy security. *Energy Environ Sci.* 2: 148-173.
- James C. M., Al-Hinty S., Salman A. E. (1989). Growth and  $\omega$ 3 fatty acid and amino acid composition of microalgae under different temperature regimes. *Aquaculture.* 77: 337-351
- Janssen M., de Bresser L., Baijens T., Tramper J., Mur L.R., Snel J.F.H., Wiffels R.H. (2000). Scale-up aspects of photobioreactors: effects of mixing-induced light/dark cycles. *J. Appl. Phycol.* 12:225-237.
- Javanmardian M., Palsson B.O. (1991). High-density photoautotrophic algal cultures: design, construction, and operation of a novel photobioreactor system. *Biotechnol. Bioeng.* 38: 1182-1189.
- Jeffrey S.W. (1980). Algal pigment system. En: Falcowski P.G. (Ed.) Primary Productivity in the sea. Plenum Press, New York. pp 33-58.
- Kadam K.L. (2002). Environmental implications of power generation via coal-microalgae cofiring. *Energy.* 27:905-922.
- Karlson B., Potter D., Kuylenstierna M., Andersen R. (1996). Ultrastructure, pigment composition, and 18S rRNA gene sequence for *Nannochloropsis granulata* sp. nov. (Monodopsidaceae, Eustigmatophyceae), a marine ultraplankton isolated from the Skagerrak, northeast Atlantic Ocean. *Phycologia.* 35: 253-260.
- Khozin-Goldberg I., Cohen Z. (2006). The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochem.* 67: 696-701.
- Kimura, K., Yamaoka, M., Kamisaka, Y., 2004. Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile red fluorescence. *J. Microbiol. Meth.* 56: 331-338.
- Knothe G. (2005). Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Process. Technol.* 86: 1059-1070.
- Knothe G. (2009). "Designer" biodiesel: Optimizing fatty acid ester composition to improve fuel properties. *Energ. Fuel.* 22: 1358-1364.
- Krienitz L., Hepperle, D., Stich H-B., Weiler W. (2000). *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae), a new species of picoplankton from freshwater. *Phycologia.* 39: 219-227.

- Lang X., Dalai A.K., Bakhshi N.N., Reaney M.J., Hertz P.B. (2001). Preparation and characterization of bio-diesels from various bio-oils. *Biores. Technol.* 80: 53-62.
- Lebeau T., Robert J.M. (2003). Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part II: Current and putative products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 624-632.
- Lee R.E. (2008). Phycology. Cambridge University Press, New York, pp 577.
- Lee S.J., Yoon B.D., Oh, H.M. (1998). Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*. *Biotechnol. Tech.* 12: 553-556.
- Lehr F., Posten C. (2009). Closed photo-bioreactors as tools for biofuel production. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20: 280-285.
- Leonardi P.I., Popovich C, Damiani C. (2011). Feedstock for second- generation biodiesel: microalgae's biology and oil composition. En: Dos Santos Bernardes M.A. (Ed.) Economic effects of biofuel production. InTech Publisher, Croacia. pp 318- 346.
- Leu S., Boussiba S. (2014). Advances in the production of high-value products by microalgae. *Ind. Biotechnol.* 10: 169-183.
- Li F., Gao D., Hu H. (2014)a. High-efficiency nuclear transformation of the oleaginous marine *Nannochloropsis* species using PCR product. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* 78: 812-817.
- Li J., Han D., Wang D., King K., Jia J., Wei L., Jing X., Huang S., Chen J., Li Y., Hu Q., Xu J. (2014)b. Choreography of transcriptomes and lipidomes of *Nannochloropsis* reveals the mechanisms of oil synthesis in microalgae. *The Plant Cell.* 26: 1645-1665.
- Li S., Pan K., Zhu B., Ma X., Liang X., Yang G. (2011). Molecular identification of a species in genus *Nannochloropsis*. *J. Ocean Unic. China.* 10: 391-396
- 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: 629-636.
- Li Y., Horsman M., Wu N., Lan C.Q., Dubois-Calero N. (2008). Biofuels from microalgae. *Biotechnol. Prog.* 24: 815-20.
- Lubian L. (1982). *Nannochloropsis gaditana* sp. nov., una nueva Eustigmatophyceae marina. *Lazaroa.* 4: 287-293.
- Lubián L. M., Establier R. (1983). Variaciones cuantitativas de los pigmentos de *Nannochloropsis gaditana* durante su crecimiento. *Inv. Pesq.* 47:29-37.
- Lubian L., Establier R. (1982). Estudio comparative de la composición de pigmentos en varias cepas de *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae). *Inv. Pesq.* 46: 379-389.
- Lubian L., Montero O., Moreno-Garrido I., Huertas E., Sobrino C., González-del Valle M., Parés G. (2000). *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments. *J. Appl. Phycol.* 12: 249-255.
- Madrid R. E., Felice C. J. (2005). Microbial biomass estimation. *Crit. Rev. Biotechnol.* 25: 97-112.
- Margalef R. (1974). Producción primaria. En: Ecología. Ediciones Omega S.A. Barcelona. pp. 435-472.
- Maruyama L., Nakamura T., Matsubayashi T., Ando Y., Maeda T. (1986). Identification of the algae known as 'marine *Chlorella*' as a member of the Eustigmatophyceae. *J. Phycol.* 34: 319-325.
- Massart D. L, Vandeginste B. G. M., Buydens L. M. C., De Jong S., Lewi P. J., Smeyers-Verbeke J., (1997). Handbook of chemometrics and qualimetrics. Elsevier Science B.V, Amsterdam. pp. 171-230.

