

Universidad de Huelva

Departamento de Química y Ciencia de los Materiales



Evaluación del enriquecimiento en lípidos de valor energético en microalgas

Memoria para optar al grado de doctora
presentada por:

María del Carmen Ruiz Domínguez

Fecha de lectura: 2 de noviembre de 2013

Bajo la dirección de los doctores:

Carlos Vílchez Lobato
Benito A. de la Morena Carretero

Huelva, 2013



Tesis Doctoral

**EVALUACIÓN DEL
ENRIQUECIMIENTO EN LÍPIDOS
DE VALOR ENERGÉTICO EN
MICROALGAS**

**Programa de Doctorado
CIENCIA Y TECNOLOGÍA QUÍMICA**



**Universidad
de Huelva**

María del Carmen Ruiz Domínguez



Universidad
de Huelva



UNIVERSIDAD DE HUELVA

Departamento de Química y Ciencia de los Materiales
"Profesor José Carlos Vílchez Martín"

INSTITUTO NACIONAL DE TÉCNICA AEROESPACIAL (INTA)
COMPAÑÍA ESPAÑOLA DE PETROLEOS (CEPSA)

EVALUACIÓN DEL ENRIQUECIMIENTO EN LÍPIDOS DE VALOR ENERGÉTICO EN MICROALGAS

Programa de Doctorado
CIENCIA Y TECNOLOGÍA QUÍMICA

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por:
María del Carmen Ruiz Domínguez

Trabajo realizado bajo la dirección de:

Dr. Carlos Vílchez Lobato
Catedrático de Universidad en
Bioquímica y Biología Molecular

Dr. Benito A. de la Morena Carretero
Jefe de la Estación de Sondeos
Atmosféricos "El Arenosillo" del INTA



Universidad
de Huelva

AUTORIZACIÓN PARA LA DEFENSA DE LA TESIS DOCTORAL EMITIDA POR EL/LA DIRECTOR/A Y EL/LA TUTOR/A Y POR LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO

DATOS DEL/ DE LA DOCTORANDO/A:

Apellidos y nombre: RUIZ DOMINGUEZ MARÍA DEL CARMEN	NIF/ NIE/Pasaporte: 28612018 H	Nacionalidad: ESPAÑOLA
Dirección a efectos de notificaciones: LUIS MONTOTO 141 1ºB CP. 41007 - SEVILLA -		
Teléfono: 677 329505 / 954 571039	EMAIL: mcarmen.ruiz@ciecema.uhu.es // macarudo@hotmail.com	

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL:

Título: EVALUACIÓN DEL ENRIQUECIAMIENTO EN LÍPIDOS DE VALOR ENERGÉTICO EN MICROALGAS
Programa Oficial de Doctorado al que se adscribe y órgano responsable: CIENCIA Y TECNOLOGÍA QUÍMICA. Departamento de Química y Ciencia de los Materiales "Prof. J.C. Vilchez Martín"
Línea de investigación a la que se adscribe y órgano responsable: EXPERIMENTACIÓN BIOTECNOLÓGICA APLICADA A LA FOTOPRODUCCIÓN Y AL ESTRÉS ABIÓTICO EN MICROALGAS. Departamento de Química y Ciencia de los Materiales "Prof. J.C. Vilchez Martín"

A CUMPLIMENTAR POR EL/LA DIRECTOR/A Y POR EL/LA TUTOR/A DE LA TESIS DOCTORAL: (en caso de que el/la Director/a y el/la Tutor/a sean la misma persona, no es necesario cumplimentar los campos relativos al Tutor/a ni se precisa la firma de éste/a)

Director/a: Dr./Dra.: CARLOS VILCHEZ LOBATO Dr./Dra.: BENITO A. DE LA MORENA CARRETERO Dr./Dra.:	Tutor/a: Dr./Dra.: CARLOS VILCHEZ LOBATO Dr./Dra.: Dr./Dra.:
como Director/a-Tutor/a de la Tesis Doctoral antes indicada AUTORIZA LA DEFENSA DE LA MISMA.	

En Huelva a, _____ de OCTUBRE de 2013
Firma del/de la Director/a de la Tesis Doctoral

Fdo. Dr. Carlos Vilchez Lobato

Fdo. Dr. Benito A. de la Morena Carretero

Firma del/de la Tutor/a de la Tesis Doctoral

Fdo. Dr. Carlos Vilchez Lobato

A CUMPLIMENTAR POR LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO:

Una vez valorada la Tesis Doctoral presentada por el/la Doctorando/a y haber incorporado éste/a las modificaciones y/o cambios que esta Comisión Académica le pudiera haber indicado, se AUTORIZA , en reunión de fecha _____, LA DEFENSA de la misma.
--

En Huelva a, _____ de OCTUBRE de 2013
Firma y sello del/de la Presidente/a de la Comisión Académica

Fdo. _____

Abreviaturas	
Marco de la Tesis Doctoral	1
RESUMEN	9
Abstract	11

I. INTRODUCCIÓN

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN	15
1.1. Las microalgas	17
1.1.1. Definición y clasificación	17
1.1.2. Principales factores de crecimiento	19
<i>Irradiancia</i>	20
<i>Temperatura</i>	21
<i>pH</i>	22
<i>Nutrientes</i>	22
<i>Carbono</i>	24
1.1.3. Principales utilidades	25
<i>Nutrición y antioxidantes</i>	25
<i>Energéticas</i>	26
1.2. La vida en ambiente ácido extremo	27
1.2.1. Características químicas y microbiológicas de ambientes acuosos ácidos extremos de la Faja Pirítica de Huelva	29
<i>El río Tinto</i>	29
<i>Origen de la acidez del río Tinto</i>	30
<i>Características microbiológicas del río Tinto</i>	31
1.2.2. Fotosíntesis en ambiente ácido acuoso extremo	32
<i>CO₂</i>	33
<i>pH</i>	36
<i>Irradiancia</i>	36

<i>Metales y estrés oxidativo</i>	37
<i>Presión osmótica, halotolerancia y carencia de nutrientes</i>	38
1.3. Lípidos de microalgas	39
1.3.1. Definición y funciones principales en microalgas	39
<i>Carotenoides: biosíntesis y factores que inducen la acumulación</i>	39
<i>Ácidos grasos: biosíntesis y factores que inducen la acumulación</i>	44
1.4. Biodiesel de microalgas	49
1.4.1. Definición	49
1.4.2. Potencial y retos actuales de la obtención de biodiesel a partir de de microalgas	49
1.4.3. Aceites de microalgas: definición, abundancia y propiedades adecuadas para la producción de biodiesel	52
1.4.4. Extracción de aceites	55
1.4.5. Transesterificación de acilglicéridos	56
1.5. Objetivos de la Tesis Doctoral	57

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Capítulo 2. MATERIALES Y MÉTODOS	63
2.1. Microalgas empleadas	65
2.1.1. <i>Coccomyxa onubensis</i>	65
2.1.2. Microalgas aisladas de aguas tratadas de Refinería La Rábida de CEPSA	66
<i>Metodología de aislamiento</i>	67
• Toma de muestra de aguas tratadas de Refinería La Rábida de CEPSA	67
• Aislamiento de las microalgas de aguas tratadas de Refinería La Rábida de CEPSA	68
• Selección e identificación molecular de las microalgas aisladas de aguas tratadas de Refinería La Rábida de CEPSA	70

a.	Cultivos de las microalgas seleccionadas en condiciones estándar de cámara	70
b.	Recolección de células de los cultivos en la fase exponencial de crecimiento y lavado de bacterias presentes en los cultivos de microalgas	71
c.	Extracción de ADN	71
d.	PCR del gen conservado RUBISCO (Rbcl)	72
2.2.	Condiciones de cultivo	73
2.2.1.	Medio de cultivo de <i>Coccomyxa onubensis</i>	73
2.2.2.	Medio de cultivo de microalgas procedentes de aguas tratadas de Refinería La Rábida de CEPESA	74
2.2.3.	Cultivo de microalgas en laboratorio	75
2.3.	Determinaciones físicas	77
2.3.1.	Medidas de irradiancia incidente en los cultivos	77
2.3.2.	Determinación de peso seco	77
2.3.3.	Determinación del ratio de absorbancias Abs 680 /Abs 750	78
2.3.4.	Determinación de las tasas de crecimiento	79
2.3.5.	Determinación de productividades de biomasa	79
2.4.	Determinaciones analíticas	79
2.4.1.	Determinación del contenido en clorofilas y carotenoides en células de microalgas	79
2.4.2.	Separación, identificación y cuantificación de carotenoides específicos de microalgas mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	80
2.4.3.	Determinación de proteínas en células de microalgas	82
2.4.4.	Determinación de lípidos totales en células de microalgas	82
2.4.5.	Determinación de productividades de lípidos	84
2.4.6.	Transesterificación ácida de lípidos totales. Obtención de FAMES	84
2.4.7.	Identificación cualitativa y cuantificación de ácidos grasos en extractos de células de microalgas	85

2.5. Determinación de actividades biológicas	86
2.5.1. Medida de la actividad fotosintética en células de microalgas	86
2.5.2. Medida de fluorescencia en células de microalgas	88
2.5.3. Actividades enzimáticas del sistema antioxidante	88
<i>Extractos crudos</i>	88
<i>Ascorbato peroxidasa</i>	89
<i>Catalasa</i>	90
<i>Glutación reductasa</i>	90

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo 3. CRECIMIENTO, ACUMULACIÓN DE LIPIDOS Y RESPUESTA ANTIOXIDANTE DE <i>Coccomyxa onubensis</i> EN CONDICIONES DE CARENCIA NUTRICIONAL	93
3.1. Crecimiento en carencia nutricional	95
3.2. Acumulación de lípidos en carencia nutricional	103
3.3. Respuesta enzimática antioxidantes	114
Capítulo 4. CRECIMIENTO, ACUMULACIÓN DE LIPIDOS Y RESPUESTA ANTIOXIDANTE DE <i>Coccomyxa onubensis</i> EN FUNCIÓN DE LA SALINIDAD	119
4.1. Crecimiento en función de la salinidad	121
4.2. Acumulación de lípidos en función de la salinidad	129
4.3. Respuesta enzimática antioxidante	138
Capítulo 5. AISLAMIENTO, SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO Y LÍPIDOS DE MICROALGAS DE LA REFINERÍA LA RÁBIDA DE CEPESA	143
5.1. Establecimiento de puntos de muestreo	145
5.2. Aislamiento de microalgas	148

5.3. Selección de microalgas	149
5.4. Caracterización del crecimiento	149
5.5. Caracterización de lípidos	153

Capítulo 6. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y ESTUDIOS FISIOLÓGICOS PARA LA ESTIMULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS DE UNA MICROALGA AISLADA DE LA REFINERÍA LA RÁBIDA DE CEPESA	169
---	-----

6.1. Identificación molecular de dos microalgas aisladas de la Refinería La Rábida de CEPESA	171
---	-----

6.2. Estudios fisiológicos para la estimulación de la producción de lípidos de una microalga aislada de la Refinería La Rábida de CEPESA	173
---	-----

6.2.1. Estudio de la influencia de la combinación de alta irradiancia (LEDs) y carencia de nitrógeno en el medio de cultivo sobre el crecimiento y la acumulación de lípidos	174
--	-----

<i>Acumulación de carotenoides</i>	183
------------------------------------	-----

<i>Acumulación de lípidos totales y de ácidos grasos</i>	187
--	-----

6.2.2. Estudio de la influencia de condiciones heterotróficas sobre el crecimiento y la acumulación de lípidos a partir del uso de un precursor orgánico, acetato o glicerol. Estudio del efecto sinérgico de la carencia de nitrógeno y la heterotrofia	193
--	-----

<i>Acumulación de carotenoides</i>	199
------------------------------------	-----

<i>Acumulación de lípidos totales y de ácidos grasos</i>	203
--	-----

IV. CONCLUSIONES	213
-------------------------	-----

Conclusions	215
--------------------	-----

V. BIBLIOGRAFÍA	219
------------------------	-----

VI. ANEXOS	247
-------------------	-----

Producción Científica	249
------------------------------	-----

Abreviaturas

ACCase	acetil-CoA carboxilasa
ACP	grupo acilo
ACP	proteína portadora del grupo acilo
ADN ó RNA	ácido desoxirribonucleico
ADP	adenosín difosfato
APX	ascorbato peroxidasa
ARN ó RNA	ácido ribonucleico
ATP	adenosin trifosfato
BHY	β -caroteno hidroxilasa
bp	pares de bases
BSA	seroalbúmina bovina
CAT	catalasa
cCA	anhidrasa carbónica cloroplastídica
Ci	carbono inorgánico
DAG	diacilglicéridos
DCMU	3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea
DHA	ácido graso docosahexaenoico
DHAP	dihidroxiacetona fosfato
DMAPP	dimetil-alilpirofosfato
DOXP	1-deoxi-D-xilulosa-fosfato
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EHY	ϵ -caroteno hidroxilasa
EPA	ácido graso eicosapentaenoico
F₀	fluorescencia basal
FAMES	ácidos grasos metil ésteres
FC	fluidos supercríticos
FID	detector de ionización de llama
FPP	farnesil-pirofosfato
G3P	glicerol 3-fosfato
GA3P	gliceraldehido 3-fosfato
GC	cromatógrafo de gases
GGPP <i>sintasa</i>	geranil-geranil-sintasa
GGPP	geranil-geranil-pirofosfato
GPP	geranil-pirofosfato
GPx	glutación peroxidasa
GR	glutación reductasa
GSH	glutación en forma reducida
GSSG	glutación en forma oxidada
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A

HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
IPP	isopentenil pirofosfato
LED	diodo emisor de luz ó <i>Light Emitting Diode</i>
LPA	lisofosfatidato
LYC-B	licopen β-ciclase
LYC-E	licopeno ε-ciclase
MAG	monoacilglicéridos
MUFAs	ácidos grasos monoinsaturados
MVA	ácido mevalónico
NADP⁺	forma oxidada de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH⁺	forma reducida de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NXS	neoxantin sintetasa
pA	pico amperios
PAM	<i>pulse amplitude modulation</i>
PAR	luz fotosintéticamente activa
pCA	anhidrasa carbónica periplásmica
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDS	fitoeno desaturasa
PEP	fosfoenolpiruvato
PGA	ácido 3-fosfo-glicérico
PS	peso seco
PSI	fotosistema I
PSII	fotosistema II
PSY	fitoeno sintetasa
PUFAs	ácidos grasos poliinsaturados
Q_y	eficiencia fotosistema II ó <i>quantum yield</i>
Rbcl	gen conservado RUBISCO
Rbcl1-F y Rbcl1-R	cebadores <i>forward</i> y <i>reverse</i> del gen conservado RUBISCO
ROS	especies de oxígeno reactivas
SCCO₂	dióxido de carbono supercrítico
SFC	extracción de fluidos supercríticos
SOD	superóxido dismutasa
TAG	triacilglicéridos
UV-Vis	ultravioleta-visible
Volt	voltios
ZDS	ζ-caroteno desaturasa
ZEP	zeaxantin epoxidasa

Marco de la Tesis Doctoral

MARCO DE LA TESIS DOCTORAL: MOTIVACIÓN, TEMÁTICA Y ENTIDADES COLABORADORAS.

1. Motivación de la Tesis Doctoral

El planteamiento y desarrollo de esta Tesis Doctoral encuentra su motivación principal en los siguientes hechos: de una parte, la creciente actividad del equipo de investigación dentro del ámbito de la producción sistemática de cultivos de microalgas enriquecidas en moléculas de interés comercial, con utilidad en alimentación humana y animal y en la obtención de nuevas fuentes de energías renovables; de otra parte, la creciente demanda, por parte de Entidades públicas y privadas, de soluciones biotecnológicas conducentes a la obtención de nuevos recursos energéticos renovables y cuyo uso sea considerado sostenible. Es bien sabido, y así se describe en la Introducción de esta Tesis, que las microalgas cuentan con potencialidad bioquímica para ser consideradas y utilizadas en análisis científico-técnicos como materia prima de valor para la obtención de biocombustibles.

Las microalgas han concitado en los últimos años un especial interés entre los investigadores que se dedican a la biotecnología, gracias a su capacidad para acumular moléculas de alto valor en farmacología, alimentación y, recientemente, en el ámbito de los nuevos recursos energéticos procedentes de fuentes biológicas vegetales. El interés por las microalgas es, además, resultado de la facilidad de este tipo de microorganismos para crecer de forma sistemática, siendo posible ejercer un alto grado de control sobre los parámetros del proceso de cultivo, utilizando como fuente de carbono CO₂ (gas invernadero) y, como fuente de energía, la radiación solar. Además, el cultivo de microalgas procura extraordinarios ahorros de superficie de cultivo, entre 30 y 100 veces si se compara con la superficie media que demanda la producción de cultivos agrícolas convencionales.

La estimulación de la biosíntesis de moléculas de valor comercial de microalgas requiere, por lo general, de la aplicación al cultivo de algunas condiciones ambientales, físicas y químicas, más o menos extremas, como por ejemplo, alta o baja temperatura, alta intensidad de luz, aumento de la salinidad, eliminación de algún nutriente del medio de cultivo y/o alta concentración de ciertos metales, entre otras. La adecuada sistematización del cultivo bajo dichas condiciones permite desarrollar procesos de producción de microalgas enriquecidas en las moléculas objeto de interés que, en ciertos casos, sólo pueden ser obtenidas a partir de materias primas naturales.

Finalmente, el sur de España reúne condiciones excepcionales para albergar sistemas de producción masiva de microalgas. Entre tales condiciones, el número de horas de luz y la irradiancia promedio a lo largo del año hacen del sur una localización idónea para que las microalgas crezcan con una alta eficiencia de la fotosíntesis.

2. Temática de la Tesis Doctoral

Las consideraciones anteriores motivaron el planteamiento de un proyecto de Tesis Doctoral cuyo esquema, en definitiva, se sustentase sobre la siguiente propuesta: el aislamiento de microalgas desde entornos acuosos equilibrados de forma natural, ubicados en la zona geográfica donde eventualmente se realizaría la producción masiva de aquellas, y el análisis de sus características de crecimiento y de acumulación de lípidos útiles para la obtención de biocombustibles, evaluando también la obtención de moléculas de utilidad en otros ámbitos industriales.

En ciertos espacios naturales, como el río Tinto, concurren condiciones más o menos extremas de temperatura, acidez o salinidad, entre otras, que hacen de tales medios acuosos lugares excepcionales para encontrar microorganismos adaptados a crecer ante dichas dificultades. Su adaptación a condiciones extremas incluye, de manera natural, la predisposición biológica a la acumulación de algunas moléculas de interés comercial que la microalga utiliza para defenderse de las condiciones adversas, por ejemplo, lípidos insaturados útiles para producir biodiesel, carotenoides como luteína (empleada en fármacos para evitar ciertas

patologías degenerativas) o ácidos grasos como el eicosapentanoico, empleado en formulaciones especiales de leches infantiles.

Pero no sólo los espacios naturales son nichos apropiados para encontrar microalgas cuyo estudio pueda concitar interés de cara a la producción masiva y obtención de biocombustibles. Unidades de tratamiento de aguas urbanas o industriales son, a nuestro juicio, lugares idóneos de donde poder aislar microalgas adaptadas a condiciones climáticas, físicas, químicas y microbiológicas que robustezcan su producción masiva en sistemas de cultivo abiertos y de gran volumen. Adicionalmente, la reutilización en el cultivo de microalgas del propio recurso acuoso depurado, al que el microorganismo fotosintético está naturalmente adaptado, supone una extraordinaria ventaja frente al cultivo de microalgas de colección en sus medios sintéticos costosos y poco selectivos

En este trabajo de Tesis Doctoral se ha realizado la apuesta científica de utilizar microalgas aisladas por el equipo de investigación desde aguas de ambiente ácido y también de una planta de tratamiento de aguas industriales, que aunasen a un tiempo crecimiento estable y robusto y una cierta capacidad para la acumulación de lípidos de valor comercial, particularmente acilglicéridos útiles en la obtención de biodiesel de microalgas.

3. Entidades colaboradoras

Esta Tesis Doctoral es fruto de la estrecha colaboración del grupo de investigación Biotecnología de Algas, de la Universidad de Huelva, con dos Entidades: la Estación de Sondeos Atmosféricos “El Arenosillo” (en adelante ESAT), del Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial (INTA), dependiente del Ministerio de Defensa, y la Compañía Española de Petróleos (CEPSA).

Estación de Sondeos Atmosféricos “El Arenosillo” (ESAT) del INTA

La colaboración con la ESAT se sustenta, básicamente, en los sucesivos Convenios Marco y Específico suscritos entre INTA y la Universidad de Huelva, en los años 1994 y 2005, por los que se regulaba un programa de

co-financiación de becas predoctorales (Convenio Marco) y su aplicación a estudios del efecto de las radiaciones solares sobre la productividad vegetal (Convenio Específico). El fruto de la aplicación de ambos Convenios a la colaboración con el grupo Biotecnología de Algas ha permitido, desde el año 2003, la realización de 4 Tesis Doctorales, incluyendo este trabajo.



Figura M.1. Vistas de la Estación de Sondeos Atmosféricos “El Arenosillo” (ESAT) del INTA.

La ESAT (Figura M.1) es una instalación de singular relevancia científica, por su situación geográfica y por la infraestructura altamente específica y de gran valor para la determinación de distinto tipo de radiaciones solares y del ozono troposférico. Las radiaciones solares producen un conocido impacto en la salud humana y, por tanto, la medición y el conocimiento del alcance de sus efectos es determinante para advertir a la población sobre los riesgos de exposición excesiva. Por añadidura, las radiaciones solares también producen efectos medibles en la materia vegetal, afectando positiva o negativamente a la productividad de las cosechas de productos para alimentación humana y animal, y también a la productividad de microorganismos fotosintéticos cuya producción masiva es necesaria para su utilización en alimentación animal y/o humana, o para la extracción de compuestos de valor comercial. En esta Tesis Doctoral se utilizan microalgas como materia prima para la acumulación de lípidos útiles, principalmente, en la producción de biocombustible. Para el cultivo de microalgas es necesaria la aplicación de radiaciones de diversa índole y, de manera singular, de alta irradiancia para favorecer la acumulación de los lípidos de interés. Tales lípidos tienen esencialmente un destino energético, y son la base para la obtención de una de las nuevas fuentes de energía prometedoras destinadas fundamentalmente al transporte terrestre y aéreo.



Figura M.2. Experimentación realizada en la Estación de Sondeos Atmosféricos “El Arenosillo” (ESAT) del INTA.

A nivel técnico, la implicación de ESAT-INTA en los trabajos realizados con el grupo Biotecnología de Algas desde el año 2003 ha incluido, entre otras acciones relevantes, la caracterización de las propiedades ópticas de materiales plásticos utilizados en el cultivo de microalgas (Figura M.2), la realización de experiencias de resistencia de dichos materiales a la exposición continuada a radiaciones solares, estudios de productividad a la intemperie de cultivos de microalgas de valor comercial, en sistemas de cultivo contruidos a tal efecto en las instalaciones de ESAT y la habilitación y equipamiento, junto con el grupo Biotecnología de Algas, de un laboratorio de estudios biotecnológicos en la propia ESAT, operativo entre los años 2006 y 2012. Dicho laboratorio permitió el desarrollo in situ de abundante experimentación correspondiente a las Tesis Doctorales conjuntas, incluido el presente trabajo.

