



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Tesis de Doctor en Biología

**Cultivo y análisis lipídico de la diatomea *Navicula cincta*,
aislada del Estuario de Bahía Blanca (Pcia. Bs. As, Argentina):
evaluación del potencial uso biotecnológico**

Guadalupe Barnech Bielsa

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2015



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Tesis de Doctor en Biología

**Cultivo y análisis lipídico de la diatomea *Navicula cincta*,
aislada del Estuario de Bahía Blanca (Pcia. Bs. As, Argentina):
evaluación del potencial uso biotecnológico**

Guadalupe Barnech Bielsa

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 26 de mayo de 2015, bajo la dirección de la Dra. Patricia Leonardi (UNS-CERZOS-CONICET) y la Dra. Cecilia Popovich (UNS-CERZOS-CONICET).

Lic. Guadalupe Barnech Bielsa

6 de Julio de 2015

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

AGRADECIMIENTOS

A mis directoras Dra. Patricia Leonardi y Dra. Cecilia Popovich por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, darme la posibilidad de realizar el doctorado y guiarme en los inicios de este camino.

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.

Al personal técnico del Laboratorio de Alimentos de PLAPIQUI, Diana, Forbito, Clarisa y Federico, su colaboración dio forma a gran parte de esta tesis.

A la Dra. Ana María Martínez, por su inagotable capacidad de trabajo, alegría y buen humor en todo momento y sus enseñanzas inagotables a nivel personal y profesional.

A mis compañeros del CERZOS Romi, Bel, Cone, Vir, Ceci D., Melanie, Lucas, Pao, Jorge y Riqui. Gracias por su apoyo y ayuda. Una mención muy especial para mi compañera y amiga Naty... no encuentro palabras para tanto agradecimiento.

A toda mi familia y amigos, son el sostén, fuerza y felicidad que me sostiene.

A mis grandes amores: Cristian y Oliver.

RESUMEN

El biodiesel se obtiene a nivel industrial, casi en su totalidad, a partir de aceites de semillas. Sin embargo, el incremento de la demanda energética, el uso del agua dulce y la utilización de semillas con fines alimenticios plantean la necesidad y búsqueda de nuevas fuentes de materias primas sustentables que, además, posean impactos mínimos sobre el medio ambiente. Muchas especies de microalgas, denominadas oleaginosas, han despertado gran interés como fuente potencial de lípidos neutros (LN), específicamente triglicéridos (TAG), considerados la materia prima ideal para la producción de biodiesel. Una posible estrategia para mejorar los costos de producción del biodiesel de tercera generación es la búsqueda y selección de especies nativas de microalgas que, además de producir TAG, sean capaces de sintetizar productos de alto valor agregado.

Sobre la base de estos antecedentes, el objetivo general de esta tesis fue evaluar el potencial de una especie de diatomea nativa del Estuario de Bahía Blanca como materia prima para la producción de biodiesel y sustancias poliméricas extracelulares como co-productos de valor agregado, bajo un concepto de biorrefinería. Los objetivos específicos planteados fueron: 1) la identificación de la especie; 2) 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; 3) analizar el efecto de distintas condiciones ambientales (temperatura [15°C y 20°C], medios de cultivo [f/2, SWES, y SWES-N] y la fase estacionaria sobre parámetros de crecimiento, producción de biomasa, cantidad y calidad de lípidos y productividad lipídica con especial énfasis en la fracción de lípidos neutros; 4) evaluar el potencial de las sustancias poliméricas extracelulares liberadas por *N. cincta* como co-producto de valor; y 5) analizar el crecimiento de la especie en un fotobiorreactor columnar de 25L.

Los estudios morfológicos con microscopios óptico y electrónico de barrido permitieron identificar a la especie en estudio como *Navicula cincta*, una diatomea pennada. La cepa fue depositada en el *Culture Collection of Autotrophic Organism* (CCALA), República Checa, bajo la denominación *Navicula cincta* CCALA 984.

La velocidad de crecimiento de *N. cincta* varió entre 0,29 div. día⁻¹ y 1,42 div. día⁻¹, mientras que el tiempo de generación varió entre 16,8 horas y 82,5 horas. Las máximas densidades celulares (DC) fueron obtenidas con el medio SWES-N. Se estableció un modelo entre la DC y la absorbancia, el cual permitió monitorear el crecimiento de *N. cincta* en f/2. La espectrofluorimetría de la clorofila *a* se presentó como un método adecuado para evaluar la cinética de crecimiento y para obtener información sobre el estado fisiológico de los cultivos. La cinética de clorofila *a in vivo* presentó la misma dinámica que la de la DC en los tres medios de cultivo testeados. El medio f/2 resultó adecuado para producir un rápido crecimiento seguido de una fase estacionaria temprana, mientras que los medios SWES y SWES-N permitieron un crecimiento sostenido a lo largo de todo el período considerado. La relación IFR-Cel establecida entre la intensidad de fluorescencia relativa del cultivo teñido con Rojo Nilo (IFR-RN) y la DC se propone como un índice para estimar el tiempo de acumulación máxima de LN y, por lo tanto, determinar el tiempo de cosecha de la biomasa. Esta información resultó útil para cultivos llevados a cabo en medio f/2, pero no así en los desarrollados en los medios SWES y SWES-N, debido a que en éstos últimos no se detectó acumulación lipídica. El contenido de lípidos totales (LT) de *N. cincta* varió entre 6-40 % del peso seco libre de cenizas (% PSLC). En las condiciones de crecimiento evaluadas, los LN o TAG representaron entre un 50 % y 90% de los LT. La mayor productividad de LN fue de 10 mg. L⁻¹. d⁻¹ en los cultivos creciendo a 20°C en f/2 durante 10 días. Los valores más bajos de LT y LN se obtuvieron con los medios SWES y SWES-N, sugiriendo que en estos medios no hubo acumulación lipídica. Con respecto a la composición de los LN, los ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) fueron la clase dominante representando el 53% a 60%, seguida por los ácidos grasos saturados (AGS) que constituyeron entre el 22% a 28%. Una excepción a este patrón ocurrió en los cultivos en SWES-N, donde los contenidos de AGMI y AGS de la fracción neutra fueron similares (39% y 38%, respectivamente). Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) fueron la fracción minoritaria en todos los casos testeados. El perfil de ácidos grasos de la fracción neutra fue similar en todas las condiciones de cultivo testeadas. Los principales ácidos grasos fueron los ácidos palmítico (16:0), palmitoleico (16:1 (n-7)) y eicosapentaenoico (20:5 (n-3)). En relación a

los parámetros de calidad del aceite, el índice de Yodo 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. cincta* se presentan como una materia prima adecuada para la producción de biodiesel.

En las cinéticas de nutrientes se pudo observar una limitación de fósforo y sílice en el medio f/2, durante la fase estacionaria. En los medios SWES y SWES-N, los nutrientes no alcanzaron valores limitantes para el crecimiento, lo cual se visualizó en un incremento sostenido en la DC y en la baja acumulación de LN.

Las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) de *N. cincta* fueron clasificadas en EPS solubles (EPS-S), EPS levemente unidos a la célula (EPS-LU) y EPS fuertemente unidos (EPS-FU) a la célula. Las cinéticas de producción de las mismas fueron analizadas en los tres medios de cultivo. Los EPS-S fueron el principal constituyente en los medios f/2 y SWES (77% y 86% de los EPS totales, respectivamente), mientras que en SWES-N representaron la tercera parte del total de EPS. La producción media de los EPS-S estaría relacionada con las relaciones estequiométricas N/P. En general, los EPS-FU fueron más abundantes que los EPS-LU y esto podría estar asociado al hábito bentónico de la especie. La composición de monosacáridos neutros de los EPS-S fue similar a la de los EPS-FU. Sus principales componentes fueron xilosa, manosa y *N*-acetilglucosamina. Los EPS-LU estuvieron mayormente constituidos por galactosa y glucosa. La relación carbohidrato:proteína y la identificación de la *N*-acetilglucosamina y la *N*-acetilgalactosamina sugieren la presencia de proteoglucanos y/o glicoproteínas en los EPS.

Navicula cincta fue cultivada en un fotobiorreactor columnar con medio SWES-N y con CO₂. Los cultivos presentaron una fase exponencial, estacionaria y una de disminución celular, no detectada a escala de laboratorio. La producción de biomasa fue de 319 mg. L⁻¹. La cinética espectrofluorométrica del Rojo Nilo evidenció acumulación de LN durante la fase estacionaria. El contenido de LT fue de 32 % PSLC, representando los LN un 81 % de los LT. La productividad de los LN fue de 51 mg. L⁻¹.d⁻¹. Con respecto a la composición de ácidos grasos de los LN, el porcentaje de AGMI fue de 51%, mientras que los de AGS

y AGPI fueron de 32% y 16%, respectivamente. Los principales ácidos grasos fueron los ácidos palmítico, palmitoleico y eicosapentaenoico.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede concluir que la microalga oleaginosa *Navicula cincta* puede ser considerada como una especie potencialmente útil para la producción de biodiesel. Además, la producción simultánea de TAG para biodiesel y de EPS como co-producto, bajo un contexto de biorrefinería, se presenta como una propuesta novedosa para ser aplicada en cultivos energéticos sustentables.

ABSTRACT

Biodiesel is obtained at industrial level almost entirely from seed oils. However, factors like increasing of the demand of energy, freshwater use and the utilization of seeds for food purposes suggest the need and search for new sources of sustainable and alternative feedstocks, which have minimal impacts on the environment. Many species of microalgae, called oleaginous, have raised great interest as a potential source of neutral lipids, specifically triglycerides (TAG), which are considered the ideal feedstock for biodiesel production. A possible strategy for improving the cost of production of third-generation biodiesel is the search and selection of microalgae native species that can produce TAG and could be able to synthesize valuable co-products.

On the basis of previous background, the objective of this thesis was to evaluate the potential of a native diatom from Bahía Blanca Estuary as raw material for both biodiesel production and extracellular polymeric substances as valuable co-products, under a concept of biorefinery. The specific objectives were: 1) to identify the species; 2) to optimize different techniques for the determination of cell density, the photosynthetic pigment concentration and the content of neutral lipids in cultures at laboratory scale; 3) to analyse the effect of different environmental conditions (temperature [15°C and 20°C], culture media [f/2, SWES, SWES-N] and stationary phase) on growth parameters, biomass production, lipid quantity and quality and lipid productivity, with particular emphasis on neutral lipid fraction; 4) to evaluate of the potential of the extracellular polymeric substances released by *N. cincta* as an added value co-product; 5) to analyse the growth of the species in a 25L columnar photobioreactor.

Both morphological studies with optical and scanning electronic microscopes allowed identifying the studied strain as *Navicula cincta*, a pennate diatom. The strain was deposited in the *Culture Collection of Autotrophic Organism* (CCALA), Czech Republic, under the name *Navicula cincta* CCALA 984.

The growth rate of *N. cincta* ranged between 0,29 div. día⁻¹ and 1,42 div. día⁻¹, while the time of generation ranged between 16,8 hours y 82,5 hours. The maximum cell densities (CD) were obtained with the SWES-N medium. A model between the CD and the absorbance was established. It allowed monitoring the

growth of *N. cincta* in f/2. The spectrofluorometry of chlorophyll a was presented as an adequate method to evaluate the kinetic of growth and to give information about the physiological state of the cultures. The kinetic of the chlorophyll a *in vivo* presented the same dynamic as the CD in the three culture media tested. The f/2 medium was suitable for producing a rapid growth followed by an early stationary phase. Moreover SWES and SWES-N media allowed a sustained growth along the all considered period. The relationship IFR-Cel established between the relative fluorescence intensity of Nile Red dyed culture (NR-RFI) and the DC was proposed as an index to estimate the maximum neutral lipids accumulation time and, consequently, to determine the biomass harvesting time. This information was useful for cultures performed in f/2 medium, but this index was not useful for the culture developed in SWES or SWES-N media, because in these media lipid accumulation was not detected. The total lipid content (TL) of *N. cincta* varied between 6- 40% of ash-free dry weight (% of AFDW). Under growing conditions evaluated, the NL or TAG represented between 50% and 90% of TL. The highest NL productivity was 10 mg. L⁻¹.d⁻¹ in culture growing at 20°C in f/2 medium for 10 days. The lowest values of TL and NL were obtained with SWES-N and SWES, suggesting that, in these culture media, there was not lipid accumulation. Respect of the composition of LN, monounsaturated fatty acids (MUFA) were the dominant class representing from 53% to 60%, followed by saturated fatty acids (SFA) that they constituted from 21% to 28%. An exception of this pattern occurred in SWES-N culture, where the contents of MUFA and SFA of NL were similar (39% and 38%, respectively). Polyunsaturated fatty acids (PUFA) were the minority fraction in all tested cases. The fatty acid profile of the neutral fraction was similar under all evaluated culture conditions. The main fatty acids were the acids palmitic (16:0), palmitoleic (16:1 (n-7)) and eicosapentaenoic (20:5 (n-3)). Regarding to oil quality parameters, iodine index and content of linolenic acid were within the limits established by European quality standard EN14214. These features allowed inferring that the oils of *N. cincta* constitute a suitable feedstock for biodiesel production.

In the kinetics of nutrients could be observed a limitation of phosphate and silicate in f/2 medium, during early stationary phase. In the SWES and SWES-N

media, nutrients did not reach limiting values for growth, which was visualized in a sustained increase of DC and lower accumulation of LN.

Extracellular polymeric substances (EPS) of *N. cincta* were classified into soluble EPS (S-EPS), cell loosely bound EPS (LB-EPS) and cell tightly bound EPS (TB-EPS). The kinetic of production of these was analyzed in the three culture media. The EPS-S was the major component in both f/2 and SWES media (77% and 86% of the total EPS, respectively), while in SWES-N it was a third of the total EPS. The average production of EPS-S would be related to stoichiometric ratios N / P. In general, the TB-EPS were more abundant than the LB-EPS and this could be associated with the benthic habit of the species. The S-EPS and TB-EPS neutral monosaccharide composition was similar. Their main components were xylose, mannose and *N*-acetylglucosamine. The LB-EPS was largely constituted by galactose and glucose. The carbohydrate:protein ratio as well as the identification of *N*-acetylgalactosamine and *N*-acetylglucosamine suggest the presence of proteoglycans and/or glycoproteins in the EPS.

Navicula cincta was grown in a columnar photobioreactor with SWES-N and CO₂. The culture exhibited exponential phase, stationary phase and cell decreased phase that was not detected at laboratory scale. Biomass production was 319 mg. L⁻¹. The kinetic of the spectrofluorometry of Nile Red showed accumulation of LN during stationary phase. The content of TL was 32 (% AFDW), being the NL 81% of TL. The NL productivity was 51 mg. L⁻¹.d⁻¹. In regard to fatty acid composition of NL, MUFA percentage was 51%, while the SFA and PUFA were 32% and 16%, respectively. The main fatty acids were the acids palmitic, palmitoleic and eicosapentaenoic.

According to the obtained results, it is concluded that the oleaginous microalgae *Navicula cincta* can be considered as a potentially useful species for production of biodiesel. In addition, the simultaneous production of TAG for biodiesel and EPS as co-product, under a biorefinery context, is presented as a novel proposal to be applied in sustainable energetic cultures.

ESTRUCTURA DE LA TESIS

En el **Capítulo 1** se realiza una introducción general del tema desarrollado. Las microalgas oleaginosas son de actual interés como fuentes de materia prima alternativa y renovable para la producción de aceites (lípidos neutros) y obtención de biodiesel. Se plantea el concepto de biorrefinería, como una estrategia para mejorar los costos de producción del biocombustible a través de la selección de especies nativas, que, además de producir aceites, sean capaces de sintetizar productos de valor agregado. Se introducen características generales de las diatomeas y sus potenciales aplicaciones. Además, se describen algunas características del Estuario de Bahía Blanca como potencial sitio para futuros emprendimientos de cultivos de microalgas. 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 de la Tesis y las técnicas usadas para el aislamiento y mantenimiento de cultivos de diatomeas. Se describe la identificación de la especie seleccionada mediante microscopía óptica y electrónica de barrido. Los protocolos y procedimientos específicos y el análisis estadístico abordado se describen en cada capítulo, según corresponda.

En el **Capítulo 3** se describen los métodos utilizados para analizar el crecimiento y la biomasa de *Navicula cincta*, bajo determinadas condiciones cultivos. Se describen las técnicas utilizadas para estimar la velocidad de crecimiento, el contenido de pigmentos fotosintéticos, la cinética de la clorofila *a* y la detección y acumulación de lípidos neutros.

En el **Capítulo 4** se evalúan los efectos de la temperatura y los medios de cultivo sobre la velocidad de crecimiento, el contenido de pigmentos fotosintéticos y la cinética de acumulación de lípidos neutros de *N. cincta*. Además, se determina el contenido de lípidos totales, las fracciones lipídicas, la composición de los ácidos grasos y las productividades de lípidos totales y lípidos neutros en ciertas condiciones de cultivo. Se evalúa la cinética de los

nutrientes disueltos en relación al contenido lipídico. Además se infieren las propiedades del biodiesel a partir de la composición de los ácidos grasos de la fracción neutra.

En el **Capítulo 5** se analiza la cinética de producción y composición de sustancias poliméricas extracelulares en cultivos de *N. cincta*, con el fin de evaluar el potencial de estos componentes como co-productos, de acuerdo con el concepto de biorrefinería.

En el **Capítulo 6** se realiza una experiencia de cultivo de *N. cincta* en un fotobiorreactor columnar de 25 L. Se analizan el crecimiento y la producción de biomasa. Se evalúan el contenido de lípidos totales, las fracciones lipídicas y la composición de los ácidos grasos. Se analiza la producción de biomasa para ser utilizada como inóculos de cultivos a mayor escala.

Finalmente se presentan las **Síntesis y Conclusiones Generales**. Se destacan los hallazgos más relevantes y se plantea un esquema hipotético del cultivo de *Navicula cincta*, bajo un contexto de biorrefinería, haciendo hincapié en la producción simultánea de triglicéridos, sustancias poliméricas extracelulares y sílice como bioproductos de interés.

INDICE

Prefacio	I
Agradecimientos	II
Resumen	III
Abstract	VII
Estructura de la tesis	X
Capítulo 1 – Introducción General	1
Objetivo general	11
Objetivos específicos	12
Capítulo 2- Materiales y métodos comunes a la tesis y descripción de la especie seleccionada	13
2.1 Materiales y métodos	13
2.1.1 Obtención de muestras naturales	13
2.1.2 Acondicionamiento del material de laboratorio	13
2.1.3 Medios de cultivo	14
2.1.4 Establecimiento de cultivos unialgales en laboratorio	18
2.1.5 Mantenimiento de los cultivos stock y escalado de cultivos	19
2.1.6 Criterios para la selección de la especie aislada	20
2.1.7 Métodos usados para la identificación de la especie seleccionada	20
2.2 Descripción de la especie seleccionada	22
2.2.1 Características morfológicas de la especie.....	22
Capítulo 3: Evaluación del crecimiento, biomasa, pigmentos celulares y acumulación de lípidos neutros en cultivos de <i>Navicula cincta</i>	28
3.1 Introducción.....	28
3.2 Hipótesis	32
3.3 Materiales y Métodos	32
3.3.1 Cultivos	32
3.3.2 Determinación de la densidad celular (DC)	34
3.3.3 Cálculo de la velocidad de crecimiento y tiempo de generación.....	35
3.3.4 Definición de modelos estimadores de la densidad celular y la biomasa a partir de medidas de absorbancia	36
3.3.6 Validación de los modelos definidos	38
3.3.6 Determinación de pigmentos.....	39
3.3.7 Detección celular y cinética de acumulación de lípidos neutros	40
3.3.8 Análisis estadístico de los datos	42
3.4 Resultados	42
3.5 Discusión.....	57

3.6 Conclusiones.....	64
Capítulo 4: Contenido y composición lipídica de <i>Navicula cincta</i> en cultivos <i>batch</i> convencionales	66
4.1 Introducción.....	66
4.2 Hipótesis y Objetivos	70
4.3 Materiales y métodos	71
4.3.1 Cultivos.....	71
4.3.2 Cosecha y preparación del material para análisis lipídico	73
4.3.3 Cuantificación de los lípidos totales	74
4.3.4 Fraccionamiento de lípidos totales	75
4.3.5 Determinación del perfil de ácidos grasos.....	76
4.3.6 Determinación del peso seco libre de cenizas	79
4.3.7 Estimación de la producción de biomasa y productividad de lípidos neutros.	79
4.3.8 Cinética de la concentración de los nutrientes disueltos	80
4.3.9 Cálculo de la velocidad de consumo	83
4.3.10 Análisis estadístico de los datos	83
4.4 Resultados	84
4.4.1 Contenido de lípidos totales y de sus fracciones (neutra y polar).....	84
4.4.2 Producción de biomasa y productividad de lípidos neutros (PLN).....	87
4.4.2 Composición lipídica: Clases lipídicas y perfiles de ácidos grasos en cada fracción.....	88
4.4.3 Cinética de nutrientes y velocidades de consumo.....	95
4.5 Discusión.....	98
4.6 Conclusiones.....	105
Capítulo 5: Cuantificación y caracterización de los EPS en cultivos de <i>Navicula cincta</i>	106
5.1 Introducción.....	106
5.2 Hipótesis	108
5.3 Materiales y métodos	109
5.3.1 Determinación de la cinética de los EPS.....	109
5.3.2 Cuantificación de los EPS en cultivo.....	110
5.3.3 Determinación de la densidad celular (DC).....	111
5.3.4 Determinación de la composición de las fracciones de EPS en f/2 (proteínas, ácidos urónicos y azúcares).....	111
5.3.5 Análisis estadístico de los datos	114
5.4 Resultados	114

5.5	Discusión.....	124
5.6	Conclusiones.....	130
Capítulo 6- Crecimiento, contenido y composición lipídica de cultivos de		
<i>Navicula cincta</i> en fotobiorreactor		
6.1.	Introducción.....	132
6.2	Hipótesis	134
6.3	Materiales y métodos	135
6.3.1	Características del Fotobiorreactor (FBR).....	135
6.3.2	Acondicionamiento del FBR.....	135
6.3.3	Medio de cultivo y agua de desinfección.....	135
6.3.4	Inóculo	136
6.3.5	Inicio de la experiencia.....	136
6.3.6	Control de variables y toma de muestras	137
6.3.7	Determinaciones y análisis de las muestras.....	137
6.3.8	Cosecha de la biomasa.....	138
6.3.9	Análisis estadístico de los datos	138
6.4	Resultados	139
6.5	Discusión.....	146
6.6	Conclusiones.....	151
Síntesis y conclusiones generales.....		152
Referencias		156

Capítulo 1 – Introducción General

El incremento de la población mundial, la progresiva industrialización y el continuo aumento del transporte son los principales factores que contribuyen a una creciente demanda energética (World Energy Outlook, 2013). Asociado a ello, el agotamiento irreversible de las fuentes tradicionales de combustibles fósiles y el incremento de las emisiones de gases que contribuyen al calentamiento global (efecto invernadero), estimulan la búsqueda de otras fuentes alternativas. En la actualidad, cerca del 80% de la demanda energética mundial es satisfecha con combustibles fósiles. Sin embargo, se estima que el uso continuo de estos combustibles producirá el agotamiento de estos recursos en aproximadamente 50 años (Rodolfi et al., 2009) y que el futuro de la humanidad dependerá solamente de fuentes de energía renovables y ambientalmente no dañinas. En un contexto actual y frente a las necesidades energéticas, los combustibles líquidos derivados del material vegetal - biocombustibles - presentan un rol crucial en la matriz energética del futuro (Nigam Singh y Singh, 2011).

Dentro de los biocombustibles, el biodiesel se define químicamente 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 (TAG) y un alcohol de cadena corta, en presencia de un catalizador (ácido o básico), para producir alquilésteres de ácidos grasos (biodiesel) y glicerol como subproducto (Fig. 1.1). 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). El biodiesel de “primera generación”, elaborado a partir de materias primas convencionales como la soja, el girasol, la colza, entre otros, es una alternativa comercialmente viable. Sin embargo, entre sus limitaciones se pueden mencionar, que son cultivos agrícolas destinados a la alimentación, que requieren de grandes áreas de tierras cultivables y que

demandan, en general, el uso de agua dulce, la cual es un recurso primario de consumo humano (Demirbas, 2010).

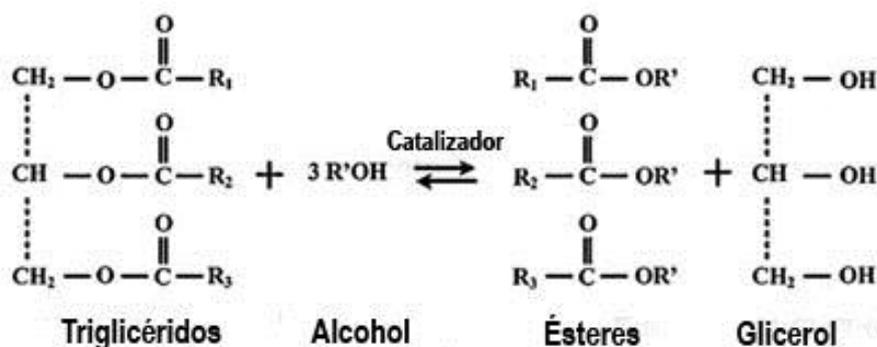


Figura 1.1: Reacción de transesterificación de un aceite para la obtención de biodiesel (Fuente: Mata et al., 2010)

En Argentina, y en particular en la provincia de Buenos Aires la situación energética no escapa a esta realidad. Actualmente en el país se producen 2.4×10^6 ton/año de biodiesel, de los cuales 800.000 toneladas se destinan al corte del 10% en el gasoil para consumo interno (www.minplan.gob.ar) y se espera incrementar este valor. Si bien esta ley impulsa la investigación y el desarrollo de aquellos cultivos de “primera generación”, también alienta el desarrollo de materias primas alternativas diversificadas.

Entre estas fuentes, las microalgas han despertado especial interés como materia prima para la producción de biocombustibles de “tercera generación” (Ahmad et al., 2011; Leonardi et al., 2011) y sus ventajas las presentan como un recurso potencial para complementar y eventualmente reemplazar a los combustibles fósiles (Chisti, 2007; Demirbas y Demirbas, 2011; Bellou et al., 2014). Para la selección de nuevas cepas potencialmente útiles como fuente de materia prima para la producción de biodiesel, alguno de los aspectos que se deben tener en cuenta son: 1) microalgas nativas adaptadas a las condiciones climáticas locales, 2) capacidad de crecimiento alto y bajo una amplia variedad de condiciones ambientales; 3) altos contenidos lipídicos, productividad de biomasa y productividad lipídica; 4) producir importantes cantidades de TAG bajo condiciones de estrés (microalgas oleaginosas); 5) proporción de lípidos neutros/ lípidos polares alta y

6) una composición de ácidos grasos adecuada para una buena calidad de biodiesel (Pienkos y Darzins, 2009; Grifitths y Harrison, 2009; Rodolfi et al., 2009; Leonardi et al., 2011).

Frente a un escenario energético vulnerable, la producción de TAG microalgales para la obtención de biodiesel ha incentivado numerosos estudios científicos-tecnológicos a nivel mundial. Si bien la producción de biodiesel a partir de estos aceites es técnicamente factible (Norsker et al., 2011), para alcanzar una producción sustentable se requiere una reducción en los costos de producción de biomasa algal (Wijffels y Barbosa, 2010; Georgianna y Mayfield, 2013). Frente a ello, el desarrollo de tecnologías estables (optimización en la cosecha, elaboración de productos, procesos de biorrefinerías) que maximicen la producción de microalgas (Leu y Boussiba, 2014) y la minimización de costos de operación y mantenimiento son la clave para la comercialización exitosa de los combustibles a base de microalgas (Singh y Gu, 2010).

Una estrategia para mejorar los costos de producción, es la selección de especies nativas, que, además de producir TAG, sean capaces de sintetizar productos de alto valor agregado, los cuales mejoran la rentabilidad final del proceso (Rawat et al., 2013). Bajo este contexto, el concepto de **biorrefinería** resulta de gran interés para efectivizar la producción de metabolitos primarios, secundarios y residuos, todos con aplicaciones directas o indirectas (Brennan y Owende, 2010; Rawat et al., 2013). Sin embargo, la síntesis de todas estas biomoléculas no es aleatoria, sino que requiere de una selección adecuada de las especies microalgales, de un conocimiento profundo de su biología y fisiología y de una determinación rigurosa de las estrategias de cultivo tendientes a la producción simultánea de los bioproductos de interés.

El programa *Aquatic Species Program*, llevado a cabo por el Departamento de Energía de Estados Unidos, ha recomendado, sobre una selección de 3000 especies de microalgas, 50 cepas potencialmente aptas para la producción de biocombustibles, entre las cuales se han reportado diversas especies de **diatomeas**. Las mismas fueron seleccionadas teniendo en cuenta sus altas tasas de crecimiento, alto rendimiento lipídico, tolerancia a condiciones ambientes hostiles y rendimiento en cultivos a gran escala (Shennan et al., 1998).

Las diatomeas son microalgas unicelulares principalmente autótrofas, que dependen de la luz solar y el CO₂ para producir biomasa y energía (Barsanti y Gualtieri, 2006). Además, algunas especies pueden vivir heterotróficamente a partir de fuentes de materia orgánica. Estas microalgas juegan un rol decisivo en los ecosistemas acuáticos desde su aparición hace 180-250 millones de años, como uno de los principales productores de biomasa en los océanos y de oxígeno en el planeta (Bozarth et al., 2008). A escala global, contribuyen en un 20-25% de la productividad primaria anual terrestre (Field et al., 1998) y en aproximadamente un 40 % de la productividad primaria total de los océanos (Falkowski et al., 1998; Treguer et al., 1995), convirtiéndose así en el grupo de organismos dominante en la captación de CO₂ de la atmósfera. Además, tienen un rol crucial en la biogeoquímica acuática del carbono, nitrógeno, fósforo y sílice (Sarhou et al., 2005).

A nivel taxonómico, constituyen la Clase Bacillariophyceae (Simonsen, 1972) y la identificación a nivel de especie se basa fundamentalmente en la morfología de su pared celular silícica, la cual está compuesta por dos valvas que en conjunto se denomina frústulo (Figura 1.2.) (Ross et al., 1979). De acuerdo a la simetría de la pared, las diatomeas se dividen en dos grandes órdenes, el Orden Centrales y Orden Pennales, considerando si el frústulo es de simetría radial (Fig. 1.2 A) o bilateral (Fig. 1.2 B), respectivamente. A nivel ecológico, dentro del primer orden se encuentran, en general, especies de hábitos planctónicos (viven en la columna de agua), mientras que las diatomeas pennadas son, en general, bentónicas (viven sobre un sustrato). En términos de diversificación evolutiva, constituyen un grupo de organismos muy exitoso que incluye, dependiendo de los autores, más de 900 géneros y hasta 100.000-1.000.000 de especies (Mann y Droop, 1996; Graham et al., 2009), números que se acrecientan con la continua descripción de nuevos taxones.

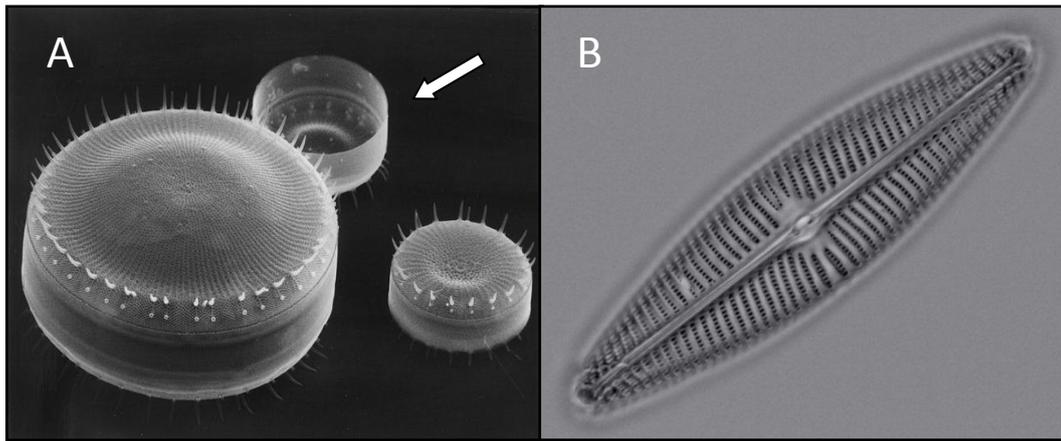


Figura 1.2: Frústulos de diatomeas observados con microscopio electrónico de barrido. **(A)** Diatomea del Orden Centrales, la célula de mayor tamaño presenta un frústulo completo y la flecha indica una valva separada. **(B)** Diatomea del Orden Pennales (Fuente: Stoermer y Smol, 2004).

Los principales compuestos orgánicos que componen las diatomeas comprenden, proteínas, carbohidratos y lípidos, y su proporción relativa varía a nivel específico (Brown et al., 1997), con las condiciones ambientales y con la etapa de crecimiento (Roessler, 1990; Hu et al., 2008). En términos generales, la composición bioquímica bajo crecimiento exponencial y sin limitación de nutrientes comprende: 30 a 60% de proteínas, 10 a 50% de carbohidratos y 5 a 20% de lípidos (peso seco libre de cenizas) (Brown et al., 1997; Scholz y Liebezeit, 2013). En cambio, bajo condiciones de limitación de nutrientes, se produce una aclimatación metabólica como resultado de cambios en la proporción relativa y composición de estos compuestos (Wilhelm et al., 2006). Por ejemplo, las reservas de nitrógeno son utilizadas para la biosíntesis de proteínas, pigmentos y ácidos nucleicos, mientras que el fósforo es el principal componente de los ácidos nucleicos y fosfolípidos (Geider y LaRoche, 2002). La energía celular para la biosilicificación (proceso de absorción de sílice del ambiente, precipitación del ácido silícico amorfo en la célula y creación del frústulo) y el transporte del ácido silícico $-\text{Si}(\text{OH})_4^-$ (forma en que el sílice es incorporado por las diatomeas) provienen de la respiración metabólica sin participación directa de la energía fotosintética (Martin Jézéquel et al., 2000). La silicificación de la pared celular y el transporte están estrechamente acoplados al ciclo celular, lo que resulta en una estrecha dependencia entre la silicificación y la tasa de crecimiento. Bajo limitaciones de sílice, las diatomeas

pueden incrementar la acumulación de lípidos. Esta acumulación parecería involucrar dos procesos: una mayor proporción del carbono nuevo asimilado dirigido hacia la ruta metabólica de los lípidos y una leve conversión del carbono previamente asimilado desde los componentes no lipídicos hacia los lípidos neutros (Roessler, 1988).

Como se ha mencionado, las diatomeas se encuentran libres en la columna de agua o adheridas a sedimentos, rocas u otras plantas. Se encuentran ampliamente distribuidas en las zonas fóticas marinas o de agua dulce, desde las latitudes polares hasta las tropicales. Esta amplitud ecológica, sumado a su sensibilidad ambiental, ha convertido a muchas especies en indicadores de cambios climáticos e hidrológicos (Stoermer y Smol, 2004) mediadoras de ciclos biogeoquímicos (Stoermer y Smol, 2004) indicadores de aguas eutróficas y estuarinas (Popovich y Marcovecchio, 2008); herramientas de reconstrucción paleoambiental, debido a su alta capacidad de fosilización (Reid et al., 1995), entre otras. Sin embargo, a pesar de su alto grado de flexibilidad, robustez y diversidad fisiológica, pocas especies de diatomeas han sido utilizadas en biotecnología (Lebeau y Robert, 2003 a, b; Bozarth et al., 2009). Algunos ejemplos de las cepas más estudiadas son *Chaetoceros gracilis*, *Skeletonema costatum*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Thalassiosira pseudonana*, *Nitzschia laevis*, *Cylindrotheca closterium* y *Navicula saprophila*, principalmente por su valor nutritivo para ser utilizadas como alimento en acuicultura, generación de biodiesel, producción de sustancias poliméricas extracelulares y por su posibilidad de manipulación genética (Lebeau y Roberts, 2003b; Bozarth et al., 2009).

Una de las principales aplicaciones de las diatomeas la constituye la **producción de diatomita**, la cual consiste en depósitos fósiles de frústulos de diatomeas compuestos de sílice amorfo ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) (Fig. 1.3).



Figura. 1.3. Depósito de diatomita del género *Aulacoseira* (Fuente: Stoermer y Smol, 2004).

La tierra de diatomita por sus características (baja densidad, alta porosidad, elevado punto de fusión e inercia química) ha sido usada en 300 a 500 aplicaciones comerciales como, filtración, abrasión, adsorción, pesticidas, aditivos alimenticios, insecticidas, biosensores, nanotecnología, implantes médicos (Lebeau y Robert 2003, a,b; Stoermer y Smol, 2004; López et al., 2005), entre otros. Este producto representa un importante *commodity* en California, donde se encuentra el 60% de la producción de diatomita de Estados Unidos y cuyo valor comercial es superior a otros minerales como el oro, cobre y aluminio (Stoermer y Smol, 2004).

Algunas de las potenciales aplicaciones en diatomeas comprenden:

1) Producción de metabolitos intracelulares: entre ellos se pueden mencionar los ácidos grasos poliinsaturados-omega 3, (AGPI- ω 3) como son los ácidos eicosapentaenoico (**EPA**) y docosahexaenoico (**DHA**). Estos ácidos grasos son esenciales, dado que nuestro organismo no contiene las enzimas necesarias para sintetizarlos y por lo tanto deben ser incorporados en la dieta. Juegan un rol clave en el crecimiento y desarrollo neurológico del niño y en un adecuado funcionamiento del sistema cardiovascular del adulto (Calder, 2013). El EPA ha sido identificado por reducir la hipertrigliceridemia, la agregación plaquetaria y el colesterol y por ende por prevenir enfermedades coronarias, aterosclerosis e inflamación (Lebeau y Robert, 2003 b). Mientras

que el DHA está siendo profundamente estudiado por su participación en el desarrollo visual y neurológico en infantes, como también por sus efectos sobre determinadas enfermedades crónicas neurológicas, inflamatorias o metabólicas (Gil-Campos et al., 2010). Si bien la principal fuente de EPA y DHA son los aceites de pescado de mares fríos, la pesca indiscriminada y la contaminación marina han llevado a una necesidad urgente de nuevas fuentes sostenibles de AGPIs ω -3. Por otro lado, los aceites de pescado con ω -3 son caracterizados por tener mal olor, inestabilidad oxidativa y altos costos de purificación (Spolaroe et al., 2006). En contraste, los ésteres de EPA y DHA microalgales son más estables y representan, por lo tanto, una fuente potencialmente alternativa (Apt y Behrens, 1999). La síntesis de EPA y DHA en diatomeas, ocurre principalmente en asociación con los lípidos polares durante la etapa de crecimiento exponencial, a diferencia de la síntesis de TAG (lípidos neutros), que tiene lugar durante la etapa estacionaria (López-Alonso et al., 2000). Estos AGPI- ω 3 son bioproductos de alto valor agregado, dado que si bien el proceso de producción es costoso y complejo, los valores de comercialización son elevados por su incidencia en industrias alimentarias y farmacéuticas (Molina Grima et al., 1996). Por ejemplo, *Phaeodactylum tricornutum*, una especie de diatomea pelágica (vive libre en el agua), ha sido estudiada para su explotación comercial desde el enfoque de la biorrefinería, debido a la producción de EPA, fucoxantina y biocombustibles (Leu y Boussiba, 2014). Otros metabolitos intracelulares obtenidos a partir de diatomeas son **aminoácidos** para aplicaciones cosméticas y **TAG** destinados a funcionar como materia prima para la producción de biodiesel (Lebeau y Robert, 2003 a, b; Hildebrand et al., 2012; Levitan et al., 2014). Popovich et al., (2012) estudiaron dos especies de diatomeas aisladas del estuario de Bahía Blanca, *Skeletonema costatum* y *Navicula gregaria*, a escala de laboratorio con el fin de evaluar sus aceites para la producción de biodiesel. Los TAG fueron la fracción dominante en ambas especies (ca. 65% y 76%, respectivamente) y los aceites extraídos presentaron una dominancia de ácido palmitoleico (16:1(n-7), el cual ha sido señalado por mejorar la calidad de los aceites destinados a biodiesel, dado que aumenta el número de cetano y la estabilidad oxidativa de este biocombustible (Knothe, 2005).

2) Producción de metabolitos extracelulares liberados al medio, como por ejemplo **pigmentos, antibióticos y sustancias poliméricas extracelulares (EPS)** (Lebeau y Robert 2003, a,b; Pal y Paul, 2008). Con respecto a estos últimos productos, en el caso particular de las diatomeas bentónicas (organismos que viven asociados al fondo de la columna de agua), la secreción de EPS es muy significativa (Smith y Underwood, 1998). Los mismos consisten principalmente en carbohidratos (Hoagland et al., 1993; Staats et al., 1999) y debido a su secreción en grandes cantidades, los microorganismos quedan embebidos en una matriz de polisacáridos unidos a los sedimentos. Esta estructura se denomina *biofilm* y es común en las marismas intermareales. Las posibles aplicaciones de los EPS son muy variadas. Entre ellas: 1) en procesos de biorremediación (Bender y Phillips, 2004; Pal y Paul, 2008) debido a la presencia de polianiones que absorben y acumulan sustancias del medio circundante; 2) para la formación de estructuras tipo hidrogeles, de interés farmacéutico, por su potencial uso para la liberación controlada de drogas (Lowman, 2000); 3) en acuicultura, por incrementar la tasa de supervivencia de las post larvas del abulón (*Haliothis* sp.) (Chen, 2007). La producción de EPS en general está asociada con la fase estacionaria de crecimiento (Leandro et al., 2003) o cuando las células son expuestas a limitación de nitrógeno o fósforo (Staats et al., 1999; Smith y Underwood, 2000; Urbani et al., 2005). En base a las propiedades de los EPS y su secreción natural, los mismos constituyen co-productos de valor agregado y, asociado a la producción simultánea de biocombustibles, podrían representar una primera aproximación al concepto de biorrefinerías en diatomeas bentónicas.

Por último, la selección de especies microalgas robustas, la optimización de la producción de lípidos, la disminución de costos de cultivo, y la puesta a punto de procesos de biorrefinerías, son factores claves que deben ser resueltos para una comercialización viable de la producción de biodiesel a partir de microalgas. En un futuro próximo, la implementación de estas tecnologías será necesaria para complementar la matriz energética mundial y contribuir con la disminución de emisiones de CO₂.

Estuario de Bahía Blanca como fuente de materia prima para aplicaciones biotecnológicas

Las especies nativas poseen la particularidad de estar adaptadas a las condiciones climáticas locales, lo cual representa una ventaja en términos de crecimiento y competencia frente a otras especies (Rodolfi et al., 2009). Las microalgas oleaginosas (productoras de importantes cantidades de TAG), en general, habitan ecosistemas en donde el ambiente y el microclima alternan frecuentemente entre condiciones óptimas y sub-óptimas para el crecimiento (Schenk et al., 2008); tal es el caso de los ambientes estuarinos. En el caso particular del Estuario de Bahía Blanca, las microalgas dominantes son las diatomeas, tanto en la columna de agua (fitoplancton) como sobre los sedimentos del fondo (fitobentos) (Popovich, 2004; Popovich y Marcovecchio, 2008). Estas comunidades representan una fuente natural de biomasa y bioproductos. Estudios de más de 20 años avalan diversos aspectos ecológicos del ambiente, como son su productividad y diversidad. Sin embargo, el presente estudio profundiza aspectos relacionados con el cultivo de diatomeas tendientes al conocimiento de sus aplicaciones biotecnológicas.

Este estuario constituye una pieza fundamental para el desarrollo económico de la región. Al igual que otros sistemas de humedal, se caracteriza por ser un área de alta productividad y gran diversidad biológica. El presente trabajo ha considerado además, las ventajas que presenta este ambiente para futuros emprendimientos relacionados con la producción de microalgas a mayor escala. En especial, la robustez de las diatomeas hace prever, en parte, el éxito de cultivos masivos bajo condiciones similares a las de su ambiente natural.

La zona interna del estuario presenta algunas características que la convierten en un potencial sitio para el cultivo de microalgas con fines bioenergéticos: a) extensas planicies de marea, no aptas para la agricultura y de fácil acceso; b) agua salobre necesaria para el mantenimiento y desarrollo de los cultivos y c) es una zona portuaria que ofrece servicios ágiles, flexibles y adaptables a los requerimientos y cambios tecnológicos que exigen las economías internacionales (Fig. 1.4).



Figura 1.4. Imagen del Estuario de Bahía Blanca mostrando sus sistemas de canales, las extensas planicies de marea y el desarrollo portuario-industrial característico de su zona interna.

Por otro lado, Bahía Blanca ha sido considerada una de las ciudades argentinas que mayor cantidad de gases de efecto invernadero libera a la atmósfera debido a la intensa actividad química y petroquímica que se desarrolla (Ferraro et al., 2013). Estos autores, determinaron que las emisiones de CO₂ se deben principalmente a los consumos del sector industrial de la ciudad, el cual se concentra, en su mayor parte, en el veril norte de la zona interna del Estuario de Bahía Blanca. Considerando esta problemática ambiental, el desarrollo de cultivos masivos de microalgas en cercanías de una fuente de emisión de CO₂ podría contribuir a mitigar los gases de efecto invernadero de la región.

De acuerdo con los antecedentes expuestos anteriormente, se plantearon los siguientes objetivos.

Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo consistió en el aislamiento de diatomeas del estuario de Bahía Blanca y selección de aquella especie de mayor aptitud para el crecimiento bajo condiciones experimentales. Asimismo, las investigaciones abarcaron la optimización de los protocolos de cultivo,

considerando su crecimiento y síntesis de lípidos, específicamente triglicéridos. Dentro de esta vía, se evaluó también la potencialidad de la especie de producir EPS y ácidos grasos poliinsaturados ω -3 de valor agregado.

Objetivos específicos

Los **objetivos específicos** de esta tesis consistieron en:

- A) Aislar y seleccionar una especie de diatomea nativa oleaginosa, apta para cultivos.
- B) Optimizar los métodos de cuantificación de la velocidad de crecimiento, estimación de la biomasa y pigmentos celulares en la especie seleccionada.
- C) Determinar las condiciones específicas de cultivo para la producción de TAG en la especie seleccionada.
- D) Poner a punto métodos de detección y cuantificación de los lípidos totales, neutros y polares en la especie seleccionada.
- E) Caracterizar las fracciones lipídicas de acuerdo al perfil de los ácidos grasos en la especie seleccionada.
- F) Cuantificar y caracterizar los EPS producidos en los cultivos.
- G) Cultivar la especie seleccionada en un fotobiorreactor de 25L.

Capítulo 2- Materiales y métodos comunes a la tesis y descripción de la especie seleccionada

En este capítulo se describen los protocolos de recolección y aislamiento de distintas especies de diatomeas a partir de muestras naturales y los métodos necesarios para el mantenimiento y desarrollo de los cultivos unialgales. También se indica la metodología seguida para la identificación de la especie seleccionada para el desarrollo de la tesis y su descripción morfológica. Finalmente se detallan las abreviaturas y unidades comunes a la tesis.

2.1 Materiales y métodos

2.1.1 Obtención de muestras naturales

Se realizaron cuatro campañas durante los meses de abril, junio, julio y agosto del año 2010. La toma de muestra se efectuó desde el muelle de Puerto Cuatros (Pto. 38° 45' S, 62° 22' W) en la zona interna del Estuario de Bahía Blanca (Pcia. Bs. As) durante la pleamar. Se realizaron arrastres superficiales y verticales, en forma manual, durante cinco minutos. Se utilizó para ello una red de plancton de 25 µm de poro. Las muestras fitoplanctónicas fueron colectadas en envases de PVC, rotuladas y transportadas en heladera portátil hasta el laboratorio. Asimismo, se tomaron varios litros de agua para utilizar posteriormente en la preparación de los medios de cultivo.

2.1.2 Acondicionamiento del material de laboratorio

Se realizó el acondicionamiento del material de vidrio utilizado para la preparación de los medios de cultivo y para el desarrollo de las experiencias. De esta manera se intentó alcanzar un adecuado crecimiento de las células y evitar la infección de los cultivos con organismos indeseados, como bacterias y hongos.

Lavado: El material fue lavado con cepillo y detergente no iónico diluido al 1% y enjuagado con agua corriente. Para un segundo lavado se utilizó solución de HCl diluido al 10 % y se enjuagó con agua destilada, varias veces.

Esterilizado: Se realizó por medio de calor húmedo mediante una autoclave a 121°C y 1 atm de presión, durante 20 minutos.

2.1.3 Medios de cultivo

Se utilizaron los medios de cultivo f/2, SWES original y SWES modificado. El medio f/2 fue utilizado para el aislamiento de las células, su mantenimiento y realización de experiencias control. Este es un medio de agua marina enriquecida con nutrientes diseñado para el crecimiento de microalgas marinas costeras. El medio SWES (seawater + soil extract + salts), a diferencia del f/2, presenta molaridades de sales elevadas, es de elaboración más sencilla y menos costoso, debido a que no requiere de la incorporación de vitaminas ni buffers.

Medio de cultivo f/2 (Guillard, 1973)

Para la preparación del medio de cultivo se utilizó agua de mar envejecida de 32 UPS de salinidad. Los bidones en donde fue recolectada el agua de mar fueron almacenados en una cámara fría (4°C) durante un mínimo de 2 meses, con la finalidad de decantar el material más grueso. Para eliminar el material más fino, se realizó una filtración por medio de bomba de vacío a través de filtros Millipore de 0,45 µm de poro. Un (1) L de agua de mar filtrada, se esterilizó en autoclave a 121°C y 1 atm de presión, durante 20 minutos. Por último se adicionaron por filtración (filtros estériles Whatman de 0,2 µm de poro) los macronutrientes, micronutrientes (metales traza), vitaminas y buffer Tris. Todos estos componentes fueron adicionados a partir de soluciones madres. En la Tabla 2.1 se especifica la composición del medio y la forma en que fueron adicionadas las especies químicas al agua de mar.

Tabla 2.1: Elementos y soluciones que constituyen el medio f/2. Composición de las soluciones primarias (Sol. Primaria) y secundarias (Sol. Secundaria). Volúmenes [V (mL)] incorporados al agua de mar.

Compuestos	Sol. Primaria [g / 100 mL H ₂ O dest.]	Sol. Secundaria (1 L)	V. (mL)
Macronutrientes			
NaNO ₃	7,5		1
Na ₂ SiO ₃	3		1
NaH ₂ PO ₄	0,5		1
Micronutrientes			5
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,98	1 mL	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2,2	1 mL	
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1	1 mL	
MnCl ₂ ·4H ₂ O	18	1 mL	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,63	1 mL	
FeCl ₃ ·6H ₂ O		3,15 g	
Na ₂ EDTA·2H ₂ O		4,36 g	
Vitaminas⁽¹⁾			0,5
B12 (Cianocobalamina)	0,1	1 mL	
H (Biotina)	0,1	1 mL	
B1 (Tiamina- HCl)		0,2 g	
Tris- HCl⁽²⁾			1

⁽¹⁾ Solución de Vitaminas. Se tomaron 1 mL de las soluciones primarias de las vitaminas B 12 y H, se adicionó 0.2 g de vitamina B1 y esto fue llevado a un (1) L de agua destilada. La solución final fue fraccionada en pequeños tubos para ser mantenida en freezer, hasta el momento de su utilización.

⁽²⁾ Buffer / Tampón. Como elemento amortiguador del pH, y para evitar la precipitación de las sales, se utilizó el buffer tris [2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol; fórmula: (HOCH₂)₃CNH₂]. La solución se preparó disolviendo, en primer lugar, el Tris en agua destilada. Posteriormente se adicionaron entre 20 a 30 mL de HCl, de a poco, hasta alcanzar un pH entre 7.1 y 7.3.