- Mata T.M., Martins A.A., Caetano N.S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14: 217–232.
- McGinnis K. M., Dempster T. A., Sommerfeld M. R. (1997). Characterization of the growth and lipid content of the diatom *Chaetoceros muelleri*. *J. Appl. Phycol.* 9: 19-24.
- McKendry P. (2002). Energy production from biomass (part 2): conversion technologies. *Biores. Technol.* 83: 47–54
- McLachland J. L. (1973). Growth media-marine. En: Stein J. R. (Ed.). Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge University Press, Cambridge, UNited Kingdom. pp. 26-47.
- Medlin L, Elwood H, Stickel S, Sogin M. (1988). The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like r RNA- coding region. *Gen.* 71: 491-499.
- Merchant S.S., Kropat J., Liu B., Shaw J., Warakanont J. (2012). TAG, you're it! *Chlamydomonas* as a reference organism for understanding algal triacylglycerol accumulation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23: 352–363.
- Meseck S.L., Alix J.H., Wikfors G.H. (2005). Photoperiod and light intensity effects on growth and utilization of nutrients by the aquaculture feed microalga, *Tetraselmis chui* (PLY429). *Aquaculture.* 246: 393-404.
- Miao X.L., Wu Q.Y., Yang C.Y. (2004). Fast pyrolysis of microalgae to produce renewable fuels. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 71: 855-863.
- Minowa T, Sawayama S. (1999). A novel microalgal system for energy production with nitrogen cycling. *Fuel.* 78:1213–1215.
- Miyamoto K., Wable O., Benemann J.R. (1988). Vertical tubular reactor for microalgae cultivation. *Biotechnol. Lett.* 10: 703-708.
- Molina Grima E., Acien-Fernandez F.G., Garcia C.F., Chisti Y. (1999). Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scale-up. *J. Biotechnol.* 70: 231-247.
- Morrison W.R., Smith L.M. (1964) Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lipid Res.* 5: 600–608
- Mutanda T., Ramesh D., Karthikeyan S., Kumari S., Anandraj A., Bux F. (2011). Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. *Biores. Technol.* 102: 57-70.
- Naik S. N., Goud V. V., Rout P. K., Dalai A. K. (2010). Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. *Renew. Sust. Ener. Rev.* 14: 578-597.
- Nigam Singh P., Singh A. (2011). Production of liquid biofuels from renewable resources. *Prog. Energ. Combust.* 37: 52-68.
- Ogbonna J. C., Tanaka H. (2000). Light requirement and photosynthetic cell cultivation: development of processes for efficient light utilization in photobioreactors. *J. Appl. Phycol.* 12: 207-218.
- Ohlrogge J., Browse J. (1995). Lipid biosynthesis. *Plant Cell.* 7: 957–970.
- Ong H.C., Silitonga A.S., Masjuki H.H., Mahlia T.M.I., Chong W.T., Boosroh M.H. (2013). Production and comparative fuel properties of biodiesel from non-edible oils: *Jatropha curcas*, *Sterculia foetida* and *Ceiba pentandra*. *Energ. Conver. Manage.* 73: 245-255.
- Ordog V., Stirk W. A., Balint P., van Stadem J., Lovász C. (2012). Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella minutissima* cultures. *J. Appl. Phycol.* 24: 907-914.
- Pal D., Khozin-Goldberd I., Cohen Z., Boussiba S. (2011). The effect of light, salinity and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90: 1429-1441.