Compañía Española de Petróleos (CEPSA)

La colaboración con CEPSA para el desarrollo de esta Tesis Doctoral se sustenta en sendos Convenios específicos, suscritos entre la Compañía y la Universidad de Huelva en los años 2010 y 2011, para realizar trabajos de investigación, bajo la responsabilidad de uno de los co-directores de esta Tesis, relacionados con la obtención de lípidos útiles para la producción de biodiesel, utilizando cultivos de microalgas como materia prima natural renovable.

La estructura de los trabajos científicos con CEPSA se comprometió en dos Convenios de investigación. El primero de ellos se firmó con la Refinería La Rábida de CEPSA, y permitió iniciar los trabajos de obtención de microalgas para el posterior estudio de crecimiento y acumulación de lípidos convertibles en biodiesel. El segundo de ellos denominado “Producción de lípidos de valor energético con microalgas”, firmado en Junio de 2011, recoge y ordena la mayor parte del esfuerzo de la colaboración entre el equipo de investigación de la Universidad de Huelva y CEPSA para el uso de microalgas en la obtención de biodiesel. La materia de dicho Convenio sirvió para elaborar un proyecto más amplio en el que se incluyeron equipos de investigación involucrados en el desarrollo de tecnologías de extracción (Universidad de Cádiz) y de optimización de los procesos de conversión de acilglicéridos en biodiesel y de caracterización de productos obtenidos durante la investigación (BioOils y CEPSA). El proyecto, de dos años de duración y desarrollado entre 2011 y 2013, se denominó ALGINCO2, fue financiado por CEPSA y contó con la aprobación y apoyo económico del CDTI (Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial), del Ministerio de Economía y Competitividad (Figura M.3). Los Capítulos 5 y 6 de esta Tesis incluyen algunos de los principales resultados de dicho proyecto.



Figura M.3. Participantes del Proyecto ALGINCO2.

La participación del equipo de la Universidad de Huelva consistió, en una primera fase, en la selección de especies de microalgas que resultasen más prometedoras para la producción de aceites, atendiendo a la estabilidad y velocidad de su crecimiento y a la cantidad y al tipo de lípidos acumulados.

En una segunda fase, se optimizaron condiciones de crecimiento y de acumulación de lípidos para las especies de microalgas seleccionadas anteriormente, en base a investigación de laboratorio que incluiría la

valoración de la producción de biomasa y enriquecimiento en lípidos de tales especies mediante el desarrollo de procesos en sistemas de cultivo de poco volumen (Figura M.4).



Figura M.4. Cultivos de especies de microalgas seleccionadas crecidas en cámara.

Finalmente, en una tercera y última fase se desarrollaron procesos semicontinuos de producción de biomasa y acumulación de lípidos de dos microalgas seleccionadas entre las estudiadas con anterioridad. Para ello se utilizaron sistemas de cultivo abiertos, tipo tanque agitado, y tubulares, de volumen variable entre los 300 y los 3.500 litros de capacidad (Figura M.5). En esta Tesis se incluyen resultados correspondientes a las fases primera y segunda.

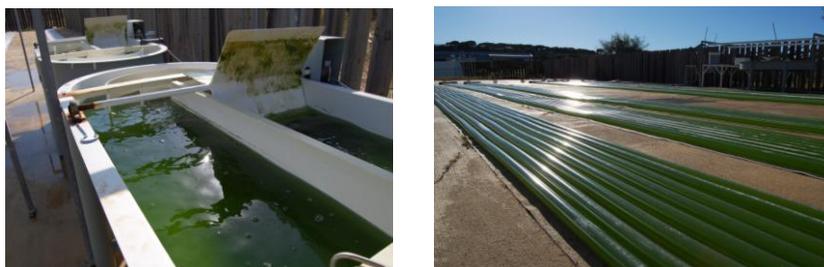


Figura M.5. Cultivos de microalgas en sistemas abiertos. La Fotografía de la izquierda representa un sistema de cultivo tanque agitado de 300 L de volumen. La Fotografía de la derecha muestra un sistema de cultivo tubular de 3.500 L de capacidad, utilizados en experiencias de escalado del proyecto ALGINCO2 en CIECEM, por el equipo de la Universidad de Huelva.

ALGINCO2 es el primer proyecto nacional de investigación sobre la obtención de biodiesel de microalgas que se basa en el aislamiento y estudio de especies aisladas de los propios entornos donde podría producirse el posterior escalado de los cultivos. Esta Tesis recoge algunos de los principales resultados correspondientes a las fases primera y segunda de laboratorio de dicho proyecto.

Resumen

Las microalgas han sido reconocidas en los últimos años como una de las nuevas fuentes de energías renovables alternativas a los recursos fósiles. Las principales características que avalan a las microalgas para dicha funcionalidad son su crecimiento rápido y controlado en medio de cultivo líquido, los requerimientos nutricionales simples para su producción masiva, - CO₂ atmosférico, agua, luz y sales minerales - y un contenido de acilglicéridos aceptable para obtención de aceites. La producción masiva de aceites para biodiésel requiere, preferiblemente, de microalgas adaptadas a las condiciones ambientales y microbiológicas propias del lugar de producción y del recurso acuoso utilizado.

Esta Tesis Doctoral estudia la acumulación de lípidos de microalgas aisladas de distintos orígenes en la provincia de Huelva, lugar adecuado para la producción masiva. Una de las microalgas se aisló de las aguas ácidas de la Faja Pirítica de Huelva y crece a pH muy ácido (inferior a 3). Se aislaron también microalgas de aguas tratadas de la Refinería La Rábida de CEPESA.

La microalga de ambiente ácido acumula lípidos antioxidantes, algunos de valor comercial como luteína y algunos ácidos grasos. En esta Tesis Doctoral se estudió la forma de estimular la acumulación intracelular de dichas moléculas, a partir de condiciones de estrés nutricional y salino. Los resultados permitieron concluir que *Coccomyxa onubensis* crece cuando se incuba en carencia de fósforo o azufre, manteniendo la captura activa de luz. Los resultados sugieren la posible disponibilidad de reservas de azufre en la microalga, que permiten su crecimiento. La carencia del medio de cultivo en nitrógeno, fósforo o azufre favorece temporalmente la acumulación de carotenoides y ácidos grasos, siendo el ácido linolénico (C18:3) el más abundante. Por vez primera en una microalga de ambiente ácido, se ha puesto de manifiesto el vínculo entre carencia de nutrientes y estrés oxidativo. Además, *Coccomyxa* muestra cierta halotolerancia. Una salinidad moderada, inferior a la del mar, favorece su crecimiento y la acumulación de luteína, β -caroteno y ácidos grasos, particularmente linoléico y linolénico, ambos esenciales en alimentación humana. En dichas condiciones, el aumento en actividades enzimáticas que utilizan glutatión y ascorbato

permite relacionar la halotolerancia con el incremento de la respuesta antioxidante.

También se aislaron e identificaron microalgas de aguas depuradas de la Refinería La Rábida de CEPSA, de crecimiento robusto y estable y con el máximo contenido posible en lípidos, particularmente acilglicéridos, útiles para la obtención de biodiésel. Se estudiaron condiciones para favorecer la acumulación intracelular de tales lípidos, en cultivos autótrofos y heterótrofos. En particular, se aisló una microalga de rápido crecimiento que se identificó como una nueva cepa del género *Chlorella*. La microalga acumuló, en forma de lípidos, máximos cercanos al 50 % de su peso seco. Los resultados obtenidos en condiciones limitantes para la fotosíntesis sugieren que la microalga podría utilizar reservas de carbono reducido para incrementar la acumulación de lípidos.

En condiciones fotoautotróficas, la producción de FAMES de la microalga *Chlorella sp.*, se realiza de forma más eficiente si los cultivos se someten a incubación bajo irradiancias saturantes, obteniendo mayor productividad de lípidos que en carencia nutricional como consecuencia de la mayor productividad de biomasa. En las condiciones de máxima acumulación determinadas, la microalga *Chlorella sp.* objeto de estudio alcanza un contenido promedio de lípidos de un 40 %-45 %, de los cuales un máximo de aproximadamente 30 % son FAMES. Además, se consiguió estimular la biosíntesis de luteína en la microalga mediante carencia nutricional y alta irradiancia ó en condiciones de heterotrofia con glicerol como fuente de carbono. Estas condiciones, especialmente la heterotrofia, abren una vía de estudio para la producción masiva de luteína a mayor escala.

La producción de lípidos en *Chlorella sp.* resultó similar tanto en condiciones autotróficas como heterotróficas de crecimiento. En condiciones heterotróficas, la mayor producción de lípidos - hasta un 35 % del peso seco de la microalga- y de FAMES - hasta un 60% del peso total de lípidos- se obtuvo utilizando glicerol como fuente de carbono en oscuridad. La alta productividad de biomasa y los menores costes de producción en heterotrofia sugieren que tales condiciones de cultivo serían de especial valor en la obtención de FAMES (biodiésel) a partir de la *Chlorella sp.* estudiada.

Abstract

Microalgae have recently been recognized as one of the renewable energy alternative sources to fossil fuels. The main features that support the microalgae for such functionality are rapid and controlled growth in liquid culture medium, simple nutritional requirements for mass production - atmospheric CO₂, water, light and minerals - and acceptable content of acylglycerides for oil production. Massive algal oil production for biodiesel preferably requires of microalgae adapted to environmental and microbiological conditions of the place and of the water source used.

This Doctoral Thesis studies the lipid accumulation of microalgae isolated from different sources in the province of Huelva, which is a suitable place for massive algal production. One of the microalgae was isolated from the acidic waters of the Pyrite Belt of Huelva and grows at very acidic pH (below 3). Microalgae were also isolated from the treated water at CEPESA's La Rabida Refinery.

The acid environment microalga accumulated lipid antioxidants, some of them of commercial value, including lutein and some fatty acids. In this Thesis we studied how to stimulate the intracellular accumulation of these molecules, from nutritional and saline stress conditions. The results led us to conclude that *C. onubensis* grows if incubated in the absence of phosphorus or sulfur, keeping active light capture. The results suggest the microalga might possibly have sulfur reserves which allow it to grow. Lack of nitrogen, phosphorus or sulfur in the culture medium temporarily promotes accumulation of carotenoids and fatty acids, linolenic acid (C18: 3) being the most abundant. For the first time in acid environment microalgae the connection between nutrient deficiency and oxidative stress has been highlighted. In addition, *Coccomyxa* showed certain halotolerance. Moderate salinity, below sea salt level, supports *Coccomyxa* growth and accumulation of lutein, β -carotene and fatty acids, particularly linoleic and linolenic acids, both essential in human nutrition. Under these conditions, the increase in enzyme activities that depend on reduced glutathione and ascorbate allows for relating halotolerance to increased antioxidant algal response.

Microalgae from CEPSA's La Rabida Refinery treated waters were also isolated and identified, looking at strong and stable growth species that accumulated as high as possible lipid content, particularly acylglycerides, which are useful for biodiesel production. Conditions were studied to promote the intracellular accumulation of these lipids in autotrophic and heterotrophic cultures. In particular, a fast-growth microalga was identified as a new strain belonging to *Chlorella* genus. That microalga accumulated maximum lipid contents of about 50% of biomass dry weight. The results obtained under photosynthesis limiting conditions suggest that the microalga might be making use of reduced carbon stocks in order to increase lipid accumulation.

Under photoautotrophic conditions, FAMES most efficient production of *Chlorella sp.* performs if cultures are incubated under saturating irradiances. Under such conditions, the increased biomass productivities result in lipid productivities which are higher than in nutrient-deficient cultures. Under conditions of maximum accumulation, the isolated *Chlorella sp.* reached average lipid content from 40% -45%, of which a maximum of approximately 30% are FAMES. Further, lutein biosynthesis in the microalga was enhanced through cultivation under nutrient deficiency and high irradiance or under heterotrophy on glycerol as a carbon source. These conditions, especially heterotrophy, open a study line for production of lutein at larger scale.

Lipid production of *Chlorella sp.* was similar in both heterotrophic and autotrophic conditions. In heterotrophic conditions, increased production of lipids -up to 35% of biomass dry weight- and FAMES -up to 60% of the total weight of lipids- was obtained by using glycerol as a carbon source in the dark. The high biomass productivities and lower production costs in heterotrophy suggest that such culture conditions would be of particular value for FAMES (biodiesel) production from the isolated *Chlorella sp.*



Universidad
de Huelva

I. INTRODUCCIÓN

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN



Universidad
de Huelva

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Las microalgas.

1.1.1. Definición y clasificación.

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos de estructura procariota o eucariota pertenecientes a un grupo muy amplio de gran diversidad genética. En general son altamente eficientes en la fijación de CO₂ y utilización de la energía solar para producir biomasa, por lo que son organismos autótrofos que realizan fotosíntesis y que dependen del agua como donador de electrones. Numerosas microalgas tienen la capacidad para crecer de manera autotrófica, heterotrófica o mixotrófica. Realizan el mismo papel que las plantas en el medio aéreo: son los productores primarios.

Las microalgas se encuentran presentes en la mayoría de los ambientes terrestres incluso en los más extremos, lo cual permite encontrarlas ampliamente distribuidas en la biósfera adaptadas a una gran variedad de condiciones. Se han aislado en ambientes húmedos, en fangos, en suelos arenosos y en agua dulce e incluso en medios acuáticos de extrema salinidad o temperatura (Gould et al. 2008). Esta flexibilidad probablemente explica por qué las microalgas presentan un rendimiento muy alto de biomasa y componen uno de los principales constituyentes de la productividad primaria en los océanos, considerándose, por tanto, una opción prometedora para aplicaciones biotecnológicas (Cardol et al. 2011). La adaptabilidad resulta de una combinación de numerosos factores, incluyendo cambios rápidos en la configuración y actividad del aparato captador de luz (Merchant et al. 2006).

Para su desarrollo las microalgas requieren, en líneas generales, de una fuente de carbono, de luz y de nutrientes en cantidad suficiente. Los principales nutrientes incluyen nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio y, en menor cantidad, iones metálicos, los cuales son esenciales porque actúan como cofactores de enzimas. La mayoría de las microalgas son mesófilas y crecen bien en un intervalo apropiado de temperatura que, generalmente, se sitúa entre los 15 y los 30 °C (Apt y Behrens 1999).

De acuerdo con la clasificación sistemática, las cientos de miles de especies de algas pueden agruparse en nueve divisiones siendo las más importantes las siguientes: *Chlorophyceae* (algas verdes), *Phaeophyceae* (algas pardas), *Pyrrophyceae* (dinoflageladas), *Rhodophyceae* (algas rojas) y *Chrysophyceae* (algas verde-amarillas) (Van den Hoek et al. 1995).

El aparato fotosintético de las microalgas, al igual que ocurre en plantas superiores, se organiza en orgánulos especiales llamados cloroplastos (Figura 1.1). Se componen de un sistema de membranas de naturaleza lipoproteica constituidas en tilacoides, una fase acuosa o estroma y diferentes pigmentos accesorios captadores de luz. Los mecanismos básicos de la fotosíntesis oxigénica se llevan a cabo por pigmentos especializados, responsables de la captura de radiación, de su transferencia al centro de reacción y, finalmente, de la reducción del primer aceptor de la cadena de transporte de electrones en fotosíntesis. El transporte electrónico permite la reducción final de NAD(P)^+ a partir de ferredoxina, dando lugar a poder reductor utilizado para la asimilación de nutrientes.

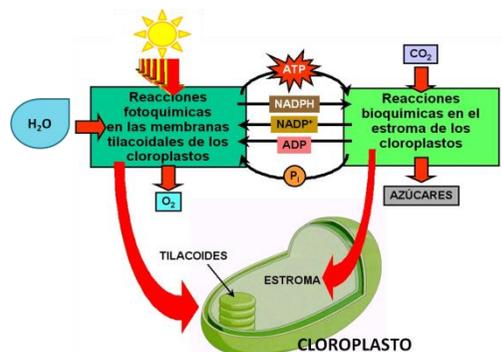


Figura 1.1. Cloroplasto y esquema general de las fases luminosa y oscura de la fotosíntesis. Modificado de <http://calycotai.blogspot.com.es/2012/04/fotosintesis.html>

En la fotosíntesis (Figura 1.1), los compuestos inorgánicos portadores de C, N y S - CO_2 , NO_3^- , SO_4^{2-} - son convertidos en materia orgánica a través de su reducción asimilatoria, que finaliza en la incorporación de tales elementos químicos a esqueletos carbonados para producir aminoácidos y diferentes intermediarios metabólicos. Este proceso proporciona hidratos de carbono para la producción de energía en plantas y animales, además de proteínas y lípidos, y constituye también la vía principal a través de la cual el

carbono vuelve a entrar en la biosfera y el medio principal de fijación del carbono y producción de oxígeno en la atmósfera, lo que determina que todas las formas de vida existentes sobre la tierra dependan directa o indirectamente de la fotosíntesis como fuente de energía para su metabolismo y crecimiento (Masojídek et al. 2004).

1.1.2. Principales factores de crecimiento.

Los factores medioambientales y, en particular, la calidad e intensidad de luz, la temperatura, la concentración y disponibilidad de nutrientes, el pH y la salinidad afectan a la fotosíntesis y, en consecuencia, al metabolismo, a la composición molecular de la célula y, en último término, a la producción de biomasa.

Diversos autores defienden que bajo condiciones de cultivo desfavorables algunas especies de microalgas presentan variaciones muy significativas en la composición celular. Como ejemplo, *Chlorella sp.*, *Botryococcus braunii* y *Dunaliella salina* (clase *Chlorophyceae*, orden *Volvocales*) muestran por término medio, bajo condiciones medioambientales favorables, entre un 30 y 50 % de su peso en proteínas, de un 20 a un 40 % en carbohidratos y de un 8 a un 15 % en lípidos. En presencia de condiciones de crecimiento desfavorables, estas especies pueden llegar a acumular hasta un 80 %, en peso seco, de compuestos hidrocarbonados (Hu 2004).

En este trabajo de Tesis se ha estudiado el efecto de diversas condiciones de cultivo con objetivos diferentes, a veces en la pretensión de estimular la productividad de los cultivos y en otras con el objetivo de favorecer la acumulación de ciertas moléculas de interés comercial, como los carotenoides o los ácidos grasos destinados a la producción de biodiesel, modificando para ello condiciones nutricionales o fisiológicas de cultivo que puedan alterar la proporción intracelular de estas biomoléculas en las microalgas estudiadas.

Los parámetros más relevantes para el crecimiento de microalgas se relacionan a continuación, junto a la función fundamental que desempeñan en el cultivo de las microalgas.

Irradiancia.

De la energía que llega al cloroplasto, sólo el 40 % corresponde a la luz visible, única radiación fotosintéticamente activa o radiación PAR. La luz visible es la radiación cuya longitud de onda está comprendida entre 400 y 700 nm. La respuesta de los organismos fotosintéticos a la energía que les llega varía en función de las diferentes longitudes de onda.

La clorofila es el principal pigmento que absorbe luz para el proceso fotosintético, otros pigmentos accesorios son los carotenoides (de color naranja o amarillo) y las ficobilinas, estas propias de cianobacterias, que también participan en fotosíntesis formando parte de los fotosistemas. Un fotosistema contiene numerosas moléculas de pigmentos antena (clorofilas y algunos pigmentos asociados) y un par de moléculas de clorofila que actúan como centro de reacción atrapando la energía procedente de la absorción de luz. El fotosistema que absorbe a 700 nm se denomina fotosistema I (PSI) y el que absorbe a una longitud de onda de 680 nm se denomina fotosistema II (PSII).

Ante intensidades de luz muy bajas, las microalgas incrementan la producción de clorofila a y de otros pigmentos colectores de luz, entre los que se encuentran las clorofilas b y c, ficobiliproteínas y carotenoides, pigmentos accesorios que asumen funciones principales en la absorción de energía luminosa (Hu 2004). Sin embargo, en respuesta a una alta intensidad de luz se produce una disminución en la síntesis de clorofila a y de otros pigmentos directamente implicados en la fotosíntesis, mientras que aumenta la cantidad de ciertos carotenoides (zeaxantina, astaxantina o β -caroteno), algunos de alto valor comercial, los cuáles ejercen funciones fotoprotectoras ante altas intensidades luminosas que pudieran perjudicar el aparato fotosintético celular (Hu 2004). En este sentido, los trabajos de Melis y otros (Melis 1999, Polle et al. 2003, Melis 2009, Ort et al. 2011) han puesto de manifiesto uno de los principales mecanismos de adaptación de las

microalgas a alta irradiancia, consistente en modificar el tamaño de la antena de los fotosistemas, esto es, la cantidad de moléculas de clorofila que intervienen en los procesos de captura y transducción de la luz en energía, mediante la regulación de la expresión de diversos componentes fotosintéticos, en especial de los complejos proteicos colectores de luz que asocian clorofilas y carotenoides primarios para la captación de luz. De los carotenoides y de los factores que estimulan su acumulación se relacionan y discuten más adelante en esta Introducción de la Tesis.

La alta intensidad de luz es otra de las condiciones reconocidas por diversos estudios como favorecedora de la acumulación de triacilglicéridos con mayor grado de saturación. Los lípidos son uno de los constituyentes principales de los cloroplastos y las insaturaciones de los PUFAs (ácidos grasos poliinsaturados) funcionan como sumidero de radicales libres producidos, en mayor medida, por la pérdida del equilibrio electrónico en los fotosistemas (Hill et al. 2011) al aumentar la intensidad de luz. Altos contenidos de PUFAs están relacionados con niveles bajos de irradiancias, aumentando el porcentaje de ácidos grasos saturados al aumentar la intensidad de luz.

Por tanto, la adecuada elección de irradiancias permite mantener un cierto control sobre la producción de biomasa o la acumulación de determinados metabolitos de interés, de los cuales carotenoides y síntesis de ácidos grasos son objeto de estudio en esta Tesis.

Temperatura.

La temperatura es uno de los factores más importantes que afectan a la composición bioquímica de las microalgas debido a su repercusión sobre las reacciones enzimáticas. La temperatura óptima de crecimiento para el fitoplancton se sitúa entre 20 y 24 °C, aunque este rango puede variar dependiendo de la composición del medio de cultivo y de la especie. Temperaturas inferiores a 16 °C provocan un lento crecimiento de las microalgas, mientras que temperaturas superiores a 35 °C son letales para numerosas especies (Raven y Geider 1988).

pH.

Es otro de los factores que pueden afectar al crecimiento de las microalgas. Aunque el rango de pH necesario para el cultivo de la mayoría de las especies de microalgas se encuentra entre 7 y 9, la captación de carbono inorgánico por el fitoplancton durante la fotosíntesis provoca un aumento del pH en su medio acuoso. La adición de CO₂ al medio de cultivo permite corregir los altos valores de pH que pueden alcanzarse durante el periodo de crecimiento. En la naturaleza también encontramos microalgas que han conseguido adaptarse a ambientes de pH extremos. En el caso particular de unas de las microalgas estudiadas en esta Tesis, *Coccomyxa onubensis*, el hábitat natural de la microalga se encuentra en el río Tinto (Huelva), cuyas aguas presentan unos valores de pH muy ácidos (2,5) y altas concentraciones de metales pesados en disolución (López-Archilla 2005), como se explica en apartados siguientes, dando características de ácido-tolerantes a la especie estudiada en esta Tesis.

Nutrientes.

La tasa de crecimiento de una microalga disminuye si la concentración de un nutriente, el suministro del mismo, o ambos, son insuficientes para mantener el crecimiento. La respuesta celular normal a la limitación de nutrientes se traduce en una adaptación de los requerimientos nutricionales de la célula, de forma que las tasas fotosintética y respiratoria disminuyen a medida que aumenta la deficiencia del nutriente limitante (Hu 2004, Hu et al. 2008). Numerosas microalgas responden de forma similar a condiciones de carencia nutricional mediante la acumulación de lípidos (Geider et al. 1998, Phadwal y Singh 2003, Lamers et al. 2012). Una de las estrategias estudiadas en esta Tesis es la incubación de las especies estudiadas bajo carencia nutricional, particularmente de nitrógeno, fósforo ó azufre.