Medio de cultivo SWES + Na₂SiO₃ (Universidad de Goettingen, Alemania)

Se preparó un medio de cultivo alternativo al f/2, de mayor contenido de nutrientes y de preparación más sencilla. Como base se utilizó agua de mar envejecida de 32 UPS de salinidad y filtrada a través de filtro de 0,45 µm de poro. Luego de medir 965 mL de la misma, se adicionaron las soluciones stock

de nitratos y silicatos, el fosfato en sólido, la solución de micronutrientes y el extracto de suelo. Para homogeneizar la mezcla se utilizó un agitador magnético a temperatura ambiente. La esterilización de la mezcla completa se realizó en autoclave a 121°C y 1 atm de presión, durante 20 minutos. En la Tabla 2.2 se especifica la composición del medio SWES + Na₂SiO₃ y la forma en que fueron adicionadas las especies químicas al agua de mar.

Tabla 2.2: Elementos y soluciones que constituyen el medio SWES.

Detalle de la forma en que se adicionaron los mismos al agua de mar: (V) Volumen incorporado de las soluciones y el extracto de suelo; (P) Peso del fosfato incorporado en forma sólida.

Compuestos	Solución [g / 100 mL H ₂ O dest.]	V. (mL)	P. (g)
NaNO ₃	2	20	
Na ₂ SiO ₃	0,3	15	
NaH ₂ PO ₄			0,02
Micronutrientes ⁽¹⁾		5	
Extracto de suelo ⁽²⁾		30	

⁽¹⁾ La composición y concentración de la solución de micronutrientes (metales traza) coincide con la utilizada para el medio f/2.

⁽²⁾ El extracto de suelo fue preparado a partir de la tindalización de un sistema formado por suelo y agua destilada. En un recipiente de vidrio se colocaron 1/3 de suelo y 2/3 de agua destilada. Luego de mezclar el sistema se llevó a autoclave (121°C y 1 atm de presión) durante 15 minutos. El material se dejó en reposo hasta el día siguiente en donde se realizó la separación del sobrenadante mediante filtración. El sobrenadante fue esterilizado y dejado en reposo hasta el día siguiente para una nueva esterilización. Este mismo procedimiento se repitió dos días más.

Medio SWES + Na₂SiO₃, modificado (SWES–N)

Para la preparación de este medio se mantuvo el procedimiento descrito anteriormente para el medio SWES. La composición y concentración de los nutrientes y elementos se especifica en la Tabla 2.3. Con la finalidad de

que el medio SWES-N presentara una concentración similar a la del medio f/2, se realizó la modificación de la concentración de N.

Tabla 2.3: Elementos y soluciones que constituyen el medio SWES-N.

Detalle de la forma en que se adicionaron los mismos al agua de mar: (V) Volumen incorporado de las soluciones y el extracto de suelo; (P) Peso del fosfato incorporado en forma sólida.

Compuestos	Solución [g / 100 mL H ₂ O dest.]	V. (mL)	P. (g)
NaNO ₃	1	10	
Na ₂ SiO ₃	0,3	15	
NaH ₂ PO ₄			0,02
Micronutrientes ⁽¹⁾		5	
Extracto de suelo ⁽²⁾		30	

⁽¹⁾ La composición y concentración de la solución de micronutrientes (metales traza) coincide con la utilizada para el medio f/2.

⁽²⁾ El extracto de suelo fue preparado a partir de la tinalización de un sistema formado por suelo y agua destilada. En un recipiente de vidrio se colocaron 1/3 de suelo y 2/3 de agua destilada. Luego de mezclar el sistema se llevó a autoclave (121°C y 1 atm de presión) durante 15 minutos. El material se dejó en reposo hasta el día siguiente en donde se realizó la separación del sobrenadante mediante filtración. El sobrenadante fue esterilizado y dejado en reposo hasta el día siguiente para una nueva esterilización. Este mismo procedimiento se repitió dos días más.

A continuación se presenta a modo comparativo un resumen de los componentes químicos y sus proporciones en los tres medios de cultivo utilizados (Tabla 2.4).

Tabla 2.4: Resumen de la composición química de los medios f/2, SWES y SWES-N. La concentración de los macronutrientes está expresada en μM . (\checkmark) Presencia del componente.

Componentes	f/2	SWES	SWES-N	Proporción f/2 : SWES: SWES-N
Nitratos	800	4700	1100	1 : 6 : 1
Fosfatos	36	145	145	1 : 4 : 4
Silicatos	100	150	150	1 : 2 : 2
metales traza	\checkmark	\checkmark	\checkmark	
vitaminas	\checkmark			
buffer	\checkmark			
extracto de suelo		\checkmark	\checkmark	

2.1.4 Establecimiento de cultivos unialgales en laboratorio

Establecimiento de cultivos unialgales a partir de muestras naturales

Con la finalidad de obtener cultivos monoclonales para el desarrollo de esta tesis, se iniciaron cultivos a partir de una sola célula o colonia. La separación del organismo de las muestras naturales se realizó mediante el método de pipeteo y lavados sucesivos (Hoshaw y Rosowski, 1973). Se colocaron sobre un portaobjetos gotas de medio de cultivo estéril, dispuestas en hilera. Sobre la primera gota de medio de cultivo se colocó una gota de muestra de red. Bajo microscopio se seleccionó un organismo y se aspiró con una pipeta Pasteur, para depositarlo en la segunda gota. Se continuó con el lavado de las unidades por medio de traspasos sucesivos a lo largo de toda la hilera de medio de cultivo. Las unidades aisladas fueron trasladadas a un tubo de vidrio esterilizado con tapa a rosca y 10 mL de medio f/2. La manipulación de las células se realizó bajo un microscopio Leica DM 2000, con una pipeta Pasteur esterilizada y afinada en su extremo. Los clones se mantuvieron en una cámara de cultivo, en f/2, 32 UPS de salinidad, 16 °C, de acuerdo con las condiciones encontradas en su medio natural. Se estableció un fotoperíodo de 12: 12h de luz y oscuridad bajo una radiación de $23 \pm 2 \mu\text{E m}^{-2} \text{seg}^{-1}$.

Aislamientos a partir de cultivos de enriquecimiento

Se desarrollaron cultivos de enriquecimiento* para aumentar el tiempo de supervivencia de las algas más robustas presentes en la muestra de red. De este modo, se pudieron realizar nuevos aislamientos en días posteriores a la toma de muestra natural. Se colocaron 50 mL de muestra concentrada en Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio f/2. Los cultivos se expusieron a las mismas condiciones que el inciso anterior. A partir de los cultivos de enriquecimiento se realizaron nuevos aislamientos. En este caso, se contó con la ventaja de que las células se encontraban aclimatadas. La técnica utilizada fue de pipeteo y lavados sucesivos, tal como se describió anteriormente.

* Cultivo de enriquecimiento: técnica en la que esencialmente se aplica el principio de selección natural a microescala.

2.1.5 Mantenimiento de los cultivos stock y escalado de cultivos

Las especies aisladas fueron mantenidas en tubos de vidrio de 10 mL estériles y con tapa a rosca, previamente llenados con 5 mL de f/2 (Fig. 2.1 a). Todos los cultivos fueron situados en una cámara de cultivo, a 15°C y una intensidad de 20 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$, medida con un fotorradiómetro (LICOR, LI-192 SB 2 π Model), aportada por tubos fluorescentes Philips L-35 de luz blanca y con un fotoperíodo de 12:12 h luz: oscuridad. La agitación se realizó de forma manual, diariamente. A intervalos de 20 días los cultivos monoclonales fueron repicados con el fin de mantenerlos sanos, evitar deformaciones valvares, envejecimiento celular y contaminación. La manipulación de los cultivos se realizó bajo cámara de flujo laminar, adaptada con alcohol 70% y cerca de la llama de un mechero Bunsen.

Previamente al inicio de cada ensayo, los cultivos stock (Fig. 2.1 a) 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. De acuerdo con la finalidad de la experiencia, se realizó el escalado progresivo de cultivos (Fig. 2.1 b-d), manteniendo a las células en fase exponencial.



Figura 2.1. Cultivos de *Navicula cincta*. (a) Cultivos stock. (b-d) Escalado de cultivos desde volúmenes de 100 mL hasta 4 L.

2.1.6 Criterios para la selección de la especie aislada

Algunas especies de los géneros *Skeletonema*, *Thalassiosira*, *Cylindrotheca*, *Chaetoceros* y *Navicula* fueron aisladas de las muestras naturales. Para una rápida selección de especies potencialmente oleaginosas, se tuvieron en cuenta: 1) su respuesta a las condiciones de cultivo y escalamiento y 2) la presencia de gotas lipídicas citoplasmáticas. En base a estos criterios, una especie de *Navicula* fue seleccionada para el desarrollo de esta tesis.

2.1.7 Métodos usados para la identificación de la especie seleccionada

Para la identificación de la especie se efectuaron observaciones con microscopio óptico (MO) de células vivas y de material tratado por oxidación de

la materia orgánica (2.1.7.1), y observaciones con microscopio electrónico de barrido (MEB) de material tratado (2.1.7.2).

2.1.7.1 Observación al MO

- a) Observación de células *in vivo*. Se colocaron gotas de cultivo sobre portaobjetos limpios con la finalidad de observar la morfología y coloración natural de las células, disposición de cloroplastos y movimiento celular.
- b) Observación de material limpio y montado en preparados definitivos. Los preparados definitivos se obtuvieron mediante dos procedimientos consecutivos que incluyeron: el tratamiento de las muestras con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el montaje del material con una resina de mayor índice de refracción.

Para el tratamiento de las células se utilizó la metodología de Hargraves (1982), con el fin de oxidar la materia orgánica y poder observar la ornamentación típica de las paredes celulares o frústulos. Los frústulos son el principal carácter diagnóstico para la identificación de las especies. Se centrifugaron 10 mL de cultivo algal con una centrífuga Rolco 2070 a 2500 rpm durante 5 minutos. Una vez descartado el sobrenadante, se adicionaron 5 mL de agua destilada, se homogeneizó la mezcla y se centrifugó nuevamente. Se realizaron 6 enjuagues sucesivos con agua destilada, con la finalidad de eliminar las sales. En el último proceso de centrifugado, sin descartar el sobrenadante, se agregó la misma cantidad de H_2O_2 diluida al 30%. La mezcla se llevó a baño maría, hasta la obtención de los frústulos limpios. Este proceso se realizó aproximadamente durante 4 horas, hasta constatar la pérdida de contenido celular; lo cual se realizó mediante observaciones frecuentes al MO. Nuevamente se efectuaron 6 lavados con agua destilada hasta llegar a pH neutro. Para la conservación del material se adicionaron unas gotas de alcohol al 70% y se guardó a 4°C.

La observación en el MO fue realizada sobre el material fijado con resina CUMAR. En primera instancia se eliminó el conservante del material tratado mediante lavados con agua destilada. Los portaobjetos de vidrio utilizados para el montaje fueron acondicionados con alcohol 98% y secados bajo llama. Sobre los mismos, se colocaron de 2 a 3 gotas de material a observar, por medio de

una pipeta Pasteur. El proceso de secado se realizó con calor seco suave, utilizando una plancha. Para finalizar, se agregaron unas gotas de resina líquida (CUMAR disuelto en xilol) sobre la muestra seca y se cubrió con un cubreobjetos limpio. El secado final fue a temperatura ambiente durante 24 horas.

2.1.7.2 Observación de material tratado con MEB

La preparación (tratamiento y conservación del material) se realizó de acuerdo con lo detallado previamente. Como soporte para los preparados se utilizaron portaobjetos de vidrio previamente limpiados con detergente no iónico, agua destilada y alcohol 98%. Para eliminar el preservante de las muestras se efectuaron dos lavados sucesivos con agua destilada. Mediante una pipeta Pasteur se colocó una gota de material en el cubreobjetos. El secado del material se realizó a temperatura ambiente. Los preparados fueron protegidos en desecador de vidrio durante unas horas, hasta la metalización con oro paladio. Las observaciones se realizaron con un Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) EVO del Complejo CONICET-Bahía Blanca.

2.2 Descripción de la especie seleccionada

2.2.1 Características morfológicas de la especie

A partir de las observaciones de distintos preparados, se determinó la especie de diatomea aislada, en base a las descripciones de Hustedt (1930), Hendey (1965), Gayoso (1981) y Lange-Bertalot (2001). Las características morfológicas observadas coincidieron con las descripciones realizadas para *Navicula cincta* (Ehrenberg) Ralfs, 1861.

Navicula cincta (Ehr.) Ralfs es una diatomea bentónica, cosmopolita, que prolifera en ambientes eutróficos, salinos a salobres y esporádicamente en áreas fuertemente contaminadas. Sus valvas pueden ser lineal lanceoladas o rómbico lanceoladas, con extremos redondeados. Sus dimensiones oscilan entre 14 µm a 45 µm de largo (eje apical) y entre 5,5 µm a 8 µm de ancho (eje

transapical). El frústulo de la especie en estudio presentó estrías fuertemente radiales en el centro y suavemente convergentes en los ápices (Figs. 2.2 y 2.3). El número de estrías fue de 8 a 12 en 10 μm (Fig. 2.2 a). El rafe fue filiforme (Fig. 2.2 a), con el área axial angosta (Fig. 2.2 b,c) y el área central pequeña e irregular, debido a la posición y largo variable de las estrías que la rodean (Fig. 2.2d).

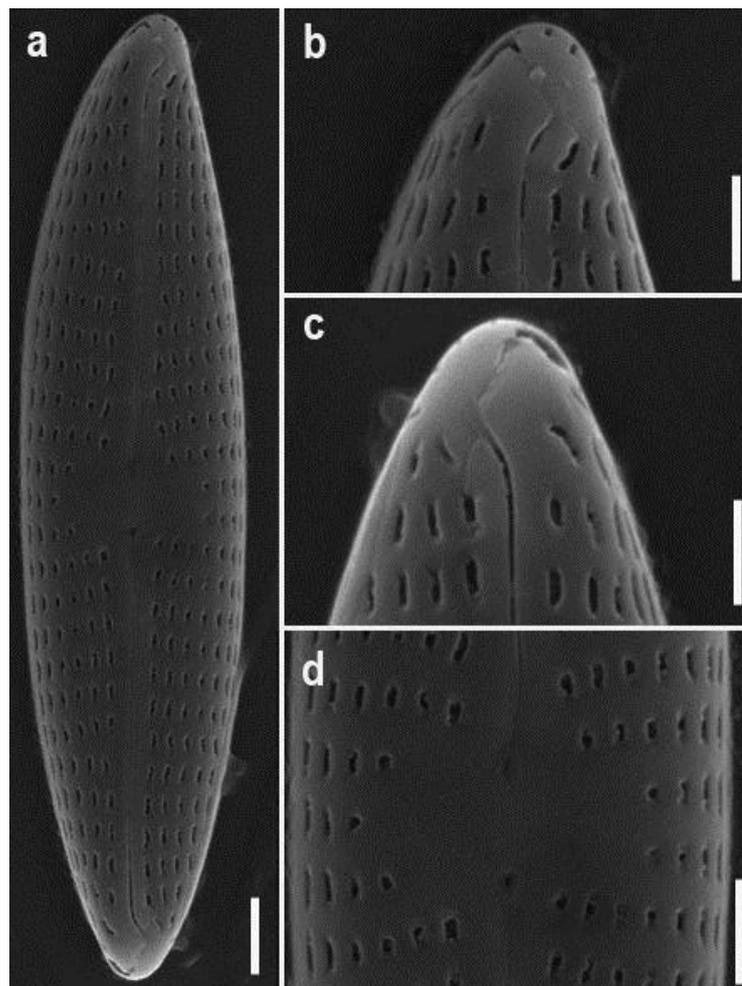


Figura 2.2. Vista externa del frústulo de *Navicula cincta*. (a-d) Micrografías de barrido. **(a)** Vista general del frústulo en posición valvar. **(b,c)** Detalle de ambos extremos. **(d)** Detalle de la porción media. Barra escala (a) = 2 μm , (b-d) = 1 μm

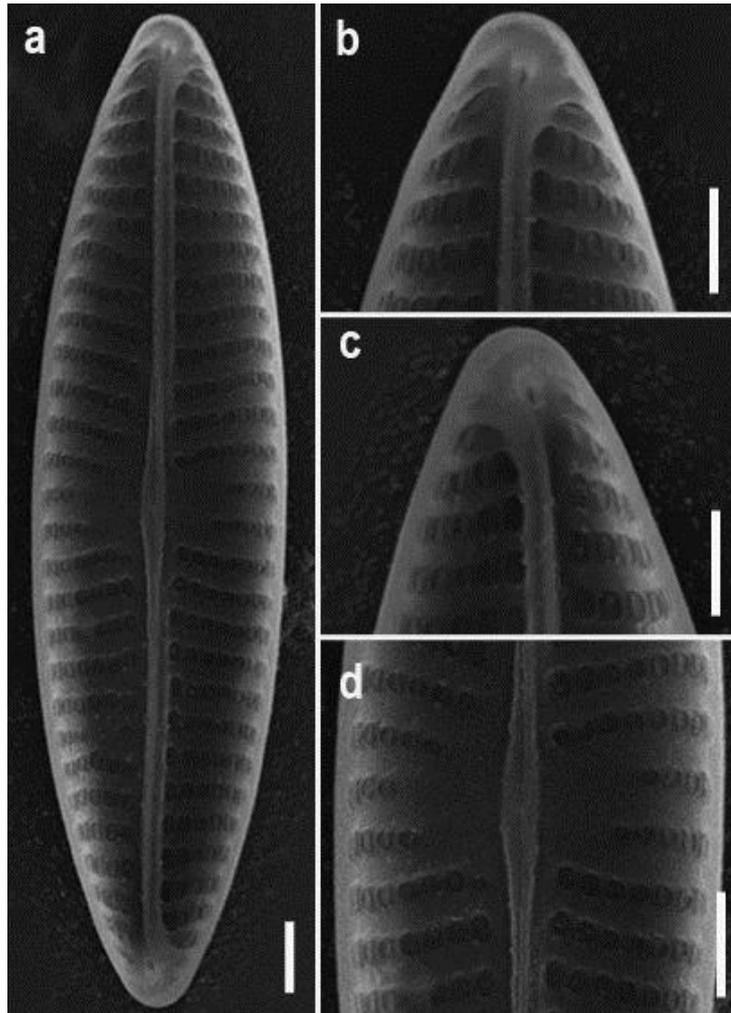


Figura 2.3. Vista interna del frústulo de *Navicula cincta*. (a-d) Micrograffías de barrido. **(a)** Vista general del frústulo. **(b,c)** Detalle de ambos extremos. **(d)** Detalle de la porción media. Barra escala (a) = 2 µm, (b-d) = 1 µm

Las células presentaron dos cloroplastos parietales (Fig. 2.4 a). En cultivos envejecidos o sin suficientes nutrientes, las células se encontraron mayormente formando agregados celulares (Fig. 2.4 b,c) y presentaron acúmulos de lípidos neutros, dispuestos en dos glóbulos, ocupando gran parte del citoplasma (Fig. 2.4 d).

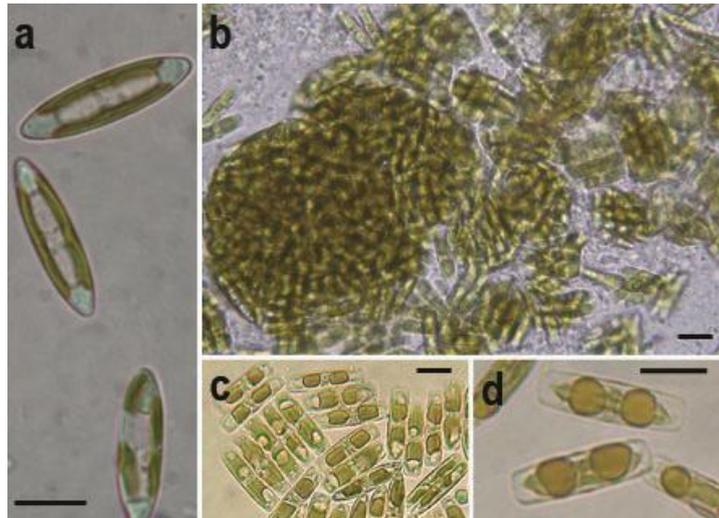


Figura 2.4. *Navicula cinta*. (a-d) Micrografías ópticas. **(a)** Células solitarias en vista valvar. Notar los cloroplastos parietales. **(b)** Agregados celulares en fase estacionaria de crecimiento. **(c)** Detalle de células agregadas. **(d)** Detalle de la disposición de los glóbulos lipídicos teñidos con Sudán. Barra escala (a,c,d) = 10 μm ; (b) = 15 μm .

La especie aislada e identificada fue enviada al cepario internacional Culture Collection of Autotrophic Organisms (CCALA), Instituto de Botánica, Academia de Ciencia, en República Checa, y actualmente se encuentra bajo el número provisorio CCALA 984.

Tabla 2.3. Abreviaturas y unidades utilizadas en la tesis.

Parámetro o variable	Símbolo o abreviatura	Unidades
condiciones ambientales fijas	CAF	
condiciones ambientales variables	CAV	
densidad celular	DC	células. mL ⁻¹
recuento celular	RC	
velocidad de crecimiento	<i>k</i>	div. día ⁻¹
tiempo de generación	TG	horas
contenido de clorofila <i>a</i>	Cl <i>a</i>	µg. mL ⁻¹
contenido de carotenoides	Carot	µg. mL ⁻¹
lípidos neutros	LN	
peso seco	PS	mg.L ⁻¹
absorbancia	Abs	
unidades arbitrarias de fluorescencia		u.a.
Rojo Nilo	RN	
intensidad de fluorescencia relativa del cultivo teñido con RN	IFR-RN	u.a.
intensidad de la autofluorescencia de la clorofila <i>a</i>	IF-CI	u.a.
intensidad de fluorescencia del RN	IF-RN	u.a.
intensidad de fluorescencia relativa por célula	IFR-Cel	u.a. mL. célula ⁻¹
cuerpos lipídicos	CL	
lípidos totales	LT	
lípidos neutros	LN	
lípidos polares	LP	
metilésteres de los ácidos grasos	FAME	
porcentaje en peso seco	% PS	g. g ⁻¹
porcentaje de peso seco libre de cenizas	% PSLC	g. g ⁻¹
porcentaje de lípidos totales	%LT	g. g ⁻¹
nitratos	N	
fosfatos	P	
silicatos	Si	
velocidad de consumo	VC	µM. día ⁻¹
Cloroformo	Clorof	
Metanol	Met	
agua destilada	AD	
glicolípidos	GL	
fosfolípidos	FL	

(continuación Tabla 2.3)

Parámetro o variable	Símbolo o abreviatura	Unidades
triglicéridos	TAG	
monoglicéridos	MAG	
diglicéridos	DAG	
reactivo color	R _{Col}	
ácidos grasos	AG	
Producción de biomasa	P _B	mg. L ⁻¹
Productividad de lípidos neutros	P _{LN}	mg. L ⁻¹ · d ⁻¹
índice de yodo	IY	g I ₂ · 100 g ⁻¹
contenido de ácido linoléico	% AcL	
ácidos grasos saturados	AGS	
ácidos grasos monoinsaturados	AGMI	
ácidos grasos poliinsaturados	AGPI	
sustancias poliméricas extracelulares	EPS	
exopolisacáridos solubles en el medio de cultivo	EPS-S	mg. L ⁻¹
exopolisacáridos levemente unidos a la célula	EPS-LU	mg. L ⁻¹
exopolisacáridos fuertemente unidos a la célula	EPS-FU	mg. L ⁻¹
fotobiorreactor	FBR	

Capítulo 3: Evaluación del crecimiento, biomasa, pigmentos celulares y acumulación de lípidos neutros en cultivos de *Navicula cincta*

3.1 Introducción

Para evaluar la aplicación biotecnológica de una especie microalgal y/o de sus bioproductos, se deben considerar ciertas características relacionadas con la potencialidad de su explotación comercial. De acuerdo al campo de aplicación, los criterios de evaluación varían. Por ejemplo, en el caso de la acuicultura se seleccionan especies con alta velocidad de crecimiento, pequeño tamaño y adecuada calidad nutricional (Jeffrey et al., 1990). Particularmente las diatomeas son muy utilizadas para el desarrollo de los primeros estadios de moluscos, crustáceos y peces, debido a las altas proporciones de los ácidos decosahecanoico (DHA) y eicosapentaenoico (EPA) (Reitan et al., 1997; Goksan et al., 2003; Richmond, 2004; Matias- Peralta et al., 2012) y la presencia de vitaminas (Brown et al., 1997). En cuanto a la temática de los biocombustibles, una prioridad es la selección de cepas oleaginosas y robustas (Rodolfi et al., 2009), es decir, que produzcan altos contenidos de lípidos neutros (LN), principalmente triglicéridos (TAG), que sean tolerantes a las técnicas de cultivo y que desarrollen elevadas velocidades de crecimiento (1 a 3 div. día⁻¹) (Hu et al., 2008).

Los sistemas de cultivo más sencillos son los denominados *batch*, dada su simplicidad y bajo costo (Barsanti y Gualtieri, 2006). Son sistemas cerrados, de volumen limitado, en donde no hay entrada ni salida de materiales y, por lo tanto, los recursos son finitos. La Fig. 3.1 representa la curva de crecimiento de un cultivo *batch* (línea continua) y la concentración de nutrientes (línea punteada) en el transcurso del tiempo (Mata et al., 2010). Las fases de crecimiento definidas son (1) lag; (2) exponencial, representando la máxima velocidad de crecimiento bajo condiciones específicas de crecimiento; (3) lineal; (4) estacionaria; (5) declinación o muerte. El patrón opuesto de la cinética de nutrientes indica una disminución de los mismos desde la fase estacionaria en adelante.

Los sistemas de cultivo cerrado o *batch* permiten un adecuado estudio y comprensión de la cinética y fisiología del alga, como así también el establecimiento de las condiciones óptimas de cultivo de una nueva especie en estudio.

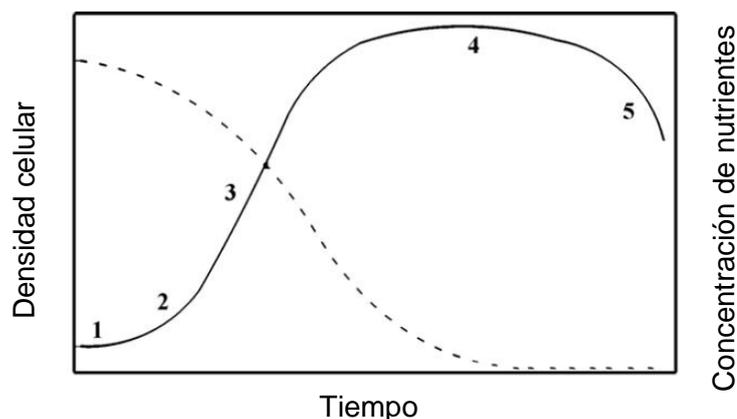


Figura 3.1. Representación esquemática del crecimiento de un alga en sistema de cultivo *batch* (línea continua) y la concentración de nutrientes (línea punteada). Los números indican las fases de crecimiento: (1) lag; (2) exponencial; (3) lineal; (4) estacionaria; (5) declinación o muerte. (Fuente: Mata et al., 2010).

En general, las producciones de biomasa y de lípidos neutros suelen concretarse en diferentes etapas del desarrollo de un cultivo y bajo distintas condiciones ambientales (Hu et al., 2008). La producción de biomasa generalmente se asocia con la etapa exponencial y requiere de condiciones favorables de temperatura, salinidad, intensidad de luz y nutrientes; mientras que la producción de lípidos neutros ocurre principalmente cuando el crecimiento disminuye por limitación de nutrientes. En procura que estas etapas sean eficientes y sustentables a nivel de procesos, es importante contar con información de la cinética del crecimiento del cultivo, como también de la acumulación lipídica, con el fin de poder estimar con mayor precisión el tiempo de cosecha. Por lo tanto, para una correcta evaluación de estas etapas, se requiere de técnicas de seguimiento y control de los cultivos que sean rápidas, sencillas y eficientes.

Un método convencional que permite estimar la velocidad de crecimiento de una población microalgal, incluye el recuento del número de células con microscopía óptica. Sin embargo, esta práctica requiere de mucho tiempo y suele ser tediosa (Madrid y Felice, 2005). Alternativamente, otros parámetros pueden ser utilizados como una aproximación de la biomasa celular, siempre que se tenga la precaución de que este parámetro y el número de células se correlacionen linealmente (Wood et al., 2005). Las mediciones de aproximación típicas incluyen fluorescencia *in vivo* de clorofila *a*, peso seco y densidad óptica.

Las determinaciones del contenido de lípidos a través de los métodos de extracción con solventes suelen ser precisas, pero insumen bastante tiempo y esfuerzo, haciendo dichos métodos poco prácticos para los seguimientos diarios de un cultivo. El contenido relativo de los lípidos neutros y su localización celular puede evaluarse *in situ* a través del uso de fluoró cromos, como es el caso del rojo Nilo (RN). El RN [(9-diethylamino-5H-benzo (α) phenoxazine-5-one)] es un colorante fluorescente que tiene la facultad de atravesar las estructuras celulares y reaccionar con los lípidos neutros dando una señal color amarillo-naranja (Fowler et al., 1987). Este colorante ha sido frecuentemente utilizado para evaluar el contenido de lípidos en diversos grupos de algas (Chen et al., 2009). De este modo, la cuantificación y visualización de los lípidos neutros se puede realizar de manera rápida sin la necesidad de utilizar solventes tóxicos (Lee et al., 1998). A pesar de las ventajas mencionadas, dentro de la Clase Bacillariophyceae, las intensidades de fluorescencia del RN suelen ser débiles (Moazami et al., 2011) o contradictorias con respecto a las determinaciones gravimétricas (Roleda et al., 2013). Una explicación a este comportamiento puede deberse a que cuando un cultivo microalgal es sometido a determinadas condiciones de estrés (factor inductor), no todas las células responden sincrónicamente debido a diferencias a nivel poblacional (tamaño celular, estado fisiológico, exposición al factor inductor, unidades de cultivo). Así, se puede hablar de una “acumulación a nivel celular” y otra “a nivel poblacional o del cultivo” (Solomon et al., 1986). La primera, requiere que la célula acumule lípidos de reserva como consecuencia de un factor inductor, el cual puede ser extrínseco (luz, nutrientes, temperatura) (Brown et al., 1996; de Castro Araujo y Tavano Garcia, 2005; Xia et al., 2013) o

intrínseco (edad del cultivo) (Brown et al., 1996). Mediante citometría de flujo Solomon et al., (1986) determinaron que la acumulación de los LN a nivel celular es un proceso rápido que puede durar entre 1 a 2 días. Mientras que la “acumulación lipídica máxima a nivel poblacional” requiere entre 7 a 10 días. De esta manera, el punto máximo en el cual los LN se han acumulado a nivel de cultivo refleja el tiempo requerido para que una significativa proporción de la población responda a uno o a varios factores de estrés. Esta fase del cultivo es clave para poder decidir el momento óptimo de cosecha de la biomasa para la producción de biodiesel.

Objetivo general

Evaluar el crecimiento de *Navicula cincta* en cultivos *batch*, bajo diferentes condiciones de temperatura y medios de cultivo, optimizando las metodologías que permitan caracterizar la velocidad de crecimiento, la producción de biomasa, el contenido de pigmentos y la cinética de acumulación de los lípidos neutros.

Objetivos específicos

- a) Analizar bajo qué condiciones de temperatura (15°C y 20°C) y medios de cultivo (f/2; SWES y SWES-N) se optimizan la velocidad de crecimiento y la producción de biomasa.
- b) Evaluar la influencia de la densidad celular del inóculo y el volumen de cultivo sobre la obtención de biomasa.
- c) Determinar si el peso seco, la estimación de la clorofila *a in vivo* y el contenido de pigmentos son parámetros estimativos o indicadores de su crecimiento.
- d) Detectar la presencia de lípidos neutros y analizar su distribución en la célula.
- e) Evaluar el contenido relativo de lípidos neutros y el posible tiempo de acumulación de los mismos.

3.2 Hipótesis

En el marco de los antecedentes planteados se pretendió testear las siguientes hipótesis:

- I. *La condición eurioica* de ciertas especies microalgales del Estuario de Bahía Blanca sugiere su robustez para ser cultivadas bajo distintas condiciones ambientales.*

En cultivos de Navicula cincta,

- II. *El aumento de la temperatura incrementa la velocidad de crecimiento y la biomasa del cultivo.*
- III. *El medio de cultivo SWES, con altas concentraciones de nutrientes, optimiza la producción de biomasa y el escalamiento de los cultivos.*
- IV. *La densidad del inóculo afecta los patrones de crecimiento*
- V. *La determinación del contenido de clorofila a y las mediciones de la autofluorescencia de los cultivos son indicadores indirectos de la actividad fotosintética de las células.*
- VI. *Las lecturas de absorbancia y la determinación del peso seco de un cultivo optimizan la cuantificación del crecimiento.*
- VII. *Las técnicas fluorométricas con rojo Nilo, resultan una herramienta útil y rápida para detectar la acumulación de los lípidos neutros y consecuentemente determinar el tiempo de cosecha.*

* Especie tolerante a un amplio rango de condiciones ambientales (temperatura, luz, concentración de nutrientes).

3.3 Materiales y Métodos

3.3.1 Cultivos

Independientemente de la finalidad de los ensayos, todos los cultivos fueron iniciados a partir de células provenientes de cultivos stock, no axénicos, en crecimiento exponencial y adaptados a las condiciones ambientales por un término de 2 a 3 generaciones.

Para el desarrollo de los cultivos, se establecieron condiciones ambientales fijas (CAF) y condiciones ambientales variables (CAV). Dentro de las CAF, se mantuvo una intensidad lumínica de $23 \pm 2 \mu\text{E m}^{-2} \text{seg}^{-1}$, un fotoperíodo de 12:12h luz: oscuridad y una salinidad de 32 UPS. Las CAV se correspondieron con dos temperaturas (15°C y 20°C) y tres medios de cultivo (f/2, SWES y SWES-N). El f/2 fue utilizado como control, debido a que es un medio de cultivo común y ampliamente utilizado para el crecimiento de algas marinas costeras, especialmente diatomeas. Los medios SWES y SWES-N fueron considerados tratamientos (Ver en Capítulo 2 detalle de la composición de los mismos).

Se realizaron cultivos a distintos volúmenes para evaluar el comportamiento y respuesta de la especie (crecimiento, cinética de pigmentos y acumulación de lípidos neutros) al escalado.

Estrategias de cultivo:

- a) Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de f/2, a 15°C y 20°C e inóculos de densidad baja (IB) ($0,3$ a $0,5 \times 10^4$ células. mL^{-1}), por triplicado, para establecer la velocidad de crecimiento (k) y el tiempo de generación (TG). La agitación de los cultivos se realizó diariamente en forma suave y manual.
- b) Erlenmeyer de 500 mL con 200 mL de f/2 o SWES, a 15°C y 20°C e inóculos de densidad media (IM) (9 a 12×10^4 células. mL^{-1}), por triplicado, para establecer k , TG, el contenido de clorofila a (Cl a) y carotenoides (Carot), la cinética de la clorofila a *in vivo* y la dinámica de acumulación de lípidos neutros (LN). A estos cultivos, además de la agitación manual, se les suministró diariamente aire, mediante aireadores eléctricos durante 3 horas.
- c) Un botellón de 5,5 L con 3,6 L de SWES-N, a 20°C y con un inóculo de densidad alta ($65,7 \times 10^4$ células. mL^{-1}) para establecer k , TG, Cl a , Carot, la cinética de la clorofila a *in vivo* y la dinámica de acumulación de LN. El cultivo fue agitado manualmente y la aireación se mantuvo de manera continua. Se le suministró aire enriquecido con CO_2 al 1%,

durante 3 horas diarias, una vez comenzado el período de luz. Las muestras fueron recolectadas como réplicas genuinas, por triplicado.

La experiencia SWES-N fue establecida como paso preliminar para la obtención de un cultivo a mayor escala (fotobiorreactor) (ver Capítulo 6). La selección de un único medio de cultivo para esta condición experimental se realizó considerando la facilidad y rapidez con que se prepara el medio SWES, en comparación con el medio f/2. La selección de un menor contenido de N, con respecto al SWES original, estuvo relacionada con el bajo contenido de lípidos totales determinado en células creciendo en SWES (ver Capítulo 4).

- d) Erlenmeyer de 1L con 400 mL de f/2 o SWES a 20°C, para establecer modelos estimadores de la densidad celular (DC) y la biomasa. La agitación de estos cultivos fue manual.

3.3.2 Determinación de la densidad celular (DC)

La DC se determinó a partir de recuentos celulares (RC) bajo un microscopio binocular Leica DM 2000, utilizando el objetivo 10 X. El conteo se realizó con una cámara de recuento tipo Sedgwick-Rafter luego de la sedimentación de las células contenidas en 1 mL de suspensión celular. En los casos en que el número de células no pudo ser determinado inmediatamente, se procedió a la fijación de las muestras con solución lugol- acético* para su preservación. Los recuentos se realizaron sobre las muestras originales, tratadas o diluidas, dependiendo de las características de cada una de las alícuotas.

Muestras originales: se tomó 1 mL de suspensión celular de un cultivo previamente homogeneizado y se colocó en la cámara de recuento. Luego de un tiempo de sedimentación se procedió al conteo celular.

Muestras tratadas: Las muestras provenientes de cultivos en medio SWES requirieron un tratamiento previo al recuento celular. La formación de agregados celulares dificultaron la individualización de las células y por lo tanto las densidades obtenidas resultaron subestimadas. Se procedió, entonces, a

diluir las muestras con agua de mar filtrada y someterlas a ultrasonido. El tiempo requerido para la desagregación parcial fue variable (entre 10 y 15 minutos) dependiendo de las características de la suspensión celular.

Muestras diluidas: Se realizaron diluciones sobre aquellas alícuotas originales que superaban las 800 células por campo óptico 10 X. La densidad final de las mismas se obtuvo por la multiplicación de las células contabilizadas y el factor de dilución correspondiente.

* Composición de la solución lugol- acético: 10 g de yoduro de potasio (KI) neutro en 100 mL de agua destilada + 50 g de iodo (I) cristalino disuelto en 10 mL de ácido acético glacial.

3.3.3 Cálculo de la velocidad de crecimiento y tiempo de generación

Velocidad de crecimiento

La velocidad de crecimiento (k) en unidades de divisiones por día (div. d^{-1}) se estimó a partir de RC siguiendo la metodología propuesta por Guillard (1973). Primero se estimó la constante de crecimiento (k_{10}) como la pendiente de la curva en la fase de crecimiento exponencial. Para ello las densidades celulares (N) de esta etapa son transformadas logarítmicamente ($Y = \log_{10} N$) y tratadas 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}).

Dado que en los organismos unicelulares el número de células se duplica durante cada generación, se realizó la interconversión de k_{10} a k (definida en base 2), mediante la siguiente fórmula

$$k \text{ (divisiones x día}^{-1}\text{)} = 3.322 \times k_{10} \quad (\text{ecuación 3.1})$$

De esta manera, k representa directamente el número de divisiones celulares por día en la población.

Tiempo de generación (TG)

Este parámetro expresa el tiempo en horas que requiere una célula para dividirse o duplicarse. Teniendo en cuenta que k fue calculada utilizando \log_2 , se utilizó la siguiente ecuación (Smayda, 1983) para establecer el tiempo de generación (TG):

$$\text{TG (horas)} = 24 / k \quad (\text{ecuación 3.2})$$

3.3.4 Definición de modelos estimadores de la densidad celular y la biomasa a partir de medidas de absorbancia

Con el objetivo de optimizar técnicas que faciliten y agilicen la determinación del crecimiento celular, se buscó obtener modelos estimadores de la DC y la biomasa, a partir de medidas de absorbancia (Rocha et al., 2003).

Para ello, se realizaron ensayos utilizando cultivos concentrados de 400 mL con f/2 o SWES a 20°C. Se tomaron muestras por triplicado, como réplicas genuinas, y se establecieron diferentes diluciones. En cada una de estas diluciones se determinó: el peso seco (a), la absorbancia (b) y la DC. La DC fue establecida como se detalló en el inciso 3.3.2.

a) Determinación de la biomasa

La biomasa algal fue estimada a partir del peso seco (PS) siguiendo la metodología de Sorokin (1973). Se tomaron entre 10 y 20 ml de suspensión celular, previamente homogeneizado, y se filtraron mediante bomba de vacío manteniendo la presión en 40 cm Hg. Se utilizaron filtros de microfibras Whatman® GF/F (0,7 μm de poro) previamente lavados con agua destilada, secados en estufa a 100-105°C durante 2 horas y pesados. Para remover las sales, los filtros con el material fueron lavados con agua destilada hasta reacción negativa de iones Cl^{-1} en el agua de filtrado*. El secado de las muestras provenientes de cultivos en f/2 fue realizado en dos etapas. La primera en estufa a 60°C durante 24 horas y la segunda en estufa a 100-105°C durante 3 horas. Este último procedimiento fue realizado con el fin de optimizar el tiempo en la obtención de resultados.

Las muestras provenientes del medio SWES fueron secadas de acuerdo con el segundo procedimiento. Todos los filtros (blancos y con muestra) se dejaron enfriar en desecador (con sílica gel, como agente desecante) antes de ser pesados. El pesaje fue realizado en balanza analítica a la cuarta cifra decimal.

* Reacción negativa: ausencia de precipitado blanco ante la adición de AgNO_3 .

El peso de la muestra se obtuvo mediante la siguiente fórmula

$$PS = (P_f - P_i) * 1000 / v * 1000 \quad (\text{ecuación 3.3})$$

donde:

PS: peso seco de la muestra en mg.L^{-1}

P_f : peso final del filtro más la muestra, luego de secado en estufa

P_i : peso inicial del filtro pre-lavado y pre-secado

v: volumen de la muestra filtrada (mL)

En la siguiente tabla se definen los volúmenes de muestra filtrada de acuerdo con el medio de cultivo y el volumen de agua destilada requerida para la eliminación de las sales.

Tabla 3.1. Detalle del volumen (V) de muestra filtrada proveniente de los medio f/2 y SWES y del volumen de agua destilada utilizada para el lavado de los filtros.

Medio de cultivo	V. alícuota (mL)	V. agua destilada (mL)
f/2	30	15
f/2	25	10
f/2	20	10
f/2	15	10
SWES	8	24
SWES	6	20
SWES	4	20
SWES	3	20

b) Determinación de la absorbancia

Otra alternativa para medir la DC en una suspensión celular son las lecturas de absorbancia (Abs), siempre que se tenga la precaución de que este parámetro se correlacione linealmente con el número de células (Wood et al., 2005). Luego de constatar que a la longitud de onda seleccionada, el aumento de DC resultó proporcional al aumento de turbidez, se realizaron las mediciones de este parámetro. Las Abs fueron registradas *in vivo* a 750 nm mediante un espectrofotómetro Shimadzu UV- 1603.

3.3.6 Validación de los modelos definidos

Con el objetivo de evaluar si los modelos planteados a partir de las Abs pueden ser usados como estimadores de la DC y del peso seco, dicha relación lineal fue contrastada con muestras tomadas al azar de cultivos desarrollados en f/2 y SWES. Sobre las muestras se estableció la DC y el peso seco en forma directa y a partir de los modelos propuestos. Ambos métodos se compararon obteniendo la pendiente b_1 y la ordenada al origen b_0 , teniendo en cuenta que ambas variables están sujetas a error (Massart et al., 1997). Los coeficientes de regresión se obtuvieron por minimización de las distancias ortogonales a la recta mediante las siguientes ecuaciones:

$$b_1 = \frac{S_y^2 - S_x^2 + \sqrt{((S_x - S_y)^2 + 4(\text{cov}(y;x))^2)}}{2\text{cov}(y;x)} \quad (\text{ecuación 3.4})$$

$$b_0 = y_p - b_1 x_p \quad (\text{ecuación 3.5})$$

Siendo: S_x^2 : varianza de las variables x

S_y^2 : varianza de las variables y

$\text{cov}(x,y)$: covarianza entre x e y

x_p : valor promedio de x

y_p : valor promedio de y

Para la evaluación conjunta de la pendiente y la ordenada al origen se plantearon las siguientes hipótesis:

$H_0: \beta_0=0$ y $\beta_1=1$

$H_1: \beta_0 \neq 0$ ó $\beta_1 \neq 1$

Se calculó el valor del estadístico F a partir de la siguiente ecuación:

$$F = \frac{(\beta_0 - b_0)^2 + 2x_p(\beta_0 - b_0)(\beta_1 - b_1) + (\sum x_i^2 / n)(\beta_1 - b_1)^2}{2S_e^2 / n} \quad (\text{ecuación 3.6})$$

Siendo: $S_e = \sqrt{\sum (y_i - y_{\text{esp}})^2}$

El estadístico F obtenido se comparó con el valor crítico tabulado F al 95% y con (2; n-2) grados de libertad.

Para validar el modelo que relaciona PS y Abs se necesitaría contar con un mayor número de muestras.

3.3.6 Determinación de pigmentos

El contenido celular de Cl a y Carot fue estimado utilizando técnicas espectrofotométricas mientras que la evaluación del comportamiento de la Cl a *in vivo* fue realizado mediante espectrofluorometría.

a) Método espectrofotométrico

Las concentraciones de Cl a y Carot fueron determinadas a partir de extractos metanólicos. El metanol es un solvente tóxico pero particularmente eficiente como vehículo extractor (Ritchie, 2006).

Alícuotas de 6 ml fueron filtradas sobre un filtro Whatman® GF/F de 25 mm de diámetro, posteriormente secado con papel absorbente y refrigerado en sobre de papel aluminio. Cada extracción se realizó por triplicado. Los filtros fueron depositados en viales de vidrio con tapa, se les adicionó 5 mL de alcohol metanol 99,9% y se mantuvieron durante toda la noche en oscuridad a -18°C. Antes de realizar las lecturas, los extractos fueron clarificados mediante filtración. El espectro de absorción se obtuvo entre las longitudes de onda de

430 nm y 750 nm, corrigiendo la línea de base con metanol. Las Abs fueron registradas mediante un espectrofotómetro Shimatzu UV- Visible 1603.

Las concentraciones de Cl a y Carot en 1 mL de cultivo se calcularon según Talling y Driver (1963) y Strickland y Parsons (1972), respectivamente.

$$\text{Cl a } (\mu\text{g.mL}^{-1}) \quad [\text{Cl a}] = 13.9 * (\text{Ab}_{665} - \text{Ab}_{750}) * v/V \quad (\text{ecuación 3.7})$$

$$\text{Carot } (\mu\text{g.mL}^{-1}) \quad [\text{Carot}] = 4 * (\text{Ab}_{480} - \text{Ab}_{750}) * v/V \quad (\text{ecuación 3.8})$$

Siendo Ab_x : lectura de la absorbancia a x longitud de onda

v: volumen de metanol

V: volumen de la muestra filtrada

b) Método espectrofluorométrico

Mediciones de autofluorescencia de la clorofila a (IF-Cl) fueron realizadas sobre alícuotas de 3 ml, mediante un espectrofluorómetro RF-5301 PC Shimadzu. Se utilizó una longitud de onda de excitación de 430 nm. Los picos de emisión se encontraron dentro de los 680 ± 5 nm. Los valores detectados fueron reportados en unidades arbitrarias de fluorescencia (u.a.).

3.3.7 Detección celular y cinética de acumulación de lípidos neutros

Cultivos desarrollados bajo diferentes condiciones fueron evaluados a partir de la tinción (a) de los mismos con rojo Nilo. Se estableció la presencia de LN mediante observaciones con un microscopio confocal de epifluorescencia (b) y se evaluó la cinética de acumulación de los mismos mediante espectrofluorometría (c). De forma anexa, se estableció la intensidad de fluorescencia relativa por célula (d).

a) Tinción: Se siguió una modificación del método propuesto por Priscu et al., (1990). Se adicionaron 5 μL de una solución de RN en acetona (1 mg.mL^{-1}) a 5 ml de suspensión celular. Las mezclas fueron agitadas durante unos minutos, por medio de un vórtex, antes y después de agregarles el colorante. Las muestras provenientes de experiencias en medio SWES fueron mantenidas en

un ultrasonido durante 3 a 5 minutos (sin temperatura) antes de su tinción con RN. Este procedimiento se realizó con la finalidad de disminuir los agregados celulares que se forman en el cultivo y dificultan las mediciones. En general, las suspensiones teñidas se incubaron entre 20 y 30 minutos, antes de realizar el análisis.

b) Microscopía de fluorescencia. Se analizó la distribución y forma de las gotas lipídicas mediante un microscopio confocal TCS SP2 SE, con un filtro de excitación de 475 nm y un filtro de emisión de 580 nm.

c) Análisis espectrofluorométrico. La cinética de acumulación de los LN durante el transcurso de las experiencias fue establecida a través de la detección de las señales con un espectrofluorómetro RF-5301 PC Shimadzu. La excitación de las muestras se realizó a una longitud de onda de 480 nm. Los lípidos fueron cuantificados a partir de los picos de fluorescencia detectados en el espectro de emisión entre los 500 a 750 nm. Los principales picos se encontraron entre los 570 y 598 nm, que corresponden al espectro de emisión de los lípidos neutros (Cooksey et al., 1987; Mendoza Guzmán et al., 2011). Las determinaciones fueron realizadas por triplicado. Los valores finales fueron definidos en unidades arbitrarias de fluorescencia (u.a.).

La intensidad de fluorescencia relativa del cultivo teñido con RN (IFR-RN) fue obtenida por la sustracción de las intensidades de autofluorescencia de las células (IF-CI) y la fluorescencia del RN (IF-RN) a la intensidad de fluorescencia de las células teñidas con RN (IF-Cul), mediante la ecuación 3.9.

$$\text{IFR-RN (u.a.)} = \text{IFR-Cul} - \text{IF-CI} - \text{IF-RN} \quad (\text{ecuación 3.9})$$

d) Intensidad de fluorescencia relativa por célula (IFR-Cel): La IFR-Cel fue establecida mediante la relación entre la IFR-RN y la DC del cultivo. La misma se utilizó como un indicativo de la acumulación de los LN a nivel celular.

La ecuación específica utilizada fue:

$$\text{IFR-Cel (u.a. mL. célula}^{-1}\text{)} = \text{IFR-RN} / \text{DC} \times 10^4 \quad (\text{ecuación 3.10})$$

3.3.8 Análisis estadístico de los datos

Debido al rechazo de los supuestos de normalidad y homocedasticidad en las variables k , DC, contenido de clorofilas y carotenoides se aplicaron test no paramétricos (Sokal y Rohlf, 1999) con un nivel de significación de 0,05. La comparación en las k y DC finales entre experiencias fue realizada mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Para comparar la composición pigmentaria obtenida mediante espectrofotometría se evaluó la relación carot/Cl a entre el inicio y final de cada condición experimental mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. El *software* estadístico utilizado fue INFOSTAT® (versión libre, <http://www.infostat.com.ar>).

3.4 Resultados

Bajo las condiciones experimentales testeadas, los cultivos presentaron diferentes patrones de crecimiento como se puede observar en la Fig. 3.2. El período de tiempo que involucró cada una de las etapas de las respectivas curvas de crecimiento se detalla en la Tabla 3.2. El inicio de la fase exponencial fue muy variable (días 0, 2 y 4) y el tiempo que comprendió también. En la experiencia inóculo alto, SWES-N a 20°C el cultivo no mostró una marcada diferenciación entre fases, por lo que en este caso se habla de un crecimiento sostenido y moderado a lo largo de los 14 días. En ninguno de los tratamientos se detectó un decaimiento del crecimiento durante el período evaluado.

Las DC alcanzadas en los cultivos estuvieron entre los $14,7 \pm 3,4 \times 10^4$ células. mL⁻¹ y $126,6 \pm 13 \times 10^4$ células. mL⁻¹ (Tabla 3.2). La DC final alcanzada en la experiencia inóculo alto, SWES-N a 20°C fue estadísticamente superior al resto de las experiencias ($H= 19.13$; $p=0.0039$).