- Pal D., Khozin-Goldberg I., Didi-Cohen S., Solovchenko A., Batushansky A., Kaye Y., Sikron N., Samani T., Fait A., Boussiba S. (2013). Growth, lipid production and metabolic adjustments in the euryhaline eustigmatophyte *Nannochloropsis oceanica* CCALA 804 in response to osmotic downshift. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 8291-8306.
- Pick U., Rachutin- Zalogin T. (2012). Kinetic anomalies in the interactions of Nile red with microalgae. *J. Microbiol. Meth.* 88: 189-196.
- Pickett- Heaps J. D. (1975). *Green Algae*. University of Colorado, Sunderland, Massachusetts. 601 pp.
- Popovich C. A., Damiani C., Constenla D., Martínez A. M., Freije H., Giovanardi M., Pancaldi S., Leonardi P. I. (2012). *Neochloris oleoabundans* grown in enriched natural seawater for biodiesel feedstock: Evaluation of its growth and biochemical composition. *Biores. Technol.* 114: 287-293.
- Pramanik K. (2003). Properties and use of *Jatropha curcas* oil and diesel fuel blends in compression ignition engine. *Renew. Energ.* 28: 239–248.
- Priscu J.C., Priscu L.R., Palmesano A.C., Sullivan C.W. (1990). Estimation of neutral lipid levels in Antarctic sea ice microalgae by Nile red fluorescence. *Antarct. Sci.* 2: 149-155.
- Pruvost J. (2011). Cultivation of algae in photobioreactors for biodiesel production. En: (Pandey A., Larroche C., Picke S.C, Dussap C.G., Gnansounou E., (eds) *Biofuels: Alternative feedstocks and conversion processes*. Elsevier, Amsterdam, pp 439-461.
- Pruvost J., Van Vooren G., Cogne, G., Legrand J. (2009). Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor. *Biores. Technol.* 100: 5988-5995.
- 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. *Biores. Technol.* 117: 164-171.
- Radakovits R., Jinkerson R., Fuertenberg S., Tae H., Settlage R., Boore L., Posewitz M. (2012). Draft genome sequence and genetic transformation of the oleaginous alga *Nannochloropsis gaditana*. *Nat. Commun.* 3: 686.
- Ramos M. J., Fernández C. M., Casas A., Rodríguez L., Pérez Á. (2009). Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Biores. Technol.* 100: 261-268.
- Renaud S. M., Parry D. L. (1994). Microalgae for use in tropical aquaculture II: Effect of salinity on growth, gross chemical composition and fatty acid composition of three species of marine microalgae. *J. Appl. Phycol.* 6: 347-356.
- Renaud S. M., Thinh L. V., Lambrinidis G., Parry D. L. (2002). Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture.* 211: 195-214.
- Renaud S.M., Parry D.L., Thinh L., Kuo C., Padovan A., Sammy N. (1991). Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis* sp. and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture. *J. Appl. Phycol.* 3: 43-53.
- Renaud S.M., Parry D.L., Thinh L.V. (1994). Microalgae for use in tropical aquaculture I: gross chemical and fatty acid composition of twelve species of microalgae from Northern Territory, Australia. *J. Appl. Phycol.* 6: 337-345.
- Rocha J., Garcia J., Henriques M. (2003). Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. *Biomol. Eng.* 20: 237-242.