El nitrógeno es un elemento esencial para la síntesis de todas las estructuras y proteínas de la microalga. La mayoría de las microalgas pueden utilizar nitratos, nitritos, amonio o incluso urea como fuentes de nitrógeno para su crecimiento (Kaplan et al. 1986), aunque la utilización de amonio

conlleva un ahorro energético para la célula al evitar la reducción previa de nitrato, dependiente de NADPH y necesaria para la posterior incorporación del amonio a esqueletos carbonados (Florencio y Vega 1983, Perez-García et al. 2011).

El fósforo es uno de los elementos principales en numerosas biomoléculas, esencial en ácidos nucleicos, lípidos de membrana e intermediarios metabólicos. Permite la movilización de la energía contenida en enlaces fosfato-fosfato de las moléculas de nucleótidos. En los entornos ácidos sus precipitados mantienen el equilibrio de especies metálicas disueltas (Gross 2000).

El azufre es un elemento presente principalmente en proteínas, como parte de la estructura de los aminoácidos cisteína y metionina, en cofactores y en otras estructuras químicas implicadas en funciones de diversa naturaleza, desde la intervención en procesos redox - por ejemplo, las agrupaciones sulfoféricas de la ferredoxina - hasta funciones antioxidante y de resistencia a metales - por ejemplo, glutatión y fitoquelatinas -. Las fitoquelatinas desarrollan uno de los mecanismos principales de detoxificación de metales en microalgas (Gross 2000, Gaur y Rai 2001).

La carencia de uno de estos nutrientes esenciales provoca en los cultivos de microalgas una sucesiva cadena de efectos negativos en su viabilidad. La ausencia de nitrógeno, fósforo o azufre es conocida porque puede provocar una reducción en la concentración celular de los pigmentos fotosintéticos y de las proteínas celulares, dificultando así la fijación fotosintética de CO₂ (Ben-Amotz et al. 1987, Grossman 2000, Cakmak et al. 2012). En tales situaciones, el flujo de carbono fijado a partir de la fotosíntesis se deriva mayoritariamente a la síntesis de carbohidratos y lípidos, en lugar de dirigirse a la síntesis de proteínas (Ben-Amotz y Avron 1983). Esto explica que la acumulación de lípidos sea una de las principales respuestas de numerosas microalgas incubadas bajo condiciones limitantes de nitrógeno. En esta Tesis se utiliza la carencia de nutrientes para estimular la acumulación de carotenoides y de acilglicéridos, estos últimos destinados a la obtención de biodiesel.

Carbono.

Por último, el aire es fundamental para el crecimiento de la microalga, puesto que contiene la fuente de carbono inorgánico necesaria para la fotosíntesis en forma de dióxido de carbono (0,038 %) (Tans 2009). Además, la aireación facilita la mezcla del cultivo, impide la sedimentación celular, favorece la exposición de las células a la luz y a los nutrientes, evita los fenómenos de estratificación térmica, importantes en cultivos al aire libre, y mejora el intercambio de gas entre el medio de cultivo y el aire.

Para no limitar el crecimiento del cultivo y mejorar la productividad, especialmente en cultivos muy densos, resulta necesario el abastecimiento de un suplemento de CO₂ en aire, normalmente hasta niveles que pueden alcanzar el 5 % (v/v) o incluso superiores (Hsueh et al. 2009). Más adelante en esta Introducción, se especifican detalles relacionados con los mecanismos de captación de carbono inorgánico en microalgas.

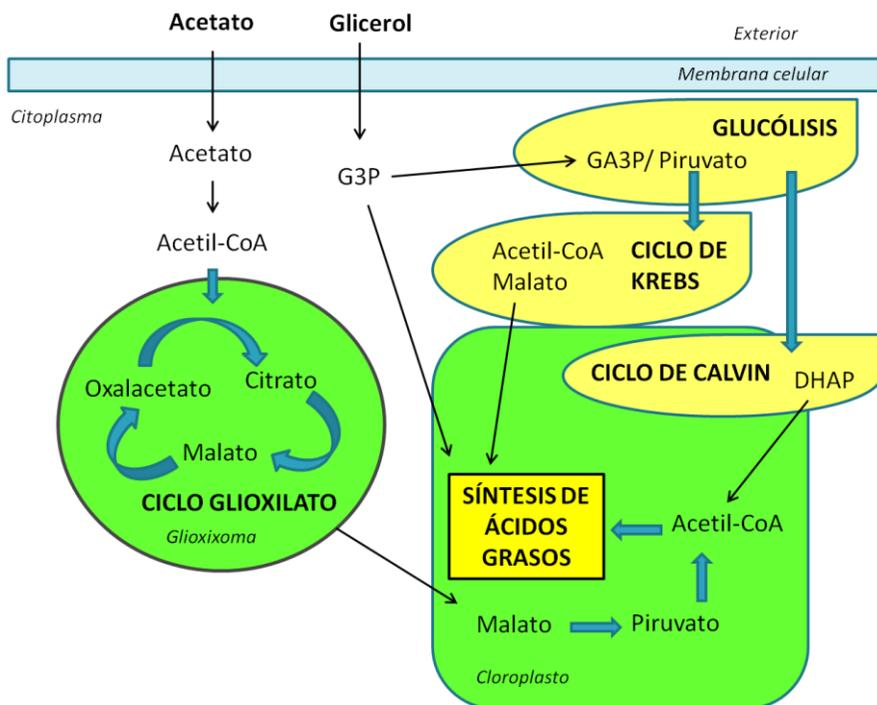


Figura 1.2. Resumen de la ruta de asimilación en la célula fotosintética de fuentes orgánicas de carbono como acetato o glicerol. Modificado de Perez-García et al. 2011. G3P: glicerol-3-fosfato, GA3P: gliceraldehído 3 fosfato. DHAP: dihidroxiacetona fosfato

El carbono suministrado a un cultivo de microalgas puede proceder también de fuentes orgánicas. Las fuentes orgánicas de carbono se emplean por lo general en cultivos en oscuridad y producen así los denominados cultivos heterotróficos. Entre las fuentes orgánicas de carbono mayoritariamente utilizadas para el cultivo de microalgas se encuentran la glucosa, la fructosa, el acetato y, en menor medida, el glicerol (Pérez-García et al. 2011). En esta Tesis se realizan estudios con fuentes orgánicas como glicerol o acetato en cultivos heterotróficos que, de acuerdo con estudios previos, pueden favorecer la síntesis de lípidos (Xu et al. 2006, Li et al 2007). La Figura 1.2 resume la asimilación en la célula fotosintética del acetato y del glicerol, siendo en términos aplicados un proceso, en principio, menos costoso que la producción fotoautotrófica por fijación de CO₂.

1.1.3. Principales utilidades.

Nutrición y antioxidantes.

En las últimas décadas se han realizado numerosas investigaciones que han tratado de encontrar nuevos suplementos alimenticios alternativos a los existentes que pudieran funcionar como una adecuada fuente de proteínas. Entre ellos se encuentra la biomasa obtenida a partir de microalgas.

Desde un punto de vista comercial, los carotenoides y ficobiliproteínas son los pigmentos vegetales más importantes. Los carotenoides son muy usados en alimentación natural como aditivos potenciadores del color de determinados alimentos como la yema de huevo, la carne de pollo o de pescado (Becker 2004). Sin embargo, de los más de 400 carotenoides conocidos sólo unos pocos se han usado con propósitos comerciales, fundamentalmente β -caroteno, luteína, zeaxantina, astaxantina y licopeno (Pulz y Gross 2004).

Desde el punto de vista nutricional, las microalgas son capaces de mejorar numerosos preparados alimenticios y provocar efectos positivos sobre la salud de hombres y animales. Por ello, es necesario tener en cuenta una serie de factores que pueden determinar la utilización de la biomasa

algal en la nutrición humana y animal entre los que se encuentran su composición bioquímica, la presencia de posibles sustancias tóxicas biogénicas (ficotoxinas) y no biogénicas (metales pesados, pesticidas o residuos provenientes de su recolección y procesado) y la calidad de las proteínas aportadas (Becker 2004). *Spirulina*, *Chlorella*, *Dunaliella* o *Nostoc* son ejemplos actuales de biomasa de microalgas y cianobacterias producidas para consumo humano (Pulz y Gross 2004).

Las microalgas también son usadas en los últimos años en acuicultura. Los cultivos de estirpes elegidas han de tener un alto contenido en proteínas y en ácidos grasos insaturados, algunos de los cuáles son esenciales para el desarrollo larvario de especies marinas e intervienen en los procesos bioquímicos relacionados con la coloración de salmónidos (Nichols 2003, Becker 2004). Como ejemplo, el carotenoide astaxantina, acumulado fundamentalmente por *Haematococcus*, se administra a los salmónidos en forma de microalga enriquecida en el pigmento para dar color a la carne (Guerin et al. 2003).

Además de ser alimento para el zooplancton, las microalgas también ayudan a estabilizar y mejorar la calidad del medio de cultivo debido a la producción de oxígeno y a la excreción de determinados compuestos que regularían la población bacteriana, a la vez que producirían efectos probióticos para los animales, estimulando la función inmunitaria (Irianto y Austin 2002).

Energéticas.

La situación actual de agotamiento de los combustibles fósiles, incremento del precio del petróleo y dificultades ambientales, demanda urgentemente fuentes alternativas de energía, siendo una opción prioritaria el biodiesel, biocombustible producido a partir de aceites provenientes de plantas oleaginosas, cuya disponibilidad, desafortunadamente, no permitirá sustituir el mercado de petróleo en el mundo si bien constituye una de las principales fuentes energéticas alternativas. El uso de microalgas para la producción de biodiesel es, en principio, ventajosa debido al elevado contenido de lípidos de dichos microorganismos y al perfil idóneo de estos

para la obtención del biocombustible. En comparación con las plantas, las microalgas presentan elevada eficiencia fotosintética, pueden crecer en aguas marinas, dulces, residuales y salobres, y su velocidad de crecimiento es relativamente mucho más alta.

No obstante, los sistemas de cultivo de microalgas actualmente presentan ciertas limitaciones, tales como la escasez de información para su escalado eficiente, la dificultad para el mantenimiento de monocultivos, los elevados costos de operación para la producción y recolección de la biomasa de microalgas, sin contar el encarecimiento del proceso de producción de biocombustible en la posterior etapa de extracción y transesterificación de triacilglicéridos. Ante estos inconvenientes, la optimización de los sistemas de cultivo de microalgas es imprescindible. Finalmente, la ventaja competitiva más importante del biodiesel de microalgas consiste en los rendimientos lipídicos por unidad de área, considerablemente superiores a los obtenidos con plantas oleaginosas (Chisti 2007, Rodolfi et al. 2009, Waltz 2009). El proceso de obtención de biodiesel a partir de microalgas y sus ventajas y limitaciones se discuten más adelante en esta Introducción de la Tesis.

1.2. La vida en ambiente ácido extremo.

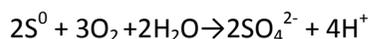
Existen numerosos microorganismos capaces de vivir bajo condiciones extremas de temperatura, presión, pH o salinidad, entre otras, y que se han adaptado a estas condiciones no comunes (Van den Burg 2003).

Ejemplos de ambientes extremos pueden ser: ambientes de altas temperaturas, donde habitan organismos hipertermófilos, que soportan temperaturas superiores a 80 °C, y organismos termófilos que crecen a temperaturas entre 60 y 80 °C; ambientes de bajas temperaturas, donde habitan organismos psicrófilos que crecen a temperaturas inferiores a 15 °C; ambientes de alta salinidad, con organismos halófilos capaces de vivir a concentraciones entre 2 y 5 M de NaCl; ambientes de altas presiones, donde habitan organismos piezófilos que soportan más de 130 MPa; lugares con altas concentraciones de metales o de radiación, y también ambientes ácidos o básicos (Van den Burg 2003). Los ambientes ácidos son especialmente

interesantes porque el pH de estos hábitats se mantiene, normalmente, gracias al metabolismo de los microorganismos y también a condiciones químicas impuestas por el medio en el que se desarrollan.

Los microorganismos capaces de vivir en ambientes de pH extremos, tanto alcalinos como ácidos, son denominados alcalófilos y acidófilos, respectivamente. Tales microorganismos son capaces de mantener su pH intracelular neutro, por lo que las enzimas intracelulares no necesitan adaptarse a condiciones extremas de crecimiento. Sin embargo, esto no es aplicable a las proteínas extracelulares, que deben ser activas a bajos o altos valores de pH. Estos microorganismos tienen interés biotecnológico (Van den Burg 2003).

Los ambientes ácidos naturales poseen dos orígenes. En los asociados a la actividad volcánica, la acidez se debe a la oxidación microbiana del azufre elemental, producto de la reacción de gases generados por la actividad volcánica:



En el segundo caso, los ambientes ácidos con elevados contenidos en metales están habitualmente asociados a actividades mineras, en la mayoría de los casos asociadas a la explotación de sulfuros (piritas). Estas operaciones exponen los sulfuros metálicos a la acción combinada del agua y del oxígeno, facilitando el crecimiento de microorganismos quimiolitótrofos y generando los denominados drenajes ácidos de minas. Este es uno de los hábitats que han servido como fuente de microalgas en esta Tesis, habiéndose crecido una especie aislada por el equipo de investigación y que resulta de interés por las moléculas antioxidantes que acumula.

1.2.1. Características químicas y microbiológicas de ambientes acuosos ácidos extremos de la Faja Pirítica de Huelva.

El río Tinto.

La Faja Pirítica se extiende a lo largo de gran parte del sur de la Península Ibérica, alrededor de 250 km de largo y de 30 a 50 km de ancho. Constituye una zona metalogénica de primer orden debido a la gran cantidad de mineralizaciones de sulfuros masivos que alberga y que están asociados a conos volcánicos en forma de piritita (Almodóvar y Sáez 2004).

El río Tinto (Figura 1.3) nace en el corazón de la Faja Pirítica Ibérica, en Peña de Hierro al norte de la localidad minera de Nerva (Huelva). Fueron los romanos los primeros en dejar constancia de su ubicación y alto valor, ya que durante cuatro siglos, extrajeron plata, cobre, oro e hierro de la Faja Pirítica donde nace el río. Se denominó inicialmente río Ubero, “el que quema”, sin que exista acuerdo sobre si el nombre hacía referencia al color rojo de sus aguas o a sus propiedades ácidas y oxidantes. “Tinto” es el nombre actual del río y no hay duda de que hace referencia al color de sus aguas.



Figura 1.3. Fotografía del río Tinto en la que se observa el color rojo de sus aguas.

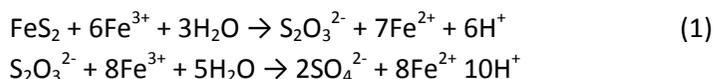
Estas características han provocado que se utilice como modelo de estudio para explicar la posible existencia de vida en Marte, debido a las similitudes que se han encontrado en el patrón de condiciones ambientales marciano y del citado río ácido (Fernández-Remolar et al. 2004). La elevada acidez del río, con un pH entre 2-3 a lo largo de su recorrido y su alto contenido en hierro, entre otros metales pesados, le hacen aparentemente

inviabile para mantener con vida cualquier sistema biológico. Pero no es así. La cuenca del río Tinto presenta una amplia variedad de ambientes en donde se desarrollan distintas comunidades (bentónicas en zonas aerobias, neustónicas en la superficie de aguas semiquietas, planctónicas en la columna de agua óxica y anóxica).

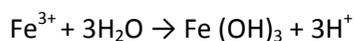
A pesar de las condiciones extremas de este ecosistema, el río Tinto posee una gran diversidad de comunidades microbianas, cuyas interacciones son de gran interés para la ecología. El río alberga más de 1300 especies distintas de microorganismos (López-Archilla 2005).

Origen de la acidez del río Tinto.

Gran parte del recorrido del río Tinto transcurre a lo largo de detritos mineros de hierro, cobre y zinc, lo que da a sus aguas altas concentraciones promedio de estos metales pesados (hasta 6, 0,2 y 0,4 g·L⁻¹, respectivamente) y también de algunos aniones como el sulfato (hasta casi 16 g·L⁻¹) (López-Archilla y Amils 1999). Tres sulfuros metálicos, pirita, molibdenita y tungstenita, son susceptibles de una oxidación química provocada por contacto con el oxígeno y el agua y mediada por ión férrico, por el denominado mecanismo del tiosulfato. Para la pirita, tal mecanismo es el siguiente:



El principal producto de esta reacción es el ácido sulfúrico. Esto provoca una bajada de pH (hasta un valor medio de 2,3, tamponado por el ión férrico) que hace que haya una cierta concentración de numerosos cationes metálicos tóxicos disueltos (Fe, As, Cu, Zn, Ni, etc.) (Davila et al. 2008). El pH es tamponado por el equilibrio de Fe³⁺/Fe(OH)₃ (pK_a 2,5) y SO₄²⁻/H₂SO₄⁻ (pK_a 2,0) (Messerli et al. 2005):



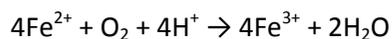
La tendencia del pH del medio, por lo tanto, es hacia la acidificación, ya que la disolución de minerales básicos (por ejemplo, carbonatos) no suele ser suficiente como para neutralizar la enorme producción de protones. Junto con el ión férrico, y debido a la presencia de otros metales en los minerales de las zonas piríticas, el agua que entra en contacto con las vetas y sale más tarde a la superficie va cargada de otros metales pesados como cobre, zinc y manganeso, debido a la gran solubilidad de estos elementos en agua ácida. Sin embargo, es el ión férrico el que normalmente domina en este tipo de aguas, y debido a que permanece en disolución a pH bajo, les proporciona su llamativo color rojo (López-Archilla 2005).

Características microbiológicas del río Tinto.

Las condiciones del río son, en gran medida, producidas y mantenidas por el componente biológico del ecosistema, principalmente organismos procarióticos quimiolitótrofos. Son estos los responsables de mantener una elevada concentración del ión férrico, el agente oxidante.

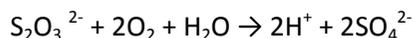
El mecanismo por el cual estos microorganismos obtienen energía oxidando sulfuros metálicos tiene gran interés industrial y se denomina biolixiviación, la base de la biominería. La biolixiviación consiste en que el ión férrico presente en el río y en las envolturas celulares de los microorganismos biolixiviadores es responsable de la transferencia electrónica desde el sustrato mineral insoluble (sulfuros) a la cadena de transporte de electrones. Esto permite aclarar el proceso de solubilización de sulfuros metálicos a bajas temperaturas y presión.

El hierro resultante de las oxidaciones producidas por estos microorganismos quimiolitótrofos se puede reoxidar mediante el concurso de microorganismos oxidadores de hierro a pH inferiores a 4:



Algunas bacterias como *Acidithiobacillus ferrooxidans* o *Thiomonas cuprina* y arqueas como *Metallosphaera* spp, *Leptospirillum ferrooxidans* y *Sulfolobus* spp. pueden oxidar tiosulfato y otros compuestos inorgánicos

como azufre e hierro reducidos, generando a su vez ácido sulfúrico. Es un papel fundamental de la biolixiviación en la generación de drenajes ácidos de minas (Kelly y Harrison 1989, Hallman et al. 1992, Espejo et al. 1995, López-Archilla 2005):



Como consecuencia de estos procesos, el río Tinto y los drenajes ácidos de la faja pirítica configuran un ambiente difícil para la vida, caracterizado por valores de pH muy bajos y concentraciones elevadas de hierro en disolución, causante de estrés oxidativo en microorganismos que lo habitan.

1.2.2. Fotosíntesis en ambiente ácido acuoso extremo.

A pesar de las extremas características que tiene este ecosistema, una extensa y compleja comunidad microbiana está presente en el río, no solo procariotas (como bacterias quimilitótrofas y heterótrofas) sino eucariotas (algas, hongos y protistas) (López-Archilla et al. 1993, 1995 y 2005) (Figura 1.4). Esto sugiere que los microorganismos que en ellas se desarrollan podrían expresar mecanismos antioxidantes para adaptarse al estrés ocasionado por la presencia de altas concentraciones de metales o el bajo pH.

Las algas eucarióticas son productores primarios del sistema, mientras que hongos y bacterias heterotróficas juegan el papel de consumidores y descomponedores. La producción de materia orgánica en el río Tinto se debe tanto a la actividad quimiolitoautótrofa como fotosintética. Los productores fotosintéticos se encuentran principalmente en aquellos lugares donde el cauce es somero y la luz penetra sin problemas hasta el fondo. Estos pueden estar asociados con otros organismos dando lugar a *biofilms* (Figura 1.4 C). Las algas más abundantes son clorofitas unicelulares, principalmente de los géneros *Chlamydomonas* y *Chlorella* (Lopez-Archilla et al. 2001).

Este ecosistema de condiciones hostiles para la vida hace que los organismos fotosintéticos que en él cohabitan tengan notable capacidad de

adaptación. Por esta razón, nuestro equipo de investigación ha aislado microalgas de este ambiente ácido y estudia su potencial biotecnológico en la producción de antioxidantes, estudios de los que esta Tesis forma parte.

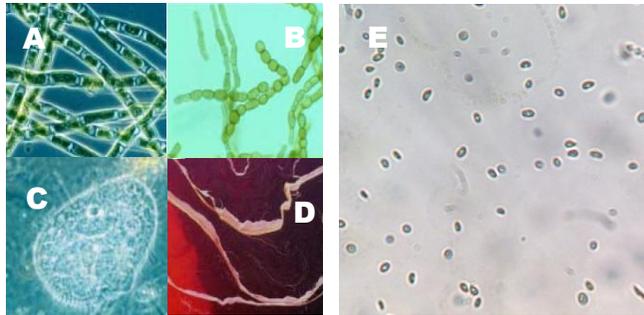


Figura 1.4. Fotografía al microscopio óptico de distintos tipos de microorganismos observados en el río Tinto. (A) Filamentos algales del género *Klebsormidium*; **(B)** Aspecto microscoscópico del hongo *Scytalidium thermophilum*; **(C)** *Biofilms* ciliado; **(D)** Fotografía de macrofilamentos. (Fuente: López-Archilla 2005) **(E)** Microalga acidotolerante del río Tinto aislada por el grupo de Biotecnología de Algas, *Coccomyxa onubensis*, vista al microscopio 40x.

Las microalgas presentan una gran adaptabilidad a distintas condiciones ambientales, lo que ha hecho que se encuentren ampliamente distribuidas en la biosfera bajo formas unicelulares, coloniales o filamentosas, como las especies localizadas en el río Tinto. Como se comentó con anterioridad, para su desarrollo requieren, en líneas generales, de una fuente de carbono apropiada, luz, nutrientes en cantidad suficiente y un intervalo apropiado de temperatura (Apt y Behrens 1999); en este sentido, el río Tinto presenta determinadas peculiaridades que dificultan el crecimiento de las microalgas en sus aguas ácidas.

CO_2 .