El rango determinado para k fue $0,29 \pm 0,02$ div. día⁻¹ y $1,42 \pm 0,09$ div. día⁻¹, mientras que el correspondiente a TG estuvo entre $16,8 \pm 2,4$ horas y $82,5 \pm 12$ horas (Tabla 3.2). Se detectaron algunas diferencias en las k entre tratamientos. El valor de k establecido en la experiencia inóculo bajo, f/2 a 20°C (ca. 1,4 div. día⁻¹) fue significativamente superior a los determinados en inóculo

medio, f/2 a 15°C; inóculo medio, SWES a 15°C e inóculo alto, SWES-N a 20°C (H= 18,27; p=0,0055).

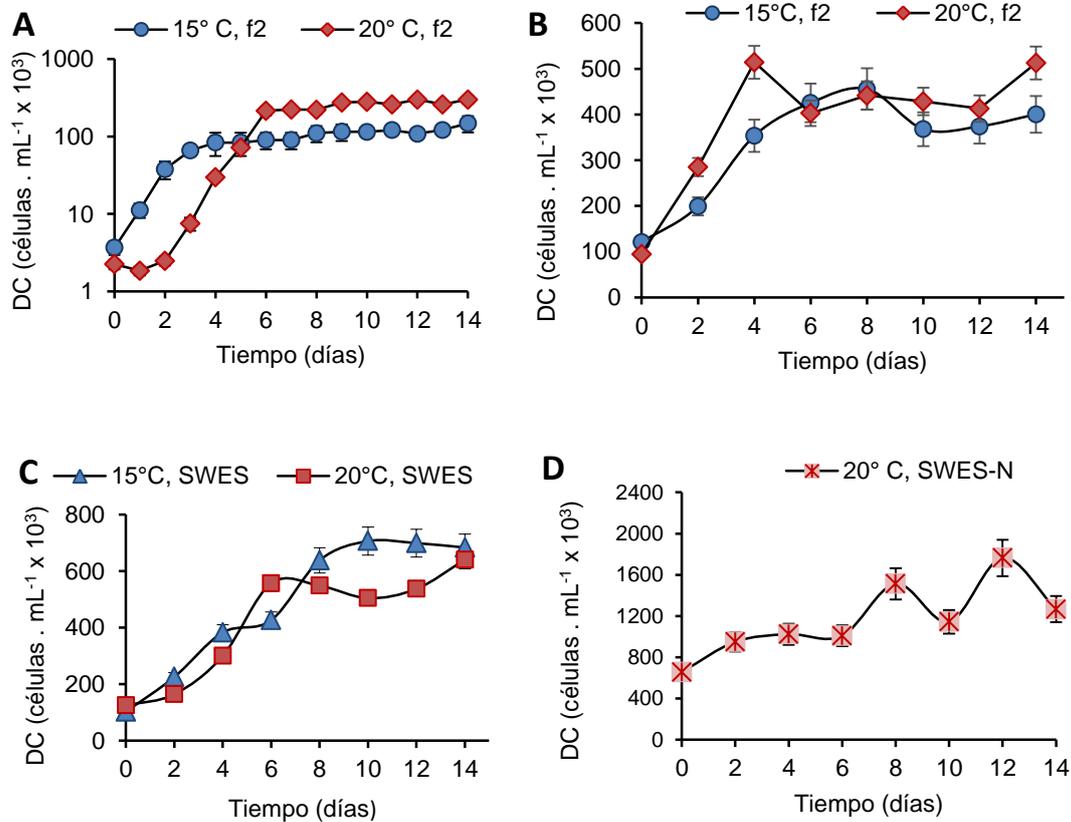


Figura 3.2. Curvas de crecimiento de *Navicula cincta* en las diferentes condiciones de cultivo evaluadas. (A) inóculo bajo, f/2 a 15°C y 20°C. (B) inóculo medio, f/2 a 15°C y 20°C. (C) inóculo medio, SWES a 15°C y 20°C. (D) inóculo alto, SWES-N a 20°C. Las barras de error representan desviaciones estándar entre réplicas.

Tabla 3.2. Resumen del tiempo de cada fase de crecimiento, densidad inicial y final y parámetros establecidos en las experiencias de cultivo con distinto inóculo inicial. Cada una de las fases está definida en los días correspondientes a la curva de crecimiento. Las densidades están expresadas en células. mL⁻¹ x 10⁴ y *k* y TG en div. día⁻¹ y horas, respectivamente. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p=< 0.05; a<b<c<d<e). (Temp: temperatura (°C); exp: exponencial; est: estacionaria, DC: densidad celular; Pm: parámetros).

Inóculo	Densidad baja		Densidad media				Densidad alta
	f/2		f/2		SWES		SWES- N
Medio	f/2		f/2		SWES		SWES- N
Temp.	15	20	15	20	15	20	20
Fase							
lag	-	0 - 2	0 - 2	-	-	0 - 2	-
exp.	1 - 2	2 - 6	2 - 4	0 - 4	0 - 8	4 - 6	0 - 14
est.	3 - 14	6 - 14	4 - 14	4 - 14	8 - 14	6 - 14	-
DC							
inicio	0,3 ± 0,07	0,2 ± 0,03	12,1 ± 1,2	9,4 ± 0,9	10,2 ± 1,5	12,5 ± 1,8	65,7 ± 7,0
final	14,7 ± 3,4 ^a	30 ± 3,5 ^{ab}	40 ± 4,8 ^{abc}	51,2 ± 6,1 ^{abcd}	68,3 ± 8,2 ^{cd}	64,0 ± 7,6 ^{bcd}	126,6 ± 13 ^d
Pm.							
<i>k</i>	1,28 ± 0,15 ^{cd}	1,42 ± 0,09 ^d	0,41 ± 0,02 ^{abc}	0,42 ± 0,02 ^{abcd}	0,38 ± 0,02 ^{ab}	0,44 ± 0,03 ^{bcd}	0,29 ± 0,02 ^a
TG	18,7 ± 1,2	16,8 ± 2,4	58,5 ± 3,8	57,1 ± 3,6	63,1 ± 8,6	58,5 ± 7,4	82,5 ± 12

Con respecto a la determinación de biomasa mediante PS, se observó que las dos temperaturas y tiempos de secado del material proveniente de los cultivos en f/2 fueron satisfactorias (Fig. 3.3). Sin embargo, la dispersión del PS obtenido a 60-65°C durante 24 horas fue mayor que el obtenido a 100-105°C durante 3 horas. Por lo tanto, este último se seleccionó como mejor protocolo de secado para la definición de los modelos que relacionan PS y Abs en los medios f/2 y SWES.

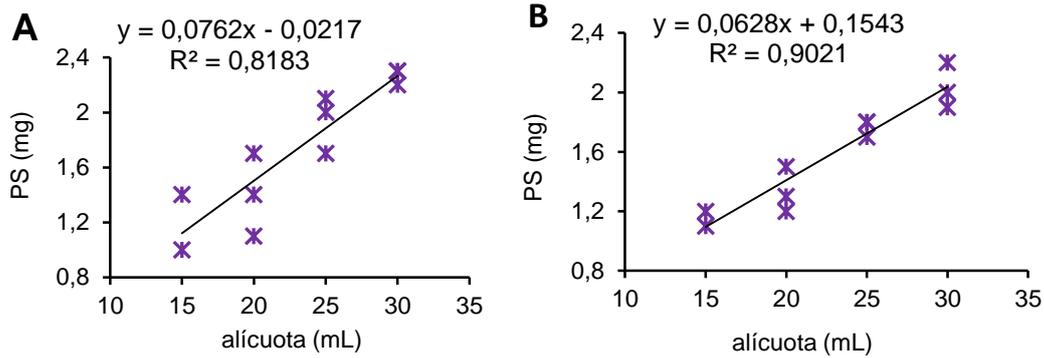


Figura 3.3. Gráficos de dispersión de los PS y las alícuotas del cultivo en f/2, obtenidos mediante dos metodologías. (A) PS a 60°C durante 24 horas. (B) PS a 100°C durante 3 horas.

La Fig. 3.4 muestra las curvas de calibrado que permiten obtener estimaciones de la DC y el PS del cultivo en f/2 (A y B, respectivamente) y SWES (C y D, respectivamente) a partir de las mediciones de Abs a 750 nm. Dentro de cada uno de los gráficos se expresa la ecuación correspondiente que relaciona las variables involucradas y los coeficientes de correlación (R^2). El modelo para el medio f/2 es aplicable a los cultivos con una DC entre $2,9 \times 10^4$ y $3,4 \times 10^5$ células. mL^{-1} y un PS entre 36 mg. L^{-1} y 73 mg. L^{-1} , considerando el mantenimiento de la linealidad en los rangos mencionados. En cuanto al modelo desarrollado para el medio SWES, la relación lineal entre las variables se verifica a DC entre $1,0 \times 10^5$ y $8,2 \times 10^5$ células. mL^{-1} y un PS entre $77,5 \text{ mg. L}^{-1}$ y 326 mg. L^{-1} .

Con los valores experimentales y $\beta_0=0$ y $\beta_1=1$ se obtuvo un F estadístico de 0,21 y 355,67 para f/2 y SWES, respectivamente. Los mismos fueron comparados con un valor crítico tabulado (Tabla 3.3). Dado que el valor de F para f/2 fue menor que el tabulado, no se encontraron evidencias para rechazar la hipótesis nula. Es decir, la ordenada al origen "0" y la pendiente "1" caen dentro de la elipse de dispersión de puntos con un 95% de confianza.

El modelo

$$DC = 3 \times 10^6 \text{ Abs} - 16.623$$

(ecuación 3.11)

puede ser empleado para obtener una estimación del número de células en f/2 mediante lecturas de Absorbancias a 750 nm *in vivo*.

Considerando que el F calculado para SWES fue mayor que el tabulado, se rechaza la hipótesis nula conjunta. Es decir, no se tiene la certeza que el modelo propuesto para este medio sea el adecuado para estimar el número de células en SWES mediante lecturas de absorbancias.

Tabla 3.3. Datos del análisis de validación del modelo que relaciona DC y Abs en cultivos creciendo en f/2 y SWES. n: Número de muestras en las que se basó el test. b_1 y b_0 : coeficientes de la regresión obtenidos por minimización de las distancias ortogonales a la recta.

Origen de los datos	n	b_1	b_0	F estadístico	F crítico
f/2	18	0,95	-13582,86	0,21	3,634
SWES	15	-0,13	493994,11	355,67	3,806

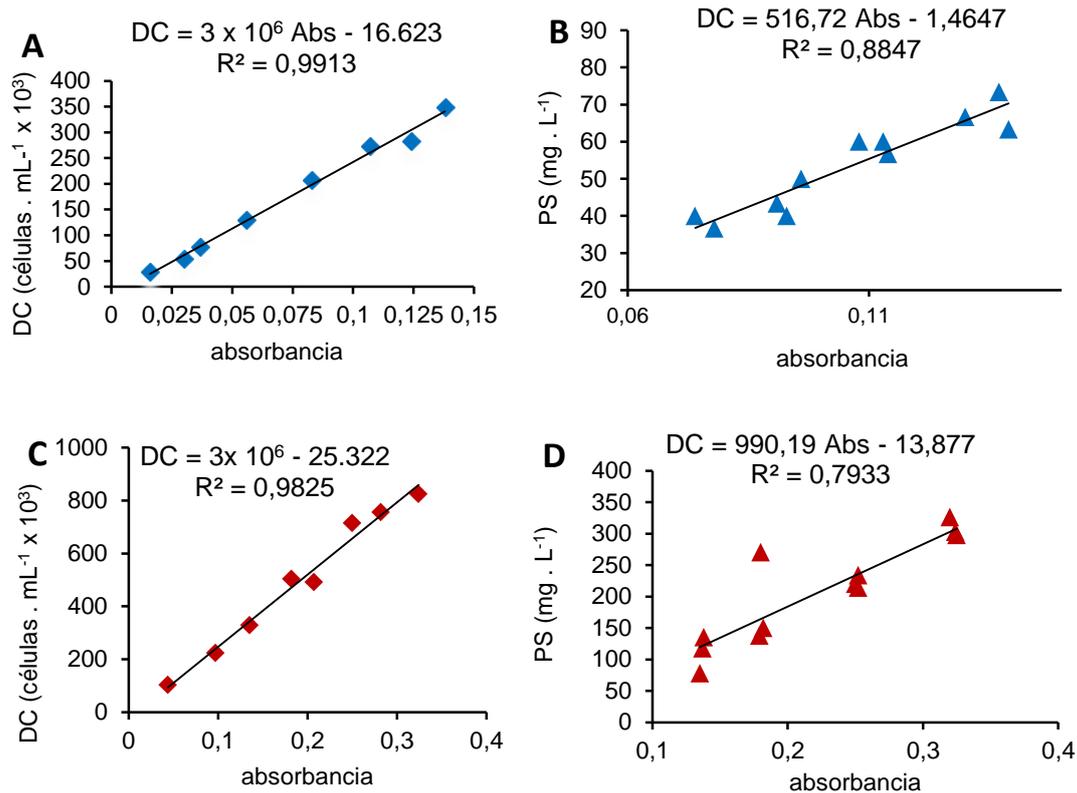


Figura 3.4. Modelos de regresión que relacionan mediciones de DC y PS con lecturas de Abs, a 20°C. Curvas de calibrado de la DC (A) y PS (B) en relación a la Abs en cultivos desarrollados en f/2. Curvas de calibrado de la DC (C) y PS (D) en relación a la Abs en cultivos desarrollados en SWES.

En cuanto a la composición pigmentaria, se encontró que el contenido de Cl a final varió entre $1,32 \pm 0,18$ pg. célula⁻¹ y $2,47 \pm 0,19$ pg. célula⁻¹, mientras que el contenido de Carot final estuvo entre los $0,34$ pg. célula⁻¹ $\pm 0,03$ y $0,92 \pm 0,09$ pg. célula⁻¹ (Fig. 3.5). Sin considerar el valor del día 2, que representa la historia previa del cultivo, y, en términos generales, el contenido de Cl a mostró un incremento desde el día 2 hasta el día 10 en medio f/2; un comportamiento estable en SWES y un incremento sostenido en SWES-N.

Del mismo modo, el contenido de Carot no mantuvo la misma tendencia en todas las experiencias. Las concentraciones finales por célula disminuyeron (15°C y 20°C, SWES), no variaron (15°C, f/2) o aumentaron (20°C, f/2 y 20°C, SWES-N) respecto al contenido inicial. La proporción entre Carot y Cl a se mantuvo constante en el transcurso de las experiencias 20°C, f/2 y 15°C, SWES y disminuyó en el resto de las condiciones evaluadas.

No se detectaron diferencias significativas en la relación CI *a*/Carot inicial y final dentro de cada experiencia (Wilcoxon Mann Whitney; $W= 0,6$; $p=0,1$, para cada experiencia).

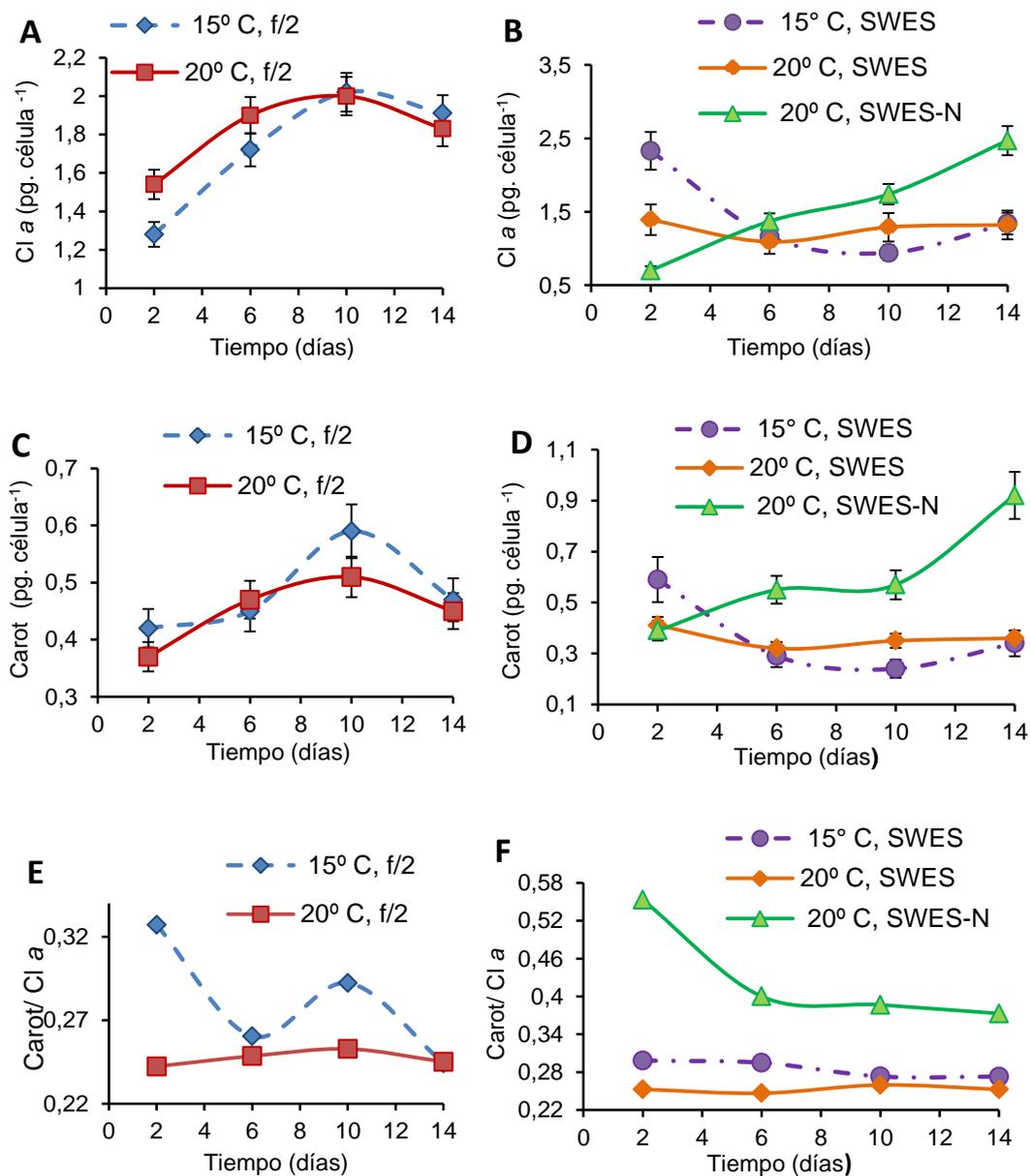


Figura 3.5. Valores promedio del contenido de clorofila a y carotenoides (pg. célula⁻¹) bajo las distintas condiciones de cultivo. (A) Concentración de Cl a en f/2 a 15°C y 20°C. **(B)** Concentración de Cl a en SWES a 15°C y 20°C y en SWES-N a 20°C. **(C)** Concentración de Carot en f/2 a 15°C y 20°C. **(D)** Concentración de Carot en SWES a 15°C y 20°C y en SWES-N a 20°C. **(E)** Relación Carot/Cl a en f/2 a 15°C y 20°C. **(F)** Relación Carot/Cl a en SWES a 15°C y 20°C y en SWES-N a 20°C. Cl a: clorofila a; Carot: carotenoides.

El conjunto de datos de Cl a *in vivo* y el contenido de Cl a obtenida mediante extractos metanólicos fueron graficados para analizar el comportamiento de las dos metodologías, respecto a la DC. La variabilidad

observada en los resultados no se asoció a las distintas temperaturas, por lo que los datos fueron separados de acuerdo al medio utilizado para cultivar (Fig. 3.6).

En los medios f/2 y SWES se puede observar que a DC bajas (4×10^5 células. mL⁻¹ y 3×10^5 células. mL⁻¹, respectivamente) la curva de tendencia lineal de los extractos fue superior a la curva de tendencia lineal de la CI *in vivo*. A DC mayores la curva de tendencia lineal de la autofluorescencia supera la de los extractos. En el caso particular de la experiencia en SWES-N la tendencia lineal de la CI *a in vivo* fue superior a la espectrofotométrica, en todo el rango de DC evaluadas.

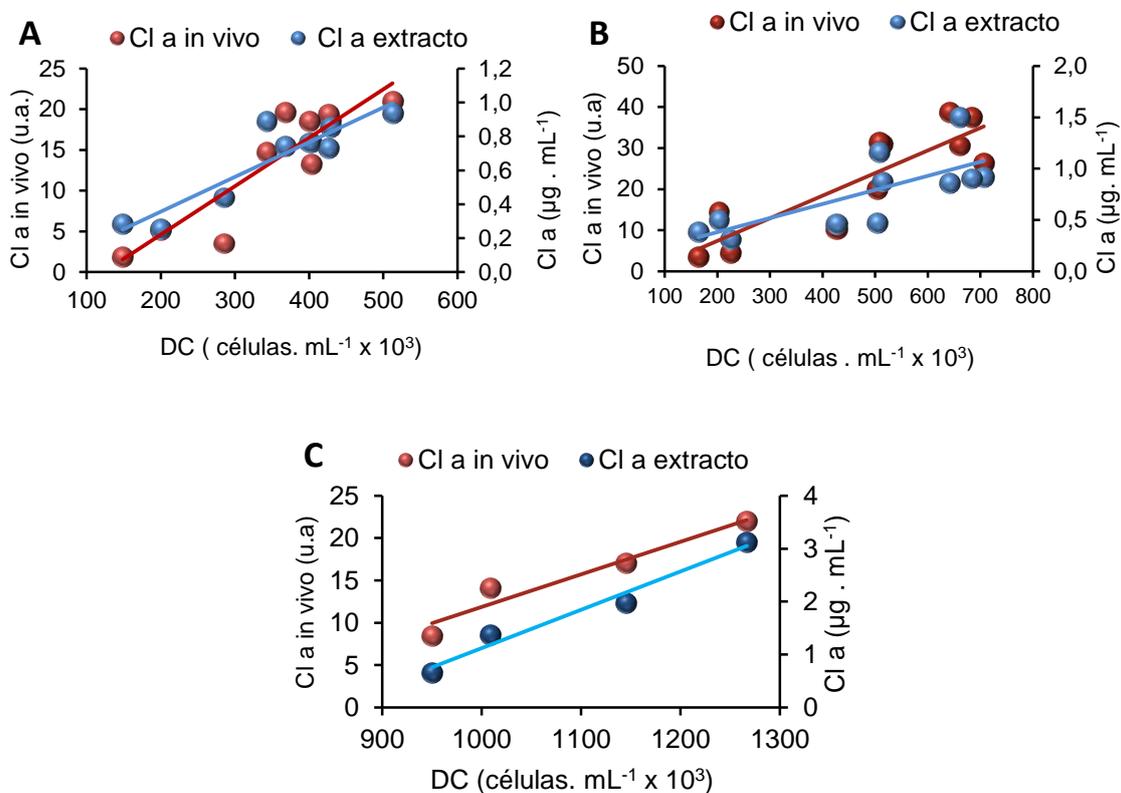


Figura 3.6. Clorofila *a in vivo* y contenido de clorofila *a* en cultivos desarrollados en distintos medios de cultivo. (A) Valores obtenidos en f/2 a 15°C y 20°C. **(B)** Valores obtenidos en SWES a 15°C y 20°C. **(C)** Valores obtenidos en SWES-N a 20°C. Las líneas azul y roja representan la tendencia lineal media del contenido de CI *a* y la autofluorescencia de la CI *a*, respectivamente.

Los lípidos neutros se detectaron mediante tinción con rojo Nilo y observación con microscopio de fluorescencia confocal durante la fase estacionaria de crecimiento (Fig. 3.7). A una longitud de onda de emisión de 580 nm, los cuerpos lipídicos se evidenciaron por su coloración dorada característica, ocupando gran parte del citoplasma (Fig. 3.7 b,d,e). Cuando las células fueron excitadas con luz verde los cloroplastos emitieron autofluorescencia roja (Fig. 3.7 c,e).

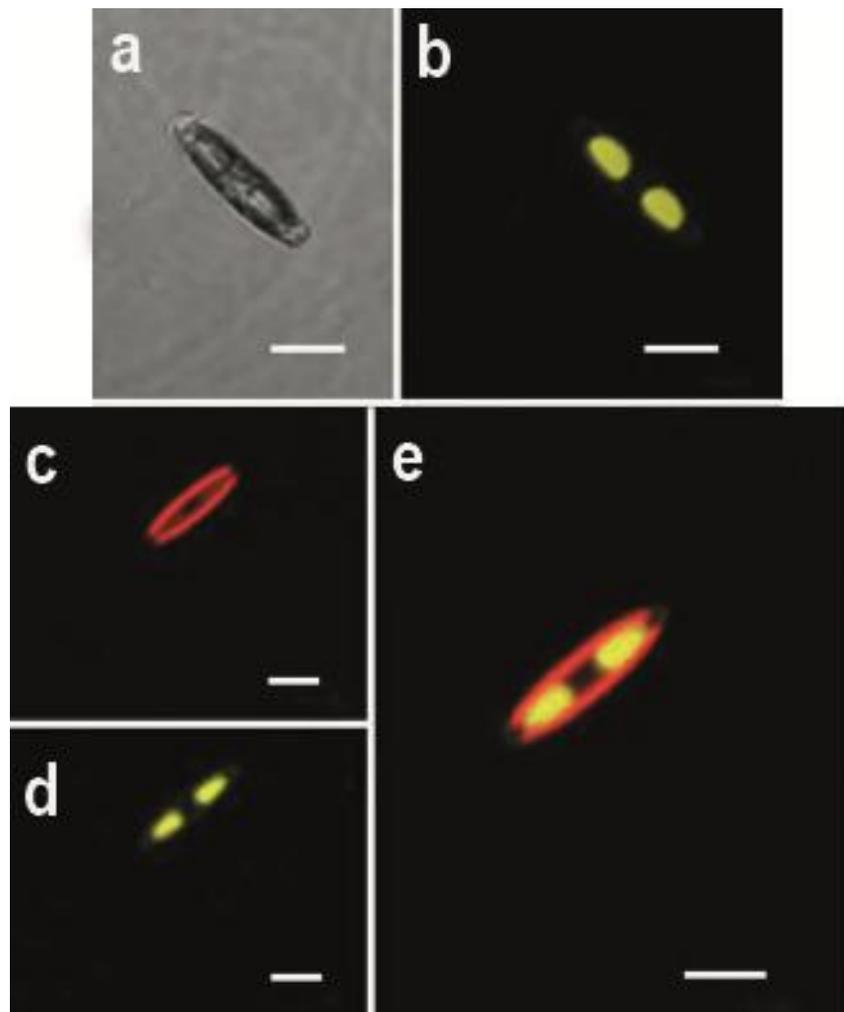


Figura 3.7. Observación de células de *Navicula cincta* en fase estacionaria con microscopio confocal. (a) contraste de fases. (b-e) fluorescencia. (b,d) la coloración dorada indica dos corpúsculos de lípidos neutros. (c) autofluorescencia de los cloroplastos parietales. (e) Superposición de las imágenes c y d. Barra escala Figuras a-e = 10 μ m

Para evaluar la progresión de los cuerpos lipídicos (CL) en cultivo, células de *N. cincta* creciendo en f/2 se tiñeron con RN (Fig. 3.8). El seguimiento fue realizado durante 14 días. Al inicio de la fase exponencial (día 2), los CL se evidenciaron como estructuras puntiformes, con una leve intensidad de la fluorescencia (Fig. 3.8 a,b). Al final de la fase exponencial (día 6), los CL adquirieron forma más definida y presentaron mayor intensidad de fluorescencia (Fig. 3.8 c,d). En la fase estacionaria (días 8 y 10) el volumen y la intensidad de fluorescencia de los CL incrementó considerablemente (Fig. 3.8 e,f y g,h). Además, en fase estacionaria tardía (día 14) se observaron agregados formados por algunas células y material mucilaginoso (Fig. 3.8 i, j).

Luego de 18 días de cultivo, los CL ocuparon la mayor parte del citoplasma y la mayoría de las células se encontraron formando agregados celulares (Fig. 3.9).

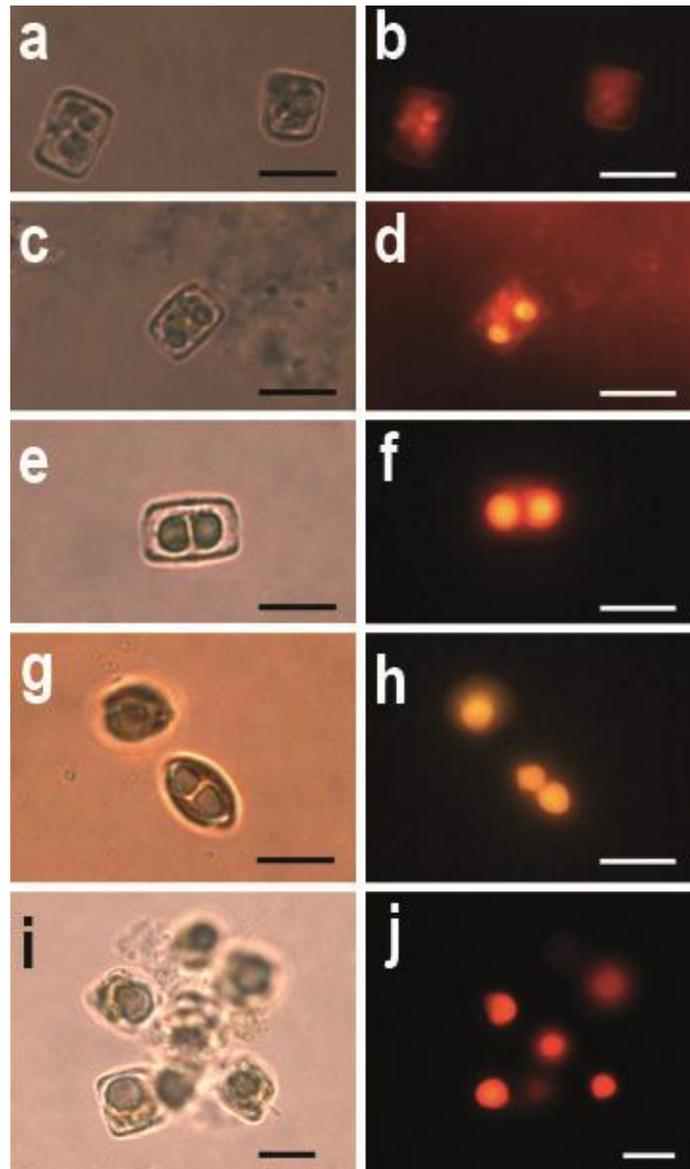


Figura 3.8. Acumulación de lípidos neutros en *Navicula cincta* durante distintas fases de crecimiento. (a,c,e,g,i) contraste de fases. (b,d,f,h,j) fluorescencia. (a,b) día 2: inicio de la fase exponencial. (c,d) día 6: final de la fase exponencial. (e,f y g,h) días 8 y 10 respectivamente: fase estacionaria. (i,j) día 14: fase estacionaria tardía. Barra escala a-j = 20 μ m

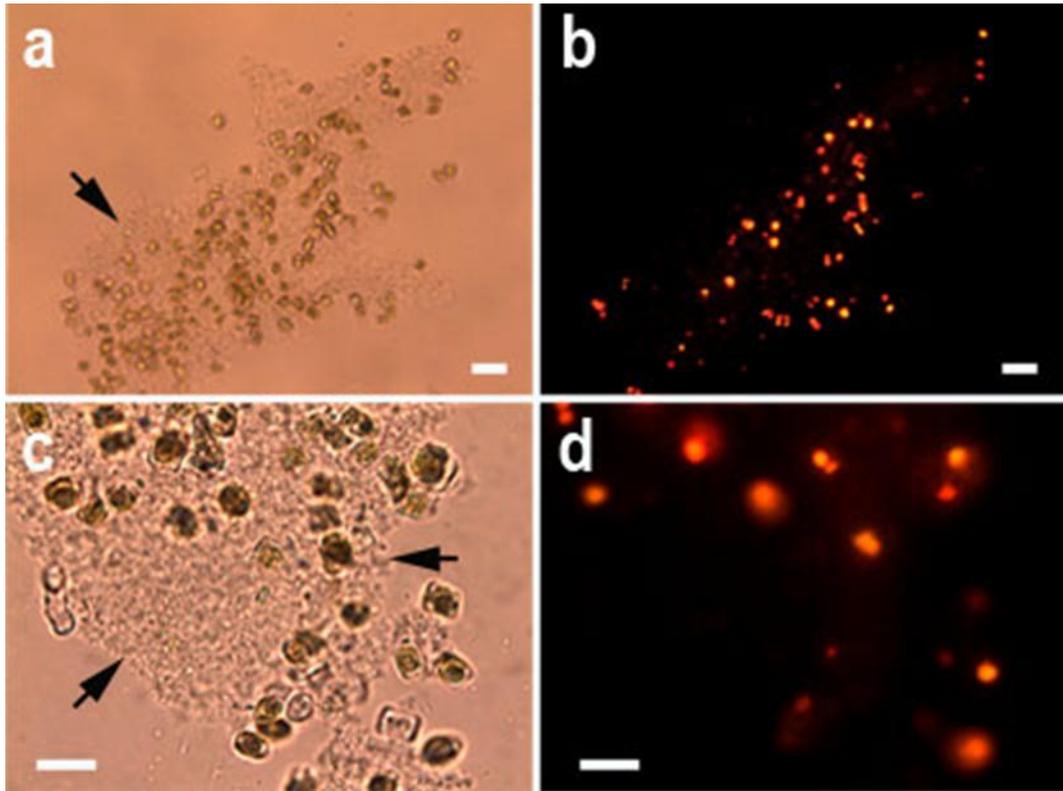


Figura 3.9. Agregado celular en *Navicula cincta* a los 18 días de cultivo. (a,c) contraste de fases. Agregado formado por numerosas células y abundante mucílago (flechas). (b,d) fluorescencia. Notar la acumulación de lípidos neutros en forma de corpúsculos. (a,b). Vista general. Barra escala = 60 μm . (c,d) Detalle de una porción del agregado. Barra escala = 35 μm .

En relación a la cinética de acumulación de los LN, se estableció la cinética espectrofluorométrica de la IFR-RN, como una medida de la acumulación de los LN de toda la población en cultivo, y la relación IFR-Cel, como un índice de acumulación de LN a nivel celular (Fig. 3.10). En la misma también se indica la cinética de la clorofila *a*, como una medida del estado fisiológico del cultivo (etapa positiva, indica células activas en crecimiento o con actividad fotosintética, y etapas estables o negativas, indican células en estado estacionario y con baja actividad fotosintética).

Por un lado, la cinética de la IF-CI mostró los siguientes comportamientos: con medio de cultivo f/2, e independientemente de la temperatura, la IF-CI mostró un incremento hasta el día 8 y luego permaneció constante hasta el final de la experiencia (Fig. 3.10 a,b), en correspondencia

con el patrón de la CI a extraída con metanol. En medio SWES, e independientemente de la temperatura, los valores fueron relativamente constantes hasta el día 8 y luego aumentaron hasta el final de la experiencia (Fig. 3.10 c,d). Finalmente con medio SWES-N a 20°C, los valores aumentaron relativamente poco y en forma constante durante los 14 días de la experiencia (Fig. 3.10 e), en correspondencia con el patrón de la CI a extraída con metanol

La acumulación de los LN a nivel de cultivo mostró las siguientes tendencias: en f/2 a 15°C aumentó 4,5 veces a partir del día 10 (Fig. 3.10 a) y con f/2 a 20°C aumentó 2 veces a partir del día 8 (Fig. 3.10 b). En ambos casos este aumento coincidió con la etapa estacionaria de crecimiento y consecuentemente la IFR-Cel aumentó significativamente a partir del día 8. En SWES a 15°C aumentó 8 veces a partir del día 2 y a partir del día 6 se mantuvo relativamente constante (Fig. 3.10 c); mientras que a 20°C los valores de IFR-RN se triplicaron entre los días 2 y 4 y permanecieron relativamente constantes hasta el final de la experiencia (Fig. 3.10 d). Con SWES-N la IFR-RN se mantuvo constante a lo largo del tiempo experimental (Fig. 3.10 e). Como resultado de un valor constante en el contenido relativo de LN en la fase estacionaria y un incremento constante en la DC, la IFR-Cel se mantuvo estable en SWES y disminuyó a la mitad de su valor original en SWES –N.

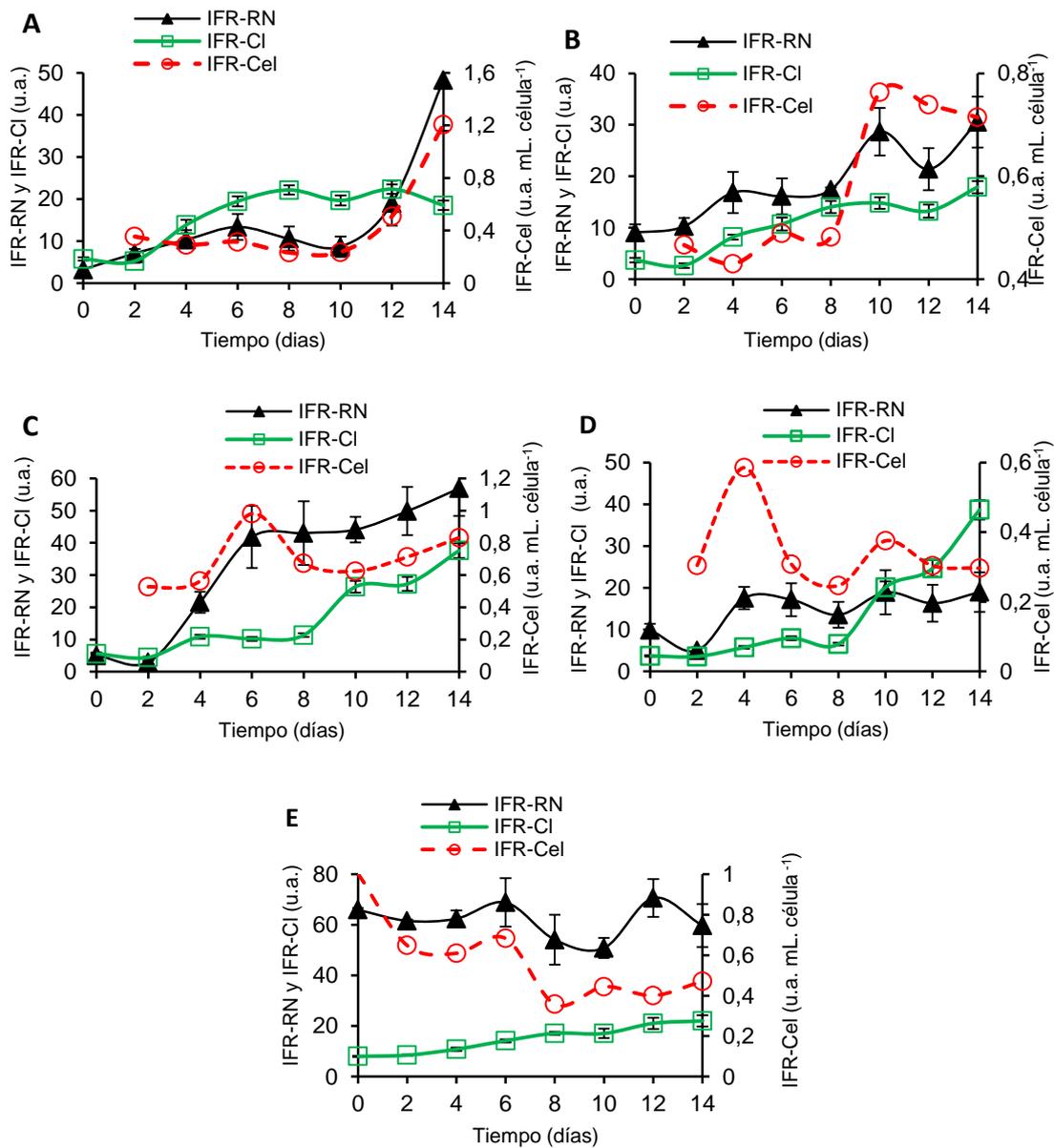


Figura 3.10. Cinética espectrofluorométrica de la CI *a in vivo* (IF-CI), de los lípidos neutros (IFR-RN) y de la relación entre la intensidad del RN y la DC (IFR-Cel). (A) f/2 a 15°C, (B) f/2 a 20°C, (C) SWES a 15°C, (D) SWES a 20°C y (E) SWES-N a 20°C. Las barras de error representan desviaciones estándar entre réplicas.

3.5 Discusión

El cultivo “*batch*” es un sistema de cultivo cerrado, es decir sin renovación de nutrientes, apropiado para el estudio de los patrones de crecimiento de las microalgas. Las distintas fases que pueden ser registradas mediante este sistema (lag, exponencial, estacionaria y senescente) brindan información sobre la velocidad de crecimiento, aspectos fisiológicos y comportamiento de la especie en estudio. Cuando el objetivo es producir metabolitos de interés biotecnológico, toda esta información es importante para establecer y estandarizar las mejores estrategias de cultivo, la duración de las experiencias, la metodología de monitoreo y el momento de cosecha.

En general, en los cultivos *batch* de 14 días de *N. cincta* se detectaron las fases de crecimiento lag, exponencial y estacionaria. Una excepción fue con medio SWES-N a 20°C, en donde el crecimiento fue sostenido durante los 14 días.

Navicula cincta presentó un amplio rango de velocidades de crecimiento específicas (0,38 a 1,42 div. día⁻¹) bajo las condiciones testeadas en este trabajo. Las mismas coinciden con las indicadas en otras especies de diatomeas bentónicas del género, como *N. dissipata* (1,4 div d⁻¹), *N. acceptata* (1,0 div. d⁻¹), *N. jeffreyi* CS-46 (0,39 div. d⁻¹), *Navicula* sp. CS-786 (0,60 div. d⁻¹) y *N. parva* (0,53 div. d⁻¹) (Tadros y Johansen, 1988; Mansour et al., 2005; Xing et al., 2007). Sin embargo, hay que considerar que las comparaciones entre las *k* varían con la concentración de los nutrientes (Pacheco Vega et al., 2010); la temperatura, salinidad e incorporación de CO₂ (de Castro Araujo y Tavano Garcia, 2005), el fotoperíodo e intensidad de luz (Csavina, 2008), las fases de de crecimiento (Siron et al., 1989; Ugalde et al., 2013; Xia et al., 2013) y la forma de las células (Yang et al., 2006). Incluso, en condiciones naturales, una misma especie es capaz de manifestar distintas *k* en relación a los factores climáticos. Yoder (1979) propone como mejor modelo predictivo de las velocidades de crecimiento exhibidas por *Skeletonema costatum* (desde 0,09 a 1,45 div. día⁻¹) aquel que incorpora más de una variable ambiental (temperatura, intensidad de luz y concentración de sílice).

De acuerdo con los resultados, las variaciones de *k* estarían afectadas, de manera inversa, con las DC iniciales del cultivo. Resultados similares fueron

observados en cultivos de *N. incierta* creciendo 28,5°C en medio f/2 e intensidad lumínica de 62 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Porta Vales, 2009). Teniendo en cuenta que en la etapa exponencial los nutrientes no se consideran limitantes, la mayor *k* establecida en cultivos con menor inóculo inicial se podría deber a que las células cuentan con una mayor disponibilidad de luz.

Cuando el objetivo es el escalado de los cultivos, existe un compromiso entre el tiempo y el rendimiento del proceso, por lo que los inóculos deben ser lo suficientemente densos para alcanzar altos valores de DC y, por ende, de biomasa. En este estudio, los máximos valores de DC fueron alcanzados con el medio SWES-N partiendo de un inóculo alto ($65,7 \pm 7 \times 10^4$ células. mL⁻¹). Sin embargo, otros factores como la composición del medio, el agregado de CO₂ y el volumen del cultivo pueden también haber influenciado en las densidades celulares alcanzadas.

La experiencia en medio SWES-N fue la única a la cual se le adicionó CO₂, presentó un incremento en la DC a lo largo de toda la experiencia y en la cual se estableció una disminución en la IFR-Cel (disminución en el contenido de LN a nivel celular). En estudios del efecto del CO₂ sobre la composición bioquímica de una diatomea (de Castro Araujo y Tavano Garcia, 2005) y varios grupos de microalgas (Brown et al., 1997), el contenido de lípidos totales como porcentaje de PS fue similar al determinado en los cultivos enriquecidos con CO₂. Por otro lado, en dichos cultivos también pudo establecerse un incremento en el contenido de proteínas, sugiriendo que las células aún se encuentran en etapa de crecimiento y que el CO₂ podría estar prolongando la fase exponencial (de Castro Araujo y Tavano Garcia, 2005). Por lo tanto, y en términos generales, la composición del medio SWES-N, junto al enriquecimiento de los cultivos con CO₂, sería una combinación propicia para un crecimiento celular prolongado (mayor obtención de biomasa), pero no para un incremento en el contenido lipídico celular.

La lectura de densidad óptica, también conocida como absorbancia o turbidez, es ampliamente utilizada para cuantificar las densidades celulares en cultivos de microalgas, permitiendo independizarse totalmente de los RC (Reitan et al., 1994; Csavina, 2008; Matsumoto et al., 2010; Chaffin et al., 2011; Roleda et al., 2013). Sin embargo, la relación entre el número de células y la Abs depende de factores como los cambios en el contenido pigmentario,

debido al patrón normal de crecimiento (edad del cultivo), y/o a las diferentes condiciones de cultivo (Griffiths et al., 2011). Debido a ello, es importante realizar una validación de las relaciones en lo que respecta a linealidad, número de datos y rango de valores. Si bien la enumeración de células puede ser una práctica tediosa y menos precisa que otros métodos, provee información valiosa en cuanto a la morfología, tamaño, estados reproductivos y fisiológico de las células, como también a la presencia de contaminantes (MacIntyre y Cullen, 2005).

En este estudio, las curvas de regresión planteadas relacionan DC y Abs en cultivos desarrollados a $23 \pm 2 \mu\text{E m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ de intensidad de luz, 20°C y en dos medios cultivo. Particularmente, la ecuación definida en f/2: $\text{DC} = 3 \times 10^6 \text{ Abs} - 16.623$ para DC entre $2,9 \times 10^4$ y $3,4 \times 10^5$ células. mL^{-1} , fue validada y puede ser empleada para obtener una estimación del número de células mediante lecturas de Abs a 750 nm. La no validación del modelo propuesto en SWES, se confiere al tipo de medio de cultivo. El SWES presenta una importante turbidez debido a la alta concentración de sales y en él las células manifiestan una mayor agregación que en f/2, por lo que una mayor evaluación del modelo en SWES debe ser realizada.

Las medidas de PS son un importante parámetro para estimar la producción y productividad de biomasa de un cultivo y el porcentaje de los componentes celulares. Sin embargo, el PS de los cultivos de microalgas marinas es afectado por las sales absorbidas en la superficie celular y las sales presentes en el espacio intercelular (Zhu y Lee, 1997). De acuerdo con ello, un especial énfasis en el lavado de las muestras fue realizado, especialmente en aquellas provenientes del medio SWES, con el fin que el PS estimado fuese representativo de la biomasa microalgal. Los PS máximos establecidos en medio f/2 (73 mg. L^{-1}) fueron similares a los obtenidos en cultivos de otras especies de *Navicula* creciendo en medio f a escala de laboratorio [80 mg. L^{-1} en *N. jeffreyi* CS-46 (Mansour et al., 2005) y 79 mg. L^{-1} en *N. incierta* (Chávez Medrano, 2008)], mientras que el máximo establecido en SWES (326 mg. L^{-1}) fue comparable con valores alcanzados en cultivos de *Navicula* spp. en f/2 pero en fotobiorreactores [486 mg. L^{-1} (Silva- Aciaras y Riquelme, 2008)]. Esto es un indicativo de la ventaja de utilizar el medio SWES en cultivos de *N. cincta* a mayor escala.

Además, es importante recalcar que la biomasa estimada a través del PS con estufa considera la suma de la materia orgánica e inorgánica de las células. En el caso particular de las diatomeas, el óxido de silicio (comúnmente llamado sílice) que constituye la pared celular, representa un aporte inorgánico considerable al PS (Zhu y Lee, 1997; Hildebrand et al., 2012). De aquí la importancia de realizar el PS libre de cenizas (ver Capítulo 4) para no subestimar los porcentajes de los distintos componentes celulares (proteínas, hidratos de carbono o lípidos) en relación al PS.

Los cloroplastos de las diatomeas contienen clorofilas *a*, *c*₁ y *c*₂, con una relación *a:c* 4:1 en *Phaeodactylum tricornutum* (Mann y Myers, 1968). Como principales pigmentos accesorios se encuentran los carotenoides fucoxantina, diadinoxantina, diatoxantina y β,β - caroteno (Jeffrey y Vesk, 1997). A modo de referencia, el contenido de Cl *a* (entre 1,32 pg. célula⁻¹ a 2,47 pg. célula⁻¹) y Carot (0,34 pg. célula⁻¹ a 0,92 pg. célula⁻¹) determinados en *N. cinta* fueron similares a los determinados en *Chaetoceros gracilis* y *Thalassiosira weissflogii* cultivadas en *f/2*, a 25°C, con un fotoperíodo luz: oscuridad 12:12 y una radiación de 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fujiki y Taguchi, 2002).

El contenido de pigmentos en las microalgas no es una característica estática, sino que puede variar con la velocidad de crecimiento, las condiciones ambientales y las fases de crecimiento (Goericke y Montoya, 1988; Wilhelm y Manns, 1991). La radiación es uno de los factores ambientales estudiados que afectan la composición pigmentaria. Fujiki y Taguchi (2002) establecieron que un aumento en la radiación incrementa el contenido de pigmentos fotoprotectores respecto a la totalidad de los pigmentos celulares. En nuestro caso, las relaciones similares Carot/ Cl *a* establecidas entre las distintas condiciones experimentales podrían deberse a que todos los cultivos fueron desarrollados a la misma intensidad de luz ($23 \pm 2 \mu\text{E m}^{-2} \text{seg}^{-1}$). Cambios en la composición pigmentaria de acuerdo con la fase de crecimiento han sido estudiados en *Navicula ramosissima*. Por ejemplo, Méleder et al., (2003) establecieron que las relaciones entre los pigmentos fucoxantina, diadinoxantina, y β carotenos respecto a la Cl *a* fueron estadísticamente diferentes entre la fase exponencial y senescente. Teniendo en cuenta que los cultivos desarrollados en esta tesis nunca llegaron al decaimiento en la DC (etapa senescente), la no detección de diferencias en la relación Carot/ Cl *a*

entre las etapas inicial y final de cada experiencia podría deberse a que el tiempo considerado (14 días) no fue suficiente para generar cambios en dicha composición.

La comparación entre los resultados de *Cl a* obtenidos mediante fluorimetría y espectrofotometría no es sencilla debido a las diferentes características que acompañan a cada uno de los métodos. Por ejemplo, los picos adjudicados solamente a la *Cl a* en el análisis fluorométrico podrían estar representando la excitación de la *Cl a* asociada a cualquiera de los pigmentos accesorios en el proceso de la fotosíntesis. Méleder y colaboradores (2003) observaron que ciertas bandas de absorción *in vivo* se correspondieron a una combinación entre las bandas de absorción de las *Cl a* y *c*. En cuanto a las determinaciones a partir de extractos metanólicos, en este trabajo no se han tenido en cuenta los productos de la degradación natural de la clorofila que presentan máximos de Abs a longitudes de onda similares que la *Cl a*. Por ejemplo, la feofitina interfiere en las determinaciones de la *Cl a* (Šesták, 1971), pero además interfiere seriamente cuando los ensayos son realizados con metanol (Ritchie, 2008).

En el presente trabajo, la determinación de la *Cl a in vivo* presentó la misma dinámica que la de la DC en los medios f/2, SWES y SWES-N. En base a ello, y considerando que el objetivo principal de este estudio fue emplear técnicas que sean útiles para una aproximación del crecimiento, la determinación de la *Cl a* se propone como un buen estimador cualitativo de la biomasa metabólicamente activa en cultivos de *N. cincta*.