- Rodolfi L., Chini Zittelli G., Barsanti L., Rosati L., Rosati G., Tredici M. R. (2003). Growth medium recycling in *Nannochloropsis* sp. mass cultivation. *Biomol. Eng.* 20: 243-248.
- 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. Bioeng.* 102:100–112.
- Roessler P. (1990). Environmental control of glycerolipids metabolism in microalgae: commercial implications and future research directions. *J. Phycol.* 26: 393-399.
- Roleda M. Y., Slocumbe S. P., Leakey R. J., Day J. G., Bell E. M., Stanley M. S. (2013). Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. *Biores. Technol.* 129: 439-449.
- Sánchez A., González A., Maceiras R., Cancela A., Urrejola S. (2011). Raceway Pond Design for Microalgae culture for Biodiesel. *Chem. Eng. Transac.* 25: 845-850.
- Sandnes J. M., Källqvist T., Wenner D., Gislerod H. R. (2005). Combined influence of light and temperature on growth rates of *Nannochloropsis oceanica*: linking cellular responses to large-scale biomass production. *J. Appl. Phycol.* 17: 515-525.
- Santos L.M.A., Leedale G.F. (1995). Some notes on the ultrastructure of small azyosporic members of the algal class Eustigmatopyceae. *Nova Hedwigia.* 60: 215–225.
- Schenk P., Thomas-Hall S., Stephens E., Marx U., Mussgnug J., Posten C., Kruse O., Hankamer B. (2008). Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenerg. Res.* 1: 20–43.
- Searchinger T., Heimlich R., Houghton R.A., Dong F., Elobeid A., Fabiosa J., Tokgoz S., Hayes D., Yu T-H. (2008). Use of U.S. croplands for biofuels increases greenhouse gases through emission from land-use change. *Science.* 319:1238–1240.
- Serôdio J., Cartaxana P., Coelho H., Vieira S. (2009). Effects of chlorophyll fluorescence on the estimation of microphytobenthos biomass using spectral reflectance indices. *Remote Sens. Environ.* 113: 1760-1768.
- Sforza E., Bertucco A., Morosinotto T., Giacometti G. (2012). Photobioreactor for microalgal growth and oil production with *Nannochloropsis salina*: from lab-scale experiments to large-scale design. *Chem. Eng. Res. Des.* 90: 1151-1158.
- Sforza E., Bertucco A., Morosinotto T., Giacometti G.M. (2010). Vegetal oil from microalgae: species selection and optimization. *Chem. Eng. Trans.* 2: 199–204.
- Shennan J., Dunahay T., Benemann J., Roessler P. (1998). A look back at the US Department of Energy's aquatic species program: biodiesel from algae (Vol. 328). Golden: National Renewable Energy Laboratory. (NREL) report: NREL/TP-580-24190. Golden, CO.
- Sialve B., Bernet N., Bernard O. (2009). Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnol. Adv.* 27: 409-416.
- Silva-Aciare, F. R., Riquelme C. E. (2008). Comparisons of the growth of six diatom species between two configurations of photobioreactors. *Aquacult. Eng.* 38: 26-35.
- Simionato D., Block M.A., La Rocca N., Jouhet J., Maréchal E., Finazzi G., Morosinotto T. (2013). The response of *Nannochloropsis gaditana* to nitrogen starvation includes de novo biosynthesis of triacylglycerols, a decrease of chloroplast galactolipids, and reorganization of the photosynthetic apparatus. *Eukariotic Cell.* 12: 665-676.
- 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. *Biores. Technol.* 102: 6026-6032.