La habilidad de los organismos fotosintéticos para usar el CO_2 para la fotosíntesis depende en parte de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa, RUBISCO. Dicha enzima tiene una afinidad sorprendentemente baja por el CO_2 , probablemente porque se desarrolló en una atmósfera que tenía los niveles de CO_2 muy altos en comparación con la atmósfera presente. La concentración de CO_2 en agua en equilibrio con el aire es aproximadamente de $10 \mu M$. Es probable que no más del 30 % de moléculas de RUBISCO sea operativa bajo condiciones atmosféricas estándar. Esta es

una de las razones por las que las plantas C3 contienen mas concentración de Rubisco (K_m (CO_2) entre 15 y 25 μM) (Moroney y Somanchi 1999).

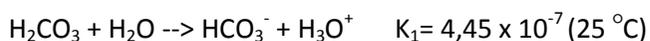
Vivir en condiciones de ambientes ácidos supone, en particular, una baja disponibilidad de CO_2 dado que a pH ácido la solubilidad del gas es muy baja y, por tanto, no hay apenas carbono disponible en forma de bicarbonato. En este sentido, las microalgas acidotolerantes, una de las cuales es objeto de estudio en esta Tesis, deben expresar mecanismos concentradores de CO_2 que podrían hacer de algunas de tales microalgas, buenas candidatas para el desarrollo de procesos eficientes de mitigación de CO_2 (Gross 2000).

El pH ácido tiene una fuerte influencia en la cantidad de carbono inorgánico disuelto disponible para la fotosíntesis. La solubilidad del CO_2 en agua dulce a temperatura de 18 °C es de 10-15 μM y esta puede cambiar por el pH. El CO_2 consumido en la fotosíntesis será repuesto rápidamente por HCO_3^- existente en el medio bajo pH alcalinos y neutros. Sin embargo, a pH ácido, el CO_2 es utilizado en la fotosíntesis porque bajo estas condiciones casi todo el carbono inorgánico disuelto es CO_2 . Este efecto negativo es contrarrestado con la alta tasa de reposición de CO_2 atmosférico en el medio líquido. A pH 7 son necesarios 3,5 min (18 °C) para alcanzar el equilibrio entre las formas disueltas de carbono inorgánico, mientras que a pH 2 son necesarios sólo 0,42 s (Brinkman et al. 1933, Gross 2000).

El dióxido de carbono cambia el pH del agua. Se disuelve ligeramente en agua para formar un ácido débil llamado ácido carbónico, H_2CO_3 , de acuerdo con la siguiente reacción:



A su vez, el ácido carbónico reacciona con el agua para formar un catión hidronio, H_3O^+ , y el ión bicarbonato, HCO_3^- , de acuerdo con el siguiente equilibrio:



Este comportamiento químico explica por qué el agua, que normalmente tiene un pH neutro de 7, tiene pH ácido cuando ha sido expuesta al aire.

En el caso de encontrarse las microalgas en el medio natural a pH muy ácido, como ocurre en el río Tinto debido a las reacciones ya comentadas de oxidación de azufre, el equilibrio de ionización del carbónico tiende a estar desplazado a la izquierda, lo que determina que en medio acuoso sea CO_2 la fuente mayoritaria de carbono, por lo que las microalgas acidófilas deben expresar mecanismos capaces de asumir mayoritariamente esa forma de carbono inorgánico e incorporarla en su ciclo de vida.

Los principales mecanismos concentradores de carbono de microalgas y cianobacterias captadores de CO_2 son un sistema de anhidrasas carbónicas repartidos en diferentes compartimentos celulares (Figura 1.5). La energía requerida para dichos mecanismos concentradores es similar a la de las plantas C4. Bajo condiciones de acidez, puede asumirse consumo de CO_2 como única fuente de carbono, una anhidrasa carbónica extracelular parece, en principio, mucho menos necesaria. De acuerdo con diversos autores, existe poca actividad en anhidrasas carbónicas externas en comparación con microalgas que viven en ambientes básicos (Geib et al. 1996, Gross 2000).

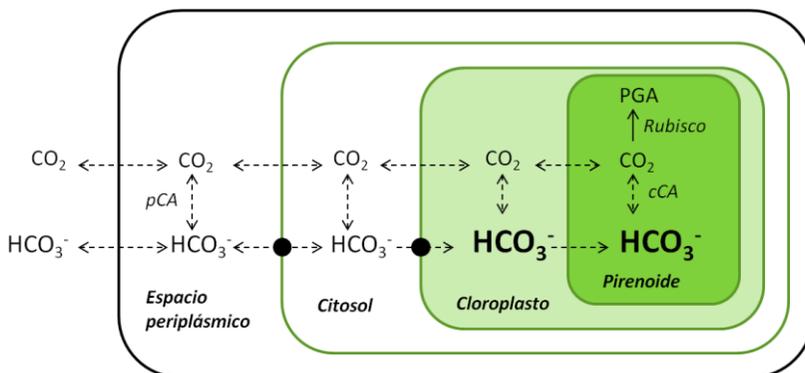


Figura 1.5. Modelo propuesto para el mecanismo de concentración de CO_2 en microalgas eucarióticas. El tamaño de las flechas indica la concentración relativa de cada especie de carbono inorgánico (Ci). cCA, anhidrasa carbónica cloroplastídica; pCA, anhidrasa carbónica periplásmica; PGA, ácido 3-fosfo-glicérico. Fuente: Moroney y Somanchi (1999).

Bajo condiciones de pH ácido, el CO₂ entra en la célula en parte por difusión para convertirse en HCO₃⁻ en el citosol, que se encuentra a pH neutro. Este será acumulado a un ritmo que está en función de satisfacer el propio equilibrio químico intracelular del carbono inorgánico y la demanda de CO₂ de la Rubisco. Este método pasivo de concentración de CO₂ no es muy eficiente, aunque sin embargo incrementará el carbono inorgánico disuelto en el citosol (Raven et al. 1982, Gross 2000).

pH.

Debido a la alta acidez, los organismos tienen que hacer frente a una elevada concentración de H⁺ y esto causa numerosos problemas en la célula, la cual debe adaptarse.

El pH del citosol de las microalgas es neutro, luego la diferencia de pH entre el exterior y el interior celular (algunas capaces de vivir a pH 1) es considerable. Para compensar el elevado gradiente de protones a uno y otro lado de la membrana celular externa, hay un continuo bombeo de protones al exterior. El coeficiente de permeabilidad de protones en la membrana plasmática en condiciones de pH 6-7 varía desde 10 a 50.000 nms⁻¹, mientras que en microorganismos acidotolerantes, este flujo debe ser menor, unos 100 nms⁻¹, para que pueda mantenerse el pH celular neutro.

La membrana plasmática de las algas acidófilas es aparentemente bastante impermeable para los protones, que requieren relativamente poca energía para ser bombeados activamente contra un flujo de protones pasivo. Otro mecanismo para evitar el bombeo de protones es que la superficie de la membrana tenga carga neta altamente positiva, como se ha descrito en *Dunaliella acidophila* (Gimmler et al. 1989, Gross 2000). La masiva entrada de protones del exterior debe estar balanceada con la salida de protones del interior (Gross 2000).

Irradiancia.

El Tinto es un río de poco caudal. En casi todo su recorrido el cauce es ancho y el agua que fluye forma una lámina somera que permite la

penetración de la luz hasta el fondo, facilitando la proliferación de microalgas y otros pigmentos asociados (López-Archilla 2005). En estos lugares la radiación recibida es alta, lo que da lugar a que las especies que allí crecen tengan además, una concentración de pigmentos asociados a la captación de luz más elevada. Es el caso de *Coccomyxa onubensis*, una de las microalgas de estudio en esta Tesis, que además se le conoce entre otras cosas, por su elevada capacidad de síntesis de luteína (xantofila).

Metales y estrés oxidativo.

Debido a la oxidación de la pirita y otros minerales de forma natural y a la acción de los organismos procariontas quimiolitótrofos, el río Tinto tiene altas concentraciones de metales, solubilizados en su mayoría por el pH ácido del agua.

La presencia de metales es una forma de estrés para el crecimiento de los microorganismos. Se ha descrito que altas concentraciones de iones metálicos dan lugar a especies ROS (especies de oxígeno reactivas) (Nagalakshmi y Prasad 2001, Li et al. 2006, Vaquero et al. 2012). Estos radicales afectan a la viabilidad de la célula, a sus macromoléculas como las proteínas, lípidos, polisacáridos o los ácidos nucleicos, desembocando en una posible alteración de la membrana, posible pérdida de funciones enzimáticas y daño genómico (Dietz et al. 1999). Es lo que comúnmente se denomina como daño oxidativo.

Para evitar el daño generado por la presencia de dichas moléculas ROS, los microorganismos han desarrollado mecanismos de defensa enzimáticos y no enzimáticos (Mallick y Mohn 2000, Schützendübel y Polle 2002). Los mecanismos antioxidantes no enzimáticos incluyen compuestos de bajo peso molecular tales como glutatión, compuestos fenólicos y ascorbato, mientras que las defensas enzimáticas incluyen superóxido dismutasa (SOD), glutatión reductasa (GR), catalasa (CAT) y una variedad de peroxidasas, como ascorbato peroxidasa (APX).

Los microorganismos que son capaces de vivir en un medio con concentraciones de hierro, cobre y zinc del orden de $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ deben, por la lógica de los procesos bioquímicos conocidos, expresar propiedades antioxidantes

(Morelli y Scarano 2004). Dichas propiedades antioxidantes implican, como se ha comentado, mayor acumulación moléculas de valor comercial como carotenoides y compuestos fenólicos. En consecuencia, los microorganismos acidófilos podrían ser nuevas fuentes de tales compuestos y su potencial biotecnológico merece ser objeto de estudio.

Presión osmótica, halotolerancia y carencia de nutrientes.

Debido a la baja permeabilidad de la membrana celular a los protones del medio, la elevada concentración de estos en las aguas ácidas, habitualmente a pH inferiores a 3, debe causar en los microorganismos una considerable presión osmótica. Este hecho, unido a la elevada concentración de aniones vinculados a la presencia de cationes metálicos en disolución, particularmente los sulfatos cuya concentración supera normalmente los $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, permitiría esperar en los microorganismos de ambiente ácido una cierta halotolerancia. Aunque hay escasas referencias al respecto, este hecho ha sido probado en algunas microalgas acidófilas (Gimmler y Weis 1992) y permite en este trabajo plantear la hipótesis de que el aumento de salinidad en el medio podría utilizarse para estimular la acumulación de carotenoides y de otros lípidos que se sintetizan en dichas condiciones (Richmond 2004).

De otra parte, las aguas procedentes de drenajes ácidos de minas son muy escasas en nitrógeno inorgánico, mantienen determinados niveles de fósforo en equilibrio con precipitados de fosfato y, como se ha comentado, son extremadamente ricas en azufre (Ferris et al. 2004). El azufre forma parte esencial del glutatión y, por lo tanto, de las actividades enzimáticas antioxidantes, cuya expresión es esperable en microalgas acidófilas sometidas a factores físico-químicos oxidantes. La carencia de nutrientes es una de las estrategias utilizadas para estimular la acumulación de moléculas lipídicas de microalgas y se aplica en esta Tesis con dicho propósito a una microalga de ambiente ácido.

1.3. Lípidos de microalgas.

1.3.1. Definición y funciones principales en microalgas.

Bajo el término lípido se incluyen, generalmente, moléculas de origen biológico insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos, como acetona, metanol, éter dietílico, hexano y cloroformo, entre otros. Las principales funciones biológicas de los lípidos incluyen su papel central en el almacenamiento de energía, como componentes estructurales de las membranas celulares, y como importantes moléculas de señalización.

Los lípidos denominados neutros incluyen los TAG (triacilglicéridos). Estos compuestos sirven principalmente como almacenamiento de energía y carbono orgánico. Aparecen en forma de cuerpos oleosos en las células de muchas especies de microalgas. En la mayoría de los casos, los TAG se acumulan en las microalgas cuando sus cultivos se someten a condiciones limitantes para el crecimiento, que suelen denominarse condiciones de estrés e incluyen variaciones en la temperatura, alta irradiancia, carencias nutricionales o altas concentraciones de sal en el medio, entre otras. Por tanto, los TAG son una reserva relevante de carbono y energía para el crecimiento de los microorganismos después de estar sometidos a alguna condición de estrés (Cohen y Khozin-Goldberg 2005, Rontani et al. 2006, Hu et al. 2008, Solovchenko 2012). Por otra parte, los lípidos polares desempeñan un papel estructural en la membrana celular y en otros orgánulos, y junto a esta función estructural también pueden operar como moléculas señales o precursores de la biosíntesis de otras (Thompson 1996, Solovchenko 2012). Entre los lípidos polares se encuentran moléculas de naturaleza terpenoide que realizan funciones colectora de luz y antioxidante en plantas y microalgas, conocidas como pigmentos fotosintéticos.

Carotenoides: biosíntesis y factores que inducen la acumulación

La mayoría de los carotenoides son isoprenoides de 40 carbonos, los cuales están compuestos por cadenas de 8 unidades de isoprenos (Naik et al. 2003). Debido a su estructura, los carotenoides juegan un importante papel en la fotosíntesis en términos de captura de energía, como complemento de

las clorofilas. En su estructura se encuentran numerosos dobles enlaces que dan lugar a diferentes absorciones en la zona visible del espectro y a distintas propiedades fotoquímicas, presentando por tanto diferencias de color, de forma geométrica de la molécula (cis/trans) y de su efectividad en los procesos de transferencia de energía dentro del aparato fotosintético. Desempeñan un papel fundamental en la protección en el organismo fotosintético contra el daño producido por la fotooxidación. Además, una función muy importante es la de minimizar el daño producido por radicales libres en el metabolismo celular. Dicha función antioxidante hace de los carotenoides moléculas con propiedades en la prevención de patologías humanas que cursan por degeneración oxidativa (Ye et al. 2008).

La estructura molecular de los carotenoides puede terminar en anillos no aromáticos y puede contener grupos funcionales con átomos de oxígeno. De esta forma, los carotenoides pueden dividirse en dos grupos fundamentales: *carotenos*, carotenoides hidrocarbonados de cadena lineal o con ciclaciones a uno o ambos lados de la molécula y cuyo principal exponente es el β -caroteno ($C_{40}H_{56}$), y *xantofilas*, derivados oxigenados de los carotenos. Los átomos de oxígeno pueden presentarse formando parte de grupos hidroxilos (como en la luteína, 3R, 3'R, 6'R- β , ϵ -carotene-3,3'-diol, $C_{40}H_{56}O_2$), de grupos cetona (como en la cantaxantina), de una combinación de ambos (como en la astaxantina, 3,3'-dihidroxi- β , β -4,4'-diona, $C_{40}H_{52}O_4$) o de otros grupos como metoxilos, epóxidos, carboxilos o acetatos.

En las microalgas, al igual que en las plantas superiores, coexisten dos rutas para la síntesis de carotenoides (Figura 1.6), la llamada ruta mevalónica y la no mevalónica. Ambas terminan sintetizando isopentenil pirofosfato (IPP), compuesto de 5 átomos de carbono que constituye el punto de inicio de la biosíntesis de carotenoides.

En el caso de la ruta mevalónica, el IPP se produce en el citosol a través de la ruta acetato/mevalonato (MVA) dando lugar a la biosíntesis de esteroides, sesquiterpenos y triterpenos. La ruta mevalónica comienza mediante la condensación de 3 unidades de acetyl-Coenzima A (acetyl-CoA) para dar lugar a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), que se reduce a mevalonato, y dos sucesivos pasos de fosforilaciones y de descarboxilación/eliminación dan lugar a IPP (Schwender et al. 1996). La ruta

no mevalónica ocurre en el cloroplasto, donde el IPP es sintetizado a partir de 1-deoxi-D-xilulosa-fosfato (DOXP), procedente a su vez de la condensación de gliceralhedido 3-fosfato (GA3P) con piruvato. Monoterpenos, diterpenos, isoprenos, carotenoides, fitol (una cadena lateral de las clorofilas) y plastoquinona son productos metabólicos de esta ruta (Lichtenthaler 1999). Las algas verdes utilizan la ruta del mevalonato (Lichtenthaler 1999) aunque otros grupos de algas pueden utilizar ambas vías (Eisenreich et al. 2001). Se ha descrito que la vía DOXP ocurre en cianobacterias, el alga roja *Cyanidium* y la crisofita *Ochromonas* (Lichtenthaler 1999).

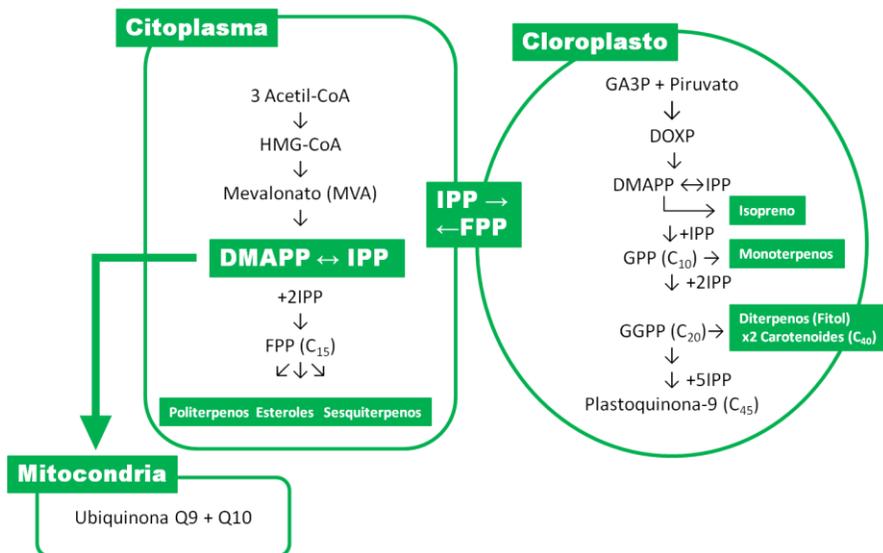


Figura 1.6. Biosíntesis de IPP e isoprenoides en plantas superiores y microalgas entre el citosol (ruta de acetato/MVA) y cloroplastos (ruta del DOXP). Abreviaturas usadas. HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A; DMAPP: dimetil-alilpirofosfato; IPP: isopentenil pirofosfato; FPP: farnesil-pirofosfato; GA3P: gliceralhedido 3-fosfato; DOXP: 1-deoxi-D-xilulosa-fosfato; GPP: geranil-pirofosfato; GGPP: geranil-geranil-pirofosfato. Fuente parcialmente modificada de Lichtenthaler (1999).

En la Figura 1.6 se muestra un resumen de la biosíntesis de IPP en ambas rutas. Hay que tener en cuenta que en la segunda etapa, después de sintetizar el IPP, éste se isomeriza a dimetil-alilpirofosfato (DMAPP), compuesto que sufre la adición secuencial de tres moléculas de IPP. Esta reacción es catalizada por la enzima geranil-geranil-sintasa (GGPP *sintasa*) que origina un compuesto de 20 átomos de carbono llamado geranil-geranil-pirofosfato (GGPP).

A partir de aquí, como muestra la Figura 1.7, dos moléculas de GGPP se condensan para formar fitoeno, reacción catalizada por la enzima fitoeno sintasa. El fitoeno es el compuesto precursor de todos los carotenoides (Lichtenthaler 1999, Naik et al. 2003, Ye et al. 2008).

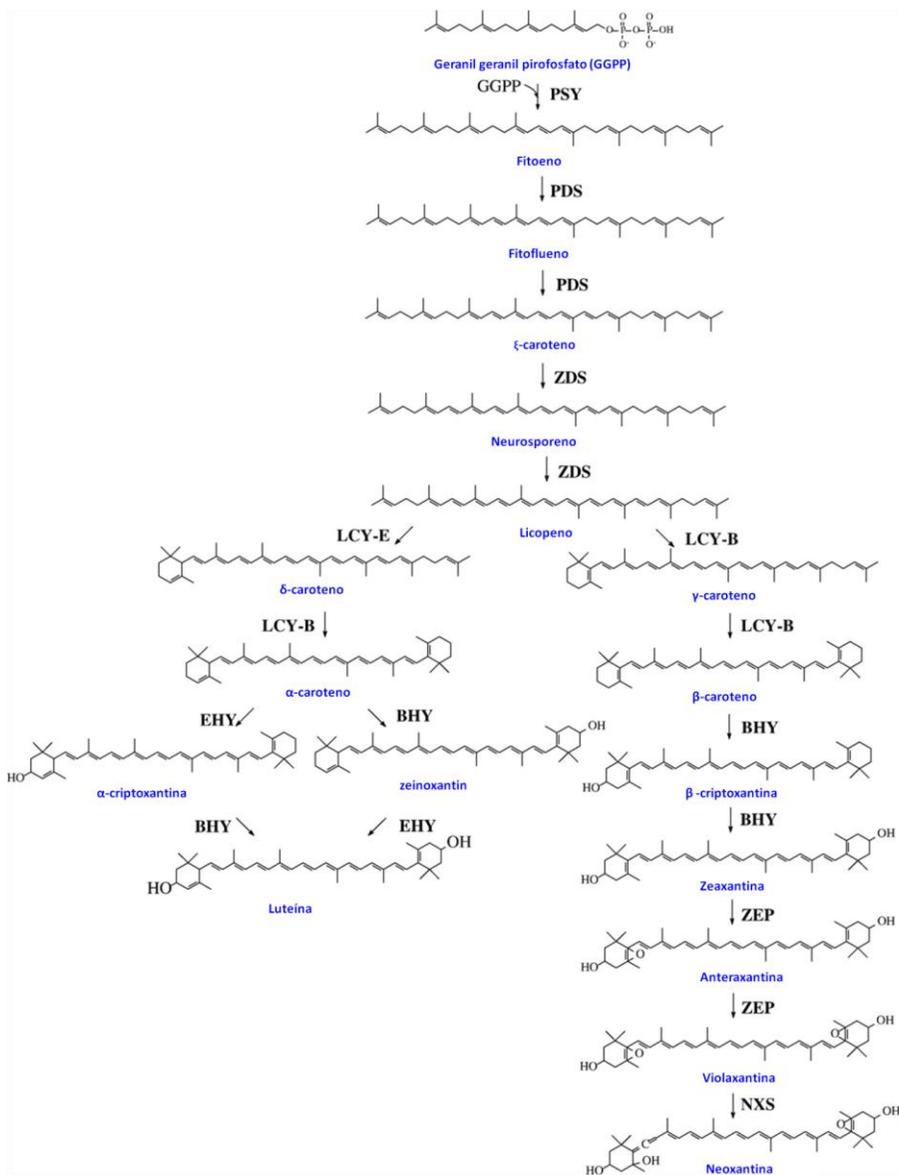


Figura 1.7. Ruta de carotenogénesis en microalgas. Abreviaturas usadas. PSY: fitoeno sintetasa; PDS: fitoeno desaturasa; ZDS: ζ-caroteno desaturasa; LYC-E: licopeno ε-ciclaza; LYC-B: licopeno β-ciclaza; EHY: ε-caroteno hidroxilasa; BHY: β-caroteno hidroxilasa; ZEP: zeaxantina epoxidasa; NXS: neoxantina sintetasa. Fuente parcialmente modificada de Naik et al. (2003).

Existen muchos factores conocidos para la acumulación de carotenoides. Por ejemplo, *Dunaliella* acumula grandes cantidades de β -caroteno bajo condiciones adversas de crecimiento, tal como alta irradiancia, alta salinidad, baja temperatura, deficiencia de nutrientes y la presencia de metales pesados (Ben-Amotz 1996). El estrés oxidativo o generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), ocurre en los sistemas biológicos cuando estos experimentan ciertas condiciones de crecimiento, como las mencionadas anteriormente, que impiden la evolución normal del metabolismo y división celulares. Se conoce que la presencia de ROS es perjudicial para la funcionalidad de numerosas biomoléculas, incluyendo lípidos, proteínas y ADN. En la protección frente a ROS es vital para la célula la presencia de sistemas internos antioxidantes, los llamados sistemas enzimáticos y los no enzimáticos (Bouvier et al. 1998).