La síntesis *de novo* de los ácidos grasos (AG) en las algas ocurre principalmente en los cloroplastos. Un incremento en la producción de AG dentro de los plástidos conduce a la formación de moléculas de TAG, que son transferidas hacia el citoplasma como cuerpos lipídicos (CL) y destinados principalmente para almacenamiento de carbono (C) y energía (Jeffryes et al., 2013). El número y tamaño de los CL depende de la especie, estado de crecimiento de la célula y condiciones ambientales (Goold et al., 2015). Mediante la tinción con RN, en cultivos de *N. cincta* se pudo observar un incremento en el tamaño de dos CL a lo largo del tiempo experimental, de manera similar a lo indicado en *Phaeodactylum tricornutum*. Wong y Franz

(2013) sugieren que el patrón de acumulación de los lípidos en ésta especie es por la fusión de CL preexistentes en 1 o 2 cuerpos de mayor volumen.

La cuantificación de los lípidos neutros mediante RN en microalgas es variable y no siempre reproducible, dado que depende de las características de cada especie y de las condiciones de tinción (Elsey et al., 2007; Chen et al., 2009). A pesar de ello, esta técnica presenta la ventaja de detectar los lípidos neutros *in situ* de una manera rápida y sencilla. De acuerdo con ello y, en términos generales, pudieron detectarse algunas diferencias en la cinética de acumulación de LN en los cultivos de *N. cincta*. Se determinó un período de aumento de la señal y consecuentemente de la cantidad relativa de LN en f/2, un mantenimiento de la señal en SWES y una disminución de la señal en SWES-N. Estos resultados sugieren, que en medio f/2 los cultivos pueden haber alcanzado un estado de estrés que induzca a la acumulación de lípidos de reserva; mientras que en los medios SWES y SWES-N, las condiciones de cultivo utilizadas no hayan permitido estresar el cultivo. Considerando que todos los cultivos tuvieron las mismas condiciones de radiación y temperatura, esta variación podría deberse a las concentraciones iniciales de nutrientes que componen los medios de cultivo y al modo en que son aprovechados por las células. Las relaciones iniciales entre los macronutrientes en los distintos medios utilizados y las relaciones estequiométricas definidas por Redfield-Brzezinski se detallan en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4: Relaciones estequiométricas entre los macronutrientes que componen los medios f/2, SWES y SWES-N y las definidas por Redfield-Brzezinski.

Relación mol/ mol	f/2	SWES	SWES-N	Redfield-Brzezinski
N/P	22	32	7,5	16
Si/N	0,1	0,03	0,1	1
Si/P	2,7	1	1	16

La relación molecular 106C: 16 N: 1P es un indicativo de la composición de células fitoplanctónica saludables y de rápido crecimiento (Redfield, 1934).

La misma representa una aproximación de la composición promedio a grandes escalas de tiempo y espacio y no describe las condiciones de las células individuales o de las poblaciones. Aún así, puede ser usada como guía para determinar qué nutriente puede estar limitando el crecimiento (MacIntyre y Cullen, 2005). La proporción N:P de Redfield es ampliamente superada en los medios f/2 y SWES, indicando una mayor disponibilidad de nitrógeno en relación al fosfato. Además, Sarthou et al., (2005) establecieron un promedio de 10 ± 4 entre estos nutrientes en 27 diatomeas (más del 90% de los valores por debajo de la relación de Redfield). De esta manera, el medio SWES-N también estaría cumpliendo con los requerimientos del N respecto al P, de acuerdo a éstos últimos autores. En definitiva, cualquiera de los medios utilizados estaría aportando la cantidad de N necesaria para el crecimiento de *N. cincta*.

Por otro lado, los altos valores de la relación N: P, podrían representar una limitación del P en el transcurso de la experiencia de cultivo en los medios f/2. La limitación de P es uno de los factores que incrementa el contenido celular de lípidos (Siron et al., 1989; Reitan et al., 1994). Sin embargo, la alta proporción entre el N y el P en el medio SWES no sería un indicativo de la limitación del P, debido a que la concentración inicial de dicho elemento es de $145 \mu\text{mol. L}^{-1}$, 4 veces más que en el medio f/2.

Considerando que las diatomeas necesitan ácido silícico para formar los frústulos, se ha reportado el consumo de Si y N en una relación molar 1:1 en ambientes sin limitación de nutrientes (Brzezinski, 1985) ó, en una revisión más actual, una relación promedio Si: N de $0.8 \pm 0.3 \text{ mol/mol}$ (Sarthou et al., 2005). De acuerdo a ello, el Si podría haber llegado a valores limitantes, disminuyendo el crecimiento y aumentando la concentración de LN en los tres medios de cultivo (Tabla 3.4). La acumulación de lípidos bajo deficiencia de sílice ha sido indicada previamente en diatomeas (Roessler, 1988; Yu et al., 2009), particularmente asociada a un incremento en la síntesis de la acetil-CoA carboxilasa (Roessler, 1988). Sin embargo, y a pesar del bajo valor de la relación Si: N en los tres medios, sólo en el medio f/2 se detectó un incremento en el contenido de LN por fluorescencia y esto podría deberse a que la concentración inicial de Si en este medio es un 50% menor que la correspondiente a los medios SWES y SWES-N.

Otra relación estequiométrica evaluada es la que involucra al Si y al P. En base a Redfield- Brzezinski estos elementos deben presentar un relación de 16, mientras que según Sarthou et al. (2005) la misma presenta un promedio de 5.9 ± 1.3 mol/mol. Esto estaría indicando una limitación de Si (respecto al P) en los tres medios de cultivo (Tabla 3.4). Sin embargo, nuevamente, se debe considerar que la concentración de Si en los medios alternativos es un 50% mayor que en el medio f/2 y que en ninguno de los cultivos desarrollados en SWES y SWES-N se alcanzó a detectar un período de acumulación lipídica.

El análisis planteado anteriormente en relación a las concentraciones iniciales de nutrientes fue realizado dentro de un marco teórico, por lo que para poder corroborar que las diferencias en el contenido de LN en *N. cincta* están relacionadas con la disponibilidad de nutrientes disueltos en el medio de cultivo, en el Capítulo 4 se analizó el contenido lipídico y la cinética de los nutrientes a lo largo de los 14 días de cultivo.

3.6 Conclusiones

En cultivos microalgales con fines bioenergéticos, la optimización de los métodos tendientes a determinar la velocidad de crecimiento, estado fisiológico y acumulación de lípidos neutros resulta de gran relevancia para poder evaluar en forma rápida y precisa la producción de biomasa y de TAG bajo las condiciones utilizadas. En este capítulo se llegaron a las siguientes conclusiones:

- 1) La selección de un apropiado inóculo representa un punto importante para lograr mayores productividades de biomasa.
- 2) El medio f/2 es adecuado para producir un rápido crecimiento en cultivos de *N. cincta* seguido por el inicio de una temprana fase estacionaria; mientras que los medios SWES y SWES-N permiten que los cultivos se mantengan bajo un estado de crecimiento sostenido por un largo plazo.
- 3) Se obtuvo un modelo para estimar la densidad celular a partir de lecturas de absorbancia en f/2 y un procedimiento de tinción con rojo Nilo para detectar con microscopía de fluorescencia la presencia de cuerpos citoplasmáticos de lípidos neutros en *Navicula cincta*.

4) Las mediciones espectrofluorométricas de clorofila *a* permitieron obtener una estimación rápida y simultánea del crecimiento y estado fisiológico de los cultivos. A partir de esta información, se pudo inferir distintos períodos potenciales de actividad fotosintética de acuerdo con el medio de cultivo usado. Así, con medio f/2 el período puede extenderse hasta el principio de la fase estacionaria; mientras con los medio SWES y SWES-N, este período es más prolongado.

5) Las mediciones espectrofluorométricas 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. Los patrones variaron de acuerdo a las condiciones testeadas: a) Con medio f/2 a 15°C, el día 14 es el día de máxima acumulación de lípidos neutros a nivel poblacional y esto se debe a que es cuando la mayor proporción de células del cultivo han respondido al estrés. b) Con medio f/2 a 20°C se observó un adelanto del tiempo de acumulación máximo de lípidos neutros. Por lo tanto, a mayor temperatura, a partir del día 10 se podría realizar la cosecha con una alta probabilidad de contar con biomasa rica en lípidos neutros por envejecimiento natural del cultivo. c) En los medios SWES y SWES-N el aumento de la IFR-RN podría deberse al aumento en el número de células, indicando que el período de cultivo estudiado no fue suficiente para incrementar los lípidos neutros a nivel celular.

Capítulo 4: Contenido y composición lipídica de *Navicula cincta* en cultivos *batch* convencionales

4.1 Introducción

En las microalgas autótrofas, el CO₂ es incorporado y asimilado por el proceso de fotosíntesis en carbohidratos simples, los cuales son los precursores de numerosos compuestos orgánicos o biomoléculas (carbohidratos complejos, proteínas, lípidos, etc.) (Buchanan et al., 2000). En el caso particular de las diatomeas, cuando las condiciones de crecimiento son favorables, las rutas metabólicas conducen a la formación de proteínas estructurales y un carbohidrato de reserva, denominado crisolaminarina (β -1,3-glucano), el cual se almacena en vesículas (Granum y Mykelestad, 2001). En cambio, durante la fase estacionaria de crecimiento o bajo condiciones de estrés, las células entran en una fase denominada “lipogénica”, la cual se caracteriza por una cesación del crecimiento, una reducción del aparato fotosintético y por la acumulación de lípidos neutros (Hu et al., 2008). En esta situación, los compuestos ricos en energía (ATP) y los carbohidratos producidos durante la fotosíntesis, son utilizados para la biosíntesis de compuestos libres de nitrógeno principalmente los lípidos neutros denominados triglicéridos (TAG).

Los lípidos se clasifican en función de su polaridad y, consecuentemente, cumplen diferentes funciones en las células. Los lípidos polares comprenden a los fosfolípidos y glicolípidos, que son componentes funcionales y estructurales de las membranas celulares (Gushina y Harwood, 2009). Los glicolípidos (GL) son esfingolípidos formados por una ceramida unida a un glúcido y se encuentran asociados con las bicapas lipídicas de las membranas cloroplásticas; mientras que los fosfolípidos (FL) se caracterizan por poseer un grupo fosfato que les otorga una marcada polaridad y son considerados característicos de las membranas extracloroplásticas (Kates y Volcani, 1966). Los lípidos neutros incluyen a diferentes esteroides, ácidos grasos libres, ceras y acilglicéridos (mono, di y triacilgliceroles o triglicéridos; MAG, DAG y TAG, respectivamente) (Kates y Volcani, 1965; Berge et al., 1995;

Guschina y Harwood, 2013). Dentro de los acilglicéridos, los TAG constituyen la principal reserva de almacenamiento de las diatomeas, dado que pueden ser fácilmente catabolizados para la obtención de energía metabólica (Gurr et al., 2002). Los TAG consisten en tres cadenas largas de ácidos grasos, unidas a una molécula de glicerol por una reacción de condensación llamada esterificación. En general, los TAG son sintetizados en condiciones de luz, almacenados en cuerpos lipídicos citosólicos y luego reutilizados para la síntesis de lípidos polares (LP) en la oscuridad (Thompson, 1996).

Los ácidos grasos (AG) de las diatomeas consisten en cadenas de 13 a 21 átomos de carbono y se clasifican en saturados e insaturados. Los AG que poseen un doble enlace se denominan ácidos grasos monoinsaturados (AGMI), si contienen dos o más dobles enlaces se denominan ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y si no poseen dobles enlaces se denominan ácidos grasos saturados (AGS). La síntesis de ácidos grasos *de novo* ocurre principalmente en el cloroplasto. La acetil-CoA carboxilasa es la enzima que cataliza la primera reacción en la ruta de biosíntesis de ácidos grasos, formando el malonil-CoA a partir del acetil-CoA y el dióxido de carbono. A partir de allí se producen una serie de reacciones de elongación (incorporación de átomos de carbono) que finalizan con la producción de ácidos grasos de 16 ó 18 átomos de carbono (Hu et al., 2008). Estos serán los ácidos grasos utilizados como precursores de los lípidos polares de membrana, como así también para la síntesis de lípidos neutros de almacenamiento (Hu et al., 2008). Después de su formación, los TAG serán posteriormente exportados desde el cloroplasto hacia el citoplasma formando cuerpos lipídicos (Goold et al., 2015).

Cada clase de microalgas posee un perfil específico de AG (Zhukova y Aizdaicher, 1994). Dentro de la clase Bacillariophyceae, los AG dominantes y comúnmente utilizados como indicadores quimiotaxonómicos incluyen a los AGS: ácidos mirístico 14:0 y palmítico 16:0, AGMI: palmitoleico 16:1(n-7) y AGPI: eicosapentanoico 20:5 (n-3) (Dunstan 1994; Scholz y Liebezeit, 2012). En cuanto a la composición relativa de los TAG, ésta depende de las fases de crecimiento y de las condiciones ambientales. Así, cuando las células están en pleno crecimiento exponencial, los TAG se caracterizan por la abundancia de AGPI. En cambio, cuando las células se encuentran bajo condiciones de

estrés, una caída en los niveles de ATP desvía las rutas metabólicas de los TAG hacia compuestos energéticamente menos costosos como son los AGS y AGMI (Pistocchi et al., 2005) y que además generan más energía de oxidación que los carbohidratos (Roessler, 1990).

De acuerdo a su composición, los ácidos grasos pueden ser usados para producir una amplia variedad de compuestos químicos de interés industrial (Harwood y Gushina, 2009). Bajo un contexto simplista, se ha sugerido que aceites ricos en AGPI deberían utilizarse con fines nutraceúticos y/o alimenticios (Belarbi et al., 2000), mientras que aceites con elevados triglicéridos ricos en AGMI deberían ser seleccionados para la producción de biodiesel (Chisti, 2007; Hu et al., 2008). Por lo tanto, un desafío importante en un contexto bioenergético es lograr una optimización de la producción de aceites con el perfil adecuado de TAG, sin disminuir en forma significativa la producción de biomasa.

Particularmente, la composición y biosíntesis de los AGPI han sido estudiadas en las diatomeas por su histórica aplicación como alimento en acuicultura (Renaud et al., 1994; Dunstan et al., 1994; Blanchemain y Grizeau, 1996; Mansour et al., 2005). Comparativamente, los estudios de aceites en diatomeas para la producción de biodiesel son más limitados (Shennan et al., 1998; Yu et al., 2009; Popovich et al., 2012; Valenzuela et al., 2012; Valenzuela et al., 2013). Un aspecto a tener en cuenta es que las propiedades del biodiesel están directamente influenciadas por las propiedades de los AG a partir de los cuales es generado. La longitud de la cadena carbonada y el grado de insaturación de los AG tienen diferentes efectos sobre algunos parámetros del biodiesel como el número de cetano (NC), los niveles de emisión, la fluidez en frío (*cold flow*), viscosidad y lubricidad (Knothe, 2005; Durrett, 2008). Por ejemplo, la presencia de AGPI mejora las propiedades a bajas temperaturas pero reduce la estabilidad oxidativa, mientras que incrementa la emisión de óxido nitroso. De aquí la necesidad de realizar estudios de la cantidad y calidad de los TAG en diversas especies de diatomeas, como criterios de selección de cepas potencialmente útiles para la producción de biodiesel. Además, es importante buscar condiciones inductoras de TAG que sean sustentables a nivel de cultivo y que maximicen la productividad lipídica.

De acuerdo con la especie microalgal, los lípidos polares son, en general, regulados por mecanismos genéticos y fisiológicos, mientras que los lípidos neutros dependen de las de las condiciones ambientales (Chen, 2012; Roleda et al., 2013). Dentro de estas últimas, se pueden mencionar estímulos químicos (limitación de nutrientes, salinidad y pH del medio de cultivo) y físicos (temperatura e intensidad de luz) (Hu et al., 2008; Gushina y Harwood, 2009). En el caso de las diatomeas, algunos de estos factores incluyen la limitación de nutrientes (Siron et al., 1989; Thompson 1996; Sheehan et al., 1998; Lopez - Alonso et al., 2000; Yu et al., 2009; Valenzuela et al., 2012; Jiang, 2014), la intensidad de la luz (Brown et al., 1995; Blanchemain y Grizeau, 1996), y la temperatura (Renaud et al., 1995; Renaud et al., 2002). Además, la fase estacionaria es un factor estresor natural que incrementa significativamente el contenido de TAG en diatomeas (Siron et al., 1989; Lombardi y Wangersky, 1995; Brown et al., 1996; Miller et al., 2012; Schwenk et al., 2013).

Especies de los géneros *Chaetoceros*, *Navicula*, *Nitzschia*, *Thalassiosira*, *Phaeodactylum* y *Skeletonema* han sido estudiadas como potenciales materia prima para la obtención de biodiesel. Su potencial se ha basado en el contenido relativo de TAG en base a la tinción específica con RN (Shennan et al., 1998; McGinnis et al., 1997; Yu et al., 2009; Valenzuela et al., 2013), el contenido en peso seco de lípidos neutros (Bertozzini et al., 2013) y el contenido de lípidos totales y neutros expresados en peso seco libre de cenizas (Jiang et al., 2014). En general, todos estos autores han utilizado como estrategia de incremento de los lípidos totales o de los TAG, el uso de un medio de cultivo carente de uno o varios nutrientes, lo cual conlleva a una disminución de la velocidad de crecimiento. Además, la puesta a punto de esta estrategia en términos de cultivos comerciales, requiere de un sistema en dos fases. La primera, tendiente a la producción de altas concentraciones de biomasa; y la segunda, destinada a la incorporación de esa biomasa, previamente cosechada, en un medio de cultivo carente de nutrientes. Si bien los resultados podrían ser satisfactorios, los costos de todos estos procesos resultarían elevados. En este trabajo, se planteó cultivar una diatomea bentónica, en sistemas *batch* e inducir la acumulación de TAG por limitación natural de nutrientes durante la fase estacionaria. Además, para determinar el tiempo preciso de cosecha y así evitar largos períodos de incubación, se usó la

información espectrofluorométrica con rojo Nilo, explicada en el Capítulo 3. También es de destacar que el hábito bentónico de *Navicula cincta* representa una característica ventajosa a nivel económico en términos de cosecha.

Para ello, se propusieron los siguientes objetivos:

Objetivo general

Caracterizar el contenido y composición lipídica de *N. cincta* en sistemas de cultivo *batch* seleccionando las condiciones de crecimiento que optimizan la cantidad y calidad de aceites potencialmente adecuados para la obtención de biodiesel.

Objetivos específicos

- a) Determinar el contenido de lípidos totales de *N. cincta* bajo distintas condiciones de temperatura, concentración de nutrientes y tiempo de cultivo.
- b) Fraccionar los lípidos totales de acuerdo a su polaridad.
- c) Caracterizar la composición de ácidos grasos en cada fracción y condición de cultivo.
- d) Determinar la cinética de la concentración de macronutrientes disueltos en los diferentes medios de cultivo.
- e) Evaluar las posibles aplicaciones de *N. cincta*, de acuerdo a sus características de crecimiento, cantidad y composición lipídica.

4.2 Hipótesis y Objetivos

En el marco de los antecedentes planteados se pretendió testear las siguientes hipótesis:

- I. *Navicula cincta* presenta un alto contenido de lípidos totales por acumulación de lípidos neutros en la fase estacionaria del crecimiento.

- II. *La combinación de información aportada por el agotamiento de los nutrientes disueltos y los picos máximos de IFR-Cel, son criterios útiles para determinar el tiempo de cosecha de biomasa rica en TAG en cultivos de N. cincta.*
- III. *El aumento de la concentración inicial de nutrientes, especialmente el Nitrógeno y el Sílice, disminuye la proporción de lípidos totales y lípidos neutros.*
- IV. *El aumento de la concentración inicial de nutrientes esenciales, especialmente nitrógeno y sílice, disminuye la productividad lipídica por provocar aumento de biomasa.*
- V. *Las técnicas gravimétricas de cuantificación de lípidos neutros se complementan con las determinaciones indirectas realizadas con espectrofluorometría con rojo Nilo.*
- VI. *La composición de los TAG en N. cincta la convierten en una posible candidata para la producción de biodiesel.*

4.3 Materiales y métodos

4.3.1 Cultivos

4.3.1.1 Análisis del contenido y composición lipídica

Los cultivos fueron desarrollados manteniendo las condiciones ambientales fijas (CAF) definidas en el Capítulo 3: intensidad lumínica de $23 \pm 2 \mu\text{E m}^{-2} \text{seg}^{-1}$, fotoperíodo de 12:12h luz: oscuridad y salinidad del agua de mar de 32 UPS.

Para la obtención de biomasa, las experiencias fueron realizadas de la siguiente manera:

1. Experiencias a 15°C y 20°C en medio f/2: se utilizaron Erlenmeyer de 2 L con 1,2 L de medio de cultivo, por triplicado, con aireador durante 7 horas diarias, aproximadamente.

2. Experiencia a 20°C en medio SWES: se utilizaron Erlenmeyer de 2 L con 1,2 L de medio SWES, por triplicado, con aireador durante 7 horas diarias, aproximadamente.
3. Experiencia a 20°C con SWES-N, como evaluación previa del crecimiento y producción lipídica de *N. cincta* a mayor escala (Capítulo 6). Se utilizó un (1) botellón de 5,5 L con 3,6 L de medio SWES-N. En este caso, la aireación se mantuvo de manera continua. Se suministró aire enriquecido con CO₂ al 1%, durante 3 horas diaria, una vez comenzado el período de luz. Durante este tiempo de adición de CO₂ no se detectaron cambios en el pH del medio de cultivo. Además, en esta experiencia, se tomaron muestras para la determinación de la cinética de los nutrientes disueltos.

Para determinar los tiempos de cosecha de los cultivos se consideraron los picos en el índice IFR-Cel establecidos en el Capítulo 3 para los medios f/2 y el máximo de 14 días de cultivo (por convención) para los medios de cultivo SWES y SWES-N, teniendo en cuenta que para disminuir los costos de producción microalgal y poder establecer mayores productividades lipídicas, el tiempo de cultivo no debería ser muy prolongado.

A modo de resumen, las condiciones ambientales variables (CAV) correspondientes al análisis del contenido y composición lipídica se detallan en la Tabla 4.1

Tabla 4.1. CAV testeadas en el análisis lipídico. Se evaluaron las características lipídicas de *N. cinta* en tres medios de cultivo (f/2, SWES y SWES-N), dos temperaturas (15°C, 20°C) y dos tiempos de cultivo (10 y 14 días).

Medio de cultivo	Temperatura (°C)	Tiempo (días)
f/2	15	14
f/2	20	10
f/2	20	14
SWES	20	14
SWES-N	20	14

4.3.1.2 Análisis del consumo de nutrientes

Para el análisis de los nutrientes se realizaron experiencias en Erlenmeyer de 500 mL con 200 mL de cultivo en medio f/2. A los cultivos se les suministró aire mediante aireadores eléctricos durante 3 horas y se los agitó diariamente, en forma manual. La toma de muestras se realizó cada dos días en alícuotas de 5 mL.

4.3.2 Cosecha y preparación del material para análisis lipídico

La totalidad de los cultivos desarrollados para la obtención de biomasa fue cosechada por medio de una centrífuga Rolco 2070 a 3000 rpm durante 20 minutos. El material concentrado fue depositado en tubos de plástico de centrífuga de 45 mL previamente acondicionados y pesados. Para eliminar el contenido de sales proveniente de los medios de cultivo se realizaron dos lavados con agua destilada. Las sales disueltas fueron eliminadas extrayendo el sobrenadante de las muestras centrifugadas. El material fue mantenido a -18°C durante un mínimo de 48 horas. La liofilización se realizó en un equipo Rifcor modelo L-A-B3-C de la Planta Piloto de Ingeniería Química (PLAPIQUI), CCT Bahía Blanca. Las condiciones de secado se mantuvieron durante 48 horas y consistieron en 0.0097 mm Hg y entre -40 y -50 °C. Posteriormente la biomasa final fue pesada en balanza analítica y conservada a -18°C.

4.3.3 Cuantificación de los lípidos totales

La extracción de los lípidos totales se realizó mediante dos técnicas. La técnica principal implementada (a) se basó en una modificación de la metodología descrita por Krienitz y Wirth (2006), que consiste en la extracción de lípidos según Folch (1957), combinada con el uso de ultrasonido. La misma fue aplicada sobre la biomasa obtenida en las condiciones experimentales definidas en la tabla 4.1. El segundo tipo de extracción (b) se realizó según el método de Bligh y Dyer (1959), modificado por Weldy y Huesemann (2007). Fue realizado en la biomasa obtenida en las experiencias en f/2 a 20°C (de 10 días y 14 días), en SWES a 20°C y en SWES-N a 20°C, con el fin de comparar los dos tipos de extracción. El mismo fue efectuado sobre material de aquellas condiciones experimentales en las cuales se obtuvo suficiente cantidad de biomasa para utilizar en ambas extracciones.

a) Principal metodología de extracción

Los lípidos totales (LT) fueron extraídos mediante la adición de cloroformo/metanol (2:1 volumen: volumen). Se adicionaron 4 ml de la mezcla de solventes sobre un vial con material previamente pesado. Se procesaron entre 160-200 mg de biomasa proveniente de f/2, 300 mg de biomasa proveniente de SWES y 200 mg de biomasa proveniente de SWES-N; todos ellos por duplicado. La mezcla fue homogeneizada utilizando un agitador magnético y tratada con sonicador (15 minutos y sin temperatura) para facilitar la ruptura celular. Se continuó con la centrifugación del material a 3000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante, compuesto de solventes y lípidos, fue separado del pellets y depositado en una ampolla de decantación, luego de ser filtrado (Fig. 4.1 a). Esta serie de pasos se repitió hasta la obtención de un extracto transparente. Se efectuaron 3 o 4 extracciones dependiendo de si la biomasa provenía de células creciendo en f/2 y SWES-N o SWES. Al extracto total se le adicionaron 4 ml de NaCl 0.9%, en dos oportunidades, para la obtención de un sistema bifásico. El sistema se mantuvo en reposo 30 minutos la primera vez y más de dos horas la segunda vez. La fracción inferior fue recuperada y depositada en viales acondicionados. Se utilizó Na₂SO₄ 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 N₂. El contenido lipídico se determinó gravimétricamente.

b) Metodología de extracción secundaria

La extracción de los LT fue realizada mediante una mezcla de cloroformo (Clorof), metanol (Met) y agua destilada (AD), en una proporción tal que se forma una única fase. La extracción se realizó a partir de 15 a 16 mg de material liofilizado, por duplicado. Sobre los viales se adicionaron 3 mL de Met, 1,5 mL de Clorof y 1,2 mL de AD. El tiempo de extracción fue de 24 horas en el freezer. Posteriormente se agregaron 1,5 mL de Clorof y 1.5 mL de AD hasta lograr un sistema bifacial. En la fase clorofórmica se encuentra el material lipídico, mientras que en la fase acuosa se encuentra el material no lipídico. Luego de la separación de fases se clarificó el material por filtración. La fase clorofórmica se evaporó en corriente de N₂ y se finalizó el secado en estufa a 35 °C durante dos horas. El contenido lipídico fue enfriado en desecador y determinado gravimétricamente.

4.3.4 Fraccionamiento de lípidos totales

Los lípidos obtenidos por la extracción de Folch fueron fraccionados en lípidos neutros (LN), glicolípidos (GL) y fosfolípidos (FL). El fraccionamiento se realizó utilizando un cartucho Sep- Pack de sílica de 1000 mg (J. T. Baker Inc., Phillipsburg, N. J.), en base al método utilizado por Berge et al., (1995) (Fig. 4.1 b). Considerando que la cantidad de GL y FL fue muy baja para su posterior análisis (cromatografía gaseosa), se decidió unir estos componentes y denominarlos lípidos polares (LP).

El cartucho fue activado con 30 mL de cloroformo antes de sembrar muestras con aproximadamente 30 mg de aceite. Los lípidos neutros (LN), que contiene los triglicéridos (TAG) y algunos pigmentos, fue eluída con 15 ml de cloroformo: ácido acético (9:1 v/v). A continuación se eluyeron los GL con 20 mL de acetona: metanol (9:1 v/v) y los FL con 20 mL de metanol. Estas dos fracciones se juntaron y denominaron lípidos polares (LP). Las distintas fracciones fueron colectadas en viales previamente acondicionados, secadas bajo corriente de N₂ y finalmente pesadas en balanza analítica.

4.3.5 Determinación del perfil de ácidos grasos

Los extractos lipídicos de cada fracción y experiencia fueron transmetilados, usando el método descrito por Morrison y Smith (1964). De esta manera se obtuvieron los metilésteres de los ácidos grasos (ó FAME, por sus siglas en inglés: Fatty Acid Methyl Esters) que fueron resueltos mediante cromatografía gaseosa.

Cada una de las muestras conteniendo un máximo de entre 25 y 30 mg de aceite, fue retomada con la cantidad adecuada de cloroformo y ubicada en viales acondicionados. En cada uno de los viales se adicionaron 2 ml de KOH 10% en metanol y se agitaron durante 1 minuto con vórtex. Debido a que los lípidos solidificados no se homogeneizaron de esta manera, se procedió a sonicar las soluciones. Se realizaron entre 2 a 3 tandas de 3 minutos, a temperatura ambiente. El O_2 de los viales fue eliminado bajo corriente de N_2 durante 1 minuto. Los mismos fueron cerrados y colocados en baño térmico a $80^\circ C$ durante 45 minutos. El material insaponificable (jabones potásicos de los ácidos grasos) fue extraído luego de la incorporación de 2 ml de éter de petróleo. Se efectuó la adición de 0.5 ml de HCl, en baño de hielo, para la separación del KCl sólido (Fig. 4.1 d). Con la incorporación de 2 ml de éter de petróleo y posterior agitación, se obtiene la liberación de los ácidos grasos que se depositan en un nuevo vial acondicionado. El éter de petróleo fue eliminado mediante corriente de N_2 . La metilación de los AG se realizó mediante incorporación de 1.5 ml de trifluoruro de boro (BF_3 , Sigma Adrich) disuelto en metanol al 10% e incubación del material a $80^\circ C$ durante 30 minutos. La transmetilación con BF_3 , al resguardo del oxígeno, garantiza la conservación de los ácidos grasos poliinsaturados que puedan estar presentes en los lípidos analizados. Los ésteres metilados (FAMEs) fueron extraídos por medio de éter de petróleo. Se adicionó 2 ml de éter de petróleo, se agitó la mezcla mediante vórtex y se dejó reposar hasta formación de un sistema bifásico. Los FAME de la fase superior fueron separados en viales acondicionados y rotulados. Antes de llevar a sequedad se adicionó Na_2SO_4 anhidro y se filtró el material para eliminar el agua que hubiera podido quedar en las muestras. Los AG de las FP y FN fueron retomados con 0.5 o 1 ml de hexano cromatográfico, respectivamente (Fig. 4.1 e). Para la resolución de los FAMEs se utilizó un

cromatógrafo Hewlett Packard® 6890 equipado con una columna capilar DB-FFAP (30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 µm de espesor de film).

Los AG fueron determinados manualmente mediante el software HP3398A GC Chemstation (Hewlett Packard 1998). La identificación de los mismos se realizó por comparación con un patrón estándar conocido (Supelco 37 componente FANE 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, a partir de 4 réplicas. El límite de detección del método cromatográfico se estableció en 0,01 %. Los compuestos en proporciones inferiores a 0,01 % se informaron cómo no detectables (nd).



Fig. 4.1. Procesamiento del material de *N. cincta* para análisis lipídico. (a) Extracción de lípidos totales. En las ampollas se visualizan los primeros extractos, en los tubos los extractos filtrados **(b)** Fraccionamiento del extracto en lípidos neutros y polares. La flecha señala el cartucho Sep- Pack de sílica **(c)** Fracciones disueltas en los solventes correspondientes. Los dos tubos de la izquierda son réplicas de la fracción neutra; los dos del medio los glicolípidos y los dos últimos los fosfolípidos. **(d)** Preparación del material para la metilación. Réplicas de las fracciones neutra y polar, luego de la adición de HCL en baño de hielo, para la separación del KCl sólido. **(e)** Réplicas de los metilésteres de ácidos grasos neutros y polares antes de adicionarles Na_2SO_4 anhidro. Luego se filtró el material, se llevó a sequedad bajo corriente de N_2 y se retomó con hexano cromatográfico. Los dos tubos de la izquierda son las réplicas de la fracción neutra.

4.3.6 Determinación del peso seco libre de cenizas

Biomasa liofilizada fue resuspendida, centrifugada y lavada con agua destilada hasta reacción negativa de iones Cl^{-1} en el agua de filtrado. Las muestras fueron secadas a 100-105°C hasta llegar a peso constante, enfriadas en desecador y pesadas para obtener el peso seco. A continuación fueron llevadas a 450°C durante 8 horas, enfriadas en desecador y pesadas en balanza para obtener el peso seco libre de cenizas (PSLC). Los pesajes fueron realizados en balanza analítica a la cuarta cifra decimal.

4.3.7 Estimación de la producción de biomasa y productividad de lípidos neutros.

La producción de biomasa fue determinada de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$P_B \text{ (mg. L}^{-1}\text{)} = \text{biomasa (mg)} / V \text{ (L)} \quad (\text{ecuación 4.1})$$

donde biomasa es la cantidad de biomasa liofilizada obtenida durante todo el período de cultivo y V es el volumen de cultivo utilizado en la experiencia.

Con el fin de comparar los rendimientos de LN de *N. cinta* entre las diferentes condiciones de cultivo, se aplicó la siguiente fórmula (Damiani et al., 2014).

$$P_{LN} \text{ (mg. L}^{-1}\text{. d}^{-1}\text{)} = [\text{biomasa (mg. L}^{-1}\text{)} \times C_{LN} \text{ (g g}^{-1}\text{)}] / t \text{ (d)} \quad (\text{ecuación 4.2})$$

donde P_{LN} es la productividad de LN, C_{LN} es el contenido de LN por gramo de biomasa, biomasa es el peso seco liofilizado y t es el tiempo de acumulación estimado a partir de la cinética de los LN, de acuerdo a lo detallado en el Capítulo 3.

4.3.8 Cinética de la concentración de los nutrientes disueltos

Los macronutrientes disueltos en el medio de cultivo y su variación a lo largo del tiempo, fueron cuantificados por medio de técnicas espectrofotométricas. Las técnicas analíticas utilizadas se basan en el cambio del estado de oxidación (reducción) de los elementos químicos y formación de complejos coloreados. Estos complejos son susceptibles a determinación colorimétrica y la intensidad del color que desarrollan es proporcional a la concentración de los elementos en solución. Las Abs fueron medidas utilizando un espectrofotómetro Spectronic 20. Las lecturas fueron realizadas a 885, 810 y 543 nm para las determinaciones de fosfatos, silicatos y nitratos, respectivamente.

4.3.8.1 Recolección de las muestras

El análisis de los nutrientes disueltos fue realizado en las siguientes condiciones: f/2 (a 15°C y 20°C), SWES (a 15°C y 20°C) y SWES a 20°C.

Se recolectaron alícuotas de 5 mL que fueron depositadas en tubos de hemólisis de plástico y congeladas (-18°C) hasta su posterior análisis.

4.3.8.2 Acondicionamiento del material de vidrio

Los viales utilizados para la determinación de los nutrientes fueron lavados con HCl diluido y caliente (> 80°C) y luego enjuagados con agua destilada.

4.3.8.3 Acondicionamiento de las muestras y determinaciones

Antes de realizar el análisis de los nutrientes, las muestras fueron filtradas con filtro Whatman GF/F (0,7 µm de poro) con el fin de separar el medio de cultivo de las células en suspensión. La cuantificación de los Nitratos (a), Fosfatos (b) y Silicatos(c) fue realizada cada 2 días hasta el día 14.

a) Nitratos (N)

Los N fueron cuantificados de acuerdo a Strickland y Parson (1972). El método se basa en la reducción de los nitratos a nitritos al pasar por una columna de cadmio cuperizada. Los nitritos reaccionan con la sulfanilamida y se acoplan con dihidroclorhidrato de N (1-naftil)-etilendiamina, formando un complejo de color rosa.

La estimación de los nitratos se realiza sobre la cuarta fracción de muestra que se hace pasar a través de la columna de Cd/Cu. Para ello se preparó una solución que incluía entre 300 y 500 μL de muestra filtrada, enrazada en un matraz aforado de 20 mL con agua destilada. La última fracción de 5 mL se recolectó con micropipeta y se depositó en un vial limpio y seco. Para la formación del complejo se adicionaron los reactivos que desarrollan color, en la cantidad y orden que se mencionan: 400 μL de sulfanilamida y 400 μL de etilendiamida. Blancos, testigos y muestras se acondicionaron con 500 μL de NH_4Cl 6,5M, antes de ser depositados en la columna, para evitar el deterioro de la misma. Para cada condición se construyó una curva de calibrado con testigos de concentraciones en el rango 8 a 18 μM preparados a partir de una solución de trabajo. La misma fue obtenida en cada oportunidad por dilución 1: 100 de un estándar 98,64 mM KNO_3 .

b) Fosfatos (P)

Las determinaciones de P se realizaron de acuerdo a Murphy y Riley, (1962). Mediante esta técnica los P en solución son reducidos mediante el ácido ascórbico, desarrollando una coloración azul.

El reactivo color (R_{Col}) involucrado en esta reacción se preparó unos instantes previos a ser utilizado, debido a que es inestable luego del transcurso de 4 horas. El agregado de las drogas que lo componen se realizó en la cantidad y orden en que se menciona a continuación: 5 mL de solución de ácido sulfúrico, 1 mL de solución de Tartrato de amonio y potasio, 2 mL de solución de Molibdato de amonio y 2 mL de Ácido ascórbico. Las soluciones mencionadas fueron preparadas a partir de drogas puras, disueltas en agua destilada, como se especifica en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Composición del reactivo color utilizado en la determinación de fosfatos disueltos. (V) Volumen en mL utilizado en la solución; (P) Peso en g utilizado en la solución.

Compuestos	V. (mL)	P. (g)	V. (mL) agua destilada
Acido sulfúrico	14		90
Tartrato de amonio y potasio		0,34	250
Molibdato de amonio		1,5	50
Ácido ascórbico		1,35	25

Las mediciones de Abs fueron realizadas sobre 4 mL de solución final integrada por 200 a 800 μl de muestra y agua destilada. Sobre la misma se adicionaron 400 μL de R_{Col} . En cada serie de determinaciones se construyó una curva de calibrado con un estándar de 1 mg. mL KH_2PO_4 . Las soluciones estuvieron en el rango 1.5 -7.5 $\mu\text{g P. mL}^{-1}$. En cada ocasión se realizaron blancos y testigos.

c) Silicatos (Si)

La técnica empleada para determinar Si en solución involucra al ácido ascórbico como agente reductor (método de Koroleff) de acuerdo a la técnica propuesta en Garay et al., (2003). El complejo formado por los silicatos es de color azul.

El R_{Col} utilizado en esta determinación se puede preparar con cierto tiempo antes de ser utilizado, ya que el mismo es estable por unos meses. El mismo fue preparado de la siguiente forma y orden: 125 ml de solución de ácido sulfúrico y 125 ml de solución de heptamolibdato de amonio. Del material filtrado se tomaron entre 100 y 2000 μL que fueron llevados a 5 mL de volumen final con agua destilada. Luego se adicionaron 0.15 mL de R_{Col} para silicatos, se dejó reposar durante 15 minutos y se agregaron 0.10 mL de solución de ácido oxálico y luego 0.10 mL de solución de ácido ascórbico. La mezcla final se dejó reposar entre 30 minutos a 3 horas. La composición de las soluciones utilizadas se especifica en la Tabla 4.3. La curva de calibrado se realizó con un

estándar de 2038 μM Na_2SiF_6 . En cada oportunidad se realizaron blancos y testigos con soluciones en el rango de 1.5 -7.5 $\mu\text{g Si.mL}^{-1}$.

Tabla 4.3. Composición del reactivo color mixto y solución de los ácidos ascórbico y oxálico, utilizados en la determinación de silicatos disueltos.

(V) Volumen en mL utilizado en la solución; (P) Peso en g utilizado en la solución.

Compuestos	V. (mL)	P. (g)	V. (mL) agua desionizada
Reactivo color			
Acido sulfúrico	50		250
Heptamolibdato de amonio		50	250
Acido ascórbico		0,35	20
Acido oxálico		10	100

4.3.9 Cálculo de la velocidad de consumo

La velocidad de consumo (o de desaparición) de los nutrientes (VC) para cada medio de cultivo y temperatura fue estimada de acuerdo a Dominguez et al. (2011) y definida en $\mu\text{M. día}^{-1}$. La misma fue calculada como la pendiente de mejor ajuste entre las concentraciones involucradas entre el inicio de la experiencia y el final de la fase exponencial (Capítulo 3). En los medios f/2 y SWES dichas concentraciones se correspondieron con los días 0 a 6. En el medio SWES-N la pendiente involucró las concentraciones entre los días 0 a 8.

4.3.10 Análisis estadístico de los datos

Se realizaron ANOVA con el fin de testear las diferencias a) entre el contenido de lípidos totales y fracciones lipídicas en relación a la temperatura, medio de cultivo y tiempo experimental, b) en el contenido porcentual medio de AGS, AGMI y AGPI entre las distintas condiciones de cultivo, c) entre los AG con una concentración $\geq 2\%$ del total de ácidos grasos y que estuvieron presentes en las 5 (cinco) condiciones experimentales evaluadas.

La comparación entre medias se realizó, en todos los casos, con el test *LSD* de Fisher (*Least Significant Difference*) con un nivel de significación fue de 0,05. El *software* estadístico utilizado fue INFOSTAT® (versión libre, <http://www.infostat.com.ar>).

4.4 Resultados

4.4.1 Contenido de lípidos totales y de sus fracciones (neutra y polar)

De acuerdo con la información aportada por el análisis espectrofluorométrico con rojo Nilo y en base al índice IFR-Cel (ver Capítulo 3) se seleccionaron como fechas de cosecha los días indicados en la Tabla 4.5. El contenido de LT en peso seco (% PS) establecido mediante la metodología de Folch (1957) y las fracciones que constituyeron los mismos, se detallan en la Tabla 4.5. Por otro lado, en la Tabla 4.6 se muestran los pesos de lípidos totales, neutros y polares expresados como porcentaje de peso seco libre de cenizas (% PSLC). Los respectivos valores entre condiciones de cultivo fueron comparados mediante ANOVA y test *LSD*.

Tabla 4.5. Contenido de lípidos totales y composición relativa de las fracciones neutra y polar, bajo las condiciones experimentales evaluadas. Los lípidos totales están expresados como porcentaje de peso seco [LT (% PS)]. Las fracciones neutra y polar están expresadas como porcentaje de peso seco [LN (% PS), LP (% PS)] y como porcentaje de lípidos totales [LN (% LT); LP (% LT)]. Los valores medios fueron determinados a partir de dos muestras. Letras asignadas alfabéticamente de menor a mayor. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$; $a < b < c$). Temp=temperatura.

Medio de cultivo	Temp. (°C)	Tiempo (días)	LT (% PS)	LN (% PS)	LP (% PS)	LN (% LT)	LP (% LT)
f/2	15	14	18,17 ± 1,41 ^c	15,87 ± 0,71 ^c	2,31 ± 0,70 ^{ab}	87,43 ± 2,89 ^c	12,58 ± 2,89 ^a
f/2	20	10	25,05 ± 0,49 ^d	22,53 ± 1,23 ^d	2,50 ± 1,13 ^{ab}	90,00 ± 2,82 ^c	10,00 ± 2,82 ^a
f/2	20	14	26,95 ± 0,91 ^d	22,85 ± 1,62 ^d	4,10 ± 1,27 ^b	84,75 ± 2,47 ^c	15,25 ± 2,47 ^a
SWES	20	14	7,13 ± 0,42 ^b	5,43 ± 0,30 ^b	1,71 ± 0,11 ^a	76,14 ± 0,24 ^b	23,86 ± 0,24 ^b
SWES-N	20	14	3,96 ± 0,43 ^a	1,97 ± 0,16 ^a	2,00 ± 0,26 ^{ab}	49,73 ± 1,31 ^a	50,26 ± 1,31 ^c

Tabla 4.6. Contenido de lípidos totales y composición de las fracciones neutra y polar en porcentaje de peso seco libre de cenizas. El contenido de lípidos totales está expresado como LT (%PSLC) y las fracciones neutra y polar como LN (%PSLC) y LP (%PSLC). Los valores medios fueron determinados a partir de dos muestras. Letras asignadas alfabéticamente de menor a mayor. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$; $a < b < c$). Temp=temperatura.

Medio de cultivo	Temp. (°C)	Tiempo (días)	LT (% PSLC)	LN (% PSLC)	LP (% PSLC)
f/2	15	14	27,53 ± 2,15 ^c	24,03 ± 1,08 ^b	3,49 ± 1,06 ^a
f/2	20	10	37,93 ± 2,18 ^d	34,12 ± 2,73 ^c	3,78 ± 2,71 ^a
f/2	20	14	40,83 ± 2,24 ^d	34,63 ± 3,85 ^c	6,21 ± 2,70 ^a
SWES	20	14	10,80 ± 0,64 ^b	8,23 ± 0,46 ^a	2,57 ± 0,18 ^a
SWES-N	20	14	6,00 ± 0,65 ^a	2,98 ± 0,24 ^a	3,02 ± 0,40 ^a

El contenido de LT expresado como porcentaje de peso seco (%PS, g⁻¹) presentó diferencias entre las condiciones de cultivo (Tabla 4.5). El contenido lipídico de los cultivos en f/2 a 20°C, 10 días y 14 días (ca. 25% y ca. 27%, respectivamente) fue estadísticamente superior al resto de las condiciones evaluadas ($p < 0.0001$) (Tabla 4.5). Entre estas dos condiciones, por otro lado, no hubo diferencias. Los valores estimados a 15°C, f/2, 14 días fueron ca. 18 %PS y en los medios de cultivo alternativo SWES y SWES-N ca. 7 %PS y ca. 3 %PS, respectivamente. Con respecto al contenido de LN, el valor como porcentaje de peso seco [LN (%PS)] establecido en las células creciendo en f/2 a 20°C durante 10 días (ca. 22 %PS) y 14 días (ca. 23 %PS) fue superior al resto de las condiciones ($p < 0.0001$); no habiendo diferencias entre ambas condiciones de cultivo (Tabla 4.5). Asimismo, se detectaron diferencias entre las tres condiciones restantes, siendo el contenido de LN a 15°C, f/2, 14 días (ca. 16 %PS) superior al de 20°C, SWES, 14 días (ca. 5 %PS) y al de 20°C, SWES-N, 14 días (ca. 2 %PS). El contenido de LP expresado como porcentaje de peso seco (%PS) presentó un máximo de 4 % en la experiencia en f/2 a 20°C, 14 días y un mínimo de 1,7% en la experiencia en SWES a 20°C durante 14 días. Entre los valores intermedios no se detectaron diferencias ($p = 0,17$).

El contenido relativo de los lípidos totales y las fracciones expresado como porcentaje de peso seco libre de cenizas (%PSLC, g. g⁻¹) fue considerablemente mayor que el referido al PS (Tabla 4.6). Cuando se evaluó el contenido de LT entre las distintas condiciones se detectaron las mismas diferencias que las establecidas entre los LT % PS. Los contenidos en f/2 a 20°C, 10 días y 14 días (ca. 38% y ca 41%, respectivamente) fueron significativamente superiores a los estimados a 15°C, f/2, 14 días (ca. 27 %PSLC), en SWES (ca. 11 %PSLC) y SWES-N (ca. 6 %PSLC) ($p < 0.0001$). El contenido de LN en las células desarrolladas a 20°C en f/2 (ca. 34% y 35%) fue significativamente superior al estimado a 15°C en f/2 (ca. 24 %), que a su vez fue superior al detectado en los medios SWES (8 %) y SWES-N (ca. 3 %) ($p = 0,0001$). En el contenido de LP estimado en todas las condiciones (ca 6% a 2,5 %) no se detectaron diferencias ($p = 0,46$).

Los LN fueron la fracción mayoritaria en todas las condiciones de cultivo, con excepción de la experiencia en SWES-N (Tabla 4.5). El porcentaje establecido en las células creciendo en f/2 (de 85% a 90%) fue significativamente superior al establecido en el medio SWES (76%) y SWES-N (49%). También se detectaron diferencias significativas entre éstas últimas dos condiciones ($p < 0,0001$).

Los LT determinados mediante una modificación de la técnica de Bligh y Dyer (Weldy y Huesemann, 2007) se presentan en la Tabla 4.7 y se comparan con los valores determinados a partir de la técnica de Folch. Además, se detalla la cantidad de biomasa que fue procesada en cada tratamiento. Los LT promedio obtenidos en los dos tipos de extracción fueron comparados mediante ANOVA y test *LSD*. Se detectaron diferencias entre los LT estimados mediante las dos técnicas en las experiencias f/2 a 20°C, durante 10 días ($p = 0.0152$) y SWES-N a 20°C, durante 14 días ($p = 0.0039$).

Tabla 4.7. Biomasa utilizada en el proceso de extracción y contenido de lípidos totales. La cantidad de biomasa utilizada se encuentra expresada en mg y los lípidos totales como porcentaje de peso seco [LT (% PS)]. Las medias fueron determinadas a partir de dos muestras (x 2). Letras asignadas alfabéticamente de menor a mayor. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$; $a < b$).

Experiencia			Biomasa (mg)		LT (% PS)	
Medio de cultivo	Temperatura (°C)	Tiempo (días)	Folch, mod. (1957)	B&D, mod. (2007)	Folch, mod. (1957)	B&D, mod. (2007)
f/2	20	10	180 (x2)	15,5 (x2)	26,95 ± 0,91 ^a	24,90 ± 0,71 ^a
f/2	20	14	160 (x2)	15,5 (x2)	25,05 ± 0,49 ^b	20,70 ± 0,60 ^a
SWES	20	14	300 (x2)	15 (x2)	7,13 ± 0,42 ^a	8,40 ± 0,24 ^a
SWES-N	20	14	200 (x2)	16 (x2)	3,96 ± 0,43 ^a	9,27 ± 0,19 ^b

4.4.2 Producción de biomasa y productividad de lípidos neutros (P_{LN})

La producción de biomasa (P_B), el tiempo de acumulación de LN y la productividad de lípidos neutros (P_{LN}) establecidos en cada una de las experiencias se resumen en la Tabla 4.4. El tiempo de acumulación para cada experiencia y los criterios usados para el tiempo de cosecha fue explicado en el Capítulo 3. Las P_B estimadas en los medios alternativos SWES y SWES-N (343,48 mg. L⁻¹ y 408,77 mg. L⁻¹, respectivamente) fueron aproximadamente cinco veces superiores a las de los cultivos en f/2 (ca. 58 mg. L⁻¹ a 70 mg. L⁻¹). En los cultivos desarrollados en f/2 se pudo establecer una P_{LN} debido a que se identificó un período de acumulación de lípidos neutros en dichos cultivos (Capítulo 3). La mejor condición de cultivo para el rendimiento de LN se estableció en la experiencia a 20°C durante 10 días. La P_{LN} allí establecida fue de 9,95 mg. L⁻¹.d⁻¹. Sin embargo, con los medios SWES y SWES-N no se calcularon las productividades lipídicas debido a que no fue encontrado un período de acumulación, lo cual fue confirmado por los bajos valores obtenidos a partir del fraccionamiento (ver sección 4.4.1).

Tabla 4.8. Producción de biomasa, tiempo de acumulación de lípidos neutros y productividad determinados en cada condición. P_B = producción de biomasa. P_{LN} = productividad de lípidos neutros. (-) condición en donde no hubo acumulación de lípidos neutros.

Medio de cultivo	Temperatura (°C)	Tiempo (días)	P_B (mg. L ⁻¹)	Tiempo de acumulación de lípidos neutros	P_{LN} (mg. L ⁻¹ . d ⁻¹)
f/2	15	14	70,34	4 días	4,22
f/2	20	10	58,31	2 días	9,95
f/2	20	14	67,7	6 días	3,91
SWES	20	14	343,48	-	-
SWES-N	20	14	408,77	-	-

4.4.2 Composición lipídica: Clases lipídicas y perfiles de ácidos grasos en cada fracción.

En cada fracción lipídica, se diferenciaron tres clases de ácidos grasos: saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) y poliinsaturados (AGPI). Estos se obtuvieron a través de la sumatoria de los metilésteres de ácidos grasos (FAME) (Fig. 4.2 y Fig. 4.3).