- Sims R.E., Mabee W., Saddler J.N., Taylor M. (2010). An overview of second generation biofuel technologies. *Biores. Technol.* 101:1570-1580.
- Singh R.N., Sharma S. (2012). Development of suitable photobioreactor for algae production- A review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 2347-2353.
- Smayda T. J. (1983). Phytoplankton ecology course. Graduate School of Oceanography, University of Rhode Island.
- Solomon J. A., Hand R. E., Mann R. C. (1986). Ultrastructural and flow cytometry analyses of lipid accumulation in microalgae. SERI-TECHNICAL Monitor-231-3089. U.S. Department Of Energy.
- Solomon S., Qin D., Manning M., Marquis M., Averyt K. B., Tignor M. M. B., Miller LeRoy H., Chen Z. (2007). IPCC, climate change 2007: the physical science basis. Contribution of Working Group I to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. pp 43.
- Solovchenko A., Khozin-Goldberg I., Recht L., Boussiba S. (2011). Stress-Induced Changes in Optical Properties, Pigment and Fatty Acid Content of *Nannochloropsis* sp.: Implications for non-destructive Assay of Total Fatty Acids. *Mar. Biotechnol.* 13: 527-535.
- Solovchenko A., Lukyanov A., Solovchenko O., Didi-Cohen S., Boussiba S., Khozin-Goldberg, I. (2014). Interactive effects of salinity, high light, and nitrogen starvation on fatty acid and carotenoid profiles in *Nannochloropsis oceanica* CCLA 804. *Eur. J. Lipid. Sci. Tech.* 116: 635-644.
- Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A. (2006)a. Optimization of *Nannochloropsis oculata* growth using the response surface method. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81: 1049-1056.
- Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A. (2006)b. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101: 87– 96.
- Stansell G.R., Gray V.C., Sym S.D (2012). Microalgal fatty acid composition: implications for biodiesel quality. *J Appl. Phycol.* 24: 791–801.
- Starkenburg S.R., Kwon K.J., Jha R.K., McKay C., Jacpbs M., Chertkov O., Twary S., Rocap G., Cattolico R.A. (2014). A pangenomic analysis of the *Nannochloropsis* organellar genomes reveals novel genetic variation in key metabolic genes. *BMC Genomic.* 15: 212- 233.
- Strickland J. D. H., Parsons T. R. (1968). *Bull. Fish. Res. Bd. Canada.* 167: 311.
- Strickland JDH, Parsons TR (1972). A practical Handbook of Sea Water Analysis. 2nd Ed. *Bull. Fich. Res. Bd. Canada* 268 pp.
- 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: 903-908.
- Suda S., Atsumi M., Miyashita H. (2002). Taxonomic characterization of a marine *Nannochloropsis* species, *N. oceanica* sp. nov. (Eustigmatophyceae). *Phycologia.* 4: 273-279
- Suen Y., Hubbard J.S., Holzer G., Tornabene T.G. (1987). Total lipid production of the green alga *Nannochloropsis* sp. QII under different nitrogen regimes. *J. Phycol.* 23: 289–296.
- Sukenik A. (1999). Production of EPA by *Nannochloropsis*. En: Cohen Z. (Ed.) Chemicals from microalgae. Taylor and Francis. London, United Kingdom. pp 41–56.
- Sukenik A., Carmeli Y. (1989). Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the Eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *J. Phycol.* 25: 686-692.

- Sukenik A., Carmeli Y., Berner T. (1989). Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the Eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *J. Phycol.* 25: 686-692.
- Sukenik A., Zmora O., Carmeli Y. (1993). Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. II. *Nannochloropsis* sp. *Aquaculture*.117: 313-326.
- Swofford D., Olsen G., Waddell P., Hillis D. (2002). PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland.
- Takagi M., Yoshida T. (2006). Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *J. Biosc. Bioeng.*101: 223-226.
- Talling J. F., Driver D. (1963). Some problems in the estimation of chlorophyll a in phytoplankton. En: Doty, M. S. (Ed.) Proc. Conf of Primary Productivity measurement, Marine and Freshwater. University of Hawai, TID-76. 33: 142-146.
- Terry K.L., Hirata J., Laws E.A. (1983). Light-limited growth of two strains of the marine diatom *Phaeodactylum tricortutum* Bohlin: chemical composition, carbon partitioning and the diel periodicity of physiological processes. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 68: 209-227.
- Thompson P. (1999). The response of growth and biochemical composition to variations in daylength, temperature, and irradiance in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 35: 1215-1223.
- Thompson P.A., Harrison P.J., Whyte J.N.C. (1990). Influence of irradiance on the fatty acid composition of phytoplankton. *J. Phycol.* 26: 278-288.
- Tonon T., Harvey D., Larson T. R., Graham I. A. (2002). Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. *Phytochem.* 61: 15-24.
- Torzillo G., Vonshak A. (2014) Environmental stress physiology with reference to mass culture. En: Richmond A., Hu Q. (Eds.) Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology. Wiley-Blackwell. United Kingdom. pp 90-113.
- Tredici M.R. (2010). Photobiology of microalgae mass cultures: understanding the tools for the next green revolution. *Future Sci. Biofuels.* 1:143–162
- Tredici M.R., Chini Zittelli G., Rodolfi L. (2010). Photobioreactors. En: Flickinger M.C., Anderson S. (Eds.) Encyclopedia of industrial biotechnology: bioprocess, bioseparation, and cell technology, vol 6. Wiley, Hoboken, pp 3821–3838.
- Tsoglin L.N., Gabel B.V., Fal'kovich T.N., Semenenko V.E. (1996). Closed photobioreactors for microalgal production. *Russ. J. Plant. Physiol.* 43:131–6.
- Ugwu C.U., Ogbonna J.C., Tanaka H. (2002). Improvement of mass transfer characteristics and productivities of inclined tubular photobioreactors by installation of internal static mixers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58: 600-607.
- Umdu E. S., Tuncer M., Seker E. (2009). Transesterification of *Nannochloropsis oculata* microalga's lipid to biodiesel on Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> supported CaO and MgO catalysts. *Biores. Technol.* 100: 2828-2831.
- Usta N. (2005). Use of tobacco seed oil methyl ester in a turbocharged indirect injection diesel engine. *Biomass Bioenerg.* 28:77–86.
- Van Vooren G., Le Grand F., Legrand J., Cuiné S., Peltier G., Pruvost J. (2012). Investigation of fatty acids accumulation in *Nannochloropsis oculata* for biodiesel application. *Biores. Technol.* 124: 421-432.
- Van Wagenen J., Miller T. W., Hobbs S., Hook P., Crowe B., Huesemann M. (2012). Effect of light and temperature on fatty acid production in *Nannochloropsis salina*. *Energies.* 5: 731-740.