De forma general y como se comentó con anterioridad en esta Introducción, los sistemas enzimáticos celulares incluyen la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX) y ascorbato peroxidasa (APX). En los mecanismos no enzimáticos los ROS son neutralizados directamente por antioxidantes internos como glutatión (GHS), α -tocoferol y carotenoides (Fryer 1992, Bouvier et al. 1998). Estudios previos han descrito que, por tanto, la presencia de ROS induce la caroterogénesis; por ejemplo, *Dunaliella salina* o *Dunaliella terriolecta* incrementan su actividad de SOD, CAT o APX además de acumular grandes cantidades de β -caroteno debido a la presencia de metales como el cobre en el medio (Rabinowitch et al. 1987, Lers et al. 1991). La presencia de metales disueltos en el lecho del río Tinto y de los drenajes ácidos de las minas de la Faja pirítica de Huelva, genera un ambiente oxidante para los microorganismos que los habitan. A tales condiciones de estrés, se unen la alta temperatura media en primavera y verano y la alta irradiancia habitual de los meses estivales. Por ello, sería esperable que las microalgas de ambiente ácido produjesen una respuesta antioxidante que, en parte, estuviese basada en la acumulación de carotenoides, pigmentos necesarios en la protección de la fotosíntesis frente al estrés oxidativo.

Ácidos grasos: biosíntesis y factores que inducen la acumulación.

En esta Tesis se estudia la acumulación de lípidos de microalgas útiles para la obtención de biodiesel. Los lípidos de microalgas que pueden utilizarse para producir biodiesel son, mayoritariamente, los ácidos grasos. Como se discutirá en un apartado posterior de esta Introducción, estos se convierten en biodiesel mediante reacciones de transesterificación con metanol.

Nos centraremos en el estudio de la biosíntesis de ácidos grasos y TAG. Su función está relacionada con la participación en el catabolismo para la producción de energía requerida para la célula (Solovchenko 2012). Los triacilglicéridos (Figura 1.8) están formados por tres moléculas de ácidos grasos esterificados con los grupos hidroxilo de una molécula de glicerol. Los ácidos grasos son moléculas formadas por cadenas de carbono que poseen un grupo carboxilo como grupo funcional.

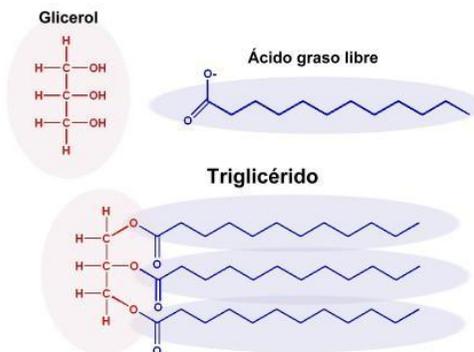


Figura 1.8. Estructura y componentes de los TAG.

El número de carbonos habitualmente es par. Los ácidos grasos pueden ser saturados o insaturados, según presenten o no insaturaciones en la cadena alifática. Los ácidos grasos que contienen dos o más dobles enlaces se denominan ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Principales ácidos grasos descritos en microalgas

Nombre común	Ácidos grasos
Ácidos grasos saturados	
Laúrico	C12:0
Mirístico	C14:0
Palmítico	C16:0
Esteárico	C18:0
Ácidos grasos monoinsaturados	
Palmitoléico	C16:1
Oléico	C18:1
Ácidos grasos poliinsaturados	
Linoleico	C18:2
γ -linolénico y α -linolénico	C18:3 ω 6 y C18:3 ω 3
Araquidónico	C20:4 ω 6
Eicosapentaenoico	C20:5 ω 3 (EPA)
Docosahexaenoico	C22:6 ω 3 (DHA)

La biosíntesis de ácidos grasos tiene lugar en el cloroplasto tal y como se observa en la Figura 1.9. La primera etapa anabólica está catalizada por la enzima acetil-CoA carboxilasa (ACCCase) y combina CO_2 (disuelto como HCO_3^-), ATP y acetil-CoA para formar el malonil-CoA. Esta fuente endógena de acetil-CoA proviene del fosfoenolpiruvato (PEP) de la ruta glucolítica o de la dihidroxiacetona fosfato originada en el ciclo de Calvin. La glucolisis citosólica comienza con la degradación de carbohidratos simples y dando lugar a PEP, que es transportado al cloroplasto para ser convertido en piruvato y posteriormente en acetil-CoA (Hu et al. 2008). Es en esta etapa donde el malonil-CoA inicia la síntesis de ácidos grasos. La mitad del grupo malonil es usado para la elongación del grupo acilo como donante central.

El siguiente paso es la transacilación, que implica un cofactor, una proteína portadora del grupo acilo (ACP) y dos moléculas de acil-CoA. Mientras que el complejo enzimático malonil-CoA/ACP es altamente específico, acetil-CoA/ACP es de menor afinidad, lo que da lugar a que pueda reaccionar con otros compuestos de acil-CoA de bajo peso molecular, por ejemplo, el propionil-CoA, dando lugar a un número impar de carbonos y a ramificación de los ácidos grasos. Estos son poco comunes en microalgas y muy típicos en lípidos de bacterias (Courchesne et al. 2009, Greenwell et al. 2010).

La formación de TAG tiene lugar en el cloroplasto y en el retículo endoplasmático. El primer paso es la condensación de G3P con una molécula de acil-CoA para formar lisofosfatidato (LPA), de nuevo condensado con otro acil-CoA para producir fosfatidato (PA) y dando lugar a diacilglicerol. El último paso incorpora de nuevo otro acil-CoA a la molécula dando lugar a triacilglicerol. Los TAG son almacenados en cuerpos oleaginosos (Greenwell et al. 2010).

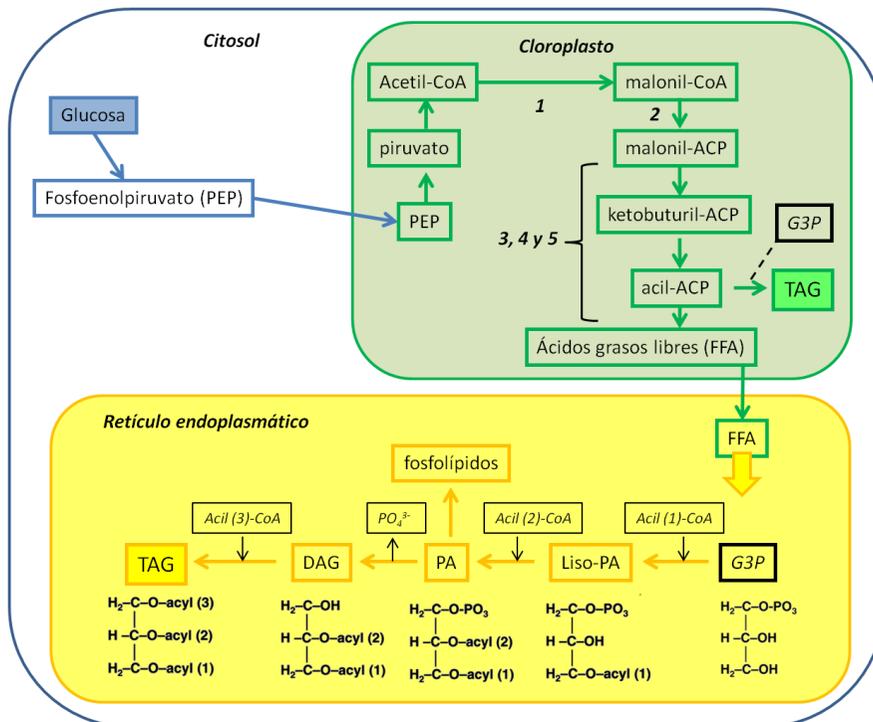


Figura 1.9. Ruta de biosíntesis de ácidos grasos y TAG (Kennedy pathway). Reacciones enzimáticas: (1) ACCase; acetil-CoA-carboxilasa (2) complejo enzimático malonil-CoA/ACP transferasa; (3) 3-ketoacil ACP reductasa; (4) 3-hidroxiacil ACP deshidrogenasa y (5) enoil ACP reductasa. ACP, proteína portadora de grupo acilo; G3P, glicerol-3-fosfato; liso-PA, ácido lisofosfatídico; TAG, triacilgliceridos; DAG, diacilgliceridos. Adaptado y modificado de: Roessler et al. (1994), Ohlrogge y Browse (1995) y Riekhof et al. (2005).

La acumulación de ácidos grasos se produce a partir de diferentes situaciones. Las células pueden ser capaces de reciclar los ácidos grasos a partir de otros componentes celulares, por ejemplo, lípidos de membrana. La decisión de si los lípidos se sintetizan a partir de nuevo carbono asimilado o

desde carbono reciclado, depende fuertemente del estado metabólico de la célula.

En células de crecimiento rápido, el metabolismo de los lípidos se centra en la síntesis de lípidos de membrana para apoyar dicho crecimiento celular. La mayoría de los lípidos en estas células son sintetizados *de novo*. Bajo condiciones de estrés, algo más de la mitad de los lípidos durante el aumento del estrés se origina a través de la síntesis de ácidos grasos, mientras que el resto de lípidos acumulados proviene del reciclaje de ácidos grasos existentes, por ejemplo, los que se encuentran en membranas de orgánulos (Kurat et al. 2006).

Vale la pena mencionar que las condiciones favorables para la biosíntesis de ácidos grasos y TAG suelen ser estresantes para el metabolismo de la microalga, es decir, dificultan la división celular y por tanto reducen la velocidad de crecimiento (Solovchenko 2012). Los principales factores químicos que inducen la acumulación son la carencia nutricional, la salinidad y los cambios de pH en el medio nutricional. Factores físicos que también pueden estimular la síntesis de ácidos grasos son la variación en la intensidad de luz y en la temperatura. Tales factores no solo afectan a la acumulación de carbono, sino al crecimiento celular y a la composición de ácidos grasos (Hu 2004). La abundancia de ácidos grasos respecto a la masa celular y la proporción de saturados e insaturados depende también de la intensidad del estrés aplicado. Generalmente, la relación entre cantidad de ácidos grasos acumulados y productividad de la biomasa es inversa, y desde el punto de vista aplicado resulta clave determinar el factor y la intensidad adecuados de estrés que favorezcan la acumulación de ácidos grasos sin limitar en extremo la productividad de la biomasa. De esta forma se conseguirá la mayor productividad posible de ácidos grasos.

La carencia de nitrógeno inorgánico es el que más afecta, de entre los nutrientes, al metabolismo de lípidos en algas. En general, se ha observado en numerosas especies un aumento en la acumulación de TAG como respuesta de la deficiencia de nitrógeno (Hu et al. 2008). La limitación de fósforo y azufre también supone en muchos casos un aumento de TAG.

Isochrysis galbana, *Chlamydomonas reinhardtii* o *Chlorella sp.* son algunos ejemplos (Otsuka 1961, Sato et al. 2000).

Por otro lado, algunos estudios revelan que en cultivos de microalgas y cianobacterias la disminución de la temperatura tiende a aumentar la proporción de los ácidos grasos insaturados, mientras los saturados aumentan con las temperaturas elevadas (Renaud et al. 2002).

La irradiancia también influye, determinando cambios en el contenido de pigmentos y en la actividad fotosintética. Bajas intensidades inducen la formación de lípidos polares, particularmente aquellos asociados a la membrana del cloroplasto, y la formación de PUFAs que participan incorporándose en la estructuras de las membranas. Sin embargo, a altas irradiancias disminuye el contenido de lípidos polares pero se compensa con el aumento en la cantidad de lípidos neutros, principalmente TAGs y ácidos grasos saturados y monoinsaturados (Sukenik et al. 1993, Brown et al. 1996, Khotimchenko y Yakovleva 2005).

Estudiar el enriquecimiento de las microalgas en ácidos grasos insaturados es relevante por el contenido de aquellas en PUFAs útiles en humanos, incluyendo ácidos grasos esenciales como el linoléico (C18:2), α -linolénico (C18:3), araquidónico (C20:4), ecosapentanoico (C20:5), docosahexanoico (C22:6) y algunos otros que tienen un alto potencial en farmacología, química o alimentación (Cardozo et al. 2007).

En definitiva, el sol facilita a las microalgas su actuación como centrales biológicas de fijación de la energía solar y del carbono atmosférico en moléculas energéticas contenidas en la biomasa generada. La energía solar, capturada por las moléculas de clorofila y de carotenoides, se incorpora finalmente en forma de enlaces químicos en el metabolismo celular. Algunas de las moléculas producidas por las microalgas tienen valor como combustibles o pueden ser convertidas en tales mediante transformaciones químicas sencillas. Además de los ya discutidos triacilglicéridos (conocidos comúnmente como *aceites* de microalgas), convertibles en combustibles mediante transesterificación con alcoholes de cadena corta o por hidrogenación, pueden citarse como moléculas de valor energético producidas por microalgas, las siguientes: (a) el hidrógeno,

obtenido previa separación de otros gases procedentes del metabolismo celular; (b) carbohidratos, fermentables a etanol; (c) hidrocarburos de cadena larga - en algunas especies de microalgas -, y (d) la propia biomasa, fermentable para la obtención de biogás rico en metano (Mata et al. 2010, Merchant et al. 2012).

1.4. Biodiesel de microalgas.

1.4.1. Definición.

El biodiesel es una mezcla de alquil-ésteres de ácidos grasos obtenido por reacción de transesterificación de aceites vegetales o grasas animales. Estas materias primas están compuestas de un 90-98 % de triacilglicéridos y pequeñas cantidades de diacilglicéridos, monoacilglicéridos y ácidos grasos libres (1-5 %), y cantidades residuales de fosfolípidos, fosfátidos, carotenos, tocoferoles y compuestos azufrados, así como trazas de agua (Bozbas 2008). Como ya se ha explicado con anterioridad, las microalgas acumulan acilglicéridos de forma natural y dicha acumulación puede estimularse mediante la aplicación a los cultivos de diversos factores físicos y/o químicos. Las microalgas se han erigido como una nueva materia prima de interés para la obtención de biodiesel gracias a su contenido natural en acilglicéridos, variable entre géneros y especies de microalgas, a las posibilidades de incrementar su acumulación intracelular y, particularmente, a la elevada productividad de biomasa de los cultivos de microalgas en comparación con los cultivos tradicionales de oleaginosas (Chisti 2007, Wijffels y Barbosa 2010).

1.4.2. Potencial y retos actuales de la obtención de biodiesel a partir de microalgas.

La idea de utilizar microalgas para obtener biocombustibles no es nueva. En los últimos 30 años se desarrollaron en el mundo al menos dos grandes programas destinados a estudiar la fijación masiva de CO₂ por microalgas y la obtención de productos combustibles a partir de la biomasa

producida, uno de ellos desarrollado mayoritariamente en la década de los 80 del siglo pasado por el Departamento de Energía de los Estados Unidos, y otro, en los años 90, financiado por el Gobierno de Japón. Sin embargo, al margen de algunos logros relacionados con la obtención de especies de microalgas prometedoras y con la mejora de la producción en sistemas de cultivo abiertos, ni tales programas ni otros proyectos han conseguido demostrar la viabilidad económica de la obtención de biocombustibles, en particular biodiesel, a partir de microalgas. En la mentalidad de científicos y tecnólogos, esto supone un reto atractivo (Chisti 2007, Wijffels y Barbosa 2010).

Los costes de producción de la biomasa y de recuperación y transformación de aceites, requerimientos energéticos incluidos, limitan, por el momento, la traslación a la escala industrial de los resultados obtenidos en la pequeña escala. Actualmente, el mayor coste de la producción de biocombustibles a partir de aceites de microalgas reside en la obtención masiva de la biomasa algal necesaria. Con la tecnología actual de sistemas de cultivo, la producción de un kilogramo de biomasa de microalgas cuesta en la factoría, en promedio, entre 2 y 10 euros/kg, dependiendo de las especies, de los sistemas de producción y de la aplicación comercial de los productos. Dicho coste puede ser asumido cuando se produce un compuesto de alto valor añadido - por ejemplo, uso dietético de la biomasa algal -, en cuyo caso la tecnología empleada en la producción de la biomasa no se convierte en el paso limitante y, por tanto, pueden emplearse sistemas de cultivo de alto rendimiento. Por el contrario, para la obtención masiva de un producto de bajo precio unitario de mercado, como el biodiesel, se hace necesario abaratar extraordinariamente el proceso de producción de la biomasa, lo que exige el empleo de sistemas de cultivo tecnológicamente menos complejos, de menor productividad pero mucho más económicos en la gran escala, como los bien conocidos y más simples sistemas abiertos tipo carrusel agitados (Norsker et al. 2011).

Asumiendo, en una aproximación razonable, que la biomasa de microalgas puede acumular, por término medio y en forma de triacilglicéridos, alrededor de un 20 % de ácidos grasos útiles para la producción de biodiesel, la obtención de un litro de aceites convertibles en biodiesel requeriría de unos 5 kg de biomasa, lo que permite rápidamente

determinar el alto coste de producción del biocombustible, aún sin contabilizar costes de extracción y transformación química de los aceites. Por tanto, la producción económicamente viable de biocombustible pasa por reducir los costes de producción de biomasa hasta, al menos, un 10 % de los actuales, y ello debería ocurrir junto a un aumento de las superficies de cultivo de microalgas.

La potencialidad de las microalgas como fuente natural, renovable, de aceites para la obtención de biodiesel es ya menos discutida por la mayoría de expertos. La productividad de las microalgas, calculada por hectárea, es superior a la de los cultivos agrícolas en un factor que varía, por término medio, entre 30 y 50 veces. Según las proyecciones de diversos autores a partir de ensayos de cultivo conocidos en menor superficie, es razonable poder obtener 100 toneladas de biomasa de microalgas por hectárea y año, de las cuales alrededor de 20 toneladas serían biodiesel, y del resto de la biomasa se obtendrían productos de valor comercial como proteínas, antioxidantes, azúcares fermentables y/u otros. Este concepto de aprovechamiento integral de la biomasa de microalgas se conoce como biorrefinería y permite plantear un escenario de factibilidad económica de la producción del biodiesel a partir de la comercialización de subproductos, aunque la mayoría de ellos tengan en realidad un precio de mercado mucho más alto que el propio biocombustible. El acercamiento a un escenario de producción económicamente viable del biodiesel de microalgas al margen del aprovechamiento de subproductos debe conseguirse, fundamentalmente, a partir del aumento de la productividad de los sistemas de cultivo más económicos y de la ya mencionada reducción de costes de producción (Wijffels et al. 2010).

Las posibilidades de alcanzar el reto de la producción económicamente viable de biodiesel de microalgas se consideran, en la actualidad, moderadamente altas. Tal potencial reside en algunos hechos científicos concretos, convertidos en retos para su posterior traslado a la gran escala: (a) es factible encontrar, en la propia naturaleza, microalgas adaptadas al crecimiento rápido y resistente frente a otros microorganismos; (b) es factible incrementar las productividades de los cultivos mediante la mejora del uso que las microalgas hacen de la luz solar y del carbono; (c) es factible incrementar la cantidad de lípidos acumulados por las microalgas

mediante estrategias fisiológicas y bioquímicas; (d) es factible disminuir los costes de infraestructuras, de operación y energéticos de la producción de microalgas; (e) es factible y necesario mejorar, más en términos económicos que de eficiencia, la tecnología de extracción y purificación de aceites de microalgas. La obtención económicamente rentable de biodiesel de microalgas requiere, por tanto, de mejoras en las estrategias de producción masiva de microalgas, hecho que debe alcanzarse mediante la mejora en la ingeniería del proceso de cultivo, el uso eficiente de la bioquímica de las microalgas para incrementar la productividad de estas en biomasa y lípidos, y el abaratamiento de la química de la extracción y purificación de aceites.

1.4.3. Aceites de microalgas: definición, abundancia y propiedades adecuadas para la producción de biodiesel.

Se ha denominado así a la sustancia de apariencia grasa obtenida de la extracción de biomasa seca de microalgas, generalmente realizada mediante el empleo de disolventes orgánicos y de técnicas eficientes de extracción. Los disolventes orgánicos utilizados suelen ser el hexano o una mezcla de cloroformo y metanol, y en la mayoría de los procedimientos se facilita el proceso extractivo mediante mecanismos basados en principios físicos que actúan sobre las estructuras celulares, facilitando su disgregación o haciéndolas más lábiles. Tales mecanismos se relacionarán más adelante en este mismo apartado de la Introducción, al relacionar los métodos de extracción de aceites de microalgas (Koberg et al. 2011).

Los lípidos de microalgas incluyen acilglicéridos (mayoritariamente triglicéridos y cantidades menores de diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres) y, en mucha menor proporción, fosfolípidos, esteroides, carotenos, xantofilas y compuestos de azufre. La producción de biodiesel requiere, en principio, de la obtención selectiva y, por tanto, mayoritaria, de acilglicéridos. Se ha publicado que utilizando un disolvente suficientemente específico, como el hexano, para la extracción selectiva de lípidos neutros, grupo en el que se encuentran los triacilglicéridos, pueden obtenerse rendimientos de hasta un 98% del contenido total de ácidos grasos de la microalga, mayoritariamente en forma de acilglicéridos (Richmond 2004), si

bien la proporción de tales acilglicéridos en el aceite obtenido varía dependiendo del procedimiento de extracción y de la microalga utilizada.

Los contenidos de aceites en la mayoría de microalgas consideradas de interés productivo varían entre un 20 % y un 50 % respecto al peso seco de biomasa (Mata et al. 2010). Excepcionalmente y en determinadas condiciones de cultivo que favorecen la acumulación de aceites, estos porcentajes pueden aumentar, si bien esto sucede a costa de la productividad de la biomasa, como se discutió con anterioridad en la Introducción al comentar los factores que estimulan la acumulación de ácidos grasos en microalgas. Por lo general, aproximadamente la mitad del peso de aceite extraído de una microalga suele ser útil para la producción de biodiesel al ser triacilglicéridos transesterificables. La Tabla 1.2 recoge una breve relación de microalgas cultivadas para experimentación en la obtención de biodiesel y su contenido en aceites respecto a su biomasa seca.

Tabla 1.2. Contenido en aceites de algunas microalgas (fuente, Chisti 2007).

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

Si bien no hay aún suficiente información cuantitativa sobre la composición de ácidos grasos de aceites de microalgas que determine las propiedades más adecuadas para el biodiesel (Griffiths y Harrison 2009, Knothe 2011, Tan y Lin 2011), la experiencia obtenida hasta la fecha ha permitido asumir generalmente que la longitud de la cadena y el grado de

insaturación en el éster metílico del ácido graso en cuestión (FAME) juegan el papel más importante en la determinación de las propiedades del combustible, incluyendo la viscosidad cinemática, la gravedad específica, el número cetano y el valor más alto de calentamiento (Tan y Lin 2011, Knothe 2011, Hoekman et al. 2012). Generalmente, la viscosidad se incrementa con la longitud de la cadena del ácido graso y decrece al aumentar el grado de insaturación (Francisco et al. 2010, Tan y Lin 2011, Hoekman et al. 2012). Sin embargo, la gravedad específica y el valor más alto de calentamiento aumentan al hacerlo el grado de insaturación y decrecen con la longitud de la cadena del ácido graso (Refaat 2009), lo que significa que es preferible larga longitud de cadena y bajo grado de insaturación para que el biodiesel tenga un buen comportamiento a baja temperatura y una buena estabilidad oxidativa (Francisco et al. 2010, Refaat 2009, Hoekman et al. 2012). En este sentido, los aceites obtenidos de microalgas contienen una mayor abundancia de ácidos grasos de cadena entre 16 y 20 átomos de carbono, con un reparto equilibrado entre saturados e insaturados, estos últimos, salvo excepciones en determinadas especies de microalgas, mayoritariamente de bajo grado de insaturación, mono- y di-insaturados.