Los LN presentaron una clara dominancia de los AGMI en los cultivos desarrollados en f/2 y SWES, representando del 53% al 60% del total de AG neutros (Fig. 4.2). En forma particular, en los cultivos creciendo en SWES-N, el contenido de los AGMI fue similar a los AGS (39% y 38% del total de AG neutros, respectivamente). El contenido porcentual máximo de AGMI fue detectado en las células creciendo a 20°C en f/2, durante 10 días. Todos los % de AGMI fueron estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0,0001$). Los AGS, que fueron la segunda fracción en importancia, representaron entre el 38% y 22% del total de AG neutros. El máximo valor fue determinado en las células desarrolladas en SWES-N y el mínimo en aquellas que crecieron a 20°C en f/2 durante 14 días ($p < 0,0001$). En todos los casos, los AGPI fueron la menor fracción representada. El máximo contenido porcentual medio (ca. 22%) se correspondió con la experiencia en medio SWES-N ($p < 0,0001$).

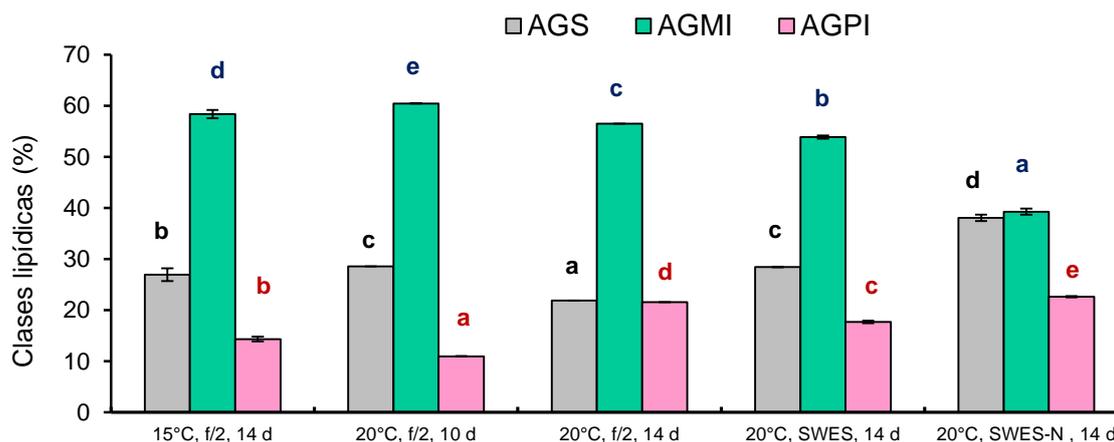


Figura 4.2. Composición de la fracción neutra de acuerdo con la saturación/insaturación de los ácidos grasos. Las barras de error representan el desvío estándar entre 4 muestras. Los grupos de AG entre condiciones fueron comparados mediante ANOVA y test *LSD*. Letras asignadas alfabéticamente de menor a mayor (Las letras de color negro, azul y rojo corresponden a los AGS, AGMI y AGPI, respectivamente). Medias que comparten alguna letra no difieren al 5%. AGS = ácidos grasos saturados, AGMI = ácidos grasos monoinsaturados, AGPI = ácidos grasos poliinsaturados. d=días.

En la fracción polar, las tendencias observadas fueron más variables (Fig. 4.3). Los AGS de la experiencia 15°C, f/2, 10 días fueron significativamente superiores al resto de las condiciones ($p=0,0005$). En esta condición los AGS y AGMI presentaron una proporción similar (42% y 43% del total de AG polares, respectivamente) mientras que en el resto de las condiciones los AGMI fueron la fracción dominante. El máximo contenido medio (ca. 50% del total de AG polares) se detectó en las experiencias 20°C, f/2, 10 días y 20°C, SWES, 14 días ($p < 0,0001$). En todas las experiencias los AGPI fueron la clase de menor contribución al total de AG polares. El máximo contenido porcentual medio (ca 22%) se correspondió con la experiencia 20°C, f/2, 14 días ($p=0,0006$).

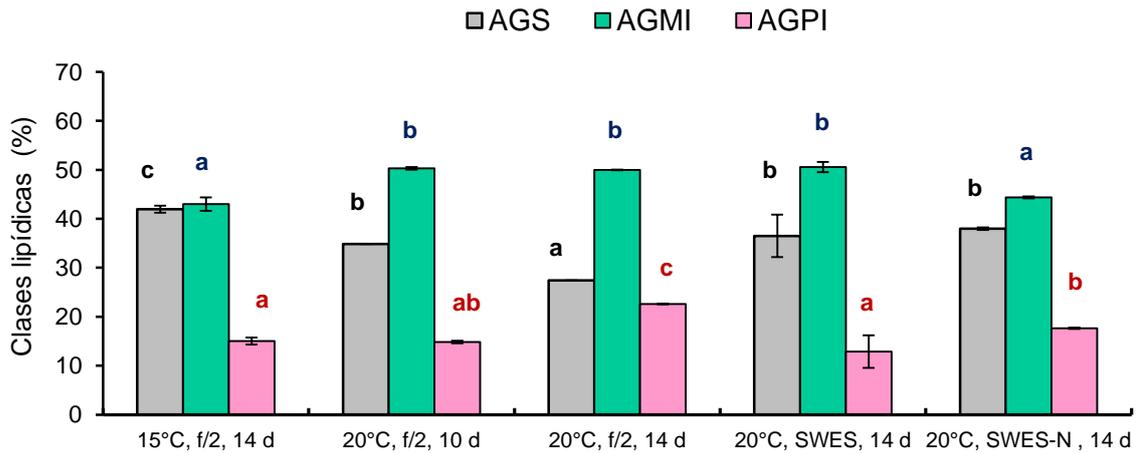


Figura 4.3. Composición de la fracción polar de acuerdo con la saturación/insaturación de los ácidos grasos. Las barras de error representan el desvío estándar entre 4 muestras. Los grupos de AG entre condiciones fueron comparados mediante ANOVA y test *LSD*. Letras asignadas alfabéticamente de menor a mayor (Las letras de color negro, azul y rojo corresponden a los AGS, AGMI y AGPI, respectivamente). Medias que comparten alguna letra no difieren al 5 %. AGS = ácidos grasos saturados, AGMI = ácidos grasos monoinsaturados, AGPI = ácidos grasos poliinsaturados. d=días.

En la caracterización del perfil lipídico de *N. cincta* se identificaron un total de 22 ácidos grasos (AG) en la fracción neutra (Tabla 4.8) y 19 AG en la fracción polar (Tabla 4.9). Los AG no determinados fueron señalados con el signo menos (-).

Los contenidos porcentuales medios mínimos y máximos de la FN se correspondieron para el AGPI 18:3 (n-6) ($0,03 \pm 0,005$ %) y el AGMI 16:1 ($53,66 \pm 0,03$ %), respectivamente. En la FP se establecieron contenidos porcentuales medios mínimos y máximos en el AGPI 22:5 (n-3) ($0,14 \pm 0,001$ %) y el AGMI 16:1 ($40,14 \pm 2,56$), respectivamente.

Tabla 4.8. Perfil de ácidos grasos neutros de *N. cincta* en las distintas condiciones de cultivo evaluadas. \pm = desvío estándar entre 4 réplicas. AGS = ácidos grasos saturados. AGMI = ácidos grasos monoinsaturados. AGPI = ácidos grasos poliinsaturados. c = isómero cis*. t = isómero trans*. Σ = sumatoria de los ácidos grasos del mismo grado de insaturación.

Condición de cultivo	f/2			SWES	SWES-N
	15°C, 14 días	20°C, 10 días	20°C, 14 días	20°C, 14 días	20°C, 14 días
AGS					
12:0	0,06 \pm 0,00	0,10 \pm 0,00	0,10 \pm 0,00	0,07 \pm 0,00	1,44 \pm 0,05
14:0	0,82 \pm 0,01	0,91 \pm 0,00	0,74 \pm 0,00	0,77 \pm 0,06	2,14 \pm 0,02
15:0	0,28 \pm 0,01	0,30 \pm 0,00	0,22 \pm 0,00	0,28 \pm 0,01	0,74 \pm 0,01
16:0	24,51 \pm 1,07	26,53 \pm 0,01	19,92 \pm 0,00	26,12 \pm 0,02	25,88 \pm 0,07
17:0	0,07 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00	0,09 \pm 0,00	0,45 \pm 0,00
18:0	1,18 \pm 0,18	0,65 \pm 0,01	0,78 \pm 0,00	1,03 \pm 0,03	7,25 \pm 0,66
20:0	0,02 \pm 0,00	0,04 \pm 0,00	0,05 \pm 0,00	0,05 \pm 0,00	0,15 \pm 0,00
AGMI					
16:1 n-7	53,43 \pm 0,77	53,66 \pm 0,03	48,70 \pm 0,02	48,38 \pm 0,28	26,38 \pm 0,36
17:1 n-7	2,55 \pm 0,06	2,94 \pm 0,01	3,12 \pm 0,00	2,23 \pm 0,06	3,37 \pm 0,06
18:1 n-9 (c y t)	2,42 \pm 0,04	3,74 \pm 0,00	4,57 \pm 0,00	3,06 \pm 0,05	9,21 \pm 0,15
24:1 n-9	-	0,12 \pm 0,00	0,14 \pm 0,00	0,21 \pm 0,01	0,32 \pm 0,02
AGPI					
18:2 n-6 t	0,23 \pm 0,02	0,30 \pm 0,00	0,30 \pm 0,00	0,23 \pm 0,02	0,64 \pm 0,01
18:2 n-6 c	1,45 \pm 0,26	0,40 \pm 0,00	0,64 \pm 0,00	1,36 \pm 0,16	1,95 \pm 0,01
18:3 n-6	0,04 \pm 0,01	-	0,17 \pm 0,00	0,29 \pm 0,03	0,30 \pm 0,00
18:3 n-3	1,83 \pm 0,17	0,94 \pm 0,00	0,58 \pm 0,00	0,23 \pm 0,01	0,17 \pm 0,01
20:2 n-6	0,33 \pm 0,02	0,30 \pm 0,00	0,49 \pm 0,00	0,55 \pm 0,02	0,36 \pm 0,01
20:3 n-3	0,04 \pm 0,00	-	-	-	-
20:4 n-6	0,13 \pm 0,01	0,08 \pm 0,00	0,56 \pm 0,00	0,89 \pm 0,01	1,84 \pm 0,01
22:2 n-6	-	-	-	-	-
20:5 n-3	9,79 \pm 0,75	8,22 \pm 0,03	16,84 \pm 0,01	11,47 \pm 0,32	15,63 \pm 0,13
22:5 n-3	0,09 \pm 0,00	-	-	0,98 \pm 0,02	-
22:6 n-3	0,75 \pm 0,10	0,71 \pm 0,00	2,03 \pm 0,01	1,70 \pm 0,07	1,76 \pm 0,01
Σ					
AGS	26,93 \pm 1,09	28,59 \pm 0,00	21,88 \pm 0,00	28,43 \pm 0,07	38,07 \pm 0,61
AGMI	58,39 \pm 0,69	60,46 \pm 0,03	56,53 \pm 0,01	53,88 \pm 0,31	39,28 \pm 0,58
AGPI	14,35 \pm 0,39	10,95 \pm 0,03	21,59 \pm 0,01	17,69 \pm 0,26	22,65 \pm 0,14

* Los isómeros son compuestos de igual fórmula molecular pero de estructura química distinta. En los isómeros *trans*, los grupos semejantes o idénticos se encuentran en el lado opuesto de un doble enlace, mientras que en los isómeros *cis* los grupos semejantes están en el mismo lado del doble enlace.

Tabla 4.9. Perfil de ácidos grasos polares de *N. cincta* en las distintas condiciones de cultivo evaluadas. ± = desvío estándar entre 4 réplicas. AGS = ácidos grasos saturados. AGMI = ácidos grasos monoinsaturados. AGPI = ácidos grasos poliinsaturados. c = isómero cis. t = isómero trans. Σ = sumatoria de los ácidos grasos con el mismo grado de insaturación.

Condición de cultivo	f/2			SWES	SWES-N
	15°C, 14 días	20°C, 10 días	20°C, 14 días	20°C, 14 días	20°C, 14 días
AGS					
12:0	0,74 ± 0,13	-	-	-	3,45 ± 0,08
14:0	1,67 ± 0,11	1,68 ± 0,01	0,96 ± 0,00	0,83 ± 0,03	1,66 ± 0,05
15:0	0,44 ± 0,05	-	0,18 ± 0,00	0,32 ± 0,04	0,57 ± 0,03
16:0	33,15 ± 0,29	26,43 ± 0,00	23,50 ± 0,05	32,69 ± 4,09	27,21 ± 0,16
17:0	0,29 ± 0,07	1,55 ± 0,03	0,17 ± 0,01	-	0,30 ± 0,01
18:0	5,32 ± 0,55	5,18 ± 0,03	2,35 ± 0,04	2,68 ± 0,22	4,58 ± 0,19
20:0	0,32 ± 0,02	-	0,25 ± 0,02	-	0,22 ± 0,01
AGMI					
16:1 n-7	29,69 ± 0,22	38,70 ± 0,25	19,93 ± 0,14	40,15 ± 2,57	21,17 ± 0,21
17:1 n-7	4,20 ± 0,31	3,35 ± 0,03	9,48 ± 0,00	4,07 ± 0,83	5,15 ± 0,03
18:1 n-9 (c y t)	9,11 ± 1,19	8,26 ± 0,07	20,58 ± 0,06	6,37 ± 0,75	17,64 ± 0,16
24:1 n-9	-	-	-	-	0,41 ± 0,05
AGPI					
18:2 n-6 t	0,30 ± 0,01	0,61 ± 0,05	0,33 ± 0,00	0,40 ± 0,03	1,37 ± 0,03
18:2 n-6 c	4,04 ± 0,45	2,17 ± 0,02	1,84 ± 0,01	2,05 ± 0,21	1,65 ± 0,04
18:3 n-3	1,22 ± 0,16	0,79 ± 0,06	0,32 ± 0,01	-	-
20:2 n-6	0,51 ± 0,05	-	0,96 ± 0,00	0,59 ± 0,05	0,44 ± 0,01
20:3 n-3	-	-	-	-	-
20:4 n-6	0,98 ± 0,34	0,59 ± 0,00	0,72 ± 0,00	0,77 ± 0,06	1,36 ± 0,04
22:2 n-6	-	-	-	-	-
20:5 n-3	5,88 ± 0,57	8,47 ± 0,10	14,63 ± 0,05	7,38 ± 2,93	11,43 ± 0,13
22:5 n-3	0,74 ± 0,16	0,92 ± 0,06	0,15 ± 0,00	1,16 ± 0,11	-
22:6 n-3	1,55 ± 0,09	1,31 ± 0,00	3,67 ± 0,01	0,76 ± 0,07	1,37 ± 0,04
Σ					
AGS	41,95 ± 0,71	34,84 ± 0,01	27,41 ± 0,02	36,52 ± 4,33	37,99 ± 0,26
AGMI	43,00 ± 1,38	50,31 ± 0,29	49,99 ± 0,08	50,58 ± 1,04	44,37 ± 0,20
AGPI	15,05 ± 0,67	14,85 ± 0,28	22,61 ± 0,06	12,89 ± 3,34	17,64 ± 0,15

En las Figuras 4.4 y 4.5 se representaron los AG neutros y polares, respectivamente, cuya contribución al total de AG registrados fue $\geq 2\%$. Sin diferenciar las fracciones, dentro de los AGS se registraron los ácidos láurico (12:0), mirístico (14:0), palmítico (16:0) y esteárico (18:0). Los AGMI estuvieron representados por los ácidos palmitoleico (16:1 (n-7)), heptadecenoico (17:1 (n-7)) y oleico (18:1 (n-9)) y los AGPI incluyeron a los ácidos linoleico (18:2 (n-6)), eicosapentaenoico (20:5 (n-3)), y docosahexaenoico (22:6 (n-3)).

La fracción neutra se caracterizó por un alto contenido del AGMI 16:1(n-7) representando entre 26% y 53% del total de AG establecidos (Fig. 4.3). Los máximos niveles del 16:1 (n-7) fueron determinados en f/2 a 15°C, 14 días y 20°C, 10 días ($p < 0,0001$). Los otros AGMI presentes en todas las condiciones fueron el 17:1 (n-7) y el 18:1 (n-9). El primero representó una media de 2% a 3% del total de AG, encontrándose diferencias en el contenido porcentual entre tratamientos ($p < 0,0001$). El 18:1 (n-9) constituyó una media porcentual del 2% al 9%, siendo estos contenidos diferentes entre sí ($p < 0,0001$). El 16:0 fue el principal AGS presentando un contenido de 19% a 26% del total de AG. Los máximos valores se determinaron en las experiencias a 20°C, f/2 durante 10 días, a 20°C, SWES durante 14 días y a 20°C, SWES-N durante 14 días ($p < 0,0001$). Los AGPI estuvieron representados por el AG 20:5 (n-3) que constituyó entre el 8% al 16% de total de AG. Se evidenciaron diferencias en el contenido porcentual medio entre las condiciones experimentales, siendo el máximo determinado en la experiencia a 20°C, f/2 durante 14 días ($p < 0,0001$).

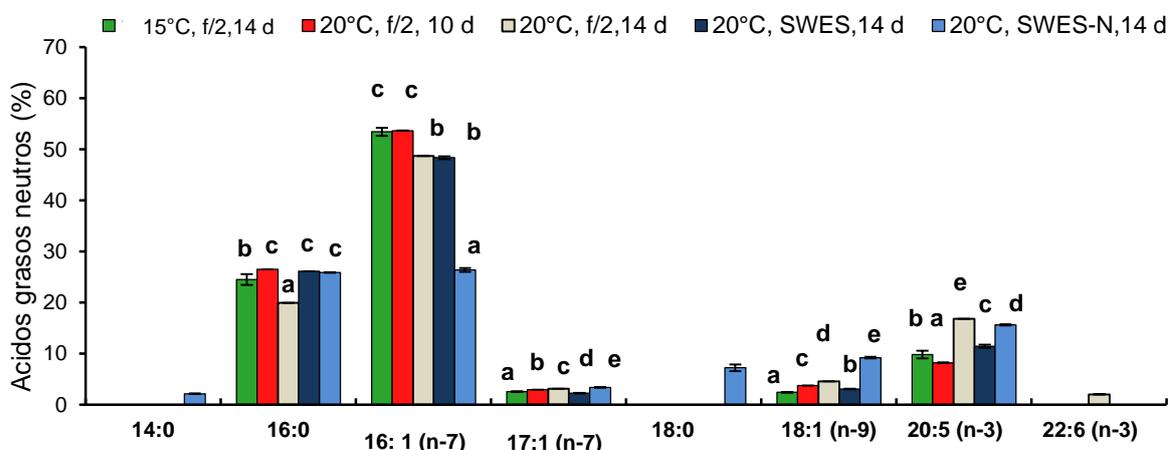


Figura 4.4. Composición porcentual media de ácidos grasos $\geq 2\%$ de la fracción neutra. Las barras de error representan el desvío estándar ($n=4$). Se representaron los ácidos grasos cuya contribución al total de ácidos grasos registrados fue $\geq 2\%$. Letras asignadas alfabéticamente de menor a mayor. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$; $a < b < c < d < e$).

En el caso de la fracción polar se determinaron dos AGS en todas las condiciones (Fig. 4.4). El AGS 16:0 presentó un contenido porcentual medio del 23% a 33% del total de AG, siendo los máximo establecidos en las condiciones 15°C, f/2, 14 días y 20°C, f/2, 14 días ($p=0.0007$). El AGS 18:0 constituyó entre el 2% y 5% y presentó diferencias en el contenido porcentual entre tratamientos ($p < 0,0001$). Para el AGMI 16:1 (n-7) se determinaron contenidos porcentuales medios 20% a 40% del total de AG. Los máximos contenidos fueron establecidos en las condiciones 20°C, f/2, 14 días y 20°C, SWES, 14 días ($p < 0,0001$). Los AGMI 17:1(n-7) y el 18:1 (n-9) presentaron diferencias entre las condiciones experimentales ($p < 0,0001$, en ambos casos). La proporción de éstos AG estuvo entre el 3% al 9% y del 6% al 20%, respectivamente. Los otros presentes en todas las condiciones fueron el 17:1 (n-7) y el 18:1 (n-9). El primero representó una media de 2% a 3% del total de AG, encontrándose diferencias en el contenido porcentual entre tratamientos ($p < 0,0001$). El 18:1 (n-9) constituyó una media porcentual del 2% al 9%, siendo estos contenidos diferentes entre sí ($p < 0,0001$). Los AGPI estuvieron nuevamente representados por el AG 20:5 (n-3). El contenido porcentual medio fue del 5% al 14% del total de AG polares, con el máximo en la condición 20°C, f/2, 14 días ($p = 0,0003$).

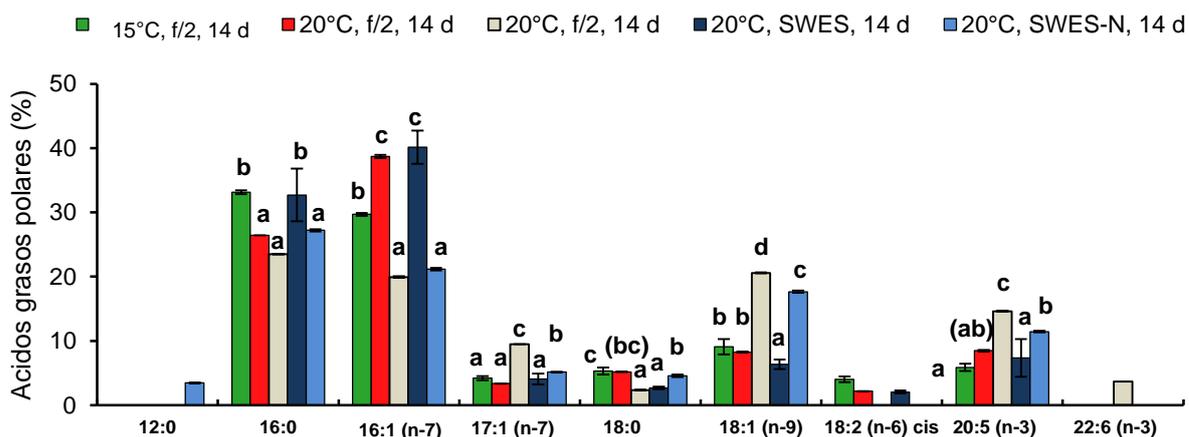


Figura 4.5. Composición porcentual media de ácidos grasos $\geq 2\%$ de la fracción polar. Las barras de error representan el desvío estándar ($n=4$). Se representaron los ácidos grasos cuya contribución al total de ácidos grasos registrados fue $\geq 2\%$. Letras asignadas alfabéticamente de menor a mayor. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$; $a < b < c < d < e$).

4.4.3 Cinética de nutrientes y velocidades de consumo

La cinética de la concentración de los macronutrientes disueltos en los medios de cultivo, se analizó con el fin de evaluar su posible rol en la limitación del crecimiento y consecuentemente en la acumulación de los lípidos neutros (Fig. 4.6).

La concentración de nutrientes varió de acuerdo con los medios de cultivo. Así, en el medio f/2, se observó una disminución exponencial en la concentración de P y Si los 6 primeros días, mientras que la del N fue entre los días 0 y 8. En el medio SWES, la principal disminución en la concentración de P y Si fue detectada entre los días 0 y 8, mientras que no se observó una disminución en la concentración de N dentro del tiempo considerado. Particularmente en la experiencia SWES-N, todos los nutrientes fueron disminuyendo de manera continua hasta el día 14.

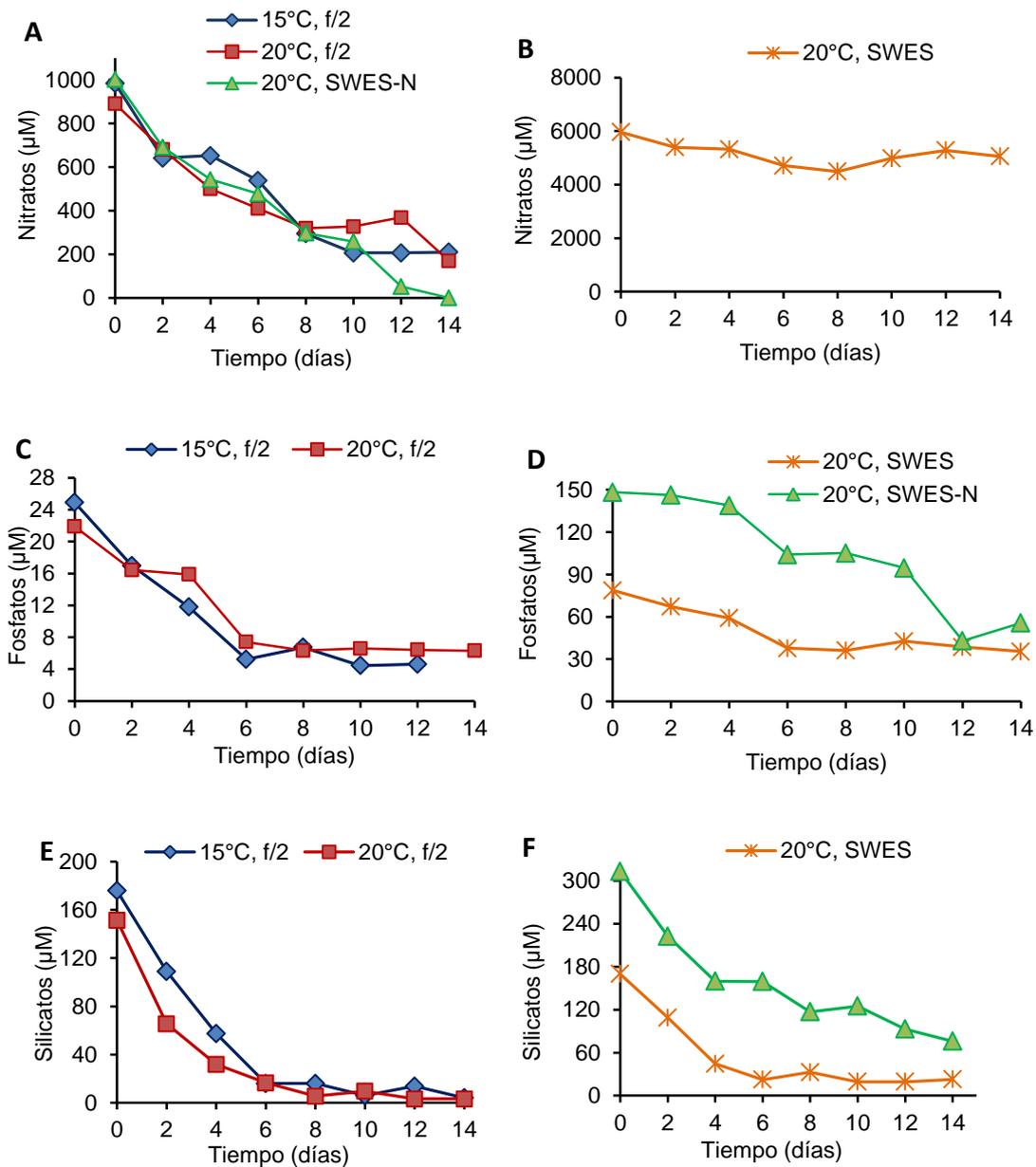


Figura 4.6. Cinética de los macronutrientes disueltos en las distintas condiciones de cultivo. (A) Variaciones en la concentración de N en f/2, a 15°C y 20°C y en SWES-N, a 20°C. **(B)** Variaciones en la concentración de N en SWES, a 20°C. **(C)** Variaciones en la concentración de P en f/2, a 15°C y 20°C. **(D)** Variaciones en la concentración de P en SWES y SWES-N, a 20°C. **(E)** Variaciones en la concentración de Si en f/2, a 15°C y 20°C. **(F)** Variaciones en la concentración de Si en SWES y en SWES-N, a 20°C.

Las velocidades de consumo (VC) y las concentraciones iniciales y finales de los nutrientes disueltos se detallan en la Tabla 4.10. La VC del N fue similar entre aquellas condiciones que presentaron concentraciones iniciales similares. En el medio f/2 y SWES-N, con concentraciones iniciales entre 890 μM y 1100 μM de N, el consumo fue de 66 $\mu\text{M} \cdot \text{día}^{-1}$ a 81 $\mu\text{M} \cdot \text{día}^{-1}$. En el medio SWES con concentración inicial de ca. 5900 μM de N, el consumo fue en proporción relativamente bajo (191 $\mu\text{M} \cdot \text{día}^{-1}$). El P fue consumido en igual medida entre las condiciones SWES a 20°C y SWES-N a 20°C (ca. 6 $\mu\text{M} \cdot \text{día}^{-1}$), siendo dos veces superior a las determinadas en medio f/2 (de 2 $\mu\text{M} \cdot \text{día}^{-1}$ a 3 $\mu\text{M} \cdot \text{día}^{-1}$); sin embargo, hay que destacar que las concentraciones iniciales de P en los medios SWES y SWES-N fue 3,5 y 6 veces superior a la concentración inicial en el medio f/2. La velocidad de desaparición de los silicatos fue similar en todas las condiciones experimentales evaluadas (entre 21 $\mu\text{M} \cdot \text{día}^{-1}$ y 26 $\mu\text{M} \cdot \text{día}^{-1}$), independientemente de la concentración inicial del medio. De acuerdo a los valores mínimos de N, P y Si (Tabla 4.10) se puede observar con un asterisco las concentraciones finales que estuvieron por debajo de los valores limitantes del crecimiento (P<8,9 μM ; N<10,2 μM ; Si <22 μM) de acuerdo con Sarthou et al. (2005).

Tabla 4.10. Cantidad de nutriente adicionado al agua de mar, concentración inicial y final del medio de cultivo y tasas de consumo de los respectivos elementos.

Nutriente	Medio de cultivo Temperatura (°C)	f/2		SWES	SWES-N
		15	20	20	20
Nitrato (N)	Concentración inicial (μM)	983	890	5962	1100
	Concentración final (μM)	209,9	169,6	5056,6	0 *
	Tasa de consumo ($\mu\text{M} \cdot \text{d}^{-1}$)	66,2	81,0	191,9	81,1
Fosfato (P)	Concentración inicial (μM)	22	25	79	148
	Concentración final (μM)	4,6 *	6,3 *	35,3	55,7
	Tasa de consumo ($\mu\text{M} \cdot \text{d}^{-1}$)	3,2	2,1	6,5	6,4
Silicato (Si)	Concentración inicial (μM)	176	151	312	170
	Concentración final (μM)	4 *	3,1 *	22,6	75,9
	Tasa de consumo ($\mu\text{M} \cdot \text{d}^{-1}$)	26,6	21,9	25,3	22,7

4.5 Discusión

Entre las cualidades implicadas en la valoración de una determinada especie como recurso alternativo para la producción de biodiesel se han definido la velocidad de crecimiento, el contenido lipídico y la productividad lipídica (Griffiths y Harrison, 2009). Además, la composición de los perfiles de ácidos grasos también es importante debido a que ésta es un reflejo de la calidad del biodiesel (Knothe, 2005). El análisis del crecimiento de *N. cincta* fue anteriormente realizado (Capítulo 3). En el presente capítulo se detallan las características lipídicas implicadas en la evaluación de su potencial como materia prima con fines energéticos.

La P_B de *N. cincta* estimada en los medios SWES y SWES-N (ca 300 mg. L⁻¹- 400 mg. L⁻¹) fue significativamente superior a la alcanzada en el medio f/2 (ca. 58 mg. L⁻¹- 70 mg. L⁻¹), lo cual confirma las observaciones realizadas en el Capítulo 3, en el cual se indica que los medios de mayor contenido de nutrientes (SWES y SWES-N) son más aptos para la obtención de mejores rendimientos de biomasa.

El crecimiento de *N. cincta* en el medio f/2, en el tiempo de cultivo considerado, fue favorable para la acumulación de LN. Por el contrario, en los medios en donde se alcanzó una alta producción de biomasa no hubo acumulación. Esto es acorde con estudios previos en donde se ha establecido que condiciones de limitación de nutrientes aumentan el contenido lipídico pero al mismo tiempo conducen a una reducción de la biomasa (Liu et al., 2012; Bertozzini et al., 2013).

Teniendo en cuenta los altos porcentajes de LN dentro de los LT, las P_{LN} establecidas en f/2 fueron comparadas directamente con las productividades de lípidos totales de otras especies de diatomeas. La condición de cultivo en f/2 a 20°C, durante 10 días resultó la más apta para obtención de LN con 9,95 mg. L⁻¹.d⁻¹, e incluso, los menores valores de P_{LN} en f/2 (3,91 mg. L⁻¹.d⁻¹ a 15°C y 4,22 mg. L⁻¹.d⁻¹ a 20°C, durante 14 días) fueron superiores a las productividades de lípidos totales estimadas para *Nitzschia* LBK-017 (2,13 mg. L⁻¹.d⁻¹, Jiang et al., 2014), y para *Navicula* sp. (3.67 mg. L⁻¹.d⁻¹, Song et al., 2013).

Un punto crítico para tener en cuenta en las estimaciones del contenido de LT o LN en las diatomeas es que las mediciones de peso seco (PS) subestiman la cantidad real de lípidos en relación a la biomasa celular. Esto se debe a la contribución de la pared celular de sílice en el peso total (material orgánico e inorgánico) de las diatomeas (Hildebrand et al., 2012). En el caso particular de *N. cincta* se determinó un contenido de material inorgánico de $34,08 \pm 0,33$ %, lo cual es acorde con el contenido de sílice determinado en el PS de otras especies de diatomeas (22% a 24% , Lewin y Guillard, 1963).

En el análisis del contenido de LT mediante diferentes técnicas de extracción se detectaron diferencias entre dos de las cuatro condiciones evaluadas. Debido a ello una mejor evaluación con mayor cantidad de muestras debería ser realizada. La optimización de los métodos de extracción utilizados en las microalgas es otra necesidad actual, debido a que los mismos han sido originalmente utilizados en alimentos o tejidos animales y podrían no ser los adecuados (Ryckebosh et al., 2011)

En las muestras provenientes del medio f/2, el contenido lipídico establecido por el método de Folch fue levemente mayor que el determinado por Bligh y Dyer. Del mismo modo, Iverson et al. (2001) indicaron que en muestras con >2% LT la estimación de acuerdo a Bligh y Dyer fue significativamente menor a la del método de Folch y que esta subestimación incrementa con el contenido lipídico. Sólo en las muestras con < 2% LT los resultados no difirieron entre los dos métodos (Iverson et al., 2001). Así, las diferencias en los resultados del contenido lipídico en los medios alternativos podrían deberse al bajo contenido de LT de las muestras.

En base a nuestros resultados y frente a la necesidad de tomar decisiones del momento de cosecha de manera inmediata, la técnica de Bligh y Dyer resultaría efectiva para tal fin, teniendo en cuenta que los valores de LT obtenidos están dentro de “cierto rango” y la metodología es más sencilla. Por otro lado, para obtener resultados de LT con mayor precisión pero de manera no inmediata, la técnica de extracción de Folch fue la adecuada.

Una gran variabilidad en el contenido de LT fue estimada en este trabajo. Entre un 27,5 (%PSLC) y 40,8 (%PSLC) fue establecido en las células creciendo en f/2 y un contenido de 10,8 (%PS) y 6 (%PS) fue estimado en las células provenientes de los medios SWES y SWES-N, respectivamente. Esta

diferencia, de acuerdo con los resultados, estaría relacionada con la disponibilidad de los macronutrientes en el medio de cultivo. Concentraciones $< 8,9 \mu\text{M}$ para el P y $< 22 \mu\text{M}$ para el Si han sido definidas como limitantes para el crecimiento de las diatomeas (Sarhou et al., 2005). En f/2, a partir del sexto día de cultivo, se determinaron concentraciones medias de P y Si de $7 \mu\text{M}$ y $16 \mu\text{M}$, respectivamente, mientras que en SWES y SWES-N la cantidad de estos nutrientes no alcanzó valores limitantes en todo el transcurso de la experiencia (Tabla 4.9). Por otro lado, una cantidad $< 10,2 \mu\text{M}$ de N podría ser limitante para el desarrollo de las diatomeas (Sarhou et al., 2005). En las experiencias realizadas, la concentración de N llegó a valores $> 100 \mu\text{M}$ en f/2 y $> 2000 \mu\text{M}$ en SWES. Particularmente en la experiencia en SWES-N, el N fue totalmente consumido en el día 14, pero la disponibilidad de P y Si se mantuvo por encima de los valores limitantes. En base a esto, se considera que tanto el P como el Si fueron los principales factores involucrados en el incremento de la cantidad de LN en *N. cincta* creciendo en f/2, dado que con este medio se obtuvieron valores de LN de ca. 36 % PSLC. Otros autores han sugerido que la obtención de un mayor contenido lipídico en diatomeas involucra la limitación de dos nutrientes o la conjunción de más de un factor estresante (Valenzuela et al., 2012; Roleda et al., 2013; Moll et al., 2014). Por otro lado, la diferencia significativa establecida en los LT de las células creciendo en f/2 a 15°C y 20°C estaría relacionada con la relación N:P en el medio de cultivo (46 y 27, respectivamente, al momento de la cosecha). Anteriormente, Valenzuela et al. (2012) relacionaron el período de acumulación lipídica en *Phaeodactylum tricornutum* con valores aproximados de 27, en la relación exógena N:P. La disminución del P podría ser el “disparador” inicial de la acumulación lipídica y la disminución del N representaría el “magnificador” de dicho contenido (Valenzuela et al., 2012).

En muchas especies de microalgas, los TAG son acumulados como un producto de reserva y sus niveles de acumulación son muy variables (Gushina y Harwood, 2009). En *N. cincta*, los LN fueron la fracción mayoritaria en f/2 y SWES (85 a 90% LT en f/2; 76% LT en SWES), mientras que con SWES-N alcanzaron un 50% LT. Contenidos máximos de TAG de 45%, 75%, y 76% (% de LT) han sido determinados en cultivos expuestos a rayos ultravioletas (UV) (Guihéneuf et al., 2010), limitación de N (López Alonso et al., 2000) y

envejecimiento del cultivo (Popovich et al., 2012), respectivamente. Por otro lado, el contenido de TAG (%PS) en *N. cincta* creciendo en f/2 fue de ca. 16% a 15°C y de ca. 23% a 20°C durante los dos períodos de la fase estacionaria (10 días y 14 días). En cultivos de *Thalassiosira pseudonana* y *Phaeodactylum tricornutum* creciendo a 21°C y bajo limitación de N (50 μ M-N y 210 μ M-Si) se determinó un contenido de TAG (%PS) de ca. 15% (Yu et al., 2009). Por lo tanto, *N. cincta* posee la capacidad de sintetizar y acumular importantes cantidades de LN por simple envejecimiento del cultivo.

En el caso particular de la experiencia en SWES-N, la proporción de LN similar a la de LP (aproximadamente 50% de cada una) estaría relacionada con que las células aún se encuentran en activo crecimiento y por tal razón, no presentan acumulación lipídica. De igual manera, Dunstan et al., (1994) determinaron una composición lipídica de 50,1 % de LP (%LT) y 47,7% de TAG (%LT) en cultivos de *Navicula* sp. en fase logarítmica.

En las dos fracciones lipídicas de *N. cincta* se determinó una predominancia de los AGS y AGMI, siendo los AGPI la clase de menor contribución al total de AG (11% a 22%). Una estructuración similar ha sido expuesta por Xia et al. (2013) en la diatomea *Odontella aurita* creciendo a dos intensidades de luz y distintas concentraciones nutrientes. Estos autores sugieren que la disminución de los AGPI totales (en algunos casos de hasta el 50%) e incremento de los AGS y AGMI en un cultivo *batch* de 15 días, estaría asociada a una disminución de los lípidos polares e incremento de los lípidos neutros. Los TAG están predominantemente constituidos por AGS y AGMI mientras que los AGPI se encuentran principalmente formando complejos lipídicos polares (GL y FL) de membrana (Berge et al., 1995). Por otro lado, este mismo comportamiento en la disminución de los AGPI totales fue relacionado con la limitación del P (Siron et al., 1989; Pistocchi et al., 2005). En las condiciones de cultivo de *N. cincta*, el P llegó a valores considerados limitantes sólo en el medio f/2; sin embargo, las concentraciones finales fueron $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ y $\frac{1}{3}$ respecto a la concentración inicial en f/2, SWES y SWES-N, respectivamente.

Las diatomeas se caracterizan por la presencia de los AG 16:1 (n-7) y 20:5 (n-3) (Kattner et al., 1983). Considerando los perfiles de todas las condiciones de crecimiento, la FN presentó mayor homogeneidad que la FP en

el tipo y proporción de cada AG. En el análisis de la FN (con excepción de la experiencia SWES-N), los AG predominantes fueron el AGMI 16:1(n-7), representando entre 48% y 53%; el AGS 16:0 con un 20% a 26% y el AGPI 20:5 (n-3) con una proporción del 8% a 17% respecto a los AG neutros. La estructura de estos AG predominantes y sus % correspondientes concuerdan con los perfiles neutros de otra especie de *Navicula* del estuario de Bahía Blanca (Popovich et al., 2012) y los perfiles totales de *Nitzschia* LBK018 (Jiang et al., 2014). El ácido mirístico (14:0), que suele estar presente en altas proporciones (Dunstan et al., 1994; Renaud et al., 1995; Budge y Parrish, 1999; Guihéneuf et al., 2010; Scholz y Liebezeit, 2013; Chen, 2012) sólo fue detectado en una de las condiciones de cultivo evaluadas, constituyendo el 2% del total de AG neutros.

La clara dominancia del AGMI 16:1(n-7) en la FN (ca. 50%) no fue establecida en la experiencia en medio SWES-N. En este caso, los AGMI estuvieron principalmente representados por dos AG: el 16:1 (n-7) con un 26% y el 18:1(n-9) con un 9% del total de AG. En los perfiles se pueden detectar variaciones día a día en el contenido de AG (Siron et al., 1989; Miller et al., 2012) y reversiones de las tendencias manifestadas previamente en el transcurso del cultivo (Miller et al., 2012). La diferencia detectada entre la experiencia en SWES-N y el resto de las condiciones de cultivo de *N. cinta* podría deberse a la etapa de desarrollo (activo crecimiento vs estacionaria) en donde fue cosechado el cultivo.

Por otro lado, en la experiencia en SWES-N se puede observar que el AGS 18:0 fue 7 veces superior al resto de las condiciones. A modo comparativo, y en concordancia con nuestros resultados, en la FN de *Chaetoceros calcitrans* se detectó una disminución del 50% del AGMI 16:1 (n-7) y un incremento de ocho veces en el AGS 18:0, entre el primer y séptimo día de cultivo (Miller et al., 2012). Los AG aquí mencionados están involucrados en una de las rutas metabólicas de AG determinada en diatomeas, en donde el 16:0 es desaturado a 16:1 o elongado a 18:0 (Moreno et al., 1979).

Los distintos % del AGPI 20:5 (n-3) -EPA- respecto del total de AG neutros representarían un indicativo de la actividad celular del cultivo. Los valores entre 8% y 9% se correspondieron con los cultivos en f/2, a 15°C, durante 14 días y en f/2, a 20°C, durante 10 días que se encontraban en fase

estacionaria (Capítulo 3). En los medios alternativos SWES y SWES-N, se determinó un contenido de ca. 11% y 15%, respectivamente de EPA. Como se ha mencionado anteriormente, los cultivos de *N. cincta* en éstos medios, durante 14 días aún manifestaron un activo crecimiento. Los mayores contenidos de EPA han sido anteriormente relacionados con la fase logarítmica y la actividad fotosintética (Siron et al., 1989; Blanchemain y Grizeau, 1996; Miller et al., 2012). Un resultado particular se detectó en la experiencia en f/2 a 20°C, durante 14 días (ca. 16% EPA). Sin embargo, considerando la disminución en la IFR-Cel con respecto a los 10 días (Fig. 3.10 B) y el incremento en la IF-CI entre los días 12 y 14, esto podría estar sugiriendo la habilidad de la especie de mantener su capacidad de crecimiento en f/2. Por otro lado, en ésta última condición de cultivo se determinó el AGPI 22:6 (n-3), que no fue detectado en las otras condiciones. Este AG, junto con el 20:5 (n-3), es uno de los principales AGPI indicado en diatomeas (Hu et al., 2008) y ha sido frecuentemente determinado en el género *Navicula* en distintas fases de crecimiento (Dunstan et al., 1994; Mansour et al., 2005; Scholz y Liebezeit, 2013; Chen et al., 2012). Además de la presencia del AGPI 22:6 (n-3), el contenido del AGS 16:0 (19% del total de AG) fue levemente menor que en el resto de los cultivos (24% a 26% del total de AG, Fig. 4.4). Una posible hipótesis de éste perfil podría ser que el AGS 16:0 ha sido involucrado en la ruta de síntesis *de novo* de los ácido grasos poliinsaturados de cadena larga (Moreno et al., 1979).

Ciertas propiedades del biodiesel pueden ser determinadas a partir de la composición de AG acumulados en la materia prima (Francisco et al., 2009; Ramos et al., 2009; Song et al., 2013; Talebi et al., 2013). Así, en *N. cincta*, a partir de los FAME de la fracción neutra se pudieron inferir algunas características del biodiesel a obtener. El contenido de ácido linoleico (% AcL) fue establecido en base a los perfiles de AG y el índice de iodo (IY) se calculó de acuerdo con Firestone (2001). Ambos parámetros se hallaron dentro de los límites de calidad considerados en el estándar europeo de biodiesel EN 14214 (Tabla 4.11).

Tabla 4.11. Características inferidas del biodiesel de *N. cincta* creciendo bajo diferentes condiciones de cultivo.

	f/2			SWES	SWES-N	EN 14214
	15°C, 10 d	20°C, 10 d	20°C, 14 d	20°C, 14 d	20°C, 14 d	
% de ácido linolénico (18:3 n-3)	1,83	0,94	0,58	0,23	0,17	< 12
Índice de Yodo (g I ₂ / 100g)	60,63	57,87	53,77	52,70	38,69	máximo 120

La restricción en el % de ácido linolénico (< 12) se debe a que los dobles enlaces de los AG presentan susceptibilidad a reaccionar con el oxígeno. Especialmente los ácidos linoleico (18:2 (n-6)) y linolénico (18:3 (n-3)) son susceptibles a la oxidación (Knothe, 2008), por lo que un mayor contenido de estos compuestos incrementa la inestabilidad del aceite durante almacenamientos prolongados. En general, la estabilidad oxidativa disminuye con el incremento del contenido de metil ésteres poliinsaturados (Ramos et al., 2009). De acuerdo con ello, *N. cincta* presenta una característica favorable presentando un rango de ca. 11 % a 23 % de AGPI en todas las condiciones de crecimiento testeadas. Los AGPI en otros grupos de microalgas, la canola y la soja llegan a contenidos de 30% a 48 %, 29% y 61%, respectivamente (Talebi et al., 2013).

El IY es una medida del grado de insaturación (números de dobles enlaces) de los ácidos grasos y se define como los gramos de yodo absorbidos por 100 g de muestra. Los valores de IY hallados en *N. cincta* (ca. 39 a 61) fueron acordes con los determinados en otras especies de diatomeas (Popovich et al., 2012; Jiang et al., 2014).

Otra característica de relevancia en *N. cincta* es la gran proporción del ácido palmitoleico en su composición (48% a 53% del total de AG neutros; sin considerar la experiencia en SWES-N). En términos de viscosidad cinemática, el metil palmitato (metil éster del ácido palmítico) es más adecuado que el metil oleato en aplicaciones a baja temperatura (Knothe 2008), debido a que su punto de fusión es de -33,9 ° (14 °C por debajo del metil oleato). Por lo tanto la riqueza del ácido palmitoleico en los aceites de *N. cincta* contribuiría a un biodiesel apropiado para bajas temperaturas.

4.6 Conclusiones

- 1) Las determinaciones de peso seco libre de cenizas son más adecuadas que el peso seco para establecer el contenido de lípidos, debido a que el peso seco subestima los componentes orgánicos por el alto contenido de material inorgánico (especialmente pared celular).
- 2) *Navicula cincta* presenta una proporción de lípidos neutros entre 85% a 90% en cultivos envejecidos (f/2) y un contenido cercano al 50% en cultivos en activo crecimiento (SWES-N).
- 3) La acumulación de TAG en f/2 se debió a la limitación de P y Si.
- 4) El perfil de ácidos grasos neutros estuvo constituido principalmente por los ácidos palmítico, palmitoleico y eicosapentanoico.
- 5) La relación IFR-Cel resultó un buen estimador de la dinámica de los lípidos neutros y su acumulación.
- 6) Los medios de cultivo SWES y SWES-N son adecuados para alcanzar altos rendimientos de producción de biomasa.
- 7) En el medio de cultivo f/2, a 20°C se obtuvo la mayor productividad de lípidos neutros en el día 10 de cosecha.
- 8) Se destaca el alto contenido de AGMI, los cuales le confieren al biodiesel un balance adecuado entre las propiedades de flujo en frío y la estabilidad oxidativa.
- 9) Todos estos resultados indican que los lípidos neutros en cultivos de *N. cincta* en medio f/2 se presentan como una materia prima adecuada para la producción de biodiesel.

Capítulo 5: Cuantificación y caracterización de los EPS en cultivos de *Navicula cincta*

5.1 Introducción

Los sistemas marinos intermareales son altamente dinámicos, caracterizados por las fluctuaciones periódicas de los parámetros ambientales. Dentro de las comunidades epipélicas (organismos que viven asociados a sustratos de grano fino) las diatomeas son el grupo de organismos microfítobentónicos dominantes (Underwood, 1994). Debido a la secreción en grandes cantidades de sustancias poliméricas extracelulares (comúnmente denominados EPS), los microorganismos de la comunidad microbentónica quedan embebidos en una matriz de polisacáridos unidos a los sedimentos. Dentro de dicha estructura, común en las marismas intermareales, la comunidad microfítobentónica interviene en procesos biológicos y geoquímicos (como el ciclado de nutrientes) que, colectivamente, se denomina *biofilm* microbiano (Decho, 2000).

La modalidad de movimiento más estudiada en las diatomeas epipélicas es el deslizamiento (*gliding*), en donde el mecanismo de propulsión incluye la expulsión de exopolímeros ricos en carbohidratos altamente hidratados, a través del rafo (Edgar y Pickett-Heaps, 1984). El movimiento de las diatomeas responde a estímulos externos como la luz, temperatura, nutrientes y salinidad (Apoya-Horton et al., 2006) y representa una ventaja ecológica ya que las células pueden migrar hacia zonas de condiciones más favorables como mayor disponibilidad de luz y/o nutrientes (Smith y Underwood, 2000; Staats et al., 2000).

Los EPS de las diatomeas, a menudo denominados mucílago, consisten principalmente en carbohidratos (Hoagland et al., 1993; Staats et al., 1999). Son materiales complejos y heterogéneos compuestos por polisacáridos y glicoproteínas (Chiovitti et al., 2003 a,b; Bellinger et al., 2005). Son moléculas de cadena larga, principalmente heteropolisacáridos con sustanciales

cantidades de azúcares neutros, ácidos urónicos y azúcares sulfatados (Urbani et al., 2012).