- Verma N., Mehrotra S., Shukla A., Mishra B. (2010). Prospective of biodiesel production utilizing microalgae as the cell factories: A comprehensive discussion. *African J. Biotechnol.* 9: 1402-1411.
- Vieler A., Wu G., Tsai C-H., Bullard B., Cornich A.J., Harvey C., Reca I-B., Thornburg C., Achawanantakun R., Buehl C.J., Campbell M.S., Cavalier D., Childs K.L., Clarck T.J., Deshpande R., Erickson E., Ferguson A.A., Handee W., Kong Q., Li X., Lui B., Lundback S., Peng C., Roston R.L., Sanjaya P., Simpson J.P., Terbuch A., Warakanont J., Zäuner S., Farre E.M., Hegg E.L., Jiang N., Kuo M-H., Lu Y., Niyogi K.K., Ohlrogge J., Osteryoung K.W., Shachar- Hill Y., Sear B.B., Sun Y., Takahashi H., Yandell M., Shiu S-H., Benning C. (2012). Genome, functional and gen annotation and nuclear transformation of the heterokont oleaginous alga *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779. *PLOS Genetics.* 8: 1-25.
- Volkman J. K., Brown M. R., Dunstan G. A., Jeffrey S. W. (1993). The biochemical composition of marine microalgae from the class. *J. Phycol.* 29: 69-78.
- Wahidin S., Idris A., Shalh Muhamad S. (2012). The influence of light intensity and photoperiod on the growyih and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. *Biores. Technol.* 129: 7-11.
- Wang B., Li Y., Wu N., Lan C. Q. (2008). CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79: 707-718.
- Wang D., Ning K., Li J., Hu J., Han D., Wang D., Wang H., Zeng X., Jing X., Zhou Q., Su X., Chang X., Wang A., Wang W., Jia J., Wei L., Xin Y., Qiao Y., Huang R., Chen J., Han B., Yoon K., Hill R.T., Zohar Y., Chen F., Hu Q., Xu J. (2014). *Nannochloropsis* genomes reveal evolution of microalgal oleaginous traits. *PLOS Genetics.* 10: 1-13.
- Wang G., Wang T. (2012) Characterization of Lipid Components in Two Microalgae for Biofuel Application. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 89: 135-143.
- Wei L., Xin Y., Wang D., Jing X., Zhou Q., Su X., Jia J., Ning K., Cheng F., Hu Q., Xu J. (2013). *Nannochloropsis* plastid and mitochondrial phylogenomes reveal organelle diversification mechanism and intragenus phylotyping strategy in microalgae. *BMC Genomics.* 14: 534-551.
- Weldy C. S., Huesemann M. (2007). Lipid production by *Dunaliella salina* in batch culture: effects of nitrogen limitation and light intensity. *US Department of Energy Journal of Undergraduate Research.* 7: 115-122.
- Whittle S. J., Casselton P. J. (1975). The chloroplast pigments of the algal classes Eustigmatophyceae and Xanthophyceae. I. Eustigmatophyceae. *British Phycol. J.* 10: 179-191.
- Wilcove D. S., Koh L. P. (2010). Addressing the threats to biodiversity from oil-palm agriculture. *Biodivers. Conserv.* 19: 999-1007.
- World Energy Outlook (2013). IEA: international Energy Agency. Paris, Francia. pp. 676.
- World Energy Outlook. (2012). IEA: International Energy Agency. Paris, Francia. pp 672.
- World Energy Outlook (2011). IEA: International Enegy Agency. Paris, Francia. Pp 675.
- Xiao Y., Zhang J., Cui, J. Feng Y., Cui Q. (2013). Metabolic profiles of *Nannochloropsis oceanica* IMET1 under nitrogen-deficiency stress. *Biores. Technol.* 130: 731-738.
- Yongmanitchai W., Ward O.P. (1991). Growth of and omega-3-fatty-acid production by *Phaeodactylum tricornutum* under different culture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:419-425.
- Yoo C. Jun S-Y., Lee J-V., Ahn C-Y., Oh H-M. (2010). Selection of microalgae for lipid production under high levels carbón dioxide. *Biores. Technol.* 101: S71-S74.