Tabla 1.3. Ácidos grasos principales presentes en vegetales y microalgas utilizados para la producción de biodiesel. Los datos muestran el porcentaje relativo de cada ácido grasos respecto a la suma de todos ellos. (Datos obtenidos de Padley et al. 1986, Gunstone y Harwood 2007).

Ácidos grasos										
Especies	16:0	16:0	16:2	16:3	18:0	18:1	18:2	18:3	18:4	20:5
<i>Palma</i>	32-59	--	--	--	1-8	27-52	5-14	--	--	--
<i>Girasol</i>	3-10	--	--	--	1-10	14-65	20-75	--	--	--
<i>Soja</i>	7-14	--	--	--	1-6	19-30	44-62	4-11	--	--
<i>Oliva</i>	7-20	--	--	--	0,5-3,5	56-83	3,5-20	--	--	--
<i>Chlamydomonas sp.</i>	20	4	1	4	--	7	6	30	3	27
<i>Chlorella vulgaris</i>	26	8	7	2	--	2	34	20	--	--
<i>Dunaliella salina</i>	41	15	--	--	--	11	8	19	--	--
<i>Nannochloris sp.</i>	9	20	7	9	--	4	1	1	--	--

En esta Introducción de la Tesis se ha incluido con anterioridad, a modo de ejemplo, la composición de ácidos grasos más abundantes en

microalgas (Tabla 1.1). Además, en la Tabla 1.3 se comparan las proporciones de ácidos grasos de microalgas con las de otras especies vegetales.

1.4.4. Extracción de aceites.

Para la producción de biodiesel, los lípidos y ácidos grasos deben ser extraídos previamente de la biomasa de microalgas. El disolvente extractante es un paso clave en la eficiencia de la extracción, no sólo por su naturaleza, sino por la proporción disolvente:biomasa liofilizada (Mata et al. 2010), que debe incluir cantidad suficiente de disolvente para una completa extracción de aceites. Estudios previos defienden el uso de disolventes de diversa naturaleza para la mejora de la extracción (Molina Grima et al. 1994, Lee et al. 1998), tales como hexano, etanol, cloroformo, metanol, isopropanol, acetona, dicloroetanol ó mezclas conocidas como cloroformo: metanol (2:1, v/v), tal y como detalla el método Bligh y Dyer (1959). El uso de un disolvente u otro puede dar lugar, como en el caso del etanol, al arrastre de algunos compuestos de la célula que no sean deseables en los aceites, como azúcares, aminoácidos, sales ó pigmentos.

Los métodos de extracción más comunes, como ultrasonidos, microondas ó soxhlet, son relevantes en una eficiente extracción de aceites. El mayor de los problemas de estos métodos es que usan grandes cantidades de solventes orgánicos requiriendo mucha energía para evaporarlos. Son procesos no solo costosos sino muy tóxicos, además de que la extracción de lípidos por volumen de disolvente orgánico utilizado está también termodinámicamente restringida (Wang y Weller 2006).

Otras de las técnicas actualmente muy desarrollada para la extracción de aceites es la extracción por fluidos supercríticos (SFC). Básicamente, cuando la temperatura y la presión de un fluido son llevadas a valores críticos, el fluido entra en la llamada región supercrítica, y es el fluido supercrítico (FC) el que sustituye al solvente de la extracción tradicional. Por ejemplo, SCCO_2 (dióxido de carbono supercrítico) es el solvente primario más usado en la mayoría de procesos de extracción con SFC. Esta es una técnica que mejora las tradicionales por las siguientes razones: el poder de extracción con fluido supercrítico mejora la realizada con los solventes, ya

que el FC penetra más rápidamente en la matriz celular, y además, el extracto crudo de lípidos obtenido estará libre del disolvente de extracción (Mendes et al. 1995, 2003 y 2006). Hay que destacar, que aunque mejore los rendimientos de la extracción de aceites, sigue siendo una técnica muy costosa por los dispositivos necesarios para alcanzar dichas condiciones tan elevadas de temperatura y presión.

1.4.5. Transesterificación de acilglicéridos.

La producción de biodiesel a partir de aceites vegetales se realiza mediante procesos de transesterificación en presencia de un catalizador. En dicha reacción, los triacilglicéridos reaccionan con metanol para transformarse en ésteres metílicos de los ácidos grasos que los conforman, y glicerol. La siguiente Figura 1.10 resume la reacción de transesterificación catalítica.

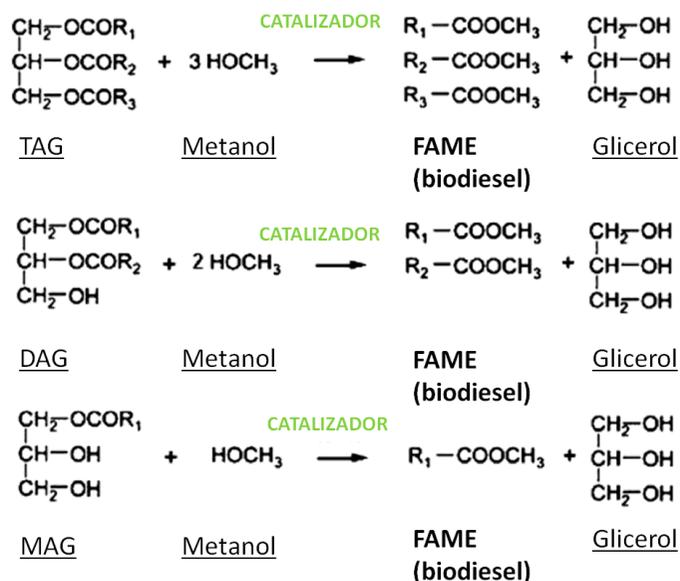


Figura 1.10. Reacciones de transesterificación. TAG: triacilglicéridos, DAG: diacilglicéridos y MAG: monoaclglicéridos. Modificado de Chisti 2007 y Huang et al. 2010.

De acuerdo con el tipo de catalizador, las reacciones para la producción de ésteres metílicos de ácidos grasos se clasifican como sigue (Fukuda et al. 2001): (a) Transesterificación con catálisis ácida, (b)

transesterificación con catálisis alcalina, (c) transesterificación enzimática y (d) transesterificación en condiciones supercríticas. Los catalizadores ácidos incluyen ácido sulfúrico, fosfórico y clorhídrico. Aunque la catálisis ácida es mucho más lenta que la alcalina (Ma y Hanna 1999), es adecuada cuando se usan triacilglicéridos con alto contenidos de agua y ácidos grasos libres (Fukuda et al. 2001). NaOH es mejor catalizador que KOH, ya que por tener menor peso molecular se requiere menor cantidad para lograr el mismo efecto y la solubilidad de las sales de sodio en FAME es menor que la de las sales de potasio (Cvengros y Povazanec 1996).

El uso de un catalizador permite que la reacción transcurra a temperaturas y presiones más normales, algo que no es factible si se permite que la reacción transcurra de manera natural.

Los catalizadores habitualmente utilizados en la industria son NaOH y metilato de sodio (NaOMe), que se diluyen en el metanol. Por lo general, el catalizador se utiliza en una concentración no superior al 1,5 % en relación a la masa de aceite utilizada en la reacción de transesterificación. Si bien la teórica relación molar alcohol/aceite es 3:1, normalmente suele aplicarse una relación molar de 6:1 para completar la reacción de manera adecuada. La relación entre la masa de materia prima utilizada y el biodiesel de salida es 1:1, lo que teóricamente permite una producción de un kilo de biodiesel a partir de un kilo de aceites, si este está formado al 100 % por triacilglicéridos.

1.5. Objetivos de la Tesis Doctoral.

El desarrollo de esta Tesis doctoral se ha basado en la consecución de los siguientes objetivos:

- 1) Maximizar la acumulación intracelular de lípidos de valor comercial, en particular carotenoides y ácidos grasos, en cultivos de una microalga de ambiente ácido, a partir de condiciones de estrés nutricional y salino.**

El hecho de que las microalgas de ambiente ácido puedan crecer en cultivos a pH inferior a 2 supone una ventaja competitiva respecto a otras microalgas de ambiente marino o de agua dulce, debido a la selectividad del medio ácido que favorece un menor riesgo de contaminación biológica. La literatura de algología prácticamente no presenta, aún, ejemplos de producción sistemática de microalgas acidófilas o de sus productos de valor, particularmente lípidos. Esta Tesis pretende contribuir a desarrollar y mostrar el potencial de producción de lípidos de valor comercial con la microalga *Coccomyxa*, como modelo de utilización biotecnológica de microalgas de ambiente ácido.

2) Selección e identificación de microalgas de aguas depuradas de origen industrial, de crecimiento robusto y estable y con el máximo contenido posible en lípidos, particularmente en acilglicéridos, útiles para la obtención de biodiesel.

La producción masiva de microalgas para la obtención de biodiesel requiere de sistemas económicos y de microalgas de crecimiento robusto y estable en el tiempo. El aislamiento de microalgas adaptadas a condiciones físicas, químicas y microbiológicas de entornos acuosos expuestos al ambiente, permite seleccionar las especies más resistentes para el cultivo masivo en exterior. La identificación de aquellas que, además, presenten mayor capacidad natural para la acumulación de lípidos las convierte en candidatas para el escalado de procesos de producción de biodiesel de microalgas. Frente a la mayoría de trabajos de la literatura relativos al estudio de obtención de biodiesel con microalgas de colección, esta Tesis pretende ofrecer una perspectiva más práctica y realista de dicho proceso mediante el uso de microalgas aisladas de aquellos entornos donde podría efectuarse la producción del combustible.

3) Maximizar la acumulación intracelular de lípidos destinados a la obtención de biodiesel, en particular acilglicéridos, en cultivos de una microalga seleccionada a partir del objetivo anterior, estimulando la biosíntesis de ácidos grasos en cultivos autótrofos o heterótrofos.

Una vez seleccionada la microalga apropiada tras la experimentación conducente al objetivo 2, se realizó investigación destinada a conocer el potencial de acumulación de ácidos grasos de la microalga mediante la aplicación de condiciones adecuadas, según la literatura del campo y la propia experiencia del equipo investigador, para la estimulación de la producción de lípidos por incubación bajo factores de estrés físico o químico y el uso de condiciones autótrofas o heterótrofas. Moléculas carbonadas como acetato o glicerol pueden ser residuos industriales y posibles fuentes de carbono conducentes a una mayor acumulación de lípidos en cultivos de microalgas, abaratando el proceso de producción de biodiesel.



Universidad
de Huelva

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Capítulo 2

**MATERIALES Y
MÉTODOS**



Universidad
de Huelva

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Microalgas empleadas.

Durante el desarrollo de la experimentación que concierne al cultivo de microalgas que se ha presentado en este trabajo de Tesis Doctoral, se han utilizado varias microalgas: una perteneciente al género *Coccomyxa*, varias no identificadas y utilizadas en experiencias de selección de especies y otra elegida entre las microalgas de dicha selección, la cual se identificó como perteneciente al género *Chlorella*. Las microalgas utilizadas en las experiencias de selección se aislaron a partir de muestras procedentes de aguas tratadas de la Refinería La Rábida de CEPESA.

2.1.1. *Coccomyxa onubensis*.

La microalga *Coccomyxa onubensis* fue aislada por nuestro grupo en la zona Norte del cauce del río Tinto (Huelva) (Figura 2.1), área en la que se encuentra una faja pirítica de origen hidrotermal submarino que ha dado lugar a una intensa actividad minera desde tiempos remotos. El río Tinto nace al Norte de la localidad minera onubense de Nerva y desemboca, tras 92 Km de recorrido, en el océano Atlántico.

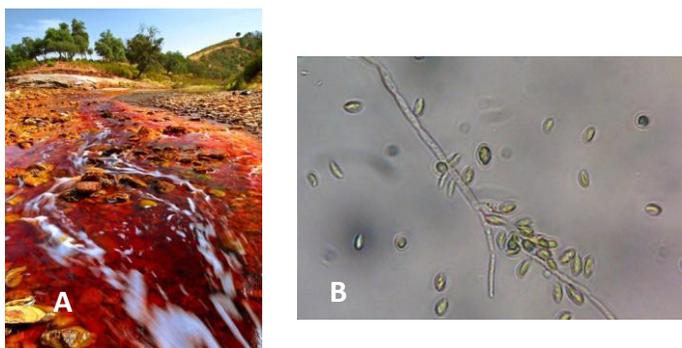


Figura 2.1. (A) Fotografía del río Tinto en la que se observa el llamativo color rojo de sus aguas. (B) Imagen de *Coccomyxa onubensis* al microscopio óptico.

El hábitat natural de *C. onubensis* se caracteriza por ser un ambiente extremo, con valores de pH ácido ($\leq 2,5$) y altas concentraciones de metales

en disolución, especialmente hierro, manganeso, cobre y aluminio, y aniones como sulfatos y nitratos. Sin embargo, el ión férrico es el que normalmente domina en este tipo de aguas y, debido a que permanece en disolución a pH bajo, proporciona al río su característico color rojo.

Se trata de un ecosistema heterogéneo en el que se han generado ambientes distintos, lo que se pone de manifiesto por la proliferación de microorganismos procariontes y eucariotes que conforman a su vez ecosistemas interdependientes y conectados entre sí. En gran parte de su recorrido, el cauce es ancho y el agua que fluye forma una lámina somera que permite la penetración de la luz hasta el fondo, facilitando la proliferación de productores primarios fotosintéticos (López-Archilla 2005), principales proveedores, en términos de biomasa, de materia orgánica para el sistema.

Sin embargo, las extremas condiciones del río son, en gran medida, producidas y mantenidas por organismos procariontes quimiolitótrofos. Además de los productores primarios, los hongos, los protistas y las bacterias heterotróficas actúan como consumidores y descomponedores (López-Archilla et al. 2001, López-Archilla 2005). Dentro de la comunidad de microalgas existente en el río se distinguen especies pertenecientes a las clases *Bacillariophyta*, *Euglenophyta* (*Euglena mutabilis* representa el 32 % del total de algas del río Tinto), *Chlorophyta* (fundamentalmente de los géneros *Chlamydomonas* y *Chlorella*) y *Rhodophyta* (López-Archilla et al. 2001).

Desde el punto de vista taxonómico, la microalga *C. onubensis* se incluye en el dominio *Eukaryota*, división *Chlorophyta* y familia *Coccomyxaceae*.

2.1.2. Microalgas aisladas de aguas tratadas de Refinería La Rábida de CEPESA.

Las microalgas aisladas provienen de aguas tratadas de la Refinería La Rábida de CEPESA. Se procedió a la toma de muestra en las localizaciones 1 (Planta de efluentes acuosos) y 2 (Canal de desagüe) (ver Figura 5.1 Capítulo 5 de Resultados y Discusión). En concreto, se tomaron muestras del rebose

del decantador de la planta de tratamiento de efluentes acuosos, activa en el momento de la toma de muestra, del estanque de recepción del agua del decantador y del canal de desagüe de dicha planta de tratamiento. En todas las localizaciones se detectó visualmente la presencia de colonizaciones de posibles microalgas inmobilizadas sobre los materiales porosos de construcción (decantador y estanque) y en los bordes canal de desagüe del agua depurada.

Metodología del aislamiento.

- *Toma de muestras de aguas tratadas de Refinería La Rábida de CEPSA.*

Se llenaron dos tubos Falcon por cada uno de los tres puntos de muestreo referidos. Las claves rotuladas en los tubos Falcon fueron DEC para las muestras del decantador, BR para las de la balsa de recepción de aguas del decantador y CN para las del canal de desagüe. Una muestra de 200 μL de cada Falcon sirvió para inocular cada placa de Petri, a la que se asignó el mismo código que al Falcon del cuál procedía su correspondiente inóculo. En concreto, se prepararon placas con los siguientes códigos (Tabla 2.1):

Tabla 2.1. Codificación de muestras según la zona de muestreo en la Refinería La Rábida (CEPSA)

Codificación muestras	Punto o zona de muestreo
CN	Canal de desagüe de la balsa de agua tratada
BR	Balsa de recepción y almacenamiento de aguas a tratar
DEC	Decantadora de fangos

Para identificar sucesivas réplicas de las muestras de una zona realizadas en el desarrollo de la investigación, se utilizaron números y letras mayúsculas del siguiente modo: (ej.) CN1A, CN1B, CN2A, etc.

Para la manipulación y almacenamiento de las muestras se utilizaron, respectivamente, guantes de látex y tubos Falcon, estos extraídos de su bolsa de plástico y abiertos en el momento de realizar la toma de muestra. Todos los Falcon se rotularon siguiendo el procedimiento habitual de marcaje del equipo de trabajo, con localización, fecha y hora de toma de muestra. Las muestras se depositaron en nevera, cerrada y preservada de la luz, y se trasladaron a los laboratorios para su procesado.

- *Aislamiento de las microalgas de aguas tratadas de Refinería La Rábida de CEPSA.*

Una vez en laboratorio, se procedió a desarrollar el protocolo habitual de aislamiento en el mismo día de recepción de las muestras. Para ello, se prepararon previamente placas Petri con medio autoclavado *Sueoka* (Sueoka 1959) (Tabla 2.3) en agar, al 1,75% (p/v) y pH 7,2. El medio *Sueoka* no contiene fuente de carbono orgánico y está constituido por una mezcla de sales minerales lo que, en definitiva, minimiza teóricamente la proliferación de procariotas no fotosintéticos que pudiesen competir por los nutrientes con las microalgas. Por lo tanto, el criterio básico a la hora de seleccionar el medio de búsqueda y aislamiento de microalgas fue promover la aparición de microorganismos fotoautotróficos estrictos. El medio *Sueoka* fue seleccionado entre diferentes medios como el más adecuado para los propósitos de la experimentación. Los trabajos de siembra en placa se realizaron según los procedimientos de rutina en microbiología, en campana de flujo laminar y junto a la llama de un mechero para evitar contaminación microbiológica por precipitación.

Las placas Petri así inoculadas (Figura 2.2) se incubaron en cámara de microalgas, bajo radiación fotosintéticamente activa (PAR) continua de $140 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y sin fuente de carbono orgánico, de modo que el criterio de selección limitante impuesto, como se ha comentado, fue el de encontrar microorganismos fotoautótrofos, es decir, que forzosamente utilizaron CO_2 como fuente de carbono y luz como fuente de energía para impulsar los procesos de asimilación dependientes de la fotosíntesis, sin menoscabo de que después alguno de los microorganismos supervivientes pudiese utilizar, además, una fuente de carbono reducido.

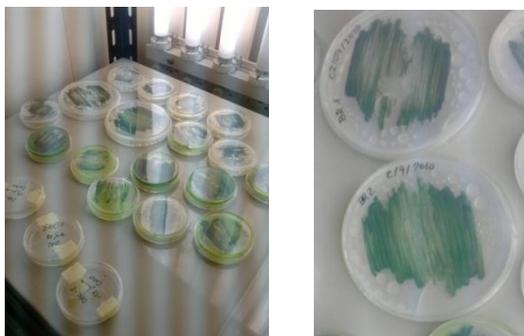


Figura 2.2. Primeras placas Petri de los microorganismos fotosintéticos aislados de La Refinería.

De las colonias obtenidas en cada placa se tomaron muestras, con la ayuda de palillos estériles, y se cultivaron de nuevo en placa para intentar aislar microalgas puras. De este modo se inició un proceso de recrecimientos, selección de colonias con apariencia de monocultivo y nuevos recrecimientos. El criterio de selección de microorganismos para efectuar siembras fue únicamente visual y se basó en la velocidad de aparición y en la apariencia de colonias en los sucesivos recrecimientos.

El trasvase de colonias desde medio sólido con agar a medio líquido se realizó utilizando tubos de vidrio con tapón roscado que contenían 10 mL de medio *Sueoka* cada uno. El medio de cultivo estaba previamente autoclavado con un programa estándar a 121 °C y una atmósfera de sobrepresión. El trasvase de las colonias a medio líquido se realizó mediante el procedimiento de rutina, en campana de flujo laminar y con ayuda de un asa de siembra estéril. Los tubos de vidrio con las microalgas resuspendidas en medio líquido se situaron en la cámara de algas, iluminados con luz PAR, blanca fluorescente, de $140 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y a temperatura constante de 25 °C. La única fuente de carbono suministrada fue el dióxido de carbono presente en el aire. Para favorecer el intercambio de gases entre el medio de cultivo con las células de las microalgas y el medio exterior, los tubos no se llenaron por completo, dejando una cámara de aire entre la superficie del medio líquido y la cabeza roscada del tubo. El tapón no se giró hasta el final de la rosca, de modo que se permitiese el intercambio de gases con el exterior y la disponibilidad de dióxido de carbono en cada cultivo.

- *Selección e identificación molecular de las microalgas aisladas de aguas tratadas de Refinería La Rábida de CEPESA.*

Se utilizó medio de cultivo (Sueoka) líquido, empleando aire enriquecido con CO₂ al 5 % (v/v) como única fuente de carbono. Esta concentración de dióxido de carbono en aire garantiza, en principio, que no exista limitación del crecimiento por falta de carbono inorgánico. El pH de cultivo en el medio Sueoka está alrededor de 7, lo que hace que la mayoría del dióxido de carbono se encuentre disuelto en su forma inorgánica de bicarbonato. Inicialmente, por tanto, se asume que las microalgas no dependen estrictamente de CO₂ para su crecimiento y que disponen de mecanismos de concentración de carbono inorgánico para poder crecer sin limitación en medios con valores de pH superiores a 6.

En base a los crecimientos de este experimento preliminar, se descartaron algunos de los cultivos, continuando la experimentación con el resto hacia la siguiente fase, el establecimiento de las curvas de crecimiento de microalgas seleccionadas, con un total de 17 *teóricos* monocultivos de posible interés, en base al crecimiento más rápido. De tales cultivos se seleccionaron 5 cuyo estudio se incluye en el Capítulo 5 de esta Tesis Doctoral.

En esta Tesis se identificó la microalga finalmente más prometedora, utilizando técnicas moleculares. Los pasos a seguir fueron los siguientes:

- a. Cultivos de las microalgas seleccionadas en condiciones estándar de cámara.*

Las microalgas cultivadas para la identificación fueron seleccionadas por sus mejores resultados en productividades de biomasa y contenidos intracelulares de lípidos totales y ácidos grasos. Las microalgas elegidas para la identificación molecular fueron las codificadas como CN1D y DEC1B procedentes del canal de desagüe y decantador de fangos, respectivamente. Como se describe en el Capítulo 6, la identificación rindió una única cepa cuyo estudio se detalla en dicho apartado de esta Tesis Doctoral.

b. Recolección de células de los cultivos en la fase exponencial de crecimiento y lavado de bacterias presentes en los cultivos de microalgas.

Una vez crecidos los cultivos de microalgas en condiciones de laboratorio (ver apartado 2.2.3 de Materiales y Métodos) con medio de cultivo *Sueoka*, se procedió a centrifugar por duplicado 200 mL de cultivo de CN1D y DEC1B durante 10 min a 600 g (aproximadamente 2000 rpm dependiendo del rotor de la centrifuga Eppendorf, modelo *centrifuge 5810*). Después de descartar el sobrenadante, el pellet fue resuspendido, junto al mechero, en 0,5-1 mL de TRIS 10 mM pH 8 estéril.