La liberación de fotoasimilados es un proceso natural que ocurre durante todas las fases de crecimiento (Puskaric y Mortain-Bertrand, 2003) y que depende de la especie y las condiciones ambientales (Myklestad, 1974, Myklestad, 1977). En condiciones de laboratorio, el incremento en la producción de exudados ha sido principalmente relacionada con la fase estacionaria del crecimiento (Guerrini et al., 2000; Leandro et al., 2003) y con la limitación de nitrógeno o fósforo en el crecimiento (Guerrini et al., 2000; Staats et al., 2000; Pistocchi et al., 2005; Urbani et al., 2005; Magaletti et al., 2004; Gärdes et al., 2012). Se considera que la secreción de EPS en las diatomeas podría ser el resultado de un desbalance en el metabolismo (*overflow metabolism*) debido a un exceso en la cantidad de dióxido de carbono fijado con respecto a los requerimientos de crecimiento (Myklestad et al., 1989, Waite et al., 1995).

Distintos tipos de EPS son recuperados y definidos por el método de extracción utilizado (Underwood y Paterson, 2003). Una de las clasificaciones más comúnmente utilizada se relaciona con las interacciones físicas que se producen entre los exopolisacáridos y la célula. De acuerdo a ello, los exopolisacáridos se diferencian en “EPS no unidos” y “EPS unidos” (Staats et al., 1999; Staats et al., 2000; De Brouwer y Stal, 2002; Underwood y Paterson, 2003; Underwood et al., 2004). La primera fracción se encuentra soluble en el medio, libremente asociada a las células (EPS soluble, EPS-S), mientras que la segunda permanece unida a la superficie celular por enlaces covalentes y no puede separarse fácilmente (Xu et al., 2009). Asimismo, de acuerdo al grado de asociación, los EPS unidos se diferencian en levemente (EPS-LU) y fuertemente unidos a la célula (EPS-FU) (Ramesh et al., 2006).

Debido a la presencia de polianiones, los exopolímeros pueden ser utilizados como agentes de bioabsorción por su capacidad de unirse a sustancias tóxicas, inmovilizar las mismas en una matriz exopolimérica y contribuir, de esta manera, en la descontaminación de los cuerpos de agua (Leppard, 1997; Pal y Paul, 2008). La presencia de grupos aniónicos en los polímeros de EPS también es una característica propicia para la producción de complejos interpolielectrolíticos (IPEC). Los mismos resultan de la interacción

entre polianiones y policationes y presentan múltiples aplicaciones, entre ellas, la liberación controlada de principios activos de interés farmacéutico o agronómico (Lowman, 2000; Gupta et al., 2002). Considerando todas estas aplicaciones, los EPS podrían ser considerados como un co-producto de valor agregado, dentro de la producción de TAG para biodiesel, bajo un contexto de biorrefinería.

Objetivo general

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados, el objetivo general de este capítulo fue analizar la capacidad de *Navicula cincta* de producir exopolisacáridos en cultivos *batch*, bajo las mismas condiciones de cultivo empleadas para la producción de TAG, de modo de poder evaluar el potencial rol de estos compuestos como co-productos de valor agregado.

Objetivos específicos

- a) Analizar bajo qué condiciones de temperatura (15°C y 20°C) y medios de cultivo (f/2; SWES y SWES-N) se optimiza la producción de las distintas fracciones de EPS.
- b) Caracterizar la dinámica de producción de las distintas fracciones (EPS solubles y EPS unidos).
- c) Determinar la composición de proteínas, carbohidratos y monosacáridos de las fracciones de EPS bajo las mismas condiciones ambientales que produjeron los máximos valores de TAG.

5.2 Hipótesis

En el marco de los antecedentes planteados se pretendió testear las siguientes hipótesis:

- I. *Navicula cincta* es capaz de producir EPS en cultivo debido a sus hábitos bentónicos.

- II. *La producción de EPS en cultivos de *N. cincta* varía con las condiciones de temperatura (15°C y 20°C) y concentración de nutrientes de los medios f/2; SWES y SWES-N.*
- III. *Las condiciones que favorecen la producción de TAG también estimulan la síntesis de EPS.*
- IV. *Los métodos de separación y extracción de las distintas fracciones de EPS (centrifugación y extracción con agua destilada y EDTA) resultan adecuados para la especie.*

5.3 Materiales y métodos

5.3.1 Determinación de la cinética de los EPS.

Para establecer la cinética de los EPS en distintas condiciones de cultivo, se desarrollaron experiencias de 15 días. Se utilizaron, para ello, Erlenmeyer de 500 mL con 200 mL de cultivo para cada condición. Las células se mantuvieron a dos temperaturas (15 y 20 ± 1 °C) y tres medios de cultivo (f/2, SWES y SWES - N) en condiciones ambientales fijas (CAF). Los cultivos fueron mantenidos con aireación moderada durante 4 horas diarias.

Para el análisis de la cinética de los EPS se realizó una toma de muestra de 5 mL cada dos días. La metodología general consistió en la separación y extracción de las distintas fracciones de EPS, de manera secuencial (Fig. 5.1). Las mismas fueron definidas como EPS solubles en el medio de cultivo (EPS-S) y EPS unidos a las células (EPS-U). Estos últimos, a su vez, fueron subdivididos en levemente (EPS-LU) y fuertemente unidos a la célula (EPS-FU).

Los EPS-S fueron separados de las células mediante centrifugación (Staats et al., 1999). El sobrenadante (con los EPS-S) fue recolectado a partir de las alícuotas centrifugadas a 3500 rpm durante 15 minutos. Los EPS levemente unidos (EPS-LU) fueron extraídos del pellet celular resultante, luego de agregarle al mismo 3 mL de agua milliQ, posterior agitación mediante vórtex y baño térmico a 30°C, durante 1 hora. Esto representó una modificación del protocolo de Brouwer y Stal (2001), con una distinta relación agua destilada /

pellet celular. Mediante centrifugación (3000 rpm, 10 minutos) se separó el sobrenadante con la fracción correspondiente. A partir del material precipitado se realizó la segunda extracción. Se adicionó 1 ml de Na₂EDTA 100 mM, se homogeneizó mediante vórtex y se mantuvo a 4 °C, durante 3 horas. Liang et al., (2010) utilizaron esta técnica pero con distinta concentración de Na₂EDTA. El material resultante fue centrifugado para recuperación del extracto (sobrenadante).

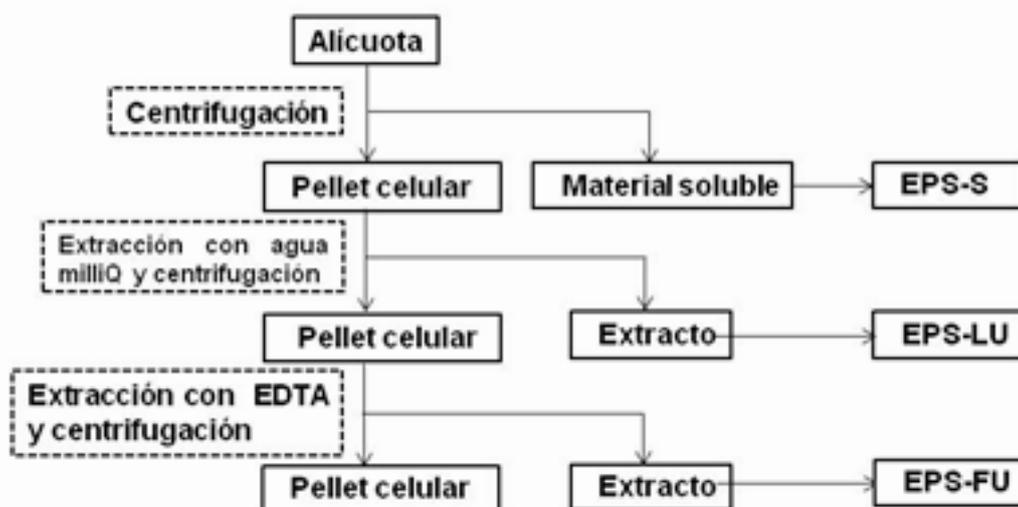


Figura 5.1. Protocolo secuencial de extracción de las fracciones de los polisacáridos del mucílago de *N. cincta*.

5.3.2 Cuantificación de los EPS en cultivo.

La cuantificación de las distintas fracciones de EPS se realizó mediante el ensayo del ácido fenol sulfúrico (Dubois et al., 1956). Se preparó 1 mL de solución con 300 a 800 µl de extracto más agua destilada, dependiendo de la muestra. Posteriormente se añadieron 0,5 mL de una solución de fenol al 5% y 2,5 mL de ácido sulfúrico. Las mezclas fueron homogeneizadas mediante vórtex y se dejaron enfriar a temperatura ambiente antes de ser llevadas a baño térmico a 30°C durante 15 minutos. Se midieron las absorbancias mediante un espectrofotómetro Spectronic 20 a una longitud de onda de 492

nm. Para cada una de las condiciones y fracciones se construyó una curva de calibrado con glucosa (eq Glu) como carbohidrato estándar. Las soluciones de glucosa estuvieron en el rango 5-33 $\mu\text{g eq Glu.mL}^{-1}$ y en cada ocasión se realizó un blanco.

5.3.3 Determinación de la densidad celular (DC).

La DC fue estimada a partir de alícuotas de 2 ml que fueron fijadas con solución lugol- acético. Los recuentos se realizaron de acuerdo a lo detallado en el Capítulo 3.

5.3.4 Determinación de la composición de las fracciones de EPS en f/2 (proteínas, ácidos urónicos y azúcares).

Para caracterizar el mucílago secretado en cultivos de *N. cincta* con altas producciones de TAG, se realizó una experiencia de 15 días con f/2 a 20°C con el fin de obtener el material necesario para tal fin. Se utilizó una pecera de 21 cm de largo, 9 cm de ancho y 12 cm de altura, con 1.2 L de cultivo (Fig. 5.2 a). Finalizado el período de la experiencia, el sobrenadante fue centrifugado y el *biofilm* recolectado mediante espátula (Fig. 5.2 b,c). Ambos componentes (material soluble y *biofilm*) fueron freezados hasta su posterior análisis. Las distintas fracciones fueron obtenidas mediante extracción secuencial.

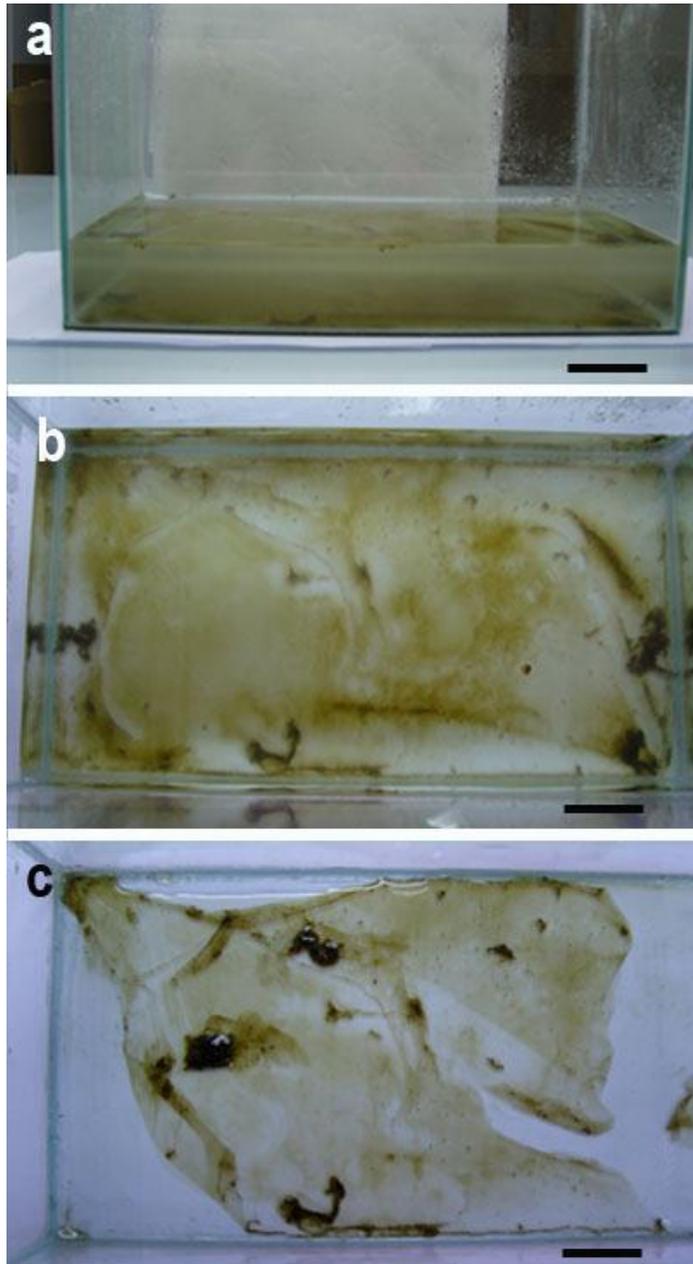


Figura 5.2. Cultivo de *Navicula cincta* en medio f/2 a 20°C desarrollado en pecera. (a) Vista frontal del cultivo. Notar que la mayoría de las células sedimentaron naturalmente y se adhirieron al sustrato. Pocas células quedan suspendidas en el sobrenadante. **(b)** Vista general del *biofilm* cubriendo la superficie de la pecera, luego de retirar el sobrenadante. **(c)** Observación de parte del biofilm despegado con espátula (esquina inferior izquierda). Barra escala (a-c) = 2.5 cm.

Los procedimientos detallados a continuación fueron realizados en colaboración con la Dra. Cristina Matulewicz en el Departamento de Química

Orgánica. CIHIDECAR-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

5.3.4.1 Determinación de proteínas totales

La determinación de proteínas se realizó de acuerdo con el protocolo de Lowry et al., (1951). A 0,4 ml de solución conteniendo hasta 500 µg de proteínas por mililitro se le agregaron 2 ml de solución conteniendo 1ml de sulfato cúprico pentahidratado al 0,5% en solución de tartrato de sodio y potasio al 1% y 50 ml de carbonato de sodio al 2% en NaOH 0,1 N. Se mezcló y dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos, al cabo de lo cual se agregaron agitando exhaustivamente 0,2 ml de reactivo de Folin Ciocalteau diluido al medio. Luego de 30 minutos se leyó mediante espectrofotómetro a 500 nm. Los valores obtenidos se refirieron a una curva de calibración de albúmina de suero bovino.

5.3.4.2 Determinación de ácidos urónicos.

El protocolo desarrollado fue el indicado por Fillisetti-Cozzi et al., (1991). A 0,4 ml de muestra conteniendo hasta 50 µg de ácido urónico se adicionaron 40 µl de ácido sulfámico (como sal de potasio) 4M. Luego se agregaron 2,4 ml de solución de tetraborato de sodio 0,075M en ácido sulfúrico concentrado. Se calentó durante 20 minutos a 95-100°C, enfriando posteriormente en baño hielo-agua. Por último se agregaron 80 µl de *m*-hidroxidifenilo 0,15% en NaOH 0.5%, agitando vigorosamente. Luego de 10 minutos se leyó la absorbancia a 525 nm. Los valores de absorbancia se refirieron a una curva de calibración de glucuronolactona.

5.3.4.3 Composición de monosacáridos neutros

La composición de monosacáridos fue determinada mediante cromatografía gaseosa (CGL) luego de la hidrólisis del producto con ácido trifluoroacético (2M) durante 90 minutos a 120°C, seguido por la conversión de los monosacáridos en sus correspondientes acetatos de alditol. El análisis

cromatográfico se llevó a cabo mediante el uso de un cromatógrafo gaseoso Hewlett-Packard 5890A equipado con una columna capilar de sílice fundida WCOT (longitud de 30 m; 0,25 mm de diámetro interno y 0,20 μm de espesor de film SP-2330), operando isotérmicamente a 220°C. Cuando fue necesario, se realizaron análisis GCL-EM en un cromatógrafo gas-líquido Shimadzu GC-17A equipado con una columna capilar 10 SP-2330 en interfaz con un espectrómetro de masa GMCSQP 5050A (Kyoto, Japón). Los espectros de masa se registraron en una rango de 30-500 Da.

5.3.4.4 Detección de aminoazúcares

Para detectar los aminoazúcares de las distintas fracciones, los productos se hidrolizaron en ácido trifluoroacético (2M) durante 240 minutos a 120°C. Los análisis se llevaron a cabo en un aparato Dionex HPAEC con un detector de pulso amperométrico. Se empleó una columna CarboPac PA20 eluída isocráticamente con NaOH (200 mM). Los espectros infrarrojos se registraron con un espectrofotómetro Thermo Scientific Nicolet IS50 FTIR equipado con un accesorio ATR a 4000-5000 cm^{-1} ; se tomaron 32 escaneos con una resolución de 4 cm^{-1} .

5.3.5 Análisis estadístico de los datos

Debido al rechazo de los supuestos de normalidad y homocedasticidad en la variable EPS-S se aplicó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, con un nivel de significación de 0,05. El *software* estadístico utilizado fue INFostat® (versión libre, <http://www.infostat.com.ar>).

5.4 Resultados

Los cultivos realizados con el fin de estudiar la cinética de los EPS, presentaron, de acuerdo a su fase de crecimiento y al medio de cultivo utilizado, distintos comportamientos celulares con respecto a la producción de

mucílago. Al principio de las experiencias la mayoría de las células se encontraron en estado solitario y en suspensión, independientemente del medio de cultivo. Sin embargo, con el transcurso de la experiencia, una proporción de ellas tendió a adherirse al sustrato del recipiente formando un *biofilm* (en medio f/2) o a formar agregados celulares en suspensión (en medio SWES y SWES-N). En las experiencias en pecera (con f/2), la mayoría de las células se adhirieron al sustrato formando una película de *biofilm* y pocas se mantuvieron en suspensión (Figs. 5.2 y 5.3). Por lo tanto, en esta última experiencia la cosecha del material fue más sencilla.

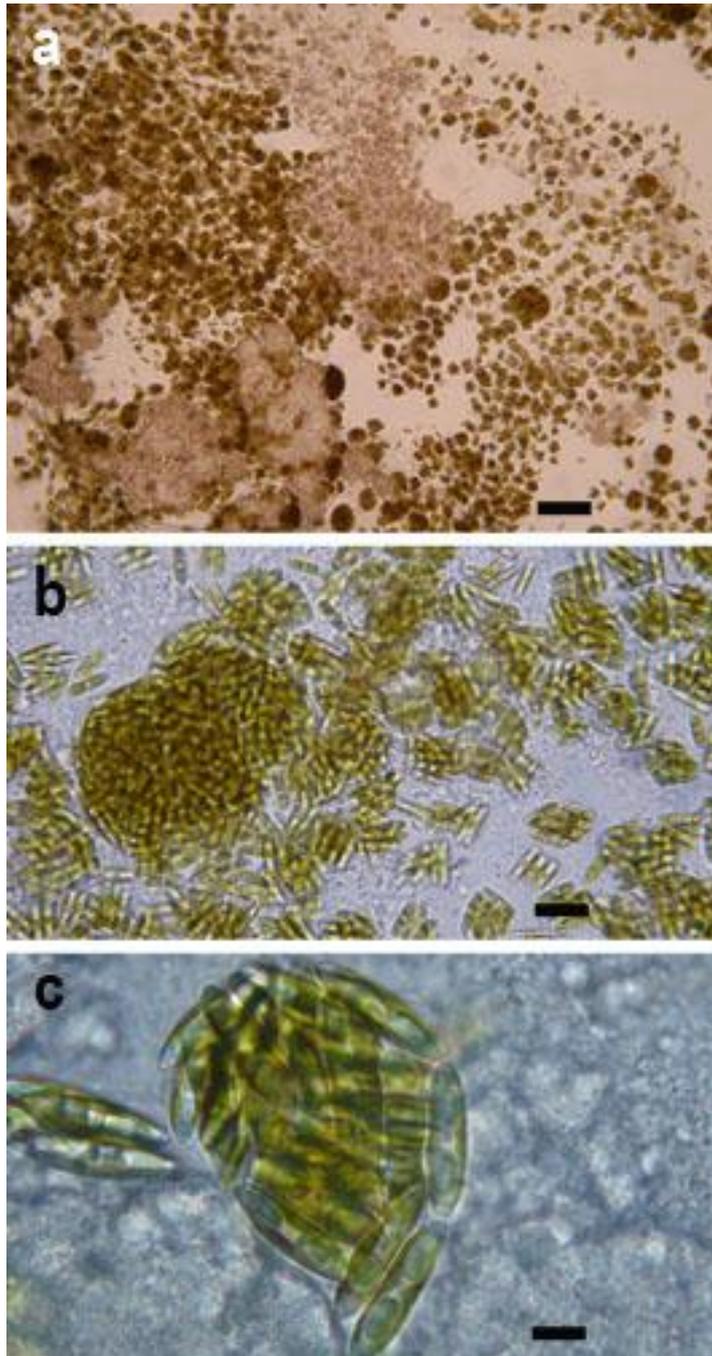


Figura 5.3. Observación del biofilm, formado en medio f/2 y a 20°C, al microscopio óptico. (a) Vista general donde se observan agregados celulares y mucílago. **(b)** Detalle de agregados celulares de diferentes tamaños, se distinguen pocas células solitarias. **(c)** Mayor detalle de un agregado celular de forma circular embebido en material mucilaginoso (EPS). Barra escala (a) = 250 μm , (b) = 30 μm , (c) = 10 μm .

La cinética de producción de EPS en las distintas condiciones de cultivo se muestra en la Fig. 5.4. Durante el transcurso de la experiencia la producción de EPS-S presentó una tendencia a incrementar en f/2, a 20°C y en SWES, a 15°C y se mantuvo prácticamente constante en el resto de las condiciones. En el caso de los EPS-LU, éstos presentaron una tendencia a incrementar entre los días 12 a 14 en las células creciendo en f/2 y se mantuvieron prácticamente constantes en los medios SWES y SWES-N. La concentración de los EPS-FU se mantuvo estable en todas las experiencias, con excepción de la experiencia en f/2, a 20°C. En este caso una marcada disminución se evidenció entre los días 6 y 8, a partir del cual se observó un leve incremento, para luego permanecer constante a partir del día 10.

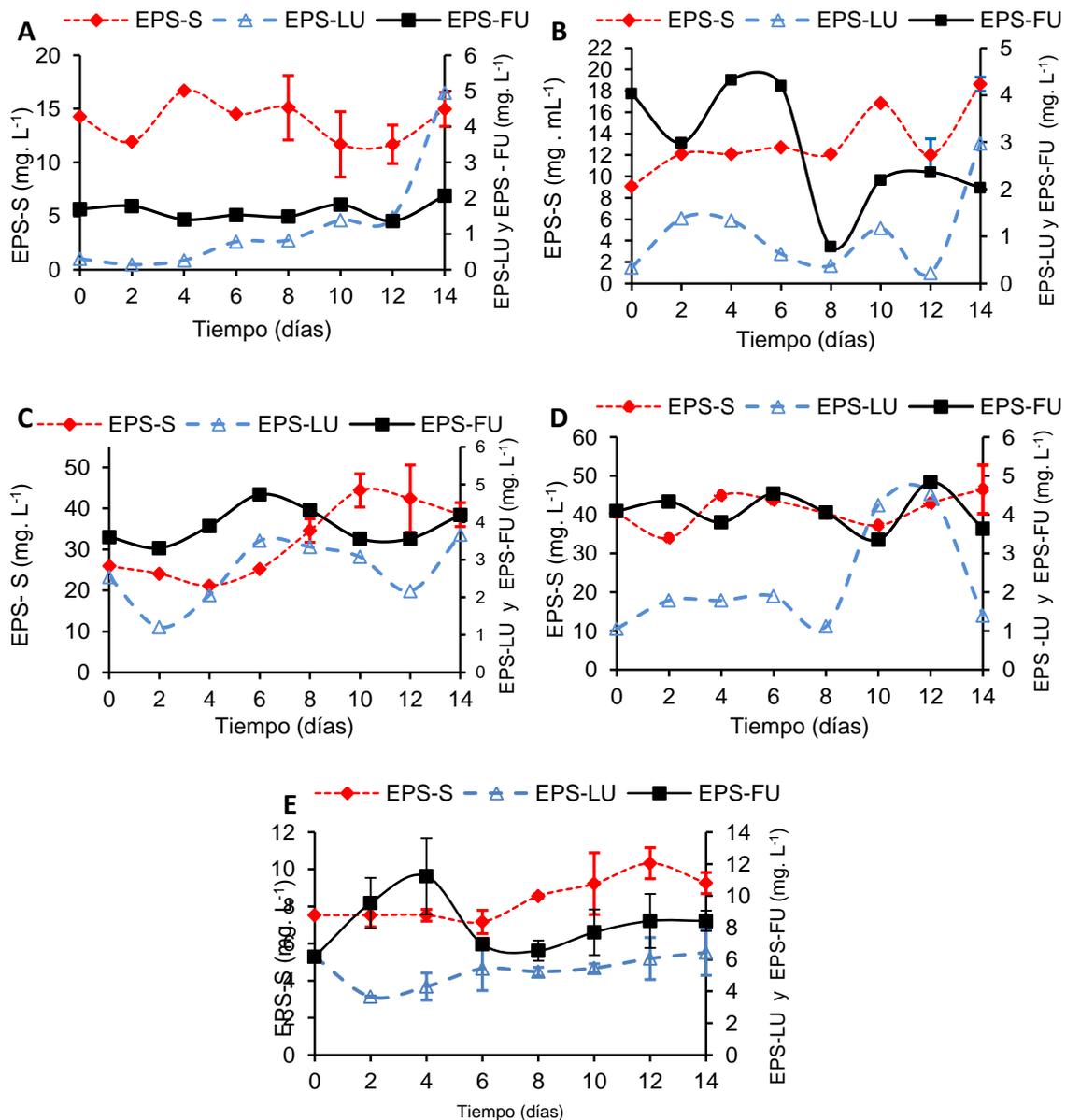


Figura 5.4. Cinética de los EPS solubles y unidos a la célula, en relación con el crecimiento celular bajo diferentes condiciones de cultivo. (A) f/2 a 15°C, (B) f/2 a 20°C, (C) SWES a 15°C, (D) SWES a 20°C, (E) SWES-N a 20°C. Las barras de error representan desviaciones estándar entre réplicas. EPS-S= EPS soluble. EPS-LU= EPS levemente unido. EPS-FU= EPS fuertemente unido

La Figura 5.5 muestra la relación entre las curvas de crecimiento de *N. cincta* y la proporción de las distintas fracciones de EPS a lo largo de los 15 días. Los cultivos desarrollados en los medios f/2 y SWES presentaron una fase estacionaria definida y ninguna diferenciación entre etapas en el medio

SWES-N (Fig. 5.5). En el medio f/2 la fase estacionaria comenzó al cuarto día de desarrollo, a 15°C y 20°C mientras que en medio SWES la misma se inició al octavo y sexto día, a 15°C y 20°C, respectivamente. En los medios de cultivo f/2 y SWES los EPS-S fueron el principal constituyente en concentración y proporción del total de EPS (77% y 86% de la totalidad de los EPS, respectivamente); mientras que en la experiencia en medio SWES-N, representaron la tercera parte (Tabla 5.1, Fig. 5.5). Las concentraciones de EPS-S finales fueron de 14 mg. L⁻¹ y 18 mg. L⁻¹ en el medio f/2, 25 mg. L⁻¹ y 40 mg. L⁻¹ en el medio SWES y 9 mg. L⁻¹ en el medio SWES-N.

Los EPS-LU representaron entre el 5% al 7% del total de EPS en los medios f/2 y SWES, con excepción del día 14, en f/2, a 15°C que llegó a un 22%. En el medio SWES-N constituyeron el 25% del total de EPS (Fig. 5.5)

Los EPS-FU constituyeron entre el 8% al 10% del total de EPS en f/2, a 15°C y en SWES (ambas temperaturas). En f/2, a 20°C representaron el 20% del total de EPS, en la mayoría de los días experimentales (Fig. 5.5).

A pesar de las distintas proporciones, los EPS-LU y EPS-FU en los medios f/2 y SWES no superaron en ningún momento los 5 µg mL⁻¹. En el medio SWES-N la máxima producción de EPS-LU y EPS-FU fue de 6 mg. L⁻¹ y 8 mg. L⁻¹, respectivamente.

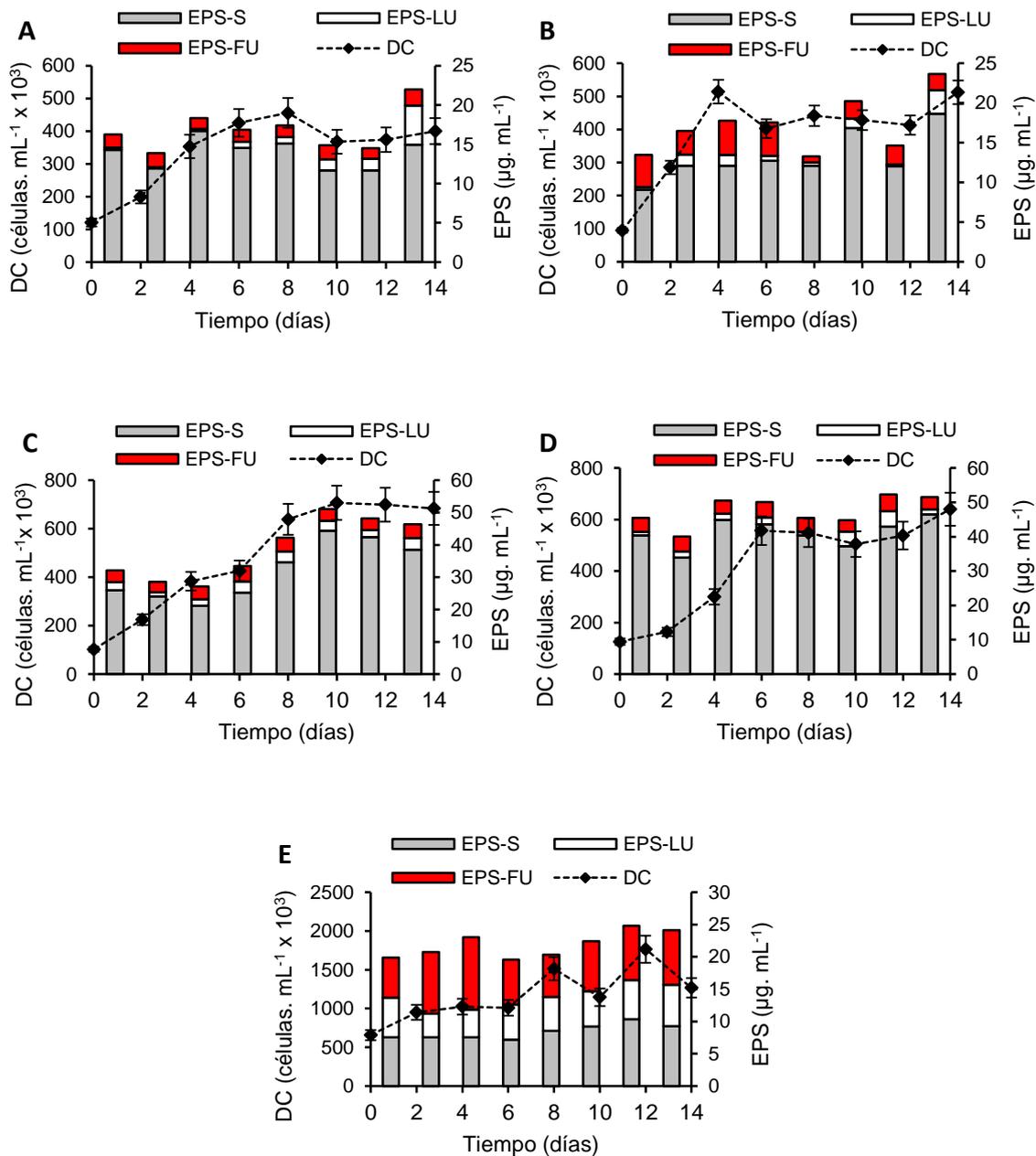


Figura 5.5. Curvas de crecimiento y aporte de cada fracción en la concentración total de EPS. (A) f/2 a 15°C, (B) f/2 a 20°C, (C) SWES a 15°C, (D) SWES a 20°C, (E) SWES-N a 20°C. Las barras de error representan desviaciones estándar entre réplicas. EPS-S= EPS soluble. EPS-LU= EPS levemente unido. EPS-FU= EPS fuertemente unido.

De acuerdo con los análisis estadísticos (Tabla 5.1), no se encontraron diferencias significativas en la concentración de los EPS-S en el último día

experimental entre condiciones de cultivo. Sin embargo, es importante recalcar que los valores de EPS-S absolutos obtenidos con SWES fueron los más elevados. La no detección de diferencias podrían deberse a la heterogeneidad de los datos y al número de muestras (n=2). Sin embargo, cuando se testeó la producción media general entre condiciones (involucrando todos los días experimentales n=8), se detectaron diferencias (Tabla 5.1). Las producciones de EPS-S en el medio SWES (32 mg. L⁻¹ a 41 mg. L⁻¹ a 15 y 20°C, respectivamente) fueron significativamente mayores que en f/2 (ca. 13 mg. L⁻¹) y SWES-N (8 mg. L⁻¹) (p< 0.0001).

Tabla 5.1. Concentración final de EPS solubles y unidos a la célula y producción general media de EPS-S en las distintas condiciones de cultivo. La concentración final de los EPS-S (n=2) y la producción media de EPS-S (n=8) fueron comparadas mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Letras asignadas alfabéticamente de menor a mayor. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p=< 0.05; a<b<c).

Medio de cultivo Temperatura (°C)	f/2		SWES		SWES-N
	15	20	15	20	20
EPS-S	14,9 ± 1,58 ^a	18,64 ± 0,66 ^a	38,51 ± 2,94 ^a	46,53 ± 6,28 ^a	9,26 ± 0,58 ^a
EPS-LU	5,0	3,0	3,7	1,4	6,4
EPS-FU	2,1	2,0	4,2	3,6	8,4
Producción media EPS-S	13,86 ± 1,87 ^b	13,21 ± 3,05 ^{ab}	32,04 ± 9,07 ^c	41,24 ± 4,16 ^c	8,39 ± 1,13 ^a

La caracterización de los monosacáridos neutros fue realizada en f/2, a 20°C. La composición de las tres fracciones de EPS se muestra en la Tabla 5.2. Los valores de los ácidos urónicos cayeron por debajo del límite de detección del método colorimétrico. Las distintas fracciones contienen importantes cantidades de proteínas, siendo la relación carbohidrato: proteína 1:1 para los EPS-S y 1:2 para los EPS-FU. La fracción de los EPS-LU estuvo altamente contaminada con residuos de sales del medio de cultivo, resultando en una sobreestimación del rendimiento.

En todos los casos, la composición de monosacáridos sugiere una gran heterogeneidad entre las fracciones (Tabla 5.2). Los EPS-S y EPS-FU presentaron una alta proporción de xilosa, manosa y *N*-acetilglucosamina,

mientras que en los EPS-LU el contenido de amino-azúcares fue mucho menor y presentó principalmente galactosa y glucosa. La ausencia de los ácidos urónicos fue confirmada por Dionex HPAEC.

Tabla 5.2. Caracterización general y composición de monosacáridos neutros en las distintas fracciones de EPS en f/2. (a) rendimiento expresado como mg de producto. L⁻¹, (b) rendimiento expresado en porcentaje de biomasa celular liofilizada, (c) contenido traza (<1%).

	EPS-S	EPS-LU	EPS-FU
Rendimiento	10.9 ^a	70.7 ^b	2.4 ^b
carbohidratos (%)	8.5	3.0	12.4
proteínas (%)	7.1	3.9	29.1
componentes monosacáridos (% molar)			
fucosa	10	12	5
arabinosa	7	Tr. ^c	13
xilosa	23	7	26
manosa	26	2	13
galactosa	4	40	6
glucosa	4	33	12
<i>N</i> -acetilgalactosamina	4	Tr	9
<i>N</i> -acetilglucosamina	22	6	16

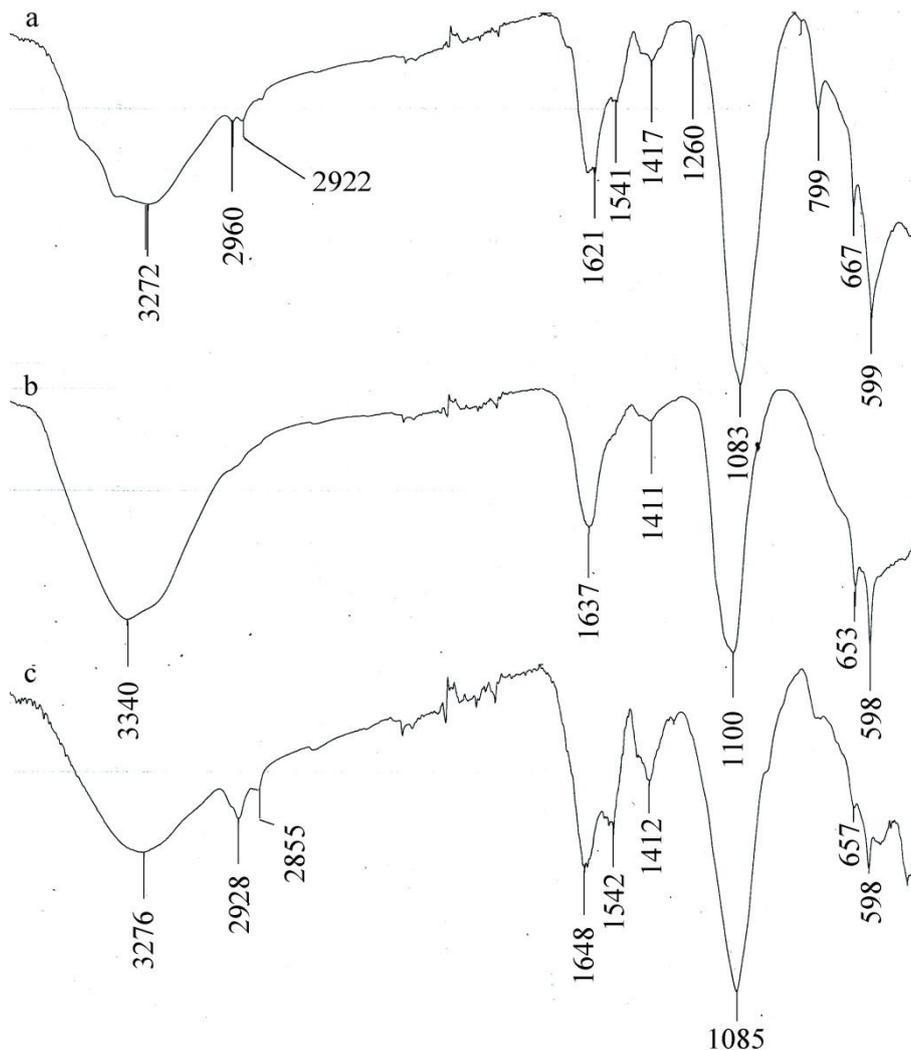


Figura 5.6. Espectros IF-RTA de las fracciones EPS-S (a), EPS-LU (b) y EPS-FU (c).

La Figura 5.6 muestra los espectros IF-RTA de la EPS-S, EPS-LU y EPS-FU. La banda de absorción ancha entre $3250\text{-}3350\text{ cm}^{-1}$ puede ser atribuida a la vibración de tensión tanto de los grupos hidroxilos (carbohidratos) como de los grupos amino (proteínas). Para las fracciones EPS-S y EPS-FU, las pequeñas bandas a 2930 y 2855 cm^{-1} pueden ser atribuidas a las frecuencias de vibración de tensión asimétricas y simétricas CH (vas y vsym) de los grupos CH_2 , respectivamente. Debe destacarse que estas bandas no estuvieron presentes en la fracción EPS-LU y mostraron un pico de intensidad débil en EPS-S. Tanto EPS-S como EPS-FU exhibieron una banda amida (ca. 1650 cm^{-1}) y una banda amida II (ca. 1540 cm^{-1}) debido a la presencia de proteínas. La banda cercana a 1430 cm^{-1} sólo fue significativa en el espectro

de EPS-FU y sugiere la presencia de grupos CH₂ de cadenas alifáticas. No se detectó ninguna señal importante (1380 cm⁻¹) de grupos metilos. La banda fuerte a 1100 cm⁻¹ presente en todos los grupos es correlacionada con vibraciones C-O de carbohidratos.

5.5 Discusión

Las diatomeas bentónicas son capaces de secretar importantes cantidades de exopolisacáridos en respuesta a cambios en el medio circundante. Sin embargo, sólo un número limitado de especies es capaz de liberar dichas sustancias en condiciones de laboratorio, y en caso de realizarlo, la excreción es en muy pequeñas cantidades (De Philippis et al., 2005). *Navicula cincta* fue aislada de su ambiente natural, se adaptó a las condiciones de laboratorio, muy probablemente por su característica de especie robusta, y fue capaz de producir importantes cantidades de EPS.

A nivel macroscópico se observaron diferentes comportamientos en cuanto a la formación del *biofilm*. En el medio f/2 las células tienden a adherirse al fondo del recipiente en el que se desarrollan, ya sea con aireación o sin aireación. En los medios SWES y SWES-N las células tienden mayormente a agregarse entre ellas, más que al recipiente que las contiene. Este mismo comportamiento ha sido citado en cultivos de *Navicula incerta* en donde las células creciendo en medio f formaron un tapete celular homogéneo adherido fuertemente al sustrato, mientras que en medio 2f (2 veces más concentrado que el medio f) hubo formación de grumos y poca adhesión al sustrato (Chávez Medrano, 2008). El incremento en la agregación celular a mayores niveles de nutrientes en el medio circundante también ha sido citado para *Cylindrotheca closterium*. Por ejemplo, células creciendo en f/2 forman agregados de 5 a 10 mm², mientras que en medio 2f los agregados alcanzaron un tamaño de 50 a 100 mm² (Apoya-Horton et al., 2006). Estos autores, además, pudieron determinar que la composición de monosacáridos de los EPS secretados por *C. closterium* en medio 2f fue de mayor diversidad en cuanto al tipo de azúcares con respecto a los hallados en el medio f/2. De este modo, podemos inferir que los cambios en el metabolismo de *Navicula cincta*,

en respuesta a diferentes concentraciones del medio de cultivo, se estarían reflejando a nivel macroscópico, como consecuencia de una diferente producción y composición de los EPS secretados.

El incremento en la producción de EPS-S en fase estacionaria no fue establecido en este trabajo, con una excepción (leve incremento en fase estacionaria en f/2, 20°C). Sin embargo, en los trabajos en que se ha establecido dicha relación, los cultivos se han mantenido un mínimo de 15 días en fase estacionaria (De Brouwer y Stal, 2002; Leandro et al., 2003; Urbani et al., 2005; Staats et al., 1999); mientras que los cultivos de *N. cincta* estuvieron un máximo de 10 días (f/2), 8 días (SWES) o ninguno (SWES-N) en fase estacionaria. De acuerdo con ello, se estima que una mayor producción de EPS podría obtenerse si se prolongara el período experimental de los cultivos.

Las concentraciones finales de la fracción de EPS-S en los medios f/2 (15 mg. L⁻¹ y 19 mg. L⁻¹) y SWES-N (9 mg. L⁻¹) fueron comparables con los rendimientos establecidos en *Cylindrotheca closterium* (ca. 15 mg. L⁻¹) y *Nitzschia* sp. (ca. 10 mg. L⁻¹), cultivadas en el mismo medio de cultivo durante 15 días (De Brouwer y Stal, 2002). En cuanto a las concentraciones finales alcanzadas en SWES (38 mg. L⁻¹ y 46 mg. L⁻¹), éstas se correspondieron con los cultivos en f/2 de más de 20 días de *Cylindrotheca closterium* (ca. 45 mg. L⁻¹, De Brouwer y Stal, 2002). Esto indica la obtención de mejores rendimientos de EPS-S en cultivos de *N. cincta* en medio SWES en un corto período de tiempo.

En cuanto a los rendimientos promedio de EPS-S a lo largo del tiempo experimental, en el medio SWES (ca. 32 a 41 mg. L⁻¹) fue estadísticamente superior al determinado en f/2 (13 mg. L⁻¹ y 14 mg. L⁻¹) y en SWES-N (8 mg. L⁻¹). Considerando las altas concentraciones de nutrientes presentes en el medio SWES y que los mismos nunca llegaron a valores limitantes en el transcurso de 14 días (Capítulo 4), el incremento en la producción de EPS-S en la especie en estudio no estuvo relacionado con la limitación de nutrientes, como varios autores han postulado para otras especies de diatomeas (Staats et al., 2000; Leandro et al., 2003; Pistocchi et al., 2005; Urbani et al., 2005; Magaletti et al., 2004).

En las condiciones de crecimiento testeadas, la mayor producción de EPS-S estaría asociada a una mayor relación N/P disuelta en el medio de

cultivo. El desbalance entre dichos nutrientes en las diatomeas bentónicas ha sido definido por algunos autores como de gran relevancia sobre la producción de los exopolisacáridos no unidos (Alcoverro et al., 2000; Guerrini et al., 2000; Magaletti et al., 2004). Las variaciones en la disponibilidad de nutrientes, especialmente N y P, afectan la cantidad y calidad de la exudación algal, debido a su efecto sobre el estado fisiológico de las células (Gärdes et al., 2012).

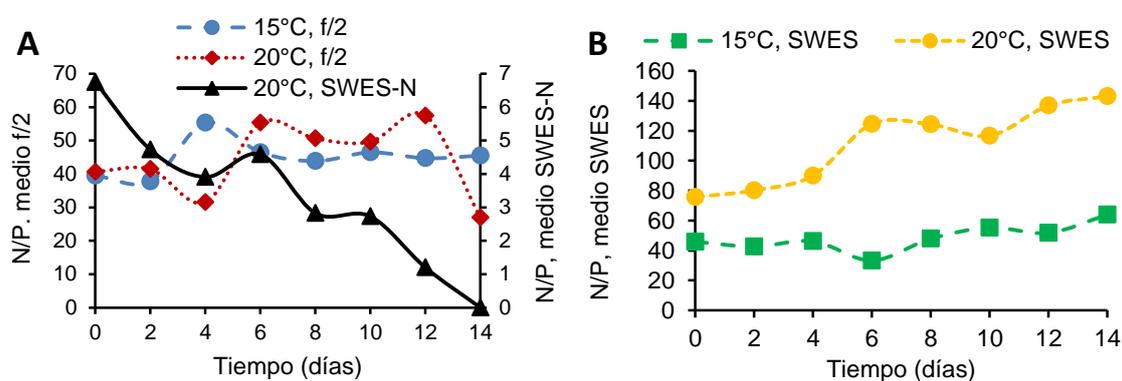


Figura 5.7. Relación estequiométrica N/P a los largo del tiempo experimental en las distintas condiciones de cultivo. (Datos obtenidos de la cinética de nutrientes del Capítulo 4).

Como se puede observar la relación N/P en el medio f/2 se mantuvo prácticamente constante a 15°C (varió entre 40 y 45), presentó un leve incremento a 20°C (varió entre 41 y 27) y disminuyó de manera continua (entre 7 y 0) en el medio SWES-N (Fig. 5.7 A). De manera diferencial, en el medio SWES la relación N/P fue en incremento, desde 46 a 64 a 15°C y desde 76 a 143 a 20°C (Fig. 5.7 B). Las variaciones entre las concentraciones de N/P disueltos como la concentración de EPS-S en SWES (32 y 41 mg. L⁻¹) y SWES-N (8 mg. L⁻¹), se correspondieron con los experimentos realizados con *Achnanthes brevipes*. En esta especie, creciendo en f/2 1/20 N (N/P= 1,2) y f/2 1/6 P (N/P= 146), se determinó una producción de carbohidratos extracelulares de 10 mg. L⁻¹ y 32 mg. L⁻¹, respectivamente (Guerrini et al., 2000). Las concentraciones final obtenidas en *N. cincta* en f/2 (13 mg. L⁻¹ y 14 mg. L⁻¹) estarían representando una situación intermedia entre lo observado en los

medios SWES y SWES-N. Bajo limitación de N (o menor relación N/P) la tasa fotosintética de las diatomeas resulta tres veces menor que bajo limitación de P (o alta relación N/P), lo que podría explicar, en parte, la predisposición a producir mayor cantidad de carbohidratos extracelulares (Alcoverro et al., 2000). Además, bajo limitación de P parte de las enzimas relacionadas con el catabolismo de los carbohidratos quedan inhibidas (Guerrini et al., 2000) favoreciendo la extrusión del “exceso” de productos fotosintéticos.

El contenido de los EPS unidos fue inferior al EPS soluble en cada día evaluado, siendo el rango de concentración final que involucra a todas las condiciones experimentales de 1,4 mg. L⁻¹ - 6,4 mg. L⁻¹ para los EPS-LU y 2,0 mg. L⁻¹ - 8,4 mg. L⁻¹ para los EPS-FU (Tabla 5.1). La predominancia de la fracción soluble sobre las fracciones unidas ha sido citada anteriormente en diatomeas en cultivo (Wolfstein y Stal, 2002; De Brouwer y Stal, 2002). Excepcionalmente en la experiencia en medio SWES-N, los EPS unidos presentaron una concentración similar a los EPS-S, debido a la baja concentración de éstos últimos, en coincidencia con las relaciones N/P más bajas de todas las condiciones ambientales.

A partir de la dinámica de los EPS unidos se pudo establecer que los EPS-FU, presentaron una mayor concentración que los EPS-LU durante el tiempo experimental, con excepción del día 14 en el medio f/2, a 15°C y 20°C. La predominancia de los EPS-FU en todos los medios de cultivo podría deberse a los hábitos bentónicos de *N. cincta*. La secreción continua de la fracción unida ha sido definida como típica de las diatomeas bentónicas (Faraloni et al., 2003) y, específicamente, la fracción soluble en EDTA permite la unión de las células a las partículas del sedimento y a otras superficies celulares (Decho, 1990; Lundkvist et al., 2007).

En el caso particular de los cultivos en medio f/2, a 20°C, las cinéticas de los EPS-S y EPS-FU presentaron tendencias opuestas. Por un lado el EPS-S presentó un comportamiento relativamente estable hasta el inicio de la fase estacionaria, a partir de la cual la producción incrementó levemente. Por el otro, los EPS-FU disminuyeron considerablemente a partir del sexto día de experiencia. Esto podría estar indicando una transformación del EPS-FU en EPS-S, como ha sido citado por otros autores (De Brouwer et al., 2002). La degradación de los EPS unidos (Staats et al., 2000; Smith y Underwood, 2000)

y su utilización heterotrófica por las mismas células que los producen es un mecanismo probable en diatomeas bentónicas en cultivo (De Brouwer et al., 2002). Conjuntamente, los ciclos de luz-oscuridad es otro factor que afecta la producción de EPS, siendo los EPS solubles independientes de la luz y los EPS unidos altamente dependientes de la luz (De Brouwer et al., 2002). De acuerdo con estos autores, los EPS unidos pueden ser transformados en EPS-S en oscuridad o cuando la disponibilidad de luz disminuye debido el tamaño de los agregados celulares. En los cultivos de *N. cincta*, los EPS-FU disminuyeron durante el período estacionario, cuando las células presentaron una mayor agregación, menor movilidad individual y por lo tanto, una probable limitación de luz. Por otra parte, a partir del espectro ATR-IR de los EPS-S y EPS-FU se pudo observar una composición similar entre dichas fracciones. Esto sugiere que los productos solubles en el medio de cultivo derivan de una solubilización parcial de los EPS-FU, lo cual es acorde a lo reportado por Chiovitti et al., (2003b) y Bellinger et al., (2005).

La composición de proteínas, carbohidratos y composición monosacárida de *N. cincta*, fue realizada en células creciendo en f/2, a 20°C. Las comparaciones entre trabajos no resultan sencillas debido a que la composición de monosacáridos varía con la especie (Hoagland et al., 1993) y a que cada fracción de carbohidratos está empíricamente definida por la técnica de extracción utilizada (Underwood y Paterson, 2003).