- Zhu S., Huang W., Xu J., Wang Z., Xu J., Yuan Z. (2014). Metabolic changes of starch and lipid triggered by nitrogen starvation in the microalga *Chlorella zofingiensis*. *Biores. Technol.* 152: 292-298.
- Zou N., Richmond A. (1999). Effect of light-path length in outdoor flat plate reactors on output rate of cell mass and of EPA in *Nannochloropsis* sp. *J. Biotechnol.* 70: 351–356.
- Zuchova N.V., Aizdaicher N. A. (1995). Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. *Phytochem.* 39: 351-356.
- Zwickl D. J. (2006). Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Ph.D. dissertation, University of Texas.

## Listado de publicaciones y presentaciones a congresos derivadas de esta Tesis

### Publicaciones

- Bongiovani N., Popovich C., Martínez A.M.; Freije H., Constenla D., Leonardi, P.I. (2013). *In vivo* measurements to estimate culture status and neutral lipid accumulation in *Nannochloropsis oculata* CCALA 978: implications for biodiesel oil studies. *Algological Studies*. 142: 3-16. Alemania (ISSN 0342-1120).
- Bongiovani N.; Sánchez-Puerta M.V.; Popovich C., Leonardi P.I. (2014). Molecular and phylogenetic identification of an oil-producing strain of *Nannochloropsis oceanica* (Eustigmatophyceae) isolated from the southwestern Atlantic coast (Argentina). *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 49: 615-623. Chile. (ISSN 0717-3326).

### Presentaciones a congresos nacionales e internacional

- Bongiovani N.; Popovich C.; Martínez A. M.; Freije H., Leonardi, P.I. (2009). Estimación del número de células y optimización del método de extracción de pigmentos en cultivos de *Nannochloropsis oculata*. VII Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar. p. 157. Bahía Blanca.
- Bongiovani N. S., Popovich C. A., Martinez A. M., Freije R. H., Leonardi P. I. (2011). Evaluación del crecimiento, contenido de lípidos neutros y pigmentos en *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae). XIV Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar. COLACMAR. Camboriú-Santa Catarina- Brasil.
- Bongiovani N. S., Popovich C. A., Martinez A. M., Freije R. H., Leonardi P. I. (2011). Cultivo de *Nannochloropsis oculata* bajo deficiencia de nitrógeno: crecimiento, contenido de lípidos neutros y de pigmentos. IX Congreso de Ficología de Latinoamérica y el Caribe. VII Reunión Iberoamericana de Ficología y IX Simposio Argentino de Ficología. Bol. Soc. Arg. Bot. 46 (Supl): 124-125. La Plata. Argentina.
- Bongiovani N.; Constenla D.; Popovich C., Leonardi P.I. (2012). Extracción y caracterización de ácidos grasos en *Nannochloropsis oculata* CCALA 978 (Eustigmatophyceae) bajo distintas condiciones de cultivo. VIII Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar. Comodoro Rivadavia, Chubut.
- Bongiovani N.; Constenla D.; Popovich C., Leonardi P.I. (2013). Análisis de la composición de los ácidos grasos y las clases lipídicas en la microalga *Nannochloropsis oceanica* (Eustigmatophyceae). XV Latin American Congress and Exhibition on Fats and Oils. Chile.
- Bongiovani N., Barnech Bielsa G., Damiani C., Constenla D., Popovich C., Leonardi P.I. (2014). Microalgas oleaginosas: análisis comparativo del contenido y composición lipídica como fuente de materia prima para la

obtención de biodiesel. X Congreso de Ficología de Latinoamérica y El Caribe y la VIII Reunión Iberoamericana de Ficología. p. 276. Metepec, México.