Los cultivos se sometieron a sonicación por 1 min (Scientec Elma EGOH Elmasonic) y se incubaron durante 1 min en hielo. Posteriormente se centrifugaron a 600 g durante 3 min (mini centrifuga YCLtech Limited, modelo c6) y se descartó el sobrenadante. Este procedimiento se llevó a cabo 3 veces consecutivas (Rivas et al. 2010). El pellet seco fue almacenado a -80 °C hasta su uso.

c. Extracción de ADN.

Posteriormente, a partir del pellet seco, se extrajo el ADN de las células de CN1D y DEC1B, utilizando el kit de extracción The PowerSoil® DNA Isolation (Laboratorio MoBio), de acuerdo al procedimiento descrito por el fabricante, y se guardó a -20°C hasta su utilización. La extracción se confirmó por electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % (p/v) (Figura 2.3).



Figura 2.3. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % (p/v). La marca de la derecha de la imagen evidencia la extracción de ADN de las muestras CN1D y DEC1B, por duplicado. La marca de la izquierda corresponde a los correspondientes marcadores moleculares.

d. PCR del gen conservado RUBISCO (*Rbcl*).

Con el ADN extraído y cebadores universales para microalgas eucariotas se amplificó el gen *Rbcl*, que codifica para la enzima Ribulosa 1-bifosfato carboxilasa. Se usaron los cebadores *Rbcl1-F* (AACCTTTCATGCGTTGGAGAGA) y *Rbcl1-R* (CCTGCATGAATACCACCAGAAGC) para amplificar el gen *Rbcl* (Toplin et al. 2008) mediante PCR, usando un termociclador Thermal Cycler C1000 (Bio Rad Laboratories, Inc) y utilizando Sapphire Fast PCR Mastermix (TAKARA, N°cat RR350A) en las condiciones dadas por el fabricante. Las condiciones de amplificación fueron: (a) 5 min a 95 °C; (b) 34 ciclos de 30 s a 95 °C, 1 min a 60 °C y 1 min a 72 °C; (c) un ciclo de extensión final a 72 °C durante 5 min. El producto de PCR se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % (p/v), realizada a 80 Volt durante 30 min. Se utilizó el marcador de peso molecular 100 bp Plus (Fermentas) y el producto se purificó desde gel de agarosa, utilizando el kit de purificación de productos de PCR marca Power Soil, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante (Figura 2.4).

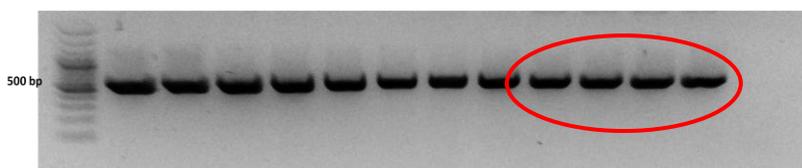


Figura 2.4. Electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v). En la Figura, se muestra rodeado de color rojo la banda correspondiente a fragmentos del gen RBCL amplificados. Estas muestras son procesadas para ser posteriormente enviadas a secuenciación a *Macrogen Inc.*

Los fragmentos del gen *Rbcl* amplificados se secuenciaron por *Macrogen Inc.*, en Holanda. Luego, las secuencias se analizaron usando los programas bioinformáticos CLC Main Workbench (versión 6.7.1) y BlastN, contra la base de datos no redundante de GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi). Las secuencias obtenidas para la especie en estudio se agregaron a la base de datos de Genbank, obteniendo un número de acceso, el cual está detallado en el Capítulo 6 de Resultados y Discusión. El análisis de secuencias permitió asignar a las cepas de microalgas el género *Chlorella* y, probablemente, la especie *sorokiniana*.

2.2. Condiciones de cultivo.

2.2.1. Medio de cultivo de *Coccomyxa onubensis*.

El medio de cultivo utilizado para *C. onubensis* fue el medio K9, desarrollado por Silverman y Lundgren (1959), aunque con ligeras modificaciones para asemejarlo en su composición básica y pH al medio natural del que fue aislada la microalga. La composición por litro del medio K9 se muestra en la Tabla 2.2. El aislamiento de la microalga se llevó a cabo tras obtener un cultivo axénico mediante siembra en placa con agar sólido, a pH 2,5. Para preparar el medio sólido se utilizaron 300 mL de medio de cultivo K9 con la proporción de agar de 1,75 % (p/v). Posteriormente las colonias aisladas se transfirieron a medio líquido.

Tabla 2.2. Reactivos utilizados en la preparación de un litro de medio K9.

Componente	Volumen (mL)	Cantidad (g)
K ₂ SO ₄		3,95
KCl		0,1
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O		0,5
MgCl ₂ · 6H ₂ O		0,41
KNO ₃		2,29
CaCl ₂ · 2H ₂ O		0,01
Solución Trazas Hutner	5	
Solución Trazas Hutner (composición por litro)		
H ₃ BO ₃		2,28
ZnSO ₄ · 7H ₂ O		4,40
MnCl ₂ · 4H ₂ O		1,02
FeSO ₄ · 7H ₂ O		1,00
CoCl ₂ · 6H ₂ O		0,32
CuSO ₄ · 5H ₂ O		0,32
Mo ₇ O ₂₄ (NH ₄) ₆ · 4H ₂ O		0,22

Para preparar la solución de trazas Hutner (Hutner et al. 1950) se disolvieron 10 g de EDTA (ácido libre) en 250 mL de agua destilada, facilitando su disolución con KOH concentrada. A una temperatura de 100 °C y en un volumen de 550 mL de agua destilada se añadieron, para su

disolución, los compuestos mencionados en el orden especificado en la Tabla 2.2 (apartado de Solución de Trazas Hutner). Las dos disoluciones se mezclaron y se elevó la temperatura a 100 °C para, posteriormente, dejar enfriar hasta 80-90 °C. La solución se ajustó luego a pH 6,8 con una disolución al 20 % (p/v) de KOH, manteniendo siempre la temperatura por encima de 70 °C. Por último, se enrasó el volumen total a un litro con agua destilada y se dejó reposar en oscuridad a 4-6 °C durante 48 h antes de su uso.

Tras preparar el medio de cultivo, éste se ajustaba a pH 2,5 con la adición de H₂SO₄ o HCl diluido al 10 % (v/v). El matraz que contenía el medio se tapaba con algodón hidrófobo y se atravesaba por una varilla de vidrio hueca, colocando un filtro de aire en el extremo superior de la varilla. Posteriormente, el medio era esterilizado en autoclave durante 20 min, a una temperatura de 126 °C y presión superior a 1 atmósfera.

Para las experiencias presentadas en el Capítulo 3 de Resultados y Discusión, los medios de cultivos de *C. onubensis* carentes en nitrógeno, fósforo o azufre se prepararon a partir del mismo medio K9 pero sin añadir la fuente inorgánica de cada uno de los elementos anteriores, en cada caso. Para los ensayos de salinidad de *C. onubensis* mostrados en el Capítulo 4 de Resultados y Discusión, al mismo medio de cultivo K9 se le añadió NaCl en concentraciones de 20, 50, 100, 200, 500 mM y 1 M.

2.2.2 Medio de cultivo de microalgas procedentes aguas tratadas de Refinería La Rábida de CEPESA.

Para las microalgas aisladas de Refinería se usó el medio estándar *Sueoka* (Tabla 2.3). Dicho medio se usó en todos los casos, a excepción de los ensayos que requerían un medio diferente por las condiciones experimentales de cultivo (es el caso de carencia de nitrógeno, adición de DCMU o heterotrofia, Capítulos 5 y 6 de Resultados y Discusión). El medio utilizado permite el crecimiento de especies fotoautótrofas como las aisladas de Refinería, procedentes de la matriz acuosa cuyas características químicas son pH neutro y una baja fuerza iónica.

Tabla 2.3. Composición de un litro del medio de cultivo desarrollado por Sueoka (1959). El medio de cultivo *Sueoka* se ha utilizado inicialmente para estudiar el crecimiento de las especies de microalgas aisladas desde la planta de tratamiento de efluentes acuosos de Refinería La Rábida de Cepsa.

Componente	Volumen (mL)	Cantidad (g)
KPO ₄ H ₂		0,72
K ₂ PO ₄ H		1,44
MgSO ₄ 7H ₂ O		0,061
CaCl ₂ 2H ₂ O		0,020
NH ₄ Cl		0,50
KNO ₃		0,95
Solución Trazas Hutner	5	

Para los ensayos presentados en el Bloque de Resultados y Discusión, Capítulos 5 y 6, el medio de cultivo *Sueoka* carente en nitrógeno para las microalgas procedentes de Refinería se compuso eliminando en su totalidad de la solución de nutrientes la fuente de nitrógeno inorgánico.

En la experimentación referida en el Capítulo 6 de Resultados y Discusión, se utiliza el inhibidor del PSII DCMU (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea. La cantidad de DCMU a añadir al medio de cultivo *Sueoka* según autores como Zhang et al. 2002 y Fouchard et al. 2005 fue de 10 µM. Para las condiciones de incubación heterotróficas, véase en este bloque de Materiales y Métodos el siguiente apartado.

2.2.3. Cultivo de microalgas en laboratorio.

Los cultivos control de microalgas en medio líquido utilizados en los diferentes ensayos en interior se realizaron en condiciones fotoautotróficas en cámara climatizada, a 25 °C (Figura 2.5 A), empleando matraces erlenmeyers de distintos volúmenes según el caso, salvo en aquellos experimentos donde se especifiquen otras condiciones diferentes. La fuente de carbono se suministró burbujeando aire a través de la varilla de vidrio inmersa en el medio que contenía la suspensión celular. Salvo que se indique lo contrario, el carbono se suministraba en una mezcla de aire enriquecida en CO₂ al 5 % (v/v) proporcionada por una bala anexa a la cámara. Estas

condiciones generales de cultivo son denominadas “estándar” en el texto de la Tesis.

En los experimentos sin CO₂ añadido, como se indica en el Capítulo 6 de Resultados y Discusión, se empleó únicamente aire sin CO₂ (Tans 2009) eliminándose éste a través de una trampa de KOH 3 M. En su sustitución se usaron fuentes orgánicas de carbono como acetato o glicerol. Para estos cultivos incubados en condiciones heterotróficas, se seleccionaron en base a la bibliografía concentraciones adecuadas de los compuestos orgánicos carbonados para favorecer el crecimiento y la síntesis de lípidos y ácidos grasos. En el caso de acetato, se preparó al 1 % (p/v) de acuerdo con autores como Miao y Wu 2006, Heredia-Arroyo et al. 2010 ó Perez-Garcia et al. 2010, que en dichas condiciones muestran la estimulación del crecimiento y la acumulación de lípidos de especies pertenecientes al género *Chlorella*. Para el uso de glicerol, se añadió una cantidad al medio de cultivo *Sueoka* del 1% (v/v) adecuada para favorecer el crecimiento de los cultivos (Liang et al. 2009, Heredia-Arroyo et al. 2010). En todos los casos, la corriente de aire se hizo pasar a través de filtros de algodón para asegurar la axenia del cultivo.

Generalmente, la fuente de luz empleada para proporcionar energía lumínica a los cultivos controles en cámara fue generada por tubos fluorescentes de luz blanca (Philips 30W/33) que suministraban una intensidad de 140 $\mu\text{moles fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de PAR en la superficie de los recipientes de cultivo.

Para las experiencias presentadas en los Capítulos 5 y 6 de Resultados y Discusión, los cultivos de microalgas se incubaron bajo radiación saturante ($650 \mu\text{moles fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de PAR) ó alta irradiancia ($1800 \mu\text{moles fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de PAR). Esto se consiguió, en el primero de los casos, a través de un panel de luces blancas con potenciómetro (Philips 45W/830) y en el segundo de los casos, gracias a luces LEDs de color rojo (LED's Grow Light 300W, frecuencia de 50/60 Hz, véanse las Figuras 2.5 B y C). El cambio de luces se realizó con objeto de analizar la influencia de este tipo de radiación sobre el crecimiento y la producción de lípidos y ácidos grasos en las estirpes estudiadas. Los diferentes valores de irradiancias en la superficie de los cultivos se alcanzaron variando la distancia entre estos y la

fuentes de iluminación. La irradiancia se determinó como se explica más adelante.



Figura 2.5. (A) Cultivos en cámara climatizada. Cámara climatizada a 25 °C e irradiancia de 140 $\mu\text{moles fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de PAR. (B) Cultivos bajo irradiancia saturante de 650 $\mu\text{moles fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de PAR. (C) Cultivo bajo alta irradiancia de luces LEDs de color rojo de 1800 $\mu\text{moles fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de PAR.

2.3. Determinaciones físicas.

2.3.1. Medidas de irradiancia incidente en los cultivos.

Las irradiancias a las que se sometieron los cultivos en cada uno de los experimentos realizados se midieron con un radiómetro marca Licor modelo LI - 190 equipado con las correspondientes sondas para medidas de radiaciones fotosintéticamente activas (PAR) y UV (LP 9021 PAR, LP 9021 UV-A).

2.3.2. Determinación de peso seco.

Para la determinación del peso seco de microalgas se utilizaron filtros *Whatman* de microfibra de vidrio de 47 mm de diámetro y tamaño de poro de 0,7 μm . Previamente a la filtración de la suspensión celular los filtros se lavaron varias veces con agua destilada filtrada y se secaron en estufa a 80 °C durante 24 h, para ser posteriormente pesados en una balanza de precisión.

La biomasa húmeda se obtuvo por filtración a presión reducida, mediante bomba de vacío, de un volumen conocido de suspensión de células de la microalga, elegido en función de la densidad celular del cultivo (entre 5 y 10 mL). Este volumen se diluía previamente en 100 mL de agua destilada filtrada. Una vez realizada la filtración, los filtros se lavaban varias veces con agua destilada filtrada con objeto de eliminar las sales del medio que pudieran haber quedado retenidas.

En el caso de la experimentación descrita en el Capítulo 4 de Resultados y Discusión, donde se añade a los medios K9 de *C. onubensis* diferentes concentraciones de NaCl, el lavado de las suspensiones celulares de la microalga se realizó con una solución de formiato amónico de concentración igual a la salinidad del medio de cultivo K9 del ensayo, variando aquella desde 20 mM hasta 1 M en formiato amónico. Con este tipo de lavado se asegura la eliminación de sales en los filtros, evitando así un posible error de peso seco debido a restos de sal.

A continuación, los filtros se secaban en estufa a 80 °C durante 24 h como mínimo y se colocaban en un desecador hasta su enfriamiento a temperatura ambiente. Por último, se pesaban en una balanza de precisión. El peso seco es equivalente a la biomasa celular presente en el volumen filtrado y se calculó por la diferencia existente entre el peso inicial de los filtros (m_{filtro}) y el peso tras la filtración de la suspensión celular ($m_{\text{filtro+células}}$).

$$PS = m_{\text{filtro+células}} - m_{\text{filtro}}$$

2.3.3. Determinación del ratio de absorbancias Abs 680 / Abs 750.

El ratio de absorbancias corresponde a la división de las densidades ópticas obtenidas por espectrofotometría de alícuotas de los cultivos a longitudes de onda de 680 nm (numerador) y 750 nm (denominador). La densidad óptica mide la turbidez de los diferentes cultivos y se efectúa en espectrofotómetro UV/visible (ThermoSpectronic–Genesis 10UV) a 680 y 750 nm, tras haber diluido 1 mL de cultivo, en caso de ser necesario, hasta obtener absorbancias entre 0,2 y 0,8.

2.3.4. Determinación de las tasas de crecimiento.

Las tasas de crecimiento se calcularon por regresión lineal de los datos de la fase exponencial de la curva de crecimiento, representados como el logaritmo neperiano (Ln) del peso seco frente al tiempo.

2.3.5. Determinación de productividades de biomasa.

Las productividades de biomasa se obtuvieron como el incremento del peso seco en un volumen dado de cultivo, durante un periodo determinado de la fase exponencial de crecimiento de la microalga.

2.4. **Determinaciones analíticas.**

2.4.1. Determinación del contenido en clorofilas y carotenoides en microalgas.

La determinación del contenido en clorofilas a y b de los cultivos de microalgas de esta Tesis, se llevó a cabo mediante el método de Liechtenthaler modificado (Liechtenthaler 1987).

Para ello se tomó 1 mL de cultivo en tubos eppendorf, se centrifugó a 13.000 rpm durante 7 min en una centrifuga Mini Spin Plus de Eppendorf eliminando posteriormente el sobrenadante. El pellet obtenido se mantuvo en un baño de ultrasonido (Bandelin Sonorex) durante 5 min para provocar la disgregación celular.

Después se añadió un volumen adecuado de metanol, en función de la cantidad de pigmentos presentes en la muestra. Para extraer los pigmentos, el pellet de células resuspendido en metanol se agitaba de forma enérgica en vórtex (Velp Scientifica) y se dejaba reposar durante 8 min en baño ultrasonido a una temperatura de 60 °C. Seguidamente, la muestra se centrifugaba de nuevo a 13.000 rpm durante 5 min. La extracción se daba

por concluida una vez que se obtenía un pellet totalmente blanco, libre de pigmentos.

Una vez terminado el proceso de la muestra, dicha solución se transfería a tubos de ensayo y se añadían 4 mL de metanol, se centrifugaba durante 5 min a 4.400 rpm (centrifuga Eppendorf modelo 5702) y así se obtenía el sobrenadante libre de restos celulares.

La determinación de clorofilas y carotenoides totales se realizó en el sobrenadante midiendo la absorbancia a 470, 647 y 663 nm en el espectrofotómetro ThermoSpectronic–Genesis 10UV. Las concentraciones de clorofila a y b presentes en los extractos se calcularon utilizando como coeficientes de extinción a 663 nm y 647 nm, los valores 74,46 y 18,3 mg⁻¹·mL·cm⁻¹, respectivamente. Los contenidos en clorofila a y b, clorofila total y carotenoides totales presentes en las células de los cultivos se calcularon a partir de las siguientes ecuaciones:

Clorofila a: $Chla = 5 \cdot [(12,25 \cdot A_{663}) - (2,73 \cdot A_{647})]$

Clorofila b: $Chlb = 5 \cdot [(21,5 \cdot A_{647}) - (5,1 \cdot A_{663})]$

Clorofila total: Clorofila a + Clorofila b

Carotenoides totales: $Car = \frac{((5000 \cdot A_{470}) - (1,82 \cdot Chla) - (85,02 \cdot Chlb))}{198}$

2.4.2. Separación, identificación y cuantificación de carotenoides específicos de microalgas mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Para la extracción de las muestras se empleó el método Liechtenthaler modificado descrito en el apartado anterior. Una vez obtenidos los extractos, el sobrenadante se filtró con ayuda de una jeringa y un filtro de tamaño de poro 0,45 μm (Millipore), pasándose a otro tubo eppendorf para su conservación a -4 °C hasta el análisis por HPLC.

En la posterior separación y cuantificación de los carotenoides principales se utilizó un equipo de HPLC (Figura 2.6), modelo *Thermo Separation Products*, con una columna *Hipersil Gold thermo Scientific* de

fase reversa RP-18 250 x 4 (mm) y de 5 μm de poro, equipado con un detector UV-Vis.



Figura 2.6. Equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizado en la separación y cuantificación de carotenoides específicos.

La longitud de onda para la detección de los carotenoides se ajustó a 450 nm. La fase móvil utilizada fue la siguiente: disolvente A, acetato de etilo; disolvente B, acetonitrilo: agua (9:1 v/v). El flujo aplicado al sistema fue de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. En la elución de cada muestra se empleó el gradiente descrito por Young et al. (1997), con ligeras modificaciones, que se presenta en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4. Gradiente de elución empleado en la separación de carotenoides

Tiempo (s)	Acetato de etilo (%)	Acetonitrilo:agua (9:1 v/v)(%)
0	0	100
10	50	50
15	60	40
20	65	35
22	76	24
25	100	0
30	0	100

Las muestras se introdujeron automáticamente en el equipo, gracias a su muestreador automático de 100 viales, cuya aguja automática lleva la muestra a un *loop* de carga de 100 μL .

La identificación y cuantificación de los carotenoides específicos encontrados se basó en la comparación de los tiempos de retención para

cada uno de ellos con los de patrones comerciales de concentración conocida, situada entre 0,7 y 1,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, pertenecientes a la casa comercial DHI® *Water & Environment (Denmark)*. Los patrones de pigmentos utilizados (luteína y β - caroteno) tenían una pureza superior al 99 % y fueron diluidos en metanol al 100 %. A partir de los cromatogramas obtenidos para cada solución estándar, se procedió a calcular los factores de conversión adecuados para la cuantificación de los pigmentos, dividiendo la concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) del patrón entre el área del pico correspondiente (μV).

2.4.3. Determinación de proteínas en células de microalgas.

El contenido en proteínas se determinó mediante el método colorimétrico de Bradford (1976). La proteína contenida en el extracto produce con el reactivo de Bradford un complejo coloreado, cuyo máximo de absorción es 595 nm. El calibrado del reactivo de Bradford se realizaba con disolución patrón de seroalbúmina bovina (BSA) de concentración 0,02 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para determinar el contenido en proteínas se adicionaba un volumen de 0,2 mL de reactivo de Bradford a 0,8 mL de una solución de muestra que contenía una cantidad de proteína entre 2 y 8 μg . Tras agitar suavemente y esperar 15 min para dar tiempo a la formación del complejo coloreado, se midió la absorbancia a 595 nm. Como coeficiente de extinción se utilizó el valor obtenido de la recta de calibrado realizada con BSA.

La determinación del contenido celular en proteínas se realizaba a partir de 50 mL de cultivo. Tras centrifugar este volumen y desechar el sobrenadante, se procedía a la rotura de las células mediante sonicación (Bioblock Scientific Vibra-Cell 75041) con pulsos de 10 s y paradas de 59 s en un total de 5 pulsos y siempre manteniendo las muestras a 4 °C. Tras la rotura del pellet, éste se resuspendía en 1 mL de agua destilada y se realizaban las diluciones apropiadas antes de realizar el ensayo.

2.4.4. Determinación de lípidos totales en células de microalgas

El procedimiento desarrollado para la extracción de lípidos totales de microalgas se realizó con ayuda de un equipo llamado extractor de grasas o

soxhlet automático que se muestra en la Figura 2.7 A. Los disolventes orgánicos que se usaron fueron cloroformo:metanol (2:1 v/v) tal como describe Bligh y Dyer (1959), para asegurar el arrastre de los compuestos lipídicos polares y neutros al entrar en contacto los disolventes con las células de microalgas. Se procedió a tomar un volumen de muestra que correspondiera, según el cultivo, a 0,5 g de biomasa seca, lo que supone aproximadamente 1 L de volumen de cultivo dependiendo de cada experimentación. El pellet obtenido se lavó en todos los casos con agua destilada. En la experimentación de los cultivos de *C. onubensis* en medios con NaCl, los pellet se lavaron con la solución correspondiente de formiato amónico, tal y como se describió en la determinación del peso seco de microalgas (véanse 2.3.2 - Determinación de peso seco -).

Antes de la extracción de lípidos las muestras fueron pretratadas. Los pellet húmedos se liofilizaron y seguidamente se determinó el porcentaje de humedad de estos. Los pellet liofilizados fueron de nuevo hidratados con cloroformo:metanol (2:1 v/v), bien mezclados mediante agitación intensa con vórtex y por último rotos por sonicación para así facilitar la extracción de lípidos totales.