La relación carbohidrato: proteína y la identificación de N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina sugieren la presencia de proteoglucanos y/o glicoproteínas en los EPS. La espectroscopía de IR también mostró la presencia de carbohidratos y bandas de proteína. En general, las señales fueron más leves en la fracción de EPS-LU, pero esto no es sorprendente debido a la alta contaminación con sales que presentaron estos productos. Asumiendo una composición glicoproteica, las fracciones EPS-S y EPS-FU presentaron una alta proporción de xilosa y manosa en su composición monosacárida, de manera similar a *Craspedostauros australis* y *Phaeodactylum tricornutum* (Chiovitti et al., 2003a; Baiet et al., 2011). De hecho, el gran porcentaje de N-acetilglucosamina (22% en EPS-S y 16% en EPS-FU) sugiere la presencia de N-glicoproteínas. Por otro lado, la diferente composición de monosacáridos entre los EPS-S y los EPS-LU, particularmente

el mayor contenido de glucosa en éstos últimos, coincide con estudios previos (Staats et al., 1999). En cuanto a la ausencia de arabinosa en los EPS-FU podría deberse a la destrucción de este componente (azúcar poco estable) debido a la hidrólisis ácida (Leandro et al., 2003). Los ácidos urónicos, frecuentemente presentes en la composición de las diatomeas (Leandro et al., 2003; Underwood et al., 2004; De Philipps et al., 2005), no estuvieron presentes de acuerdo a la determinación colorimétrica. Esto podría estar representando una característica de la especie.

Otra cuestión de importancia en la determinación de las fracciones de EPS es la contaminación de las mismas con productos intracelulares como resultado del daño celular. Las extracciones con EDTA producen severas rupturas de las membranas celulares (De Brouwer et al., 2002) e incluso, la utilización de procedimientos suaves, como puede ser la extracción acuosa de EPS a temperatura ambiente, también pueden generar lisis celular (Takahashi et al., 2009). Debido a ello, las fracciones de EPS enriquecidas en glucosa podrían estar representando el material intracelular de almacenamiento (crisolaminariana) (Chiovitti et al., 2004).

En cultivos, la separación de los EPS solubilizados en el sobrenadante por medio de centrifugación es un método bastante aceptado, especialmente porque evita la contaminación de dicha fracción con material intracelular (Staats et al., 1999) a pesar de resultar en una recuperación incompleta de la totalidad de EPS (Wustman et al., 1997; De Brouwer et al., 2002). Sin embargo, para los fines de este trabajo, la metodología de extracción de los EPS-S resulta satisfactoria considerando que es un método sencillo, que se acopla al desarrollo de los cultivos para obtención de lípidos y que no requiere de procedimientos adicionales para extraerlos, como es el caso de las fracciones unidas. Además, la obtención de EPS como co-productos, puede ser aplicado en otros procesos de interés como en aplicaciones farmacéuticas en la liberación controlada de drogas (Lowman, 2000) o en procesos de biorremediación (Bender y Phillips, 2004; Pal y Paul, 2008).

5.6 Conclusiones

- 1) Los medios de cultivo SWES y SWES-N favorecen la formación de agregados celulares, mientras que el medio de cultivo f/2 favorece la adhesión de las células al sustrato con formación de una película de *biofilm*.
- 2) En el cultivo de *N. cinta* en medio SWES a 20°C se alcanzó el mayor rendimiento de EPS-S en un corto período de tiempo (14 días).
- 3) La producción media de EPS-S en SWES fue significativamente mayor que en f/2 y SWES-N. Las altas concentraciones de EPS-S se relacionaron con las mayores relaciones estequiométricas N/P.
- 4) Las concentraciones de EPS-LU y EPS-FU en los medios f/2 y SWES no superaron en ningún momento los 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y representaron, cada una, <10% de la totalidad de EPS. En SWES-N la concentración de EPS-LU y EPS-FU fueron levemente mayores que en los otros medios (6 mg. L^{-1} y 8 mg. L^{-1} , respectivamente) y cada fracción representó la tercera parte del total de EPS.
- 5) En términos generales, los EPS-FU fueron la fracción de EPS unidos de mayor concentración en todas las condiciones de cultivo, probablemente debido al hábito bentónico de la especie en estudio.
- 6) En el caso particular de los cultivos en medio f/2, a 20°C, las cinéticas de los EPS-S y EPS-FU presentaron tendencias opuestas en el período estacionario. El incremento en la concentración de la primera fracción se correspondió con la disminución de la segunda. Esto sugiere una transformación de los EPS-FU en EPS-S.
- 7) La composición de monosacáridos de los EPS-S y EPS-FU presentó altos porcentajes de xilosa, manosa y N-acetilglucosamina, mientras que la de los EPS-LU estuvo mayormente constituida por galactosa y glucosa.
- 8) Los extractos de EPS unidos fueron obtenidos mediante protocolos que probablemente rompieron la estructura celular, por lo que dichas

fracciones pudieron haber resultado contaminadas con material intracelular.

- 9) La separación de la fracción soluble por medio de centrifugación sería la adecuada para complementar la producción de TAG para biodiesel con la obtención un co-producto de valor agregado.

Capítulo 6- Crecimiento, contenido y composición lipídica de cultivos de *Navicula cincta* en fotobiorreactor

6.1. Introducción

En la actualidad, algunas especies de diatomeas son consideradas potenciales candidatos para cultivos microalgales a gran escala, destinados a la obtención de productos de alto valor y como materia prima para la producción de biodiesel (Leu y Boussiba, 2014).

Los sistemas de cultivo microalgales y las estrategias de crecimiento varían de acuerdo con la cepa utilizada y el bioproducto de interés (Borowitzka, 1999). Así, desde el punto de vista de cultivos a gran escala, se distinguen dos tipos de sistemas: sistemas cerrados (fotobiorreactores) y sistemas abiertos (tipo *raceways*) (Chini Zitelli et al., 2013). Mientras que los sistemas abiertos de tipo *raceways* son prometedores como sistema de cultivo a gran escala debido a sus bajo costo de construcción y fácil mantenimiento (Chisti, 2007), los fotobiorreactores (FBR) son muy importantes desde el punto de vista de la generación de inóculos de densidades celulares (DC) altas, factor crítico a tener en cuenta en aplicaciones industriales (Tredici, 2004). Los FBR presentan varias ventajas, como la reducción del riesgo de contaminación, la posibilidad de generar condiciones de cultivos reproducibles y controladas, la reducción en las pérdidas de CO₂ (lo cual está relacionado al incremento de la productividad), la capacidad de regulación y el control de parámetros como la temperatura, la hidrodinámica y la flexibilidad en el diseño técnico (Jeffery y Wright, 1999; Pulz, 2011 Chini Zitelli et al., 2013).

Existen distintos tipos de diseños de FBR; sin embargo, los más importantes para el cultivo a gran escala de microalgas son los horizontales de tipo tubular, los verticales de tipo columnar y los de tipo panel (Sierra et al., 2008). Estos sistemas, además, han permitido el cultivo de una importante variedad de microalgas bajo condiciones reproducibles (Aciaras y Riquelme, 2008). Al igual que en los cultivos heterotróficos convencionales, en los cultivos fotoautotróficos microalgales se requiere de una alta productividad para reducir

el tamaño de los sistemas de cultivo y consecuentemente la producción y los costos de procesamiento. Una alta densidad de células fisiológicamente activas puede ser alcanzada con un diseño de fotobiorreactor apropiado y con procesos específicos de optimización del crecimiento (Richmond, 2000). Esta característica los convierte en dispositivos adecuados para inóculos funcionales para mayores volúmenes de cultivo.

Recientemente, algunas especies de diatomeas han sido cultivadas en distintos FBR y bajo diversas variables ambientales (Lee et al., 2011; Monkonsit et al., 2011; Silva Benavides et al., 2013; Sanjay et al., 2013; Demirel et al., 2015), dificultando la comparación entre las distintas especies en término de parámetros de crecimiento y producción de lípidos. Así, por ejemplo, el crecimiento de *Skeletonema costatum* fue evaluado en dos sistemas de fotobiorreactores con fines de optimizar su crecimiento, alcanzándose los mejores rendimientos en un fotobiorreactor tipo *airlift* con $4,6 \times 10^6$ cel. mL⁻¹ (Monkonsit et al., 2011).. *Chaetoceros muelleri* y *Phaedactylum tricorutum* fueron cultivadas en fotobiorreactores cilíndricos de 15 L con el fin de evaluar su potencial como materia prima para producción de biodiesel. El mayor contenido de aceites fue determinado en *P. tricorutum*, con un 25.31% en peso seco (Lee et al., 2011). Asimismo, el crecimiento de esta última especie fue comparado en sistemas abiertos (*open ponds*) y fotobiorreactor tubular. El óptimo rendimiento (1g. L⁻¹) fue alcanzado en el fotobiorreactor, como resultado de un mejor régimen de luz/oscuridad y en consecuencia, una mayor eficiencia en el uso de la luz (Silva Benavides et al., 2013). *Navicula cryptocephala* fue cultivada en distintos sistemas (frascos agitados, bolsas de polietileno y fotobiorreactor) con el fin de extraer y caracterizar aceites para la producción de biodiesel. El mayor rendimiento de biomasa fue obtenido en fotobiorreactor (5.95 g/ 100 ml de medio). En una caracterización de los aceites extraídos de esta especie dulceacuícola se estableció la presencia de los ácidos palmítico, oleico, palmitoleico y linolénico como principales ácidos grasos (Sanjay et al., 2013). *Cylindrotheca closterium* fue cultivada en un *air-lift* fotobiorreactor bajo distintas condiciones de nutrientes e intensidad de luz para evaluar su crecimiento y contenido lipídico. Las máximas productividades lipídicas y producción de biomasa (7.364 mg. L⁻¹. d⁻¹ y 0.356 g.L⁻¹, respectivamente) fueron obtenidas en medio f/2 y a una intensidad lumínica de 56 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Estos autores resaltaron la importancia de una buena distribución de la luz en la acumulación de biomasa y eficiencia en la producción lipídica (Demirel et al., 2015).

De acuerdo con estos antecedentes el **Objetivo general** de este capítulo fue evaluar el crecimiento y el contenido y calidad lipídica de *N. cincta* cultivada en un fotobiorreactor columnar de 25L de capacidad.

Objetivos específicos

- a. Detectar durante el tiempo de cultivo fases de crecimiento y/o de acumulación lipídica.
- b. Obtener inóculos funcionales destinados a la producción de biomasa para mayor escala (300L).
- c. Determinar si el desarrollo del cultivo en fotobiorreactor optimiza la productividad de biomasa y lípidos totales en comparación con los cultivos *batch*.
- d. Determinar el contenido de lípidos totales, la composición de los mismos de acuerdo a su polaridad y el perfil de los ácidos grasos de *N. cincta* creciendo en el fotobiorreactor.
- e. Determinar la cinética de consumo de los macronutrientes.

6.2 Hipótesis

En función de los antecedentes expuestos anteriormente, se plantearon las siguientes **hipótesis** de trabajo:

- I. *La producción de biomasa de N. cinta se maximiza con la utilización del medio de cultivo SWES-N.*
- II. *El sistema de cultivo en fotobiorreactores columnares es el propicio para alcanzar mayores densidades celulares y biomasa debido a la homogeneización del cultivo y la llegada de radiación lumínica de manera más uniforme.*

6.3 Materiales y métodos

6.3.1 Características del Fotobiorreactor (FBR)

Se utilizó un FBR de 25 litros de capacidad, marca Figmay, construido de vidrio borosilicato. El mismo posee 70 cm de alto, 25 cm de diámetro interno y 26 cm de diámetro externo. Posee una tapa bridada con 5 bocas roscadas que permiten la entrada y salida de gases (O_2 , aire y CO_2) como la toma de muestras. Presenta una rosca central que permite la agitación del sistema (con velocidades de agitación entre 10 a 90 rpm), válvulas de descarga, termómetro electrónico y tablero electrónico de comando. Además presenta 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 FBR se encuentra resguardado en las instalaciones del CERZOS, dentro de una cámara que permite el control y mantenimiento de la entrada de aire enriquecido con CO_2 y la temperatura (verificada diariamente mediante un termómetro de máximos y mínimos).

6.3.2 Acondicionamiento del FBR

La desinfección del FBR se realizó el día anterior al inicio de la experiencia con hipoclorito de sodio diluido. Se utilizó para ello 15 L de lavandina al 5% y posteriormente se enjuagó con agua potable. Antes de iniciar la experiencia (agregado de medio de cultivo e inóculo) se realizó un segundo enjuague con 20 litros de agua destilada estéril.

6.3.3 Medio de cultivo y agua de desinfección

La experiencia en el FBR se realizó con medio SWES-N debido a que es un medio de fácil preparación y que estimula el crecimiento en la especie estudiada, como ha sido observado en el Capítulo 3. Dicho medio fue elaborado de acuerdo con lo detallado en el Capítulo 2. El medio y el agua destilada estéril destinada a la desinfección del FBR se prepararon en días

previos al inicio de la experiencia. Una vez acondicionados, se preservaron en cámara fría (8°C).

6.3.4 Inóculo

La obtención del inóculo se realizó mediante un escalado progresivo que consistió en el trasvaso de cultivo a un recipiente de mayor volumen y agregado de medio de cultivo nuevo, manteniendo a las células en fase exponencial.

El inóculo de 4 L se desarrolló en un recipiente estéril de 5.5 L de vidrio con medio de cultivo SWES-N, preparado con agua de mar de 32 UPS de salinidad. Las condiciones de crecimiento fueron $23 \pm 2 \mu\text{E m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ de intensidad lumínica, fotoperíodo de 12:12h luz: oscuridad y 20°C de temperatura. El cultivo fue agitado manualmente y se incorporó diariamente aire enriquecido con CO₂ al 1%, durante 3 horas, luego de iniciado el período lumínico.

6.3.5 Inicio de la experiencia

Para el inicio de la experiencia (día cero), se agregaron 12 L de medio estéril. La incorporación del inóculo se realizó luego de que el medio de cultivo alcanzara los 20°C dentro del FBR. La concentración inicial del mismo fue de aproximadamente 3.9×10^5 células. mL⁻¹. El cultivo se mantuvo en constante movimiento por agitación de las paletas internas (30 rpm) presentes en la parte central del FBR. El propósito de esto fue mantener las condiciones lo más homogéneas posibles para que las células presenten una adecuada disponibilidad de nutrientes, de absorción de luz y CO₂, una temperatura uniforme y una buena eliminación de O₂. La incorporación de CO₂ al 1% se realizó diariamente, durante 3 horas a partir de iniciado el período de luz. Además, se aplicó una intensidad lumínica de $60 \pm 7 \mu\text{E m}^{-2} \text{seg}^{-1}$, con un fotoperíodo de 12:12h luz: oscuridad y 20°C de temperatura.

La duración del cultivo fue de 16 días, seleccionando el tiempo de cosecha de acuerdo con la acumulación de lípidos neutros (LN) detectada con

la técnica de rojo Nilo (RN), detallada en el Capítulo 3. La cosecha fue realizada el día 17.

6.3.6 Control de variables y toma de muestras

El control de los valores de temperatura (T), pH y O₂ disuelto se realizó diariamente, del mismo modo que la toma de alícuotas para estimación de la DC (2 mL), la concentración de los nutrientes (5 mL) y la cuantificación de la clorofila *a* (10 mL). La toma de muestras destinadas al análisis cualitativo de LN y clorofila *a in vivo* (5 mL) se efectuó cada dos (2) días. Los días cero (0), seis (6), catorce (14) y quince (15) de la experiencia se tomaron 30 mL de muestra para la determinación del peso seco (PS).

6.3.7 Determinaciones y análisis de las muestras

- La intensidad de luz de las lámparas fluorescentes fue medida con un radiómetro LI-COR modelo LI-192SB.
- La temperatura (T), pH y O₂ disuelto fueron medidos *in situ* con un Medidor multiparamétrico digital Consort C562. Los respectivos sensores fueron desinfectados con alcohol 70%, antes de su introducción al FBR.
- Las determinaciones de la DC (N° células. mL⁻¹) se realizaron a partir de recuentos bajo un microscopio óptico (Capítulo 3). Debido a la formación de agregados celulares, y como una medida de corrección en el error de estimar DC en medio SWES-N, a las alícuotas se les adicionaron entre 3 a 6 gotas de detergente no iónico al 1%. Posteriormente, las mismas fueron diluidas y agitadas mediante ultrasonido.
- La determinación del PS se realizó gravimétricamente y la concentración de clorofila *a* se efectuó espectrofotométricamente, de acuerdo con los protocolos descritos en el Capítulo 3.
- Las estimaciones cualitativas de los lípidos neutros y la clorofila *a in vivo* se realizaron mediante la técnica espectrofluorométrica detallada en el Capítulo 3.

- La concentración de nutrientes (N, P y Si) fue determinada espectrofotométricamente de acuerdo con lo especificado en el Capítulo 4.
- El análisis lipídico de la biomasa cosechada se basó en la extracción de los lípidos totales (LT) con la técnica de Folch (1957), fraccionamiento en base a la polaridad, transmetilación de las fracciones y posterior cromatografía gaseosa utilizando la misma metodología del Capítulo 4.

6.3.8 Cosecha de la biomasa

En primera instancia el cultivo se dejó en reposo y sin agitación durante 14 horas para lograr una primera separación de un sobrenadante (pobre en concentración celular) y un pellet celular (con la mayoría de las células sedimentadas, EPS y sales). Posteriormente se retiró el sobrenadante y luego ambas fracciones fueron cosechadas mediante centrifugación. Para ello, se utilizó una centrífuga IEC Modelo 2K, de 4L de capacidad. Los pellets fueron lavados con abundante agua destilada para eliminar las sales del medio de cultivo. Se mantuvieron en freezer durante 48 horas antes de ser liofilizados y destinados al análisis lipídico.

6.3.9 Análisis estadístico de los datos

Se realizaron ANOVA con el fin de testear las diferencias entre los principales ácidos grasos del perfil de *N. cincta* creciendo en fotobiorreactor y en sistema *batch* convencional. De esta manera se comparó el porcentaje del AGM 16: 1 (n-7), del AGS 16:0 y del AGPI 20:5 (n-3) entre los dos sistemas de cultivo.

La comparación entre medias se realizó con el test *LSD* de Fisher (*Least Significant Difference*) con un nivel de significación de 0,05. El *software* estadístico utilizado fue INFostat® (versión libre, <http://www.infostat.com.ar>).

6.4 Resultados

Durante el desarrollo del cultivo la temperatura fue de $20,56 \pm 2,47^{\circ}\text{C}$, con mínimos y máximos de 18°C y 24°C , respectivamente. Las variaciones del pH y O_2 disuelto se presentan en la Figura 6.1. El pH varió desde 8,13 a 8,86, con excepción de dos días que llegó a 9,38 (sexto día) y 9,44 (sétimo día). Por otro lado, las medidas de O_2 disuelto disminuyeron de $5,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en el día uno (1) a $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en el sexto (6) día de experiencia. A partir de allí la concentración de O_2 disuelto varió entre 1.95 y $0.55 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

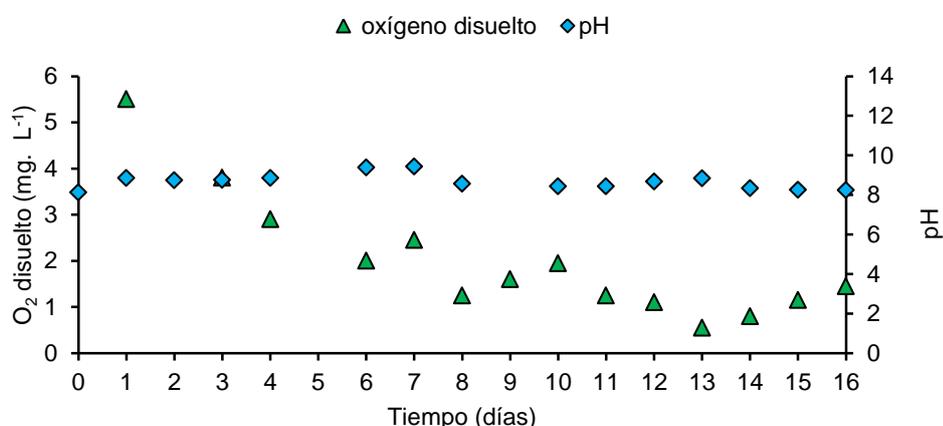


Figura 6.1. Variaciones diarias de pH y oxígeno disuelto ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) durante el cultivo de *Navicula cincta* en el fotobiorreactor.

En la Figura 6.2 se muestra la DC y la concentración de pigmentos fotosintéticos (Fig. 6.2 A), la acumulación de LN y fluorescencia *in vivo* de la clorofila *a* (Fig. 6.2 B) y la cinética de nutrientes (Fig. 6.2 C), correspondientes al cultivo de *N. cincta* creciendo en el FBR. Con respecto al crecimiento, la especie presentó una fase de crecimiento exponencial hasta el día ocho (8), una fase estacionaria hasta el día trece (13) y una fase de disminución desde ese día hasta el día dieciséis (16) (Fig. 6.2 A). Al final de la fase exponencial se obtuvo una densidad de $2,04 \times 10^6$ células. mL^{-1} (aproximadamente $0,32 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). La velocidad de crecimiento (k) y el tiempo de generación (TG) fueron $0,47 \pm 0,03 \text{ div}\cdot\text{día}^{-1}$ y $50,73 \pm 3,3$ horas, respectivamente. El número inicial de células fue de $3,9 \times 10^5$ células. mL^{-1} (aproximadamente $0,23 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) y al momento de

la cosecha la DC estimada fue de $1,44 \times 10^6$ células. mL⁻¹ (aproximadamente 0,32 g. L⁻¹). La producción de biomasa en peso seco (PS) fue de 318, 5 mg. L⁻¹ y la producción de biomasa húmeda fue de 1,86 g. L⁻¹. De acuerdo con las estimaciones de la clorofila a, los cultivos se iniciaron con un contenido de 2,55 pg. célula⁻¹ y presentaron al momento de la cosecha 0,76 pg. célula⁻¹.

La Figura 6.2 B y la Tabla 6.1 indican los resultados del análisis espectrofluorométrico en relación al crecimiento de la población y a la acumulación de LN. Durante los primeros ocho (8) días se observó un incremento en la IF-Cl y en el contenido de LN, tanto a nivel poblacional como celular (Tabla 6.1). A partir de allí se observó una disminución en la IF-Cl, un mantenimiento de la IFR-RN y un pico en el contenido de LN a nivel celular (IFR-Cel) en el último día de cultivo.

Tabla 6.1. Resultados del análisis espectrofluorométrico de la clorofila a *in vivo* y la acumulación de LN a nivel poblacional y celular en el inicio, mitad y finalización de la experiencia.

Tiempo (día)	Cl a <i>in vivo</i> (u.a)	IRF-RN (u.a)	IFR-Cel (u.a. mL. célula ⁻¹)
0	10,33	44,29	11,36
8	213,41	249,94	12,13
16	142,00	232,00	16,06

Los macronutrientes disueltos fueron consumidos de manera diferencial (Fig. 6.2 C). En la concentración de N y P en el medio de cultivo se observó una disminución abrupta durante los primeros cuatro (4) y seis (6) días, respectivamente. La variación del N fue de 713 µM a 9 µM y la del P de 69 µM a 0.2 µM. Por otro lado, el Si disminuyó gradualmente a lo largo de la experiencia. Las concentraciones determinadas en el medio de cultivo fueron entre 86 µM en el inicio de la experiencia a 36 µM al finalizar la misma.

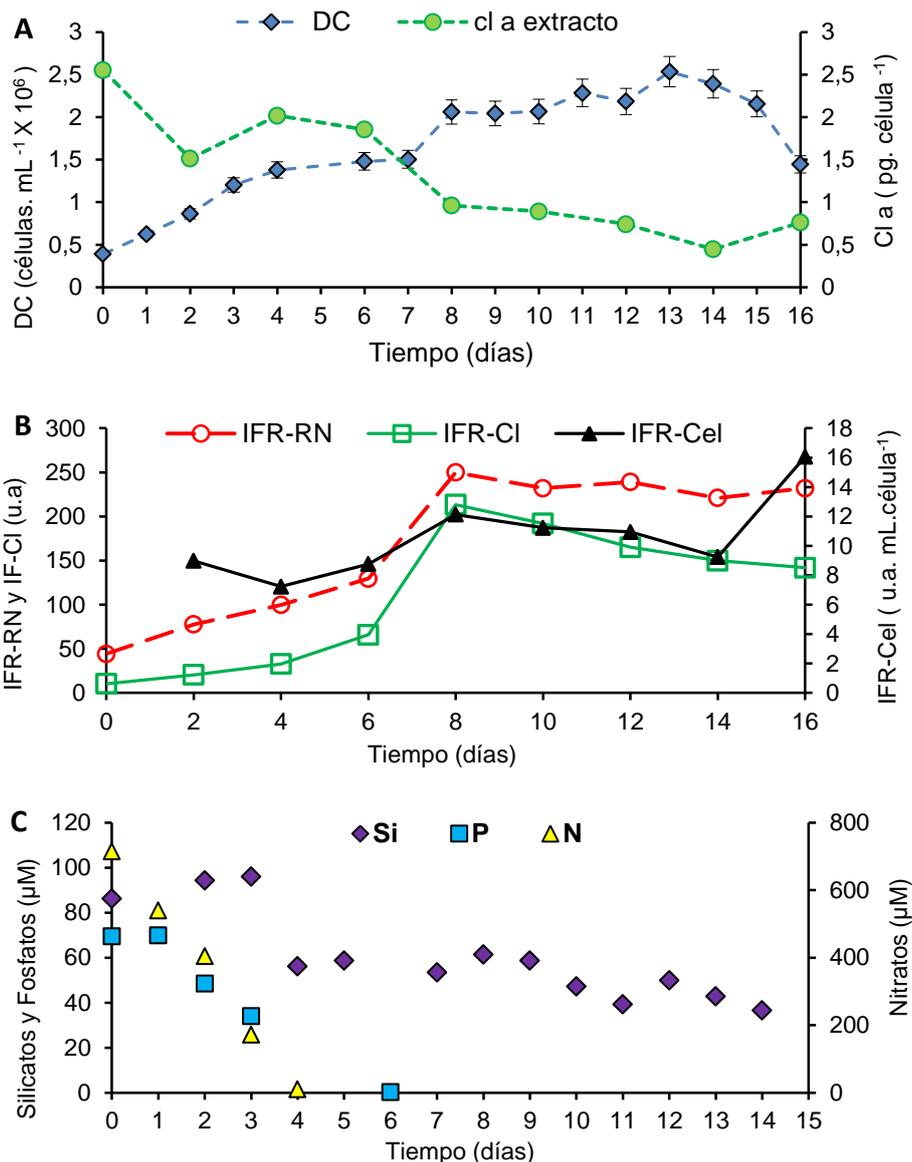


Figura 6.2. Crecimiento, acumulación de lípidos neutros y consumo de macronutrientes de *Navicula cincta* cultivada en el fotobiorreactor. (A) Curva de crecimiento y cinética de la clorofila *a in vivo*. **(B)** Variaciones del contenido relativo de los LN a nivel poblacional y por unidad celular, determinadas por espectrofluorimetría. **(C)** Cinética de silicatos (Si), fosfatos (P) y nitratos (N) disueltos en el medio de cultivo ($\mu\text{M} = \mu\text{mol L}^{-1}$).

La evolución del cultivo a nivel macroscópico se observa en la Figura 6.3. En el día 0 el cultivo presentó una coloración pálida debido a la dilución del inóculo (4 L) en 12 L de medio SWES-N. Entre los días 2 a 8 se pudo observar un rápido incremento en la intensidad del color marrón, debido a un aumento

en el número de células. Esto coincidió con la etapa exponencial definida en la curva de crecimiento (Fig. 6.2 A). En el día 10 se observó un color marrón más opaco, relacionado con la detención del crecimiento y la acumulación de LN a nivel poblacional (IFR-RN) (Fig. 6.2 B). En el día 14 se evidenció una mayor disminución en la coloración del cultivo, relacionado con un período más prolongado de limitación de nutrientes (Fig. 6.2 C) y con la consecuente mayor acumulación de lípidos. En el día 16 se observó una coloración más amarillenta, asociada al pico de acumulación de LN a nivel celular (IFR-Cel) (Fig. 6.2 B).

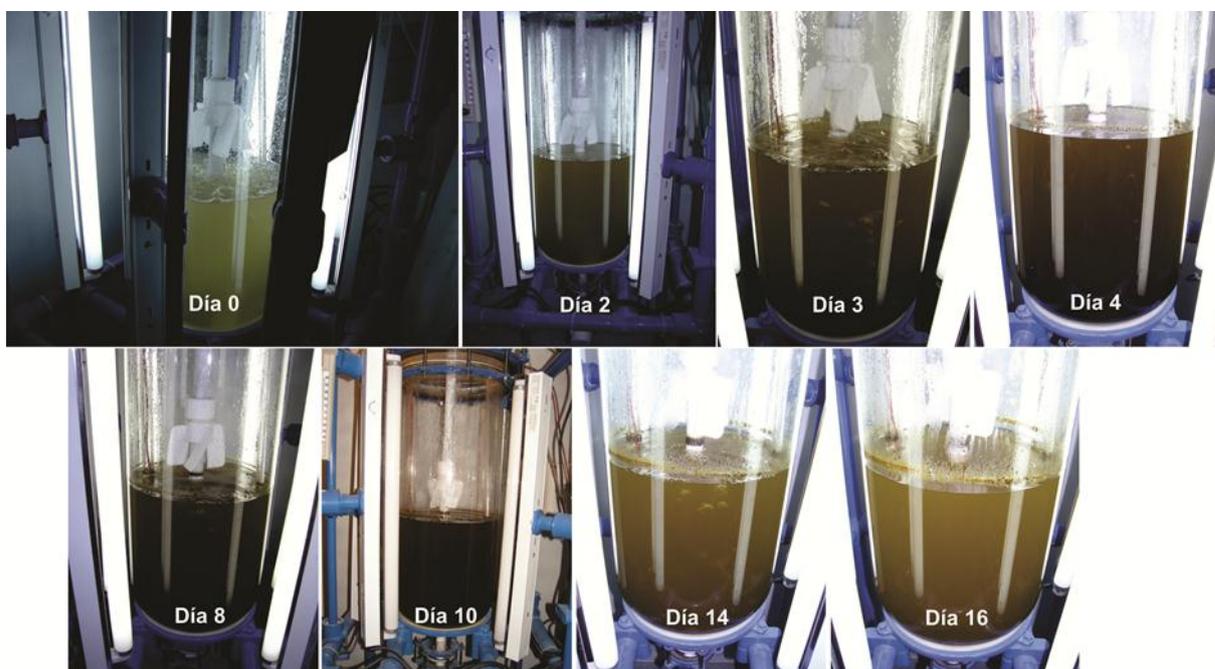


Figura 6.3. Desarrollo del cultivo de *N. cincta* en fotobiorreactor. Los días correspondientes están señalados en cada fotografía (Detalle en el texto).

El contenido de LT fue de $32,08 \pm 4,81$ (% PSLC), siendo los LN la principal fracción, representando el $81,52 \pm 0,26$ % de los LT. El contenido y productividad de LN fue de $26,15 \pm 4,00$ (% PSLC) y $51,01 \text{ mg. L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectivamente. El detalle del contenido de LT y la composición de las fracciones neutra y polar se detallan en la Tabla 6.2.

Tabla 6.2. Contenido de lípidos totales y composición relativa de las fracciones neutra y polar. Los LT están expresados como porcentaje de peso seco libre de cenizas [LT (% PSLC)]. Las fracciones neutra y polar están expresadas como porcentaje de peso seco libre de cenizas [LN (% PSLC), LP (% PSLC)] y como porcentaje de lípidos totales [LN (% LT); LP (% LT)].

Medio de cultivo	Temperatura (°C)	Tiempo (días)	LT (% PSLC)	LN (% PSLC)	LP (% PSLC)	LN (% LT)	LP (% LT)
SWES-N	20	17	32,08 ± 4,81	26,15 ± 4,00	5,92 ± 0,80	81,52 ± 0,26	18,48 ± 0,26

Dentro de la fracción de los LN, los AGMI y AGS representaron el 51% y 32%, respectivamente, del total de ácidos grasos (AG). La fracción minoritaria fue la de los AGPI con un 16% (Fig. 6.4 A).

En la caracterización del perfil lipídico se identificaron un total de 20 AG, tanto en la fracción neutra (FN) como en la fracción polar (FP) (Tabla 6.3). Los AG no determinados fueron señalados con el signo menos (-). En la Figura 6.4 B se representaron los AG neutros cuya contribución al total de AG registrados fue $\geq 2\%$. Los principales AGMI fueron los ácidos palmitoleico 16:1 (n-7) y oleico 18:1 (n-9) representando un 46% y 2%, respectivamente, del total de AG determinados. Los ácidos grasos saturados: palmítico (16:0) y mirístico (14:0) y el AGPI: eicosapentaenoico 20:5 (n-3) constituyeron el 28%, 2% y 11%, respectivamente, del total de AG neutros.

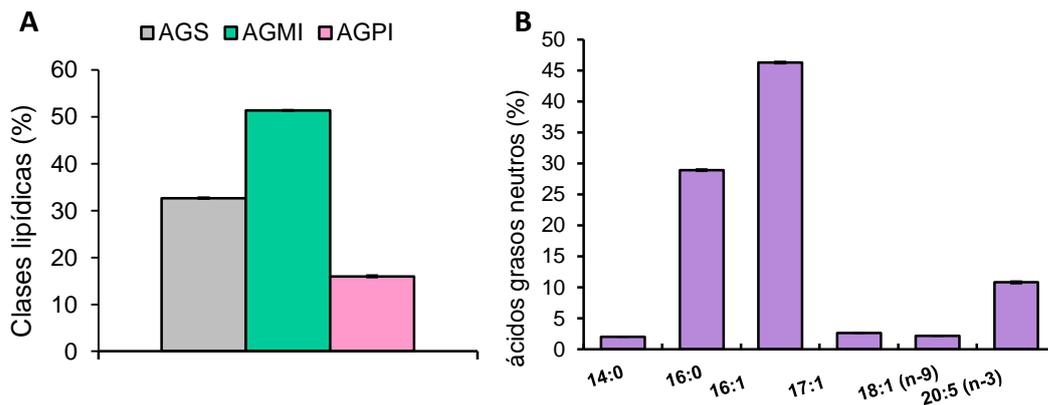


Figura 6.4. Lípidos neutros de *Navicula cincta* creciendo en el fotobiorreactor. (A) Composición de la fracción neutra de acuerdo a la saturación/insaturación de los ácidos grasos. Las barras de error representan el desvío estándar entre 4 muestras. AGS = ácidos grasos saturados, AGMI = ácidos grasos monoinsaturados, AGPI = ácidos grasos poliinsaturados. **(B)** Composición porcentual media de ácidos grasos ≥ 2 % de la fracción neutra. Las barras de error representan el desvío estándar (n=4). Se representaron los ácidos grasos cuya contribución al total de ácidos grasos registrados fue ≥ 2 %.

Tabla 6.3. Perfil de ácidos grasos neutros y polares de *N. cincta* creciendo en el fotobiorreactor. \pm = desvío estándar entre 4 réplicas. AGS = ácidos grasos saturados. AGMI = ácidos grasos monoinsaturados. AGPI = ácidos grasos poliinsaturados. c = isómero cis. t = isómero trans. Σ = sumatoria de los ácidos grasos del mismo grado de insaturación.

Composición	Fotobiorreactor	
	neutros	polares
AGS		
12:0	0,33 \pm 0,00	0,99 \pm 0,02
14:0	2,00 \pm 0,01	3,08 \pm 0,05
15:0	0,61 \pm 0,01	0,78 \pm 0,02
16:0	28,93 \pm 0,17	39,51 \pm 0,12
17:0	0,15 \pm 0,00	0,23 \pm 0,01
18:0	2,16 \pm 0,01	1,35 \pm 0,02
20:0	0,04 \pm 0,00	0,23 \pm 0,00
AGMI		
15:1 n-5	0,11 \pm 0,00	0,08 \pm 0,00
16:1 n-7	46,32 \pm 0,15	30,76 \pm 0,45
17:1 n-7	2,64 \pm 0,02	4,77 \pm 0,08
18:1 n-9 (c y t)	2,16 \pm 0,01	5,18 \pm 0,04
24:1 n-9	0,13 0,00	0,15 \pm 0,02
AGPI		
18:2 n-6 t	0,28 \pm 0,01	0,35 \pm 0,01
18:2 n-6 c	0,76 \pm 0,01	1,49 \pm 0,15
18:3 n-6	0,44 \pm 0,00	0,35 \pm 0,01
18:3 n-3	0,13 \pm 0,00	0,13 \pm 0,00
20:2 n-6	0,56 \pm 0,02	0,74 \pm 0,03
20:3 n-3	-	-
20:4 n-6	1,43 \pm 0,02	1,14 \pm 0,04
20:5 n-3	10,82 \pm 0,19	6,28 \pm 0,07
22:5 n-3	-	-
22:6 n-3	1,57 \pm 0,04	2,40 \pm 0,08
Σ		
AGS	32,66 \pm 0,18	46,18 \pm 0,14
AGMI	51,36 \pm 0,12	40,94 \pm 0,34
AGPI	15,98 \pm 0,25	12,89 \pm 0,22

6.5 Discusión

El desarrollo de los fotobiorreactores para cultivo de microalgas pretende una provisión óptima de energía lumínica, que todas las células tengan la misma exposición de luz, suministrar una relación área superficial/volumen (S/V) grande, ocupar menos espacio terrestre y, en definitiva, alcanzar mayores productividades (Janssen et al., 2000). Estos dispositivos, además, permiten un mejor control de las variables de pH, temperatura, concentración de gases y proveen un ambiente propicio para el cultivo de las especies, relativamente seguro de la contaminación por otros organismos (Barsanti y Gualtieri, 2006).

Dentro de las condiciones ambientales, la temperatura seleccionada para el desarrollo del cultivo fue de 20°C y la temperatura media lograda fue $20,56 \pm 2,47^\circ\text{C}$. Por lo tanto, considerando que dicho parámetro fue regulado mediante el control de la temperatura externa al FBR, el control del mismo resultó adecuado.

Durante el desarrollo del cultivo, el pH se mantuvo relativamente constante, variando entre 8,13 y 9,44; siendo éste último un valor aislado asociado a un día de gran elevación de la temperatura externa al FBR. Por lo tanto, el 87 % de los valores de pH fueron de 8,13 a 8,86, los cuales se encuentran dentro del rango óptimo de pH (8,2 – 8,7) para cultivos microalgales marinos, ya que no generan interrupciones en los procesos celulares (Barsanti y Gualtieri, 2006).

Los niveles de O_2 disuelto en el cultivo ($0,5 \text{ mg. L}^{-1}$ - $5,5 \text{ mg. L}^{-1}$) fueron inferiores a los reportados por Silva- Aciaras y Riquelme (2008) en *Navicula* spp. creciendo en FBR ($8,4 \text{ mg. L}^{-1}$ – $9,0 \text{ mg. L}^{-1}$). Sin embargo, estas diferencias podrían deberse, principalmente, a las diferentes intensidades lumínicas a las que ambas especies fueron cultivadas ($60 \mu\text{E m}^{-2} \text{ seg}^{-1}$ vs $110 \mu\text{E m}^{-2} \text{ seg}^{-1}$). Por otro lado, los valores establecidos en este trabajo estuvieron por debajo de los niveles que pueden causar inhibición de la fotosíntesis o, en condiciones extremas, la muerte de las células por daño oxidativo (Camacho Rubio et al., 1999).

El cultivo de *N. cincta* desarrollado en el FBR presentó tres fases: exponencial, estacionaria y de descenso o disminución (*phase crash*). La fase exponencial, asociada a la máxima velocidad de crecimiento, se desarrolló

hasta el día ocho (8), coincidentemente con una disminución en la concentración de P hasta $0,18 \mu\text{M}$ (día 6), valor limitante para el crecimiento ($< 8.9 \mu\text{M}$; Sarthou et al., 2005). Por otro lado, el N alcanzó valores limitantes el día 4 ($9,69 \mu\text{M} < 10,2 \mu\text{M}$; Sarthou et al., 2005). La fase definida como estacionaria se prolongó hasta el día trece (13); sin embargo, durante la misma se distinguieron otros pulsos de crecimiento mediante los RC. Esto podría deberse a la capacidad de las diatomeas de almacenar P y N intracelularmente (Gueder y La Roche, 2002) y a la disponibilidad continua de Si en el medio de cultivo. La concentración de Si el día final de la experiencia ($36,5 \mu\text{M}$) superó los $22 \mu\text{M}$ definidos como limitantes para el crecimiento de las diatomeas (Sarthou et al., 2005). Por último, el período de descenso o disminución de la DC se definió entre los trece (13) y dieciséis (16) días de cultivo. El mismo, se caracteriza por una velocidad de crecimiento negativa y una disminución en la concentración de nutrientes, a un nivel en que las células son incapaces de mantener el crecimiento (Barsanti y Gualtieri, 2006).

La velocidad de crecimiento y el tiempo de generación estimados ($0,47 \pm 0,03 \text{ div. día}^{-1}$ y $50,73 \pm 3,3$ horas, respectivamente) fueron superiores a los estimados en el cultivo *batch* de *N. cinta* bajo la misma temperatura y medio de cultivo ($0,29 \pm 0,02 \text{ div. día}^{-1}$ y $82,50 \pm 12$ horas, Capítulo 3). Esto muy probablemente se haya debido a que la aireación continua evita gradientes de temperatura e irradiación en el interior del medio de cultivo, generando un efecto favorable sobre la velocidad de crecimiento (Bitaubé Pérez et al., 2008).

El contenido de Cl *a* disminuyó de manera continua a lo largo de la experiencia desde $2,55 \text{ pg. célula}^{-1}$ (inicio) hasta $0,76 \text{ pg. célula}^{-1}$ (finalización de la experiencia). Particularmente la concentración en el día cero (0) en el FBR fue comparable con el definido al final de la experiencia en cultivo *batch* y medio SWES-N ($2,47 \text{ pg. célula}^{-1}$, Capítulo 3). Por lo tanto, las células en el primer día de la experiencia mantuvieron un estado fisiológico (a nivel de Cl *a*) representativo del inóculo y sus respectivas condiciones de cultivo. Por otro lado, la disminución continua de la Cl *a* en el transcurso de la experiencia podría deberse a la mayor intensidad lumínica a la que estuvieron sujetas las células en el FBR ($60 \pm 7 \mu\text{E m}^{-2} \text{ seg}^{-1}$) en relación a la que crecieron mientras se desarrollaban como inóculo ($23 \pm 2 \mu\text{E m}^{-2} \text{ seg}^{-1}$). Con el incremento de la intensidad lumínica se generan cambios en la composición pigmentaria que

implican un incremento en el contenido de pigmentos fotoprotectores y una disminución de los pigmentos fotosintéticos (Fujiki y Taguchi, 2002).

La determinación de la CI *a in vivo* resultó un buen estimador del desarrollo del cultivo, considerando que la autofluorescencia presentó una dinámica similar a la DC. La fluorescencia *in vivo* puede ser utilizada como una aproximación de la biomasa si las condiciones del cultivo son estables y las células están aclimatadas a esas condiciones (MacIntyre y Cullen, 2005). Considerando que se cumplieron dichos requisitos, el cultivo en el FBR presentó un período de acumulación de biomasa asociada a la actividad de la CI *a* durante la mitad de la experiencia y un período de disminución de la misma durante el tiempo restante. Además, este último período se desarrolló en ausencia de N. Cuando el N ha sido consumido, los pigmentos (y la eficiencia fotosintética) disminuyen ocasionando la inhibición del crecimiento microalgal y el incremento del contenido de TAG (Liu et al., 2012). Esto coincide con las cinéticas establecidas con el RN en *N. cincta*. La acumulación de LN se evidenció a nivel poblacional (IFR-RN) a partir del octavo día de cultivo, mientras que a nivel celular (IFR-Cel) se evidenció al momento de la cosecha.

El contenido de LT en la biomasa proveniente del FBR [32,08 ± 4,81 LT (% PSLC)] fue muy superior al obtenido en los cultivos creciendo en sistemas *batch* y SWES-N [6,00 LT (% PSLC), Capítulo 4]. Como se pudo observar en los resultados, el consumo de los nutrientes esenciales (en particular el N) fue diferente en los dos sistemas. Como se mencionó anteriormente, el N nunca llegó a valores limitantes para el crecimiento en el sistema *batch*, mientras que en el FBR disminuyó hasta valores limitantes, a partir del cuarto día de cultivo. Además, el P también fue limitante a partir de la mitad del período experimental. Una mayor acumulación lipídica en relación a la limitación de ambos nutrientes ha sido reportada para cultivos de *Phaeodactylum tricornutum* (Valenzuela et al., 2013).

Bajo las condiciones de cultivo testeadas, los LN representaron el 81,52 ± 0,26 (% LT). Valores similares [84 - 90% LN (%LT)] se registraron en cultivos *batch* de *N. cincta* creciendo en f/2 y cosechados los días 10 y 14, respectivamente (Capítulo 4). Por lo tanto, se podría inferir que dichos contenidos de LN serían característicos de la especie en fase estacionaria y

bajo limitación de algún macronutriente. En el caso del medio f/2 los mayores contenidos de LN coincidieron con la limitación del P y Si; mientras que en el FBR estuvo relacionado con la limitación del P y N. Si bien el incremento del contenido de LN (TAG) bajo la limitación de N ha sido frecuentemente reportado en cultivos de diatomeas (López Alonso et al., 2000; Yu et al., 2009; Bertozzini et al., 2013; Yang et al., 2013) en esta tesis sólo se ha podido establecer en la experiencia en el FBR. Un mayor número de experiencias de cultivo sería necesario realizar para poder dilucidar mejor estas diferencias; sin embargo, de acuerdo con nuestros resultados, se podría inferir que el diferente comportamiento de consumo de *N. cincta* parecería estar relacionado con el sistema de cultivo. En el FBR las células se encontraron bajo continuo movimiento y aireación, a diferencia de los cultivos *batch*, lo cual presenta ciertas ventajas. La mezcla de los líquidos causa una mayor homogeneidad entre el medio de cultivo y las células, permitiendo una utilización más eficiente de los nutrientes (Monkonsit et al., 2012). En cuanto a la aireación, ésta induce una mayor transferencia entre los elementos de la fase líquida y gaseosa del sistema (Gavrilescu y Tudose, 1998), facilitando así la remoción de metabolitos gaseosos (como el O₂) con un potencial adverso sobre el crecimiento.

La productividad de LN en el FBR (51,01 mg. L⁻¹.d⁻¹) fue cinco veces superior al valor máximo obtenido en los cultivos *batch* convencionales (9,95 mg. L⁻¹.d⁻¹ en f/2 a 20°C, durante 10 días). Por lo tanto, la combinación aquí testada entre el sistema de cultivo y las condiciones de crecimiento permitieron alcanzar una mayor productividad lipídica. Sin embargo, la producción de biomasa fue baja (144 x 10⁴ células. mL⁻¹; 0,32 g. L⁻¹). Por ejemplo, en *Navicula* spp. creciendo en FBR (de 94 cm de alto, 18 cm de diámetro interno) se determinó una producción de 1,2 g. L⁻¹ para 155 x 10⁴ células. mL⁻¹ (Silva- Aciaras y Riquelme, 2008). Muy probablemente ésta diferencia en el contenido de biomasa esté relacionada con el mayor diámetro (26 cm) del FTB columnar empleado en este trabajo de tesis, ya que la menor relación superficie iluminada y volumen del FTB estaría restringiendo la eficiencia fotosintética. Al respecto, Sánchez et al. (2000) sugieren para fotobiorreactores tubulares verticales un diámetro no mayor de 0.2 m, para evitar una reducción en la disponibilidad de luz. Por otro lado, durante ésta experiencia se observó una disminución de biomasa en relación a la limitación

del N. Una posible estrategia para maximizar la producción de LN sin afectar la biomasa, podría ser la reducción gradual en la concentración de N. Bertozzini et al. (2013) proponen una remoción periódica del medio de cultivo, con la subsiguiente incorporación del mismo medio con la mitad de la concentración de N.

Los AG determinados en *N. cincta* creciendo en medio SWES-N en el FBR se correspondieron con los anteriormente establecidos en esta especie creciendo en SWES-N, en sistemas *batch* (Capítulo 4). Sin embargo, los perfiles entre los dos sistemas de cultivo se diferenciaron en la proporción de los principales AG. En términos comparativos, *N. cincta* creciendo en el FBR presentó un incremento de los MUFA y SFA en detrimento de los PUFA (Tabla 6.4). Esto concuerda con los datos reportados para otras especies de diatomeas asociadas al envejecimiento del cultivo (Siron et al., 1989; Miller et al., 2012; Xia et al., 2013) y/o a la limitación de nutrientes (Siron et al., 1989; Gong et al., 2012; Yang et al., 2013).

Tabla 6.4: Principales constituyentes de los AGS, AGMI y AGPI de la fracción neutra en células creciendo en el FBR y en sistema *batch*. En la tabla se encuentran los desvíos estándar entre 4 réplicas. Los AG entre condiciones fueron comparados mediante ANOVA y test *LSD*. Letras asignadas alfabéticamente de menor a mayor ($p < 0.05$; $a < b$).

	Acido graso	fotobiorreactor	batch
AGS	16:0	28,93 ^b ± 0,17	25,88 ^a ± 0,07
AGMI	16:1 (n-7)	46,32 ^b ± 0,15	26,38 ^a ± 0,36
AGPI	20:5 (n-3)	10,82 ^a ± 0,19	15,63 ^b ± 0,13

6.6 Conclusiones

- 1) El sistema de cultivo en FBR y las condiciones de cultivo seleccionadas favorecieron un crecimiento sostenido de *N. cincta* hasta el día 8 de cultivo.
- 2) El cultivo en FBR favoreció la velocidad de crecimiento y la mayor asimilación de nutrientes en comparación con los sistemas *batch* realizados con el mismo medio de cultivo. Esto se manifestó en una acumulación de lípidos neutros a nivel poblacional y a nivel celular.
- 3) Para incrementar la producción de biomasa, los cultivos de *N. cincta* en FBR deberían ser cosechados al final de la fase exponencial. De esta manera se obtendrían inóculos de mayor biomasa y fisiológicamente activos, necesarios para la continuidad del proceso de obtención de aceites para biodiesel en otras unidades de cultivo, como son las piletas tipo *raceway*.
- 4) Para maximizar la producción de biomasa, se plantea la necesidad de realizar nuevas experiencias de cultivo bajo otras condiciones ambientales y/o con otros diseños de fotobiorreactores.

Síntesis y conclusiones generales

El cultivo de microalgas a nivel industrial para acuicultura y obtención de productos de alto valor agregado, como proteínas, pigmentos y sustancias antioxidantes, es una práctica que se lleva a cabo desde hace más de un siglo en algunos países. Por otro lado, la búsqueda de nuevas fuentes de energía renovables, como también, la necesidad de contar con otras fuentes de bioproductos de importancia nutraceútica y/o farmacéutica, han convertido la producción de biomasa microalgal en una temática emergente de interés mundial en diversas áreas. En la actualidad, cerca del 80% de la demanda energética mundial es satisfecha con combustibles fósiles. Sin embargo, se estima que el uso continuo de estos combustibles producirá el agotamiento de estos recursos en aproximadamente 50 años y que el futuro de la humanidad dependerá solamente de fuentes de energía renovables y ambientalmente no dañinas. Si bien la producción de biodiesel a partir de estos aceites ricos en triglicéridos (TAG) es técnicamente factible, para alcanzar una producción sustentable se requiere una reducción en los costos de producción de biomasa algal. Frente a ello, el desarrollo de tecnologías estables (optimización en la cosecha, elaboración de productos, procesos de biorrefinerías) que maximicen la producción de microalgas y minimicen los costos de operación y mantenimiento, son la clave para la comercialización exitosa de los combustibles a base de microalgas.

La metodología puesta a punto en la presente tesis, abarca un espectro de aspectos muy diversos relacionados con: 1) La selección e identificación de *Navicula cincta*, una especie de diatomea marina de hábitos bentónicos que resultó robusta frente a condiciones controladas de laboratorio. 2) La optimización de métodos espectrofotométricos y fluorimétricos de detección rápida e *in situ* de la velocidad de crecimiento, el contenido de pigmentos y la cinética de acumulación de los lípidos neutros; los cuales permitieron caracterizar períodos de crecimiento fisiológicamente activos y de acumulación de TAG bajo distintas condiciones ambientales. 3) La puesta a punto de métodos de extracción y caracterización de los aceites; que permitieron contar con datos de cantidad y calidad de los lípidos, sus fracciones y perfiles de

ácidos grasos. Se considera que toda esta información es necesaria para tener un panorama real de la calidad de los aceites para la producción de biodiesel.

4) La determinación de condiciones ambientales de base que optimizan la producción de lípidos neutros. Con respecto a esto, el medio de cultivo f/2 resultó propicio para la obtención de altos contenidos de TAG (90% de los lípidos totales) a 20°C y cosechando alrededor de los 10 días de cultivo. Bajo estas condiciones, la utilización eficiente de los nutrientes para el crecimiento, creó un escenario de limitación de P y Si que estimuló la acumulación de TAG en un corto período de tiempo. Sin embargo, para mejorar las productividades lipídicas, debería profundizarse en aspectos relacionados con la optimización de la producción de biomasa, la cual resultó escasa bajo las condiciones planteadas en esta tesis.

5) La evaluación de potenciales co-productos de valor agregado permitió determinar que *N. cincta* fue productora de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) bajo el mismo escenario ambiental que favoreció la producción de TAG. La puesta a punto de métodos de cuantificación y caracterización de EPS permitió detectar y analizar las distintas fracciones de estas sustancias y consecuentemente evaluar sus posibles aplicaciones. Por último,

6) el cultivo de la especie en un fotobiorreactor columnar de 25L con un medio cultivo (SWES-N), favoreció la velocidad de crecimiento y la asimilación de los nutrientes, en comparación con los sistemas *batch* realizados con el mismo medio de cultivo. Esto se manifestó en una acumulación de lípidos neutros a nivel poblacional y a nivel celular. Sin embargo, estos sistemas, por su alto consumo de energía, son orientados a la obtención de inóculos en un corto período de tiempo. Por lo tanto, se sugiere que los cultivos de *N. cincta* en fotobiorreactor deberían ser cosechados al final de la fase exponencial (8 días). De esta manera se obtendrían inóculos de mayor biomasa y fisiológicamente activos, los cuales son necesarios para la continuidad del proceso de obtención de aceites para biodiesel en otras unidades de cultivo, como son las piletas tipo *raceway*.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la presente tesis, el cultivo de la especie nativa y marina *Navicula cincta* se puede proponer como una fuente potencialmente útil para la producción de aceites para biodiesel y de otros bioproductos de interés industrial por las siguientes razones: 1) tiene un

tamaño relativamente pequeño, lo que incrementa su velocidad de crecimiento; 2) crece en agua de mar, un recurso que no compite con agua dulce, la cual es prioritaria para consumo humano; 3) puede crecer a bajas intensidades de luz, que es particularmente importante para el logro de cultivos energéticos sustentables; 4) puede almacenar altos contenidos de TAG en un corto período de tiempo; 5) presenta un perfil de ácidos grasos adecuado para obtener una buena calidad de biodiesel. En particular, la dominancia del ácido palmitoleico (16:1 (n-7)), el cual no es común en vegetales convencionales para biodiesel, le otorga cualidades importantes a este biocombustible en lo que respecta a su fluidez y estabilidad oxidativa; 6) producen EPS unidos a las células, que promueven la formación de *biofilm*, el cual podría ser efectivo para una cosecha de la biomasa de bajo costo energético. Usando esta propiedad, se sugiere extraer la fase acuosa por métodos de vaciado y recuperar la biomasa adherida al fondo del sistema de cultivo a través de métodos de raspado (*scraping*), una técnica convencional usada en acuicultura; 7) también libera EPS solubles (EPS-S), durante la fase estacionaria, los cuales representan un co-producto de valor agregado, que puede recuperarse fácilmente de la fase acuosa. La conformación exopolimérica de estos EPS, ricos en xilosa, manosa y *N*-acetilglucosamina podría ser usada en aplicaciones farmacéuticas en la liberación controlada de drogas o en procesos de biorremediación; y 8) además, se sugiere que las paredes celulares ricas en sílice (34% de la biomasa estimada por PSLC) representan un residuo valioso, que puede ser utilizado en diferentes industrias de acuerdo con su calidad. La producción sincrónica de TAG para biodiesel y EPS-S como co-productos de valor agregado se presenta como una alternativa novedosa en cultivos energéticos sustentables en diatomeas bentónicas.

Un esquema hipotético del cultivo de *N. cincta* en piletas tipo raceway, bajo un contexto de biorrefinerías, se presenta como una plataforma para futuros cultivos a escala piloto (Fig. 7), teniendo en cuenta, además, las ventajas de este sistema para la captura de CO₂ y consecuentemente para contribuir a la disipación del efecto invernadero a nivel regional.

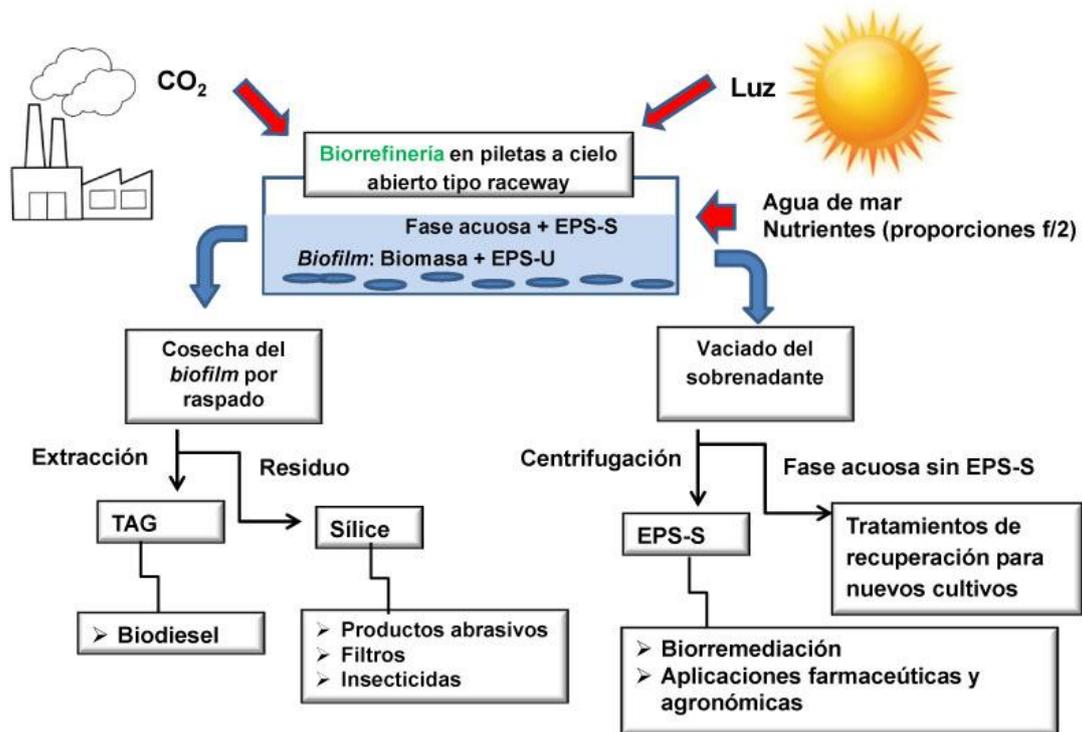


Figura 7. Esquema hipotético de cultivos de *Navicula cincta* bajo el concepto de biorrefinería

Por último, la información derivada de este trabajo representa el punto de partida para la implementación de nuevas estrategias de cultivos de la especie *Navicula cincta* con fines bioenergéticos en nuestro país, tendientes a incrementar la biomasa y el contenido lípidos; así como la obtención de co-productos de valor agregado, condiciones indispensables para lograr un proceso sustentable.

Referencias

- Ahmad AL, Yasin NH, Derek CJC, Lim JK (2011) Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: a review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 15: 584-593.
- Alcoverro T, Conte E, Mazzella L(2000) Production of mucilage by the Adriatic epipelagic diatom *Cylindrotheca closterium* (Bacillariophyceae) under nutrient limitation. *J. Phycol.* 36: 1087 – 1095.
- Apoya-Horton MD, Yin L, Underwood GJC, Gretz MR (2006) Movement modalities and responses to environmental changes of the mudflat diatom *Cylindrotheca closterium* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 42(2): 379-390.
- Apt KE, Behrens PW (1999) Commercial developments in microalgal biotechnology. *Journal of phycology* 35(2);215-226.
- Baïet B, Burel C, Saint-Jean B, Louvet R, Menu-Bouaouiche L, Kiefer- Meyer MC, Mathieu-Rivet E, Lefebvre T, Castel H, Carlier A, Cadoret JP, Lerouge P, Bardor M (2011) N-Glycans of *Phaeodactylum tricornutum* diatom and functional characterization of its N-acetylglucosaminyltransferase I enzyme. *J. Biol. Chem.* 286: 6152–6164.
- Barsanti L, Gualtieri P (2006) *Algae. Anatomy, Biochemistry & Biotechnology*. CRC Press, Taylor & Francis, Boca Raton, London 320 pp.
- Belarbi EH, Molina E, Chisti Y (2000) A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil. *Enzyme Microb. Tech.* 26: 516–529.
- Bellinger BJ, Abdullahi AS, Gretz MR, Underwood GJC (2005) Biofilm polymers: relationship between carbohydrates biopolymers from estuarine mudflats and unialgal cultures of benthic diatoms. *Aquat. Microb. Ecol.* 38:169–180.
- Bellou S, Baeshen MN, Elazzazy AM, Aggeli D, Sayegh F, Aggelis G (2014) Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives. *Biotechnol. Adv.* 32: 1476-1493.
- Bender J, Phillips P (2004) Microbial mats for multiple applications in aquaculture and bioremediation. *Bioresource Technol.* 94: 229–238.
- Berge JP, Gouygou JP, Dubacq JP, Durand P (1995) Reassessment of lipid composition of the diatom *Skeletonema costatum*. *Phytochem* 39:1017-1021.
- Bertozzini E, Galluzzi L, Ricci F, Penna A, Magnani M (2013) Neutral lipid content and biomass production in *Skeletonema marinoi* (Bacillariophyceae) culture in response to nitrate limitation. *Appl. Biochem. Biotech.* 170(7): 1624-1636.

- Bitaubé Pérez E, Caro Pina I, Pérez Rodríguez L (2008) Kinetic model for growth of *Phaeodactylum tricornutum* in intensive culture photobioreactor. *Biochem. Engineer. J.* 40(3): 520-525.
- Blanchemain A, Grizeau D (1996) Eicosapentaenoic acid content of *Skeletonema costatum* as a function of growth and irradiance; relation with chlorophyll a content and photosynthetic capacity. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 196: 177-188.
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- Borowitzka MA (1999) Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *J. Biotechnol.* 70:313–321.
- Bozarth A, Maier UG, Zauner S (2009) Diatoms in biotechnology: modern tools and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82(2):195-201.
- Brennan L, Owende P (2010) Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sust. Energ Rev.* 14(2): 557-577.
- Brown MR, Dunstan GA, Norwood SJ, Miller KA (1996) Effects of harvest stage and light on the biochemical composition of the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *J. Phycol.* 32: 64–73.
- Brown MR, Jeffrey SW, Volkman JK, Dunstan GA (1997) Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151(1): 315-331.
- Brzezinski MA (1985) The Si:C:N ratio of marine diatoms: interspecific variability and the effect of some environmental variables. *J. Phycol.* 21: 347–357.
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (2000) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. ASPP. Rockville, Maryland.
- Budge SM, Parrish CC (1999) Lipid class and fatty acid composition of *Pseudo-nitzschia multiseriis* and *Pseudo-nitzschia pungens* and effects of lipolytic enzyme deactivation. *Phytochemistry*, 52(4), 561-566.
- Calder PC (2013) Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? *Brit. J. Clin. Pharmacol.* 75(3): 645-662.
- Camacho Rubio F, Acién Fernández FG, Sánchez Pérez JA, García Camacho F, Molina Grima E (1999) Prediction of dissolved oxygen and carbon dioxide concentration profiles in tubular photobioreactors for microalgal culture. *Biotechnol. Bioeng.* 62: 71-85.
- Chaffin JD, Mishra S, Kuhaneck RM, Heckathorn SA, Bridgeman TB (2012) Environmental controls on growth and lipid content for the freshwater diatom, *Fragilaria capucina* : a candidate for biofuel production. *J. Appl. Phycol.* 24(5):1045-1051

- Chávez Medrano CI (2008) Efecto de distintas variables ambientales en la fisiología y composición bioquímica de *Navicula incerta*. Centro de investigación científica y de educación superior de Ensenada. México. Tesis 116 pp.
- Chen W, Zhang C, Song L, Sommerfeld M, Hu Q (2009) A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *J. Microbiol. Meth.* 77: 41–47.
- Chen YC (2007) Immobilization of twelve benthic diatom species for long-term storage and as feed for post-larval abalone *Haliotis diversicolor*. *Aquaculture* 263(1): 97-106.
- Chen YC (2012) The biomass and total lipid content and composition of twelve species of marine diatoms cultured under various environments. *Food Chem.* 131(1): 211-219.
- Chini Zitelli G, Rodolfi L, Bassi N, Biondi N, Tredici MR (2013). 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.
- Chiovitti A, Bacic A, Burke J, Wetherbee R (2003a) Heterogeneous xylose-rich glycans are associated with extracellular glycoproteins from the biofouling diatom *Craspedostauros australis* (Bacillariophyceae). *Eur. J. Phycol* 38: 351–360.
- Chiovitti A, Higgins M, Harper R, Wetherbee R, Bacic A (2003b) The complex polysaccharides of the raphid diatom *Pinnularia viridis* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 39 543–554.
- Chiovitti A, Molino P, Crawford SA, Teng R, Spurck T, Wetherbee R (2004) The glucans extracted with warm water from diatoms are mainly derived from intracellular chrysolaminaran and not extracellular polysaccharides. *Eur. J. Phycol.* 39: 117–128.
- Chisti Y (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25: 294–306.
- Cooksey KE, Guckert JB, Williams AS, Callisp R (1987) Fluorometric determination of the neutral lipid content of microalgal cells using Nile red. *J. Microbiol. Meth.* 6: 333-345.
- Csavina JL (2008) The Optimization of Growth Rate and Lipid Content from Select Algae Strains. Department of Civil Engineering and the Russ College of Engineering and Technology. Tesis 99 pp.
- Damiani M, Popovich C, Constenla D, Martínez AM, 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.

- De Brouwer JF, Stal LJ (2002) Daily fluctuations of exopolymers in cultures of the benthic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Nitzschia* sp. (Bacillariophyceae). J. Phycol. 38(3): 464-472.
- De Brouwer JFC, Stal LJ (2001) Short-term dynamics in microphytobenthos distribution and associated extracellular carbohydrates in surface sediments of an intertidal mudflat. Mar. Ecol. Prog. Ser. 218: 33– 44.
- De Brouwer JFC, Wolfstein K, Stal LJ (2002) Physical characterization and diel dynamics of different fractions of extracellular polysaccharides in an axenic culture of a benthic diatom. Eur. J. Phycol. 37: 37-44.
- de Castro Araujo S, Tavano Garcia VM (2005) Growth and biochemical composition of the diatom *Chaetoceros* cf. *wighamii* brightwell under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. I. Protein, carbohydrates and lipids. Aquaculture 246: 405-412.
- De Philippis R, Faraloni C, Sili C, Vincenzini M (2005) Populations of exopolysaccharide-producing cyanobacteria and diatoms in the mucilaginous benthic aggregates of the Tyrrhenian Sea (Tuscan Archipelago). Sci. Total environ. 353(1): 360-368.
- Decho AW (1990) Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes. Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev. 28: 73±153.
- Decho AW (2000) Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. Cont. Shelf Res. 20(10): 1257-1273.
- Demirel Z, Imamoglu E, Conk Dalay M (2015) Fatty acid profile and lipid content of *Cylindrotheca closterium* cultivated in air-lift photobioreactor. J. Chem. Technol. Biotechnol.
- Domingues RB, Anselmo TP, Barbosa AB, Ulrich S, Galvão HM (2011) Light as a driver of phytoplankton growth and production in the freshwater tidal zone of a turbid estuary. Estuar. Coastal Shelf S. 91: 526-535.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28: 350–356.
- Dunstan GA, Volkman JK, Barrett SM, Leroi JM, Jeffrey SW (1994) Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatom (Bacillariophyceae). Phytochemistry 35(1):155-161.
- Durrett TP, Benning C, Ohlrogge J. (2008) Plant triacylglycerols as feedstocks for the production of biofuels. Plant J. 54: 593-607.
- Edgar LA, Pickett-Heaps JD (1984) Diatom locomotion. Prog. Phycol. Res. 3: 47–88.

- Elsley D, Jameson D, Raleigh B, Cooney MJ (2007) Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids. *J. Microbiol. Meth.* 68: 639–642.
- Falkowski PG, Barber RT, Smetacek V (1998) Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. *Science* 281: 200 - 206.
- Faraloni C, De Philippis R, Sili C, Vincenzini M (2003) Carbohydrate synthesis by two *Navicula* strains isolated from benthic and pelagic mucilages in the Tyrrhenian Sea (Tuscan Archipelago). *J. Appl. Phycol.* 15(2-3): 259-261.
- Ferraro R, Gareis C, Zulaica L (2013) Aportes para la estimación de la Huella de Carbono en los grandes asentamientos urbanos de Argentina. *Cuadernos de Geografía, Revista Colombiana de Geografía, Bogotá*, 22 pp. 87 – 106.
- Field C, Behrenfeld MJ, Randerson JT, Falkowski P (1998) Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science*: 281: 237-240.
- Filisetti-Cozzi TM, Carpita NC (1991) Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Anal. Biochem.* 197: 157–162.
- Firestone D (2001) *Official Methods and Recommended Practices of AOCS*. Illinois: The American Oil Chemists' Society, AOCS, Champaign, IL
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.
- Fowler SD, Brown WJ, Warfel J, Greenspan P (1987) Use of Nile red for the rapid in situ quantitation of lipids on thin-layer chromatograms. *J. Lipid Res.* 28(10): 1225-1232.
- Francisco EC, Neves DB, Jacob-Lopes E, Franco TT (2010) Microalgae as feedstock for biodiesel production: carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. *J Chem Technol Biotechnol* 85:395–403
- Fujiki T, Taguchi S (2002) Variability in chlorophyll a specific absorption coefficient in marine phytoplankton as a function of cell size and irradiance. *J. Plankton Res.* 24(9): 859-874.
- Garay Tinoco J, Ramirez G, Betancourt J, Marín B, Cadavid B, Panizzo L, Franco A (2003) *Manual de técnicas analíticas para la determinación de parámetros fisicoquímicos y contaminantes marinos: aguas, sedimentos y organismos*. INVEMAR. Santa Marta, 148 pp. Colombia.
- Gärdes A, Ramaye Y, Grossart HP, Passow U, Ullrich MS (2012) Effects of *Marinobacter adhaerens* HP15 on polymer exudation by *Thalassiosira weissflogii* at different N: P ratios. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 461, 1-14.
- Gavrilescu M, Tudose RZ (1998) Modelling of liquid circulation velocity in concentric-tube airlift reactors. *Chem. Eng. J.* 69: 85-91.

- Gayoso AM (1981) Estudio de las diatomeas del estuario de Bahía Blanca. Doctoral Dissertation, Universidad nacional de La Plata, Argentina, 100 pp.
- Geider RJ, La Roche J (2002) Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. *Eur. J. Phycol.* 37:1-17.
- Georgianna DR, Mayfield SP (2013) Exploiting diversity and synthetic biology for the production of algal biofuels. *Nature* 488: 329 – 335.
- Gil-Campos M, Serra JD, Comité de Nutrición de la Asociación Española de Pediatría (2010) Importancia del ácido docosahexaenoico (DHA): funciones y recomendaciones para su ingesta en la infancia. *Anales de Pediatría* 73(3): 142e1-142e8.
- Goericke R, Montoya JP (1998) Estimating the contribution of microalgal taxa to chlorophyll a in the field - variations of pigment ratios under nutrient- and light-limited growth. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 169: 97-112.
- Göksan T, Durmaz Y, Gökpınar S (2003) Effects of light path lengths and initial culture density on the cultivation of *Chaetoceros muelleri* (Lemmermann, 1898). *Aquaculture* 217 (1): 431–436.
- Gong Y, Guo X, Wan X, Liang Z, Jiang M (2013) Triacylglycerol accumulation and change in fatty acid content of four marine oleaginous microalgae under nutrient limitation and at different culture ages. *J. Basic microbial.* 53(1): 29-36.
- Gould H, Beisson F, Peltier G, Li-Beisson Y (2015) Microalgal lipid droplets: composition, diversity, biogenesis and functions. *Plant cell reports* 34(4): 545-555.
- Graham L, Graham J, Wilcox L (2009) *Algae*, 2e. Benjamin Cummings (Pearson), San Francisco, CA.
- Granum E, Myklestad SM (2002) LIPIDOS A simple combined method for determination of β -1, 3-glucan and cell wall polysaccharides in diatoms. *Hydrobiologia* 477(1-3). 155-161.
- Griffiths MJ, Garcin C, van Hille RP, Harrison ST (2011) Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *J. Microbiol. Meth.* 85(2):119-123.
- Griffiths MJ, Harrison ST (2009). Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J. Appl. Phycol.* 21: 493-507.
- Guerrini, F, Cangini M, Boni L, Trost P, Pistocchi R (2000) Metabolic responses of the diatom *Achnanthes brevipes* (Bacillariophyceae) to nutrient limitation. *J. Phycol.* 36: 882 – 890.
- Guihéneuf F, Fouqueray M, Mimouni V, Ulmann L, Jacquette B, Tremblin G (2010) Effect of UV stress on the fatty acid and lipid class composition in two marine

- microalgae *Pavlova lutheri* (Pavlovophyceae) and *Odontella aurita* (Bacillariophyceae). *J. Appl. Phycol.* 22(5): 629-638.
- Guillard RRL (1973) Division rates. In: Stein JR (ed) Handbook of psychological methods: culture methods and growth measurements. Cambridge University Press, Cambridge, pp 289–311.
- Gupta P, Veermani K, Garg S (2002) Hydrogels: from controlled release to pH responsive drug delivery. *Drug Discov. Today* 7: 569–579.
- Gurr MI, Harwood JL, Frayn KN (2002) Lipid Biochemistry: An Introduction, 5th ed.; Blackwell: Oxford, UK. 320 pp.
- Guschina IA, Harwood JL (2009) Algal lipids and effect of the environment on their biochemistry. In Lipids in aquatic ecosystems (pp. 1-24). Springer New York.
- Guschina IA, Harwood JL (2013) Algal lipids and their metabolism. En: Borowitzka MA, Moheimani N.R. (Eds.) Algae for biofuels and energy, developments in applied phycology. Springer, The Netherlands. pp. 17-36.
- Hargraves, P. E. (1982) Plankton Diatoms (Bacillariophyceae) from Carrie Bow Cay, Belize. *Smithsonian Contrib. Marine Sci.* 12: 153-166.
- Hendey NI (1965) An Introductory Account of the Smaller Algae of British Coastal Waters. Part V. Bacillariophyceae (Diatoms). *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 45, pp 798-798.
- Hildebrand M, Davis AK, Smith SR, Traller JC, Abbriano R (2012) The place of diatoms in the biofuels industry. *Biofuels* 3(2): 221-240.
- Hoagland KD, Rosowski JR, Gretz MR, Roemer SC (1993) Diatom extracellular polymeric substances: function, fine structure, chemistry, and physiology. *J. Phycol.* 29(5): 537-566.
- Hoshaw RW, Rosowski JR (1973) Methods for microscopic algae. En Handbook of Phycological Methods. Culture Methods & Growth Measurements (Ed.J. R. Stein), Cambridge Univ. Press. 26-51 pp
- Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M, Darzins A (2008) Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 54:621-639.
- Hustedt F (1930) Bacillariophyta. – In: A. Pascher (ed.): Die Süßwasserflora Mitteleuropas 10. – Jena
- Iverson SJ, Lang SLC, Cooper MH (2001) Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. *Lipids* 36:1283-1287.

- Janssen M, de Winter M, Tramper J, Mur L, Snel J, Wijffels R (2000) Efficiency of light utilization of *Chlamydomonas reinhardtii* under medium-duration light/dark cycles. *J Biotechnol* 78: 123-37.
- Jeffery SW, Wright SW (1999) Photosynthetic pigments in the Haptophyta. En: Cohen Z (Ed) *Chemical from microalgae*. Taylor and Francis, Philadelphia, pp 111–132.
- Jeffrey SW, Garland CD, Brown MR (1990) Microalgae in Australian mariculture. In: Clayton MN, King RJ _Eds, *Biology of Marine Plants*. Longman Cheshire, Melbourne, pp. 400–414.
- Jeffrey SW, Vesik M (1997) Introduction to marine phytoplankton and their pigment signatures. En: Jeffrey SW, Mantoura RFC y Wright SW (eds) *Phytoplankton Pigments in Oceanography*, UNESCO (Paris) 37-84.
- Jeffrey C, Rosenberger J, Rorrer GL (2013) Fed-batch cultivation and bioprocess modeling of *Cyclotella* sp. for enhanced fatty acid production by controlled silicon limitation. *Algal Res.* 2(1): 16-27.
- Jiang Y, Lavery KS, Brown J, Brown L, Chagoya J, Burow M, Quigg A (2014) Effect of silicate limitation on growth, cell composition, and lipid production of three native diatoms to Southwest Texas desert. *J. Appl. Phycol.* DOI 10.1007/s10811-014-0463-7
- Kates M, Volcani BE (1966) Lipids of diatoms *Biochim. Biophys. Acta* 116,264.
- Kattner G, Gerken G, Eberlein K (1983) Development of lipids during a spring plankton bloom in the northern Sea. I. Particulate fatty acids. *Mar Chem* 14:149-162.
- Knothe G (2005) Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Process Technol* 86:1059-1070.
- Knothe G (2008) “Designer” biodiesel: optimizing fatty ester composition to improve fuel properties. *Energy Fuels* 22:1358–1364
- Krienitz L, Wirth M (2006) The high content of polyunsaturated fatty acids in *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae) and its implication for food web interactions, freshwater aquaculture and biotechnology. *Limnol. Ecol. Management Inland Waters* 36(3): 204-210.
- Lang X, Dalai AK, Bakhshi NN, Reaney MJ, Hertz PB (2001) Preparation and characterization of bio-diesels from various bio-oils. *Biores.Technol.* 80: 53–62.
- Lange-Bertalot H (2001) *Diatoms of European Inland Waters and Comparable Habitats* (Ed.). Vol. 2. Alemania. pp. 177-201.
- Leandro SM, Gil MC, Delgadillo I (2003). Partial characterisation of exopolysaccharides exuded by planktonic diatoms maintained in batch cultures. *Acta Oecol* 24: S49-S55.

- Lebeau T, Robert Y (2003a). Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part I: cultivation at various scales. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 60: 612-623.
- Lebeau T, Robert Y, (2003b). Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part II: current and putatives products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 624-632.
- Lee SJ, Go S, Jeong GT, Kim SK (2011) Oil production from five marine microalgae for the production of biodiesel. *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* 16:561–56.
- Lee SJ, Yoon BD, Oh HM (1998) Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*. *Biotechnol. Tech.* 12: 553–556.
- Leonardi PI, 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.
- Leppard GG (1997) Colloidal organic fibrils of acid polysaccharides in surface waters: electron-optical characteristics, activities and chemical estimates of abundance. *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 120(1):1-15.
- Leu S, Boussiba S (2014) Advances in the production of high-value products by microalgae. *Ind. Biotechnol.* 10: 169-183.
- Levitan O, Dinamarca J, Hochman G, Falkowski PG (2014) Diatoms: a fossil fuel of the future. *Trends Biotechnol.* 32(3): 117-124.
- Lewin JC, Guillard RR (1963) Diatoms. *Ann. Rev. Microbiol.* 17: 373–414.
- Liang Z, Wenhong L, Shangyuan Y, Ping D (2010) Extraction and structural characteristics of extracellular polymeric substances (EPS), pellets in autotrophic nitrifying biofilm and activated sludge. *Chemosphere* 81: 626–632.
- Liu W, Huang Z, Li P, Xia J, Chen B (2012) Formation of triacylglycerol in *Nitzschia closterium f. minutissima* under nitrogen limitation and possible physiological and biochemical mechanisms. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 418: 24-29.
- Lombardi AT, Wangersky PJ (1995) Particulate Lipid Classs Composition of Three Marine Phytoplankters *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* (Tahiti) and *Dunaliella tertiolecta* Grown in Batch Culture. *Hydrobiologia* 306: 1-6.
- Lopez Alonso L, Belarbi EH, Fernandez Sevilla JM, Rodriguez Ruiz J, Grima EM (2000) Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga *Phaeodactylum tricorutum*. *Phytochem.* 54:461–471.
- Lopez PJ, Descles J, Allen AE, Bowler C (2005) Prospects in diatom research. *Curr. Opin. Biotech.* 16(2): 180-186.

- Lowman AM (2000) Complexing polymers in drug delivery, in: D.L. Wise (Ed.), Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology, Marcel Dekker Inc., New York, 2000, pp. 89–98.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265–75.
- Lundkvist M, Gangelhof U, Lunding J, Flindt MR (2007) Production and fate of extracellular polymeric substances produced by benthic diatoms and bacteria: a laboratory study. *Estuar. Coast. Shelf S.* 75(3): 337-346.
- MacIntyre HL, Cullen JJ (2005) Using cultures to investigate the physiological ecology of microalgae. In *Algal Culturing techniques* (Ed.) Andersen RA, pp 287-326. Academic press.
- Madrid RE, Felice CJ (2005) Microbial biomass estimation. *Crit. Rev. Biotechnol.* 25: 97-112.
- Magaletti E, Urbani R, Sist P, Ferrari CR, Cicero AM (2004) Abundance and chemical characterization of extracellular carbohydrates released by the marine diatom *Cylindrotheca fusiformis* under N-and P-limitation. *Eur. J. Phycol.* 39(2):133-142.
- Mann JE, Myers J (1968) On pigments, growth and photosynthesis of *Phaeodactylum tricorutum*. *J. Phycol.* 4: 349-55.
- Mansour MP, Frampton DMF, Nichols PD, Volkman JK, Blackburn SI (2005) Lipid and fatty acid yield of nine stationary-phase microalgae: Applications and unusual C24–C28 polyunsaturated fatty acids. *J. Appl. Phycol.* 17: 287-300.
- Martin-Jézéquel V, Hildebrand M, Brzezinski MA (2000) Silicon metabolism in diatoms: implications for growth. *J Phycol* 36: 821 – 840.
- Massart DL, Vandeginste BGM, Buydens LMC, De Jong S, Lewi PJ, Smeyers-Verbeke J (1997) Handbook of chemometrics and qualimetrics. Elsevier Science B.V, Amsterdam. pp. 171-230.
- Mata TM, Martins AA, Caetano NS (2010) Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 14: 217–232.
- Matias-Peralta HM, Yusoff FM, Shariff M, Mohamed S (2012). Reproductive performance, growth and development time of a tropical harpacticoid copepod, *Nitocra affinis californica* Lang, 1965 fed with different microalgal diets. *Aquaculture* 344: 168-173.
- Matsumoto M, Sugiyama H, Macda Y, Sato R, Tanaka T, Matsunaga T (2010) Marine Diatom *Navicula* sp. Strain JPCC DA0580 and Marine Green Alga, *Chlorella* sp. Strain NKG400014 as Potential Sources for Biodiesel Production. *Appl. Biochem. Biotech.* 161: 483-490.

- McGinnis KM, Dempster TA, Sommerfeld MR (1997) Characterization of the growth and lipid content of the diatom *Chaetoceros muelleri*. J. Appl. Phycol. 9: 19-24.
- Méléder V, Barillé L, Launeau P, Carrère V, Rincé Y (2003) Spectrometric constraint in analysis of benthic diatom biomass using monospecific cultures. Remote Sens. Environ. 88 (4): 386-400.
- Mendoza Guzmán H, de la Jara Valido A, Carmona Duarte L, Freijanes Presmanes K (2011) Analysis of interspecific variation in relative fatty acid composition: use of flow cytometry to estimate unsaturation index and relative polyunsaturated fatty acid content in microalgae. J. Appl. Phycol. 23:7–15.
- Miller MR, Quek S-Y, Staehler K, Nalder T, Packer M A (2014), Changes in oil content, lipid class and fatty acid composition of the microalga *Chaetoceros calcitrans* over different phases of batch culture. Aquaculture Res. 45: 1634-1647.
- Moazami N, Ranjbar R, Ashori A, Tangestani M, Nejad AS (2011) Biomass and lipid productivities of marine microalgae isolated from the Persian Gulf and the Qeshm Island. Biomass Bioenerg. 35(5): 1935-1939.
- Molina Grima E, Robles Medina A, Giménez Giménez A, Ibañez González MJ (1996). Gram-scale purification of eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) from wet *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 640 biomass. J Appl Phycol 8:359–367.
- Moll KM, Gardner RD, Eustance EO, Gerlach R, Peyton BM (2014) Combining multiple nutrient stresses and bicarbonate addition to promote lipid accumulation in the diatom RGd-1. Algal Res. 5: 7-15.
- Monkonsit S, Powtongsook S, Pavasant P (2011) Comparison between airlift photobioreactor and bubble column for *Skeletonema costatum* cultivation. Eng. J. 15:53–64.
- Moreno VJ, de Moreno JE, Brenner RR (1979) Biosynthesis of unsaturated fatty acids in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. Lipids 14(1): 15-19.
- Morrison WR, Smith LM (1964) Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride–methanol. Journal of lipid research 5(4): 600-608.
- Murphy J, Riley IP (1962) A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Analytica Chimica Acta 27:31-36. Department of Oceanography. University of Liverpool, England.
- Myklestad (1974) Production of carbohydrates by marine planktonic diatoms. 1. Comparison of 9 different species in culture. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 15:261–274.
- Myklestad S (1977) Production of carbohydrates by marine planktonic diatoms. 2. Influence of N-P ratio in growth medium on assimilation ratio, growth rate, and

- production of cellular and extracellular carbohydrates by *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt and *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 29: 161–179.
- Myklestad S, Holm-Hansen O, Varum KM, Volcani BE (1989) Rate of release of extracellular amino acids and carbohydrates from the marine diatom *Chaetoceros affinis*. J. Plankton Res. 11:763–773.
- Nigam Singh P, Singh A (2011) Production of liquid biofuels from renewable resources. Prog. Energ. Combust. 37: 52-68.
- Norsker N, Barbosa M, Vermue RH, Wijffels (2011) Microalgal production-a close look at the economics. Biotechnol. Adv. 29: 24-27.
- Pacheco Vega JM, Cadena Roa MA, Sánchez Saavedra MP, Tovar Ramírez D, Dávalos CR (2010) Effect of culture medium and nutrient concentration on fatty acid content of *Chaetoceros muelleri*. Rev. Latinoam. Biotechnol. Amb. Algal 1(1): 6-15.
- Pal A, Paul AK (2008) Microbial extracellular polymeric substances: central elements in heavy metal bioremediation. Indian Journal of Microbiology 48: 49–64.
- Pienkos PT, Darzins A (2009) The promise and challenges of microalgal-derived biofuels. Biofuels Bioprod. Bioref. 3: 431–440.
- Pistocchi R, Trigari G, Serrazanetti GP, Taddei P, Monti G, Palamidessi S, Guerrini F, Bottura G, Serratore P, Fabbri M, Pirini M, Ventrella V, Pagliarani A, Boni L, Borgatti AR (2005) Chemical and biochemical parameters of cultured diatoms and bacteria from the Adriatic Sea as possible biomarkers of mucilage production. Sci Total Environ 353: 287- 299.
- Popovich CA (2004) Fitoplancton. En Piccolo MC, Hoffmeyer MS (Eds.) Editorial de la Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca (Argentina). pp. 91-100.
- Popovich CA, Damiani C, Constenla D, Leonardi PI (2012) Lipid quality of the diatoms *Skeletonema costatum* and *Navicula gregaria* from the South Atlantic Coast (Argentina): evaluation of its suitability as biodiesel feedstock. J. Appl. Phycol. 24(1): 1-10.
- Popovich CA, Marcovecchio JE (2008) Spatial and temporal variability of phytoplankton and environmental factors in a temperate estuary of South America (Atlantic coast, Argentina). Cont. Shelf Res. 28: 236-244.
- Porta Vales A (2009) Optimización del cultivo de diatomeas bentónicas para el cultivo de post- larvas de abalón (*Haliotis tuberculata coccinea* Reeve, 1846). V Master Universitario Internacional en acuicultura. Las Palmas de Gran Canaria, España. 102 pp.

- Priscu JC, Priscu LR, Palmesano AC, Sullivan CW (1990) Estimation of neutral lipid levels in Antarctic sea ice microalgae by Nile red fluorescence. *Antarct. Sci.* 2:149-155.
- Pulz O, Scheibbogen K (1998) Photobioreactors: design and performance with respect to light energy input. En: Scheper T (Ed) *Advances in biochemical engineering biotechnology*. Springer, Berlin, pp 123–152.
- Puskarić S, Mortain-Bertrand A (2003) Physiology of diatom *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve photosynthetic extracellular release: evidence for a novel coupling between marine bacteria and phytoplankton. *J. Plankton Res.* 25: 1227-1235.
- Ramesh A, Lee DJ, Hong SG (2006) Soluble microbial products (SMP) and soluble extracellular polymeric substances (EPS) from wastewater sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73: 219–225.
- Ramos MJ, Fernández CM, Casas A, Rodríguez L, Pérez Á (2009) Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Biores. Technol.* 100(1): 261-268.
- Rawat I, Ranjith Kumar R, Mutanda T, Bux F (2013) Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Appl. Ener.* 103: 444-467.
- Redfield AC (1934) On the proportions of organic derivations in sea water and their relation to the composition of plankton. En James Johnstone Memorial Volume. (ed. R.J. Daniel). University Press of Liverpool, pp. 177–192.
- Reid MA, Tibby JC, Penny D, Gell PA (1995) The use of diatoms to assess past and present water quality. *Aust. J. Ecol* 20, 57–64.
- Reitan KI, Rainuzzo JR, Oie G, Olsen Y (1997) A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae. *Aquaculture* 155: 207–221.
- Reitan KI, Rainuzzo JR, Olsen Y (1994) Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine Microalgae1. *J. Phycol.* 30(6): 972-979.
- Renaud SM, Thinh LV, Lambrinidis G, Parry DL (2002) Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture* 211(1): 195-214.
- Renaud SM, Zhou HC, Parry DL, Loung-Van T, Woo KC (1995) Effect of temperature on the growth, total lipid content and fatty acid composition of recently isolated tropical microalgae *Isochrysis* sp., *Nitzschia closterium*, *Nitzschia paleacea*, and commercial species *Isochrysis* sp., (clone T.ISO). *J. Appl. Phycol.* 7: 595-602.
- Richmond A (2000) Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: A personal view. *J. Appl. Phycol.* 12: 441–451.

- Richmond A (2004) Handbook of Microalgal Culture: Biotech. Appl. Phycol. Blackwell Science, Oxford, UK.
- Ritchie RJ (2006) Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynth. Res.* 89: 27-41.
- Ritchie RJ (2008). Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c, and d and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. *Photosynthetica* 46(1): 115-126.
- 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, Bassi N, Padovani G, Biondi N, Bonini G, Tredici MR (2009) Microalgae for Oil: Strain Selection, Induction of Lipid Synthesis and Outdoor Mass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor. *Biotechnol Bioeng* 102: 100-112.
- Roessler P (1990) Environmental control of glycerolipids metabolism in microalgae: commercial implications and future research directions. *J. Phycol.* 26: 393-399.
- Roessler PG (1988) Changes in the activities of various lipid and carbohydrate biosynthetic enzymes in the diatom *Cyclotella cryptica* in response to silicon deficiency. *Arch. Biochem. Biophys.* 267(2): 521-528.
- Roessler PG (1990) Environmental control of glycerolipid metabolism in microalgae: commercial implications and future research directions. *J. Phycol.* 26: 393-399.
- Roleda MY, Slocombe SP, Leakey RJ, Day JG, Bell EM, Stanley MS (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. *Bioresource Technol.* 129: 439-449.
- Ross R, Cox EJ, Karayeva NI, Mann DG, Paddock TBB, Simonsen R, Sims PA (1979) An amended terminology for the siliceous components of the diatom cell. *Nova Hedwigia (Beih.)* 64: 511-533.
- Ryckebosch E, Muylaert K, Foubert I (2012) Optimization of an analytical procedure for extraction of lipids from microalgae. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 89(2): 189-198.
- Sánchez, A., F. García, A. Contreras, E. Molina, Y. Chisti. 2000. Bubble-Column and Airlift Photobioreactors for Algal Culture. *AIChE J.* 46(9): 1872-1887.
- Sanjay KR, Nagendra PMN, Anupama S, Yashaswi BR, Deepak B (2013) Isolation of diatom *Navicula cryptocephala* and characterization of oil extracted for biodiesel production. *Afr. J. Environ. Science Tech.* 7(1): 41-48.
- Sarthou G, Timmermans KR, Blain S, Tréguer P (2005) Growth physiology and fate of diatoms in the ocean: a review. *J. Sea Res.* 53(1): 25-42.

- 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.
- Scholz B, Liebezeit G (2013) Biochemical characterisation and fatty acid profiles of 25 benthic marine diatoms isolated from the Solthörn tidal flat (southern North Sea). *J. Appl. Phycol.* 25(2): 453-465.
- Schwenk D, Seppälä J, Spilling K, Virkki A, Tamminen T, Oksman-Caldentey KM, Rischer H (2013) Lipid content in 19 brackish and marine microalgae: influence of growth phase, salinity and temperature. *Aquat. Ecol.* 47(4): 415 - 424.
- Šesták Z (1971) Determinations of chlorophylls a and b. – En: Šesták, Z., Čatský, J., Jarvis, P.G. (Ed.): *Plant Photosynthetic Production: Manual of Methods*. Pp. 672-701. Dr W. Junk N.V. Publ. The Hague.
- Sheehan J, Dunahay T, Benemann J, Roessler PG (1998) US Department of Energy's Office of Fuels Development, July 1998. A Look Back at the US Department of Energy's Aquatic Species Program – Biodiesel from Algae, Close Out Report TP-580-24190. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory.
- Sierra E, Acien FG, Fernandez JM, Garcia JL, Gonzalez C, Molina E (2008) Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae. *Chem. Eng. J.* 138: 136–147.
- Silva Aciaras FR, Riquelme CE (2008) Comparisons of the growth of six diatom species between two configurations of photobioreactors. *Aquac. Eng.* 38(1): 26-35.
- Silva Benavides AM, Torzillo G, Kopecký J, Masojídek J (2013) Productivity and biochemical composition of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) cultures grown outdoors in tubular photobioreactors and open ponds. *Biomass Bioenerg.* 54: 115–122.
- Simonsen R (1972) Ideas for a more natural system of the centric diatoms. *Nova Hedwigia (Beih.)* 39: 37-54.
- Singh J, Gu S (2010) Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renew. Sust. Energ. Revi.* 14(9): 2596-2610.
- Siron R, Giusti G, Berland B (1989) Changes in the fatty acid composition of *Phaeodactylum tricornutum* and *Dunaliella tertiolecta* during growth and under phosphorus deficiency. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 55: 95-100.
- Smayda TJ (1983) Phytoplankton ecology course. Graduate School of Oceanography, University of Rhode Island.
- Smith DJ, Underwood GJC (1998). Exopolymer production by intertidal epipellic diatoms. *Limnol. Oceanogr.* 43(7):1578-1591.

- Smith DJ, Underwood GJC (2000) The production of extracellular carbohydrates by estuarine benthic diatoms: the effects of growth phase and light and dark treatment. *J. Phycol* 36: 321–333.
- Sokal RR, Rohlf FJ (1999) *Introducción a la Bioestadística*. Editorial Reverté SA, Barcelona, España.
- Solomon JA, Hand RE, Mann RC (1986) Ultrastructural and flow cytometry analyses of lipid accumulation in microalgae. *SERI-TECHNICAL Monitor-231-3089*. U.S Department Of Energy.
- Song M, Pei H, Hu W, Ma G (2013) Evaluation of the potential of 10 microalgal strains for biodiesel production. *Bioresource technology* 141: 245-251.
- Sorokin C (1973) Dry weight, packed cell volume and optical density. En Stein, J. R. (Ed.), *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 321-343.
- Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A (2006) Commercial applications of microalgae. *J. Biosc. Bioeng.* 101(2): 87-96.
- Staats N, De Winder B, Stal L, Mur L (1999) Isolation and characterization of extracellular polysaccharides from the epipelagic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Navicula salinarum*. *Eur. J. Phycol* 34: 161–169.
- Staats N, Stal LJ, de Winder B, Mur LR (2000) Oxygenic photosynthesis as driving process in exopolysaccharide production of benthic diatoms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 193: 261±269.
- Stoermer EF, Smol JP (2004) *The diatom applications for the Environment and Earth Sciences*. Cambridge University Press, 469 pp.
- Strickland JDH, Parsons TR (1972) *A practical Handbook of Sea Water Analysis*. 2nd Ed. Bull. Fish. Res. Bd. Canadá 268 pp.
- Tadros MG, Johansen JR (1988) Physiological characterization of six lipid-producing diatoms from the southeastern United States. *J. Phycol.* 24: 445-452.
- Takahashi E, Ledauphin J, Goux D, Orvain F (2009) Optimizing extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from benthic diatoms: comparison of the efficiency of six EPS extraction methods. *Mar. Freshwater Res.* 60: 1201–1210.
- Talebi AF, Mohtashami SK, Tabatabaei M, Tohidfar M, Bagheri A, Zeinalabedini M, Bakhtiari S (2013) Fatty acids profiling: a selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production. *Algal Research* 2(3): 258-267.
- Talling JF, 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 Hawaii TID-76, 33: 142-146.
- Thompson GA (1996) Lipids and membrane function in green algae. *Biochim. Biophys. Acta* 1302: 17-45.
- Tredici MR (2004) Mass production of microalgae: photobioreactors. *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*. 1: 178-214.
- Trequer P, Nelson DM, Van Bennekom AJ, DeMaster DJ, Leynaert A, Queguiner B (1995) The silica balance in the world ocean: a reestimate. *Science* 268: 375–379.
- Ugalde SC, Meiners KM, Davidson AT, Westwood KJ, McMinn A (2013) Photosynthetic carbon allocation of an Antarctic sea ice diatom (*Fragilariopsis cylindrus*). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 446: 228-235.
- Underwood GJC (1994) Seasonal and spatial variation in epipellic diatom assemblages in the Severn estuary. *Diatom Res.* 9(2): 451-472.
- Underwood GJC, Boulcott M, Raines CA, Waldron K (2004) Environmental effects on exopolymer production by marine benthic diatoms: dynamics, changes in composition, and pathways of production. *J. Phycol.* 40(2): 293-304.
- Underwood GJC, Paterson DM (2003) The importance of extracellular carbohydrate production by marine epipellic diatoms. *Adv. Bot. Res.* 40: 184–240.
- Urbani R, Magaletti E, Sist P, Cicero AM (2005) Extracellular carbohydrates released by the marine diatoms *Cylindrotheca closterium*, *Thalassiosira pseudonana* and *Skeletonema costatum*: effect of p-depletion and growth status. *Sci. Total Environ* 353: 300–306.
- Urbani R, Sist P, Pletikapić G, Radić TM, Svetličić Žutić V (2012) Diatom Polysaccharides: Extracellular Production, Isolation and Molecular Characterization, in: D.N. Karunaratne (Ed.), *The Complex World of Polysaccharides*, Intech, Croatia pp. 345–370.
- Valenzuela J, Carlson RP, Gerlach R, Cooksey K, Peyton BM, Bothner B, Fields MW (2013) Nutrient resupplementation arrests bio-oil accumulation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97(15): 7049-7059.
- Valenzuela J, Mazurie A, Carlson RP, Gerlach R, Cooksey KE, Peyton BM, Fields MW (2012) Potential role of multiple carbon fixation pathways during lipid accumulation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Biotechnol. Biofuels* 5(1): 40.
- Waite AM, Olson RJ, Dam HG, Passow U (1995) Sugar-containing compounds on the cell surfaces of marine diatoms measured using concanavalin A and flow cytometry. *J. Phycol.* 31: 925–933.

- Weldy CS, 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(1): 115-122.
- Wijffels RH, Barbosa MJ (2010) An outlook on microalgal biofuels. Science 329: 796 - 799.
- Wilhelm C, Büchel C, Fisahn J, Goss R, Jakob T, LaRoche J, Lavaud J, Lohr M, Riebesell U, Stehfest K, Valentin K, Kroth PG (2006) The regulation of carbon and nutrient assimilation in diatoms is significantly different from green algae. Protist 157(2): 91-124.
- Wilhelm C, Manns L (1991) Changes in pigmentation of phytoplankton species during growth and stationary phase - consequences for reliability of pigment-based methods of biomass determination. J. Appl. Phycol. 3: 305-310.
- Wolfstein K, Stal LJ (2002) Production of extracellular polymeric substances (EPS) by benthic diatoms: the effect of irradiance and temperature. Mar. Ecol. Prog. Ser. 236: 13–22.
- Wong DM, Franz AK (2013) A comparison of lipid storage in *Phaeodactylum tricornutum* and *Tetraselmis suecica* using laser scanning confocal microscopy. J. Microbiol. Meth 95(2): 122-128.
- Wood AM, Everroad RC, Wingard LM (2005) Measuring growth rates in microalgal cultures. En Algal Culturing techniques (Ed.) Andersen RA, pp 269-285. Academic press.
- World Energy Outlook (2013). IEA: international Energy Agency. Paris, Francia. 676 pp.
- Wustman BA, Gretz MR, Hoagland KD (1997) Extracellular matrix assembly in diatoms (Bacillariophyceae) I. A model of adhesives based on chemical characterization and localization of polysaccharides from the marine diatom *Achnanthes longipes* and other diatoms. Plant Physiol. 113: 1059-1069.
- Xia S, Wan L, Li A, Sang M, Zhang C (2013) Effects of nutrients and light intensity on the growth and biochemical composition of a marine microalga *Odontella aurita*. Chinese Journal of Oceanology and Limnology 31:1163-1173.
- Xing R, Wang C, Cao X, Chang Y (2007) The potential value of different species of benthic diatoms as food for newly metamorphosed sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. Aquaculture 263: 142–149.
- Xu C, Santschi PH, Schwehr KA, Hung C-C (2009) Optimized isolation procedure for obtaining strongly actinide binding exopolymeric substances (EPS) from two bacteria (*Sagittula stellata* and *Pseudomonas fluorescens* Biovar II). Bioresour. Technol. 100: 6010–6021.

- Yang R, Wang X, Zhang Y, Zhan Y (2006) Influence of cell equivalent spherical diameter on the growth rate and cell density of marine phytoplankton. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 331: 33-40.
- Yang ZK, Niu YF, Ma YH, Xue J, Zhang MH, Yang WD, Li HY (2013) Molecular and cellular mechanisms of neutral lipid accumulation in diatom following nitrogen deprivation. *Biotechnol. Biofuels* 6(67): 1-67.
- Yoder JA (1979) A comparison between the cell division rate of natural populations of the marine diatom *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve grown in dialysis culture and that predicted from a mathematical model. *Limnol. Oceanogr.* 24(1): 97-106.
- Yu ET, Zendejas FJ, Lane PD, Gaucher S, Simmons BA, Lane TW (2009) Triacylglycerol accumulation and profiling in the model diatoms *Thalassiosira pseudonana* and *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) during starvation. *J. Appl. Phycol.* 21(6): 669-681.
- Zhu CJ, Lee YK (1997) Determination of biomass dry weight of marine microalgae. *J. Appl. Phycol.* 9(2): 189-194.
- Zhukova NV, Aizdaicher NA (1995) Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. *Phytochemistry* 39(2): 351-356.