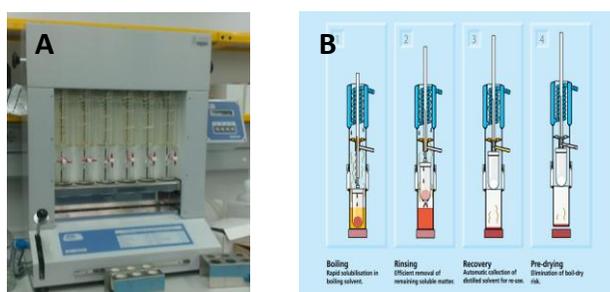


Figura 2.7. (A) Extractor de grasas multipunto o soxhlet automático. (B) Esquema del proceso de extracción de grasas. En la gráfica B y de izquierda a derecha: Punto de ebullición del solvente (*Boiling*); Recogida de aceites de las muestras (*Rinsing*); 3. Recogida de disolventes orgánicos limpios de aceites, listos para su posterior uso (*Recovery*); Pre-secado de las muestras de lípidos o aceites recogidas en los viales (*Pre-drying*).

Unas vez pretratadas las muestras, se introdujeron en los cartuchos de celulosa del soxhlet, donde se procedió a la extracción de lípidos totales a partir del programa elegido según la naturaleza del disolvente y aconsejado por el fabricante del equipo. La extracción duró unas 3 h (Figura 2.7 B), de acuerdo con los siguientes pasos: *Boiling* 70 min, *Rinsing* 90 min, *Recovery* 15

min y *Pre-drying* 15 min. Seguidamente, los viales donde se recogieron los aceites de las muestras se llevaron a estufa durante 24 h a 80 °C, siendo posteriormente pesados para conocer los gramos de lípidos por muestra de microalga, según se indica en la siguiente fórmula.

$$\text{Gramos de lípidos por muestra} = \frac{\text{Vial soxhlet lleno lípidos} - \text{Vial vacío}}{\text{Peso seco muestra en soxhlet}}$$

2.4.5. Determinación de productividades de lípidos.

Las productividades de lípidos se calcularon como el incremento en lípidos (masa) en un volumen dado de cultivo, durante un periodo determinado de tiempo de la fase exponencial de crecimiento de la microalga.

2.4.6. Transesterificación ácida de lípidos totales. Obtención de FAMES.

El análisis de ácidos grasos por cromatografía de gases exige que éstos sean volátiles a las temperaturas de trabajo usadas en esta técnica. Para ello es necesario transformar los ácidos grasos, esterificados o libres, en sus respectivos ésteres metílicos a través de una reacción de esterificación con alcohol. Este procedimiento llamado transesterificación, se realizó siguiendo el método modificado descrito por diversos autores (Gouveia y Oliveira 2009, Ota et al. 2009, Widjaja et al. 2009, Halim et al. 2011, Prabakaran y Ravindran 2011). La transesterificación fue ácida, donde aproximadamente 10 mg de residuos de los aceites (triacilglicéridos) y un alcohol con un catalizador (metanol enriquecido al 5% v/v en H₂SO₄) produce glicerol y alquil ésteres de ácidos grasos, los cuales son conocidos como biodiesel. La reacción de transesterificación se realizó a 70 °C y en continua agitación por un agitador incubador modelo MaxQ 4450 (ThermoScientific) durante 3 h, para favorecer la conversión.

Posteriormente, las muestras fueron refrigeradas a 4 °C, se les añadió un volumen de agua destilada para lavado, y de hexano, que será la matriz que arrastre todos aquellos ácidos grasos metilados obtenidos en la

reacción de transesterificación. La solución de hexano se conservará a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior análisis por cromatografía gaseosa.

2.4.7. Identificación cualitativa y cuantificación de ácidos grasos en extractos de células de microalgas.

En la posterior separación y cuantificación de los ácidos grasos principales de microalgas se utilizó un equipo de cromatografía de gases (Figura 2.8), modelo Agilent 7890 A con muestreador automático 63440 A y detector FID, con una columna capilar de sílica OmegawaxTM 320 de longitud 30 m, ancho 0,32 mm y de poro interior 0,25 μm . El gas portador fue He y la llama se obtuvo con una mezcla de aire sintético: H_2 (350:40 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$).



Figura 2.8. Equipo de cromatografía de gases

El programa de rampa de temperatura del horno del equipo de cromatografía de gases se obtuvo a partir de modificaciones de Gouveia y Oliveira 2009, y Halim et al. 2011. Dicho programa se optimizó a partir de pruebas previas con el análisis de extractos de ácidos grasos de distintas especies de microalgas, hasta conseguir una separación legible de picos en los cromatogramas resultantes. La Tabla 2.5 presenta el gradiente de temperatura del cromatógrafo de gases (GC). La temperatura del inyector fue de $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ y la del detector FID de $240\text{ }^{\circ}\text{C}$, modo Split 20:1 y volumen de inyección de $1\ \mu\text{L}$.

La identificación y cuantificación de ácidos grasos específicos encontrados se basó en la comparación de los tiempos de retención para cada uno de ellos con los correspondientes tiempos para una mezcla de patrones comerciales de concentración conocida, situada entre 50 a 1000

ppm, pertenecientes a la casa *Supelco Analytical*. Los patrones de ácidos grasos utilizados (FAME MIX C4-C24, Figura 2.9) tenían una pureza del 98,7 al 99,9 % y fueron diluidos en hexano como las muestras problema. A partir de los cromatogramas obtenidos para cada solución estándar, se procedió a calcular los factores de conversión adecuados para la cuantificación de los ácidos grasos, dividiendo la concentración (ppm) del patrón entre el área del pico correspondiente (pA).

Tabla 2.5. Gradiente de temperatura empleado en la separación de carotenoides

Rampa	Pendiente ($^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo de retención (min)
0	--	80	0
1	5	140	0
2	4	170	2
3	1	190	2
4	4	210	0

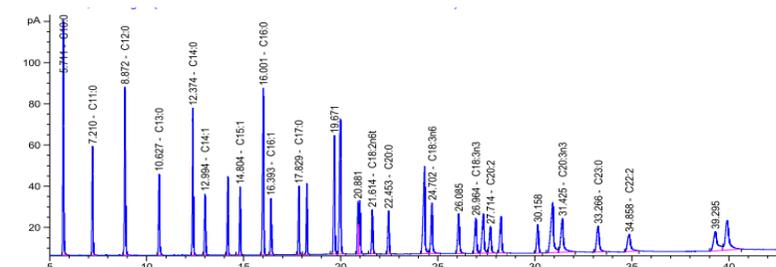


Figura 2.9. Cromatograma de una mezcla patrón de ácidos grasos. FAME MIX C4-C24 (*Supelco Analytical*).

2.5. Determinaciones de actividades biológicas

2.5.1. Medida de la actividad fotosintética en células de microalgas.

La actividad fotosintética es la actividad biológica elegida como indicador de la viabilidad celular de los cultivos, y se determina en muestras

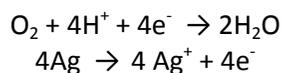
de cultivo sometidas a alta intensidad lumínica. La actividad respiratoria se determina en oscuridad.

El oxígeno que se acumula durante la fotosíntesis o el que se consume durante la respiración se puede detectar paleográficamente por un electrodo de oxígeno modelo *Oxygraph Hansatech Instruments* (Figura 2.10).



Figura 2.10. Electrodo de Oxígeno

Para ello, se necesario considerar el coeficiente de solubilidad de oxígeno a la temperatura de medida, siendo este de $0,2594 \mu\text{mol/mL}$ a 25°C . La celda de medida está dotada de un cátodo de Pt y un ánodo de Ag/AgCl inmerso en una solución saturada de KCl. Al aplicar el potencial, el oxígeno existente en la celda es reducido generándose una corriente eléctrica proporcional a la cantidad de O_2 . Las reacciones que tienen lugar son las siguientes:



Tras introducir 1 mL de cultivo en la cámara de reacción, se realizan las medidas de evolución de oxígeno a 25°C , bajo condiciones de luz blanca saturante ($\approx 650 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) para la producción fotosintética de aquel, y en oscuridad para su consumo por respiración endógena.

La cinética de desprendimiento de oxígeno obtenida en el periodo de luz es el resultado neto del funcionamiento simultáneo de la fotosíntesis y la respiración celular. Así, la pendiente obtenida, mediante una aplicación informática, durante el periodo de luz (producción neta de O_2) ha de

sumarse al valor de la pendiente obtenida durante el periodo de oscuridad (consumo de O₂), resultando la actividad fotosintética de la microalga.

2.5.2. Medida de fluorescencia en células de microalgas.

La medida de fluorescencia se obtuvo como el máximo Q_y (eficiencia del fotosistema II, PSII). La producción de fluorescencia por parte de la clorofila es una de las formas en que el cloroplasto disipa energía lumínica sobrante. La fluorescencia de la clorofila demuestra ser una herramienta útil para la evaluación del potencial fotoquímico del PSII y también del posible estrés celular. A modo de ejemplo, cambios en la eficiencia fotosintética preceden en muchas ocasiones a cambios en el contenido celular en clorofilas, por lo tanto la variación de la fluorescencia se puede observar con mucha más antelación a síntomas cloróticos de tipo visual, siendo una técnica de tipo no destructiva, no invasiva y rápida (Mohammed et al. 1995). Este método, al no ser destructivo, permite realizar medidas repetidas sobre la misma muestra.

Las medidas de fluorescencia se determinaron usando un equipo PAM (*Pulse Amplitude Modulation*, modelo AquaPEN AP100). Las determinaciones se efectuaban colocando una alícuota de cultivo en la cubeta del PAM y manteniéndola en oscuridad durante 15 min, para oxidar los centros de reacción de los fotosistemas. Posteriormente, se emite un pulso de luz saturante, que satura rápidamente los centros de reacción de los fotosistemas e induce la emisión de la fluorescencia máxima de la clorofila de los estos, dando el valor de Q_y, medida del rendimiento potencial máximo del PSII, como fracción de la unidad, tomada esta como 100% (Schreiber et al. 1995).

2.5.3. Actividades enzimáticas del sistema antioxidante.

Extractos crudos

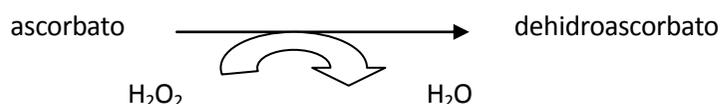
Las células de los cultivos de *C. onubensis* se recogieron durante la fase exponencial de crecimiento por centrifugación a 4.400 rpm (Eppendorf centrifuga 5810) durante 5 min y, tras eliminar los restos de medio de cultivo

mediante dos lavados sucesivos con agua destilada y posterior centrifugación, se utilizaron directamente, o bien se congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. En el caso de la experimentación con diferentes concentraciones de sal con *C. onubensis*, el lavado se realizó con la solución de concentración de formiato amónico pertinente.

Las células correspondientes a una muestra de un cultivo, aproximadamente entre 1 y 3 g de biomasa húmeda, se resuspendieron con el tampón de trabajo para poder traspasar el pellet correspondiente a tubos eppendorf de 2 mL. Se volvió a centrifugar hasta dos veces en la centrífuga MiniSpin Plus de Eppendorf, a 5.000 rpm durante 5 min. Una vez eliminado el sobrenadante, se procedió a la preparación de los extractos crudos por sonicación. Primero, se realizó la rotura celular a una temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los pulsos de la sonicación (BioBlock Scientific Vibra-Cell 75041) fueron de 10 s con paradas de 59 s durante un total de 5 pulsos. A continuación se añadió de nuevo 1,5 mL de tampón de trabajo, se agitó vigorosamente durante 1 min y se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 min. Con cuidado de no pasar restos celulares, se trasvasó con pipeta el sobrenadante a otro tubo eppendorf, siendo posible su conservación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posteriores medidas. El sobrenadante obtenido se utilizó como extracto crudo.

Ascorbato peroxidasa

La ascorbato peroxidasa (APX) cataliza la descomposición de peróxido de hidrógeno en presencia de ácido ascórbico para producir ascorbato monohidrato y agua:



La ascorbato peroxidasa se determinó espectrofotométricamente por desaparición de ascorbato reducido, a 290 nm ($\epsilon = 2,8\text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) y a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ utilizando el método descrito por Asada (1984) y modificado por Amako et al. (1994). La mezcla de reacción contenía, en 1 mL de volumen final: $1\text{ }\mu\text{mol}$ de EDTA; $0,24\text{ }\mu\text{mol}$ de ascorbato reducido; $5\text{ }\mu\text{mol}$ de H_2O_2 y $100\text{ }\mu\text{L}$ de

extracto crudo. Una unidad, U, representa la cantidad de enzima que cataliza la desaparición de $1 \mu\text{mol}$ de H_2O_2 por min.

Catalasa

La catalasa (CAT) cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. La actividad de la enzima se determinó en un electrodo de oxígeno tipo Clark, mediante la cinética de aparición de oxígeno a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, modificando el método descrito por Halbach (1977). La mezcla de reacción contenía un volumen total de 2 mL, compuesto por 1 mL de tampón fosfato 100 mM a pH 7, 500 μL de extracto crudo y 500 μL de una disolución de H_2O_2 40 mM, que da comienzo a la reacción. Una unidad, U, de actividad representa la cantidad de enzima que cataliza la producción de $1 \mu\text{mol}$ de O_2 por min.

Glutación reductasa

La glutación reductasa (GR) cataliza la reducción de glutación oxidado con NADPH:



Fue determinada cinéticamente por la desaparición de NADPH, medida espectrofotométricamente a 340 nm ($\epsilon = 6,3 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), según Lamotte et al. (2000). Así, un 1 mL de reacción contenía: 25 μmol de TrisHCl (pH 7,5); 0,5 μmol de EDTA; 1 μmol de glutación oxidado; 100 μL de extracto crudo y 0,25 μmol de NADPH, que es el reactivo con el que se empieza la reacción. Una unidad, U, de actividad representa la cantidad de enzima necesaria para catalizar la desaparición de $1 \mu\text{mol}$ de NADPH por min.



Universidad
de Huelva

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo 3

**CRECIMIENTO, ACUMULACIÓN
DE LÍPIDOS Y RESPUESTA
ANTIOXIDANTE DE *Coccomyxa
onubensis* EN CONDICIONES
DE CARENCIA NUTRICIONAL**



Universidad
de Huelva

3. CRECIMIENTO, ACUMULACIÓN DE LÍPIDOS Y RESPUESTA ANTIOXIDANTE DE *Coccomyxa onubensis* EN CONDICIONES DE CARENCIA NUTRICIONAL.

3.1. Crecimiento en carencia nutricional

Numerosas microalgas responden de forma similar a condiciones de carencia nutricional mediante la acumulación de lípidos (Geider et al. 1998, Phadwal y Singh 2003, Lamers et al. 2012). En este apartado de la Tesis se ha estudiado el efecto de la carencia de nitrato, fosfato y sulfato sobre el crecimiento de *Coccomyxa onubensis*, con objeto de analizar si la viabilidad del cultivo y la acumulación de lípidos en estas situaciones pudieran ser procesos compatibles.

Para realizar la experimentación se tomaron alícuotas de cultivos celulares en fase exponencial de crecimiento, incubados en condiciones estándar según se describe en Materiales y Métodos. Las células se lavaron previamente con medio fresco K9 carente en cada uno de los nutrientes mencionados, siendo seguidamente resuspendidas en dichos medios. En total se inocularon cuatro cultivos, tres de ellos incubados en carencia de nitrógeno, fósforo y azufre, respectivamente. El cuarto fue un cultivo control de *Coccomyxa onubensis* crecido con medio K9 pleno de nutrientes.

A lo largo de 16 días de experimento y en varias réplicas, se tomaron muestras de los diferentes cultivos para determinar la evolución de parámetros específicos del crecimiento. Estos parámetros fueron el peso seco o densidad celular, el contenido en clorofila y el contenido en carotenoides totales y específicos -luteína y β -caroteno-. Así mismo, se determinaron parámetros para conocer el estado del PSII, indicador de la viabilidad celular, y se cuantificó el contenido de lípidos totales y de FAMES. Finalmente, se realizó experimentación para estudiar la actividad de enzimas que desempeñan un papel importante en la defensa frente al estrés oxidativo que pueda provocar la carencia nutricional en *Coccomyxa onubensis*.

La Figura 3.1 muestra la evolución en el tiempo del peso seco de cultivos de *C. onubensis* incubados bajo carencia nutricional de nitrógeno,

fósforo o azufre. Como se observa en la Figura, el peso seco del cultivo control fue superior al de los cultivos en carencia de nutrientes, a lo largo de todo el experimento. En particular, tras dos semanas de experiencia el cultivo incubado en carencia de nitrógeno acumuló la menor concentración de biomasa, siguiendo en orden creciente los cultivos incubados en carencia de azufre, de fósforo y, como se ha referido, el cultivo control. A pesar de las condiciones de carencia de nutrientes, se observa que todos los cultivos aumentan la concentración de biomasa a lo largo del experimento.

Se calcularon las tasas específicas de crecimiento a partir de la evolución de la biomasa seca en los distintos cultivos sometidos a carencia nutricional. Las tasas de crecimiento más bajas obtenidas correspondieron al cultivo incubado en carencia de nitrógeno ($0,01 \text{ d}^{-1}$). Las tasas de crecimiento para los cultivos incubados en carencia de fósforo y azufre fueron de $0,14$ y $0,16 \text{ d}^{-1}$, respectivamente. Por último, el cultivo control alcanzó una media de $0,19 \text{ d}^{-1}$.

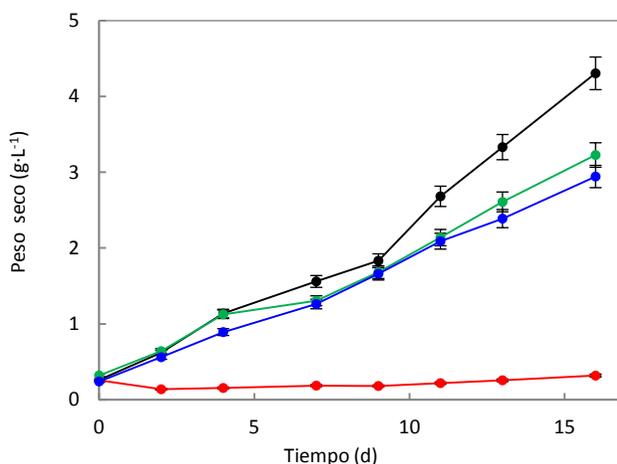


Figura 3.1. Evolución del peso seco de *Coccomyxa osubensis* incubada en carencia nutricional. Cultivos de *C. osubensis* incubados en condiciones estándar, se centrifugaron, lavaron y resuspendieron en medios sin nitrógeno (-●-), fósforo (-●-) ó azufre (-●-), respectivamente. Como control se utilizó un cultivo incubado en medio pleno de nutrientes (-●-). Los cultivos se incubaron con luz PAR continua de intensidad $140 \mu\text{mol fotonos m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 2,5 y con CO_2 a saturación, tal y como se detalla en Materiales y Métodos.

La carencia de nutrientes en el medio puede inducir una secuencia de eventos negativos para los organismos fotosintéticos, entre ellos: la

disminución del contenido celular de biomoléculas y, por tanto, de su tasa de crecimiento; la pérdida en la eficiencia de captación y fijación de luz y carbono; la reducción en la síntesis de proteínas y la reducción del contenido de pigmentos fotosintéticos. En definitiva, la paralización del crecimiento (Geider et al. 1998).

Según los resultados de esta experimentación, la respuesta del cultivo incubado bajo carencia de nitrógeno es la inhibición casi completa del crecimiento celular. Resulta obvio que la carencia de nitrógeno en el medio de cultivo afecte negativamente al crecimiento celular de cualquier organismo puesto que afecta, de manera negativa e inmediata, a la síntesis de proteínas (Grossman 2000, Phadwal y Singh 2003, Cakmak et al. 2012). Todos los organismos fotosintéticos necesitan abundancia de nitrógeno para sintetizar proteínas, ácidos nucleicos y clorofilas, entre otras biomoléculas. La carencia de nitrógeno también puede contribuir a la disminución del contenido celular de la RUBISCO y, por tanto, de la eficiencia de la captación de carbono (Geider et al. 1993).

El fósforo es un nutriente esencial para el crecimiento de los organismos y forma parte de macromoléculas y de actividades específicas de enzimas y ribosomas (Geider et al. 1998). También, el fósforo es componente importante en la estructura de fosfolípidos implicados en la pared celular. Así, la carencia de fósforo provoca que una parte de la estructura de la membrana de las células fotosintéticas sea sustituida por otros lípidos que no contienen fósforo (Spijkerman y Wacker 2011), perdiendo por tanto su composición y fluidez originales. El azufre es un elemento esencial presente también en proteínas y lípidos. La carencia de fósforo ó azufre, por tanto, puede influir en la cantidad total de lípidos y su composición de ácidos grasos, pero no de forma tan dramática en el crecimiento celular como ocurre con la carencia de nitrógeno, ya que la demanda celular de fósforo y azufre es muy inferior a la de nitrógeno. Como otros autores han publicado, aunque fósforo y azufre sean esenciales por su presencia en la estructura de macromoléculas, su carencia no afecta tan drásticamente a la división celular como el nitrógeno (Phadwal y Singh 2003, Cakmak et al. 2012).

La carencia de nitrógeno, fósforo o azufre también es conocida porque puede provocar una reducción en la concentración celular de los

pigmentos fotosintéticos y dificultar así la fijación fotosintética de CO₂ (Ben-Amotz 1987, Grossman 2000, Cakmak et al. 2012). El fósforo juega un importante papel en el transporte de energía celular a través de enlaces fosfato de alta energía (ATP, azúcar-fosfato), y en la señalización intracelular (fosforilación y desfosforilación de proteínas), por lo que la menor biodisponibilidad del fósforo afecta directamente al ciclo de Calvin, que requiere energía metabólica. El azufre, en su caso, forma parte, entre otras moléculas, de la proteína Fe-S ferredoxina, que se encarga de reducir NADP⁺ con electrones liberados de la oxidación del agua en el PSII. La limitación de azufre afecta negativamente a la obtención de poder reductor en la fotosíntesis (Melis et al. 2000).

Resulta significativo el hecho de observar crecimiento en los cultivos sometidos a carencia nutricional de fósforo o azufre, algo no esperable transcurrido un tiempo de cultivo equivalente a varias veces el de duplicación celular. Este hecho podría ser coherente con la respuesta celular de adaptación a las condiciones químicas propias del hábitat natural de la microalga. Los drenajes ácidos de la cuenca minera del río Tinto son pobres en fósforo, y además presentan un alto contenido en metales, tanto en variedad como en concentración. Entre los principales mecanismos de resistencia a metales descritos para las microalgas se encuentran las fitoquelatinas (Kneer y Zenk 1992, Hirata et al. 2005). Estas moléculas contienen en su estructura el aminoácido cisteína. Si bien no existen datos de contenido en fitoquelatinas para *Coccomyxa*, la presencia en su hábitat natural de Zn y Cd, metales secuestrados por tales fitoquelatinas, sugiere que es esperable la expresión en *Coccomyxa* de dichos péptidos. Estudios previos del grupo de investigación han revelado una significativa tolerancia de la microalga a metales, entre ellos Fe (II) y Cu (II) (Garbayo et al. 2008, Vaquero et al. 2012). El Cu (II) es uno de los metales capturados por las fitoquelatinas (Gaur y Rai 2001). Además, la presencia de metales a pH ácido, por tanto solubles en medio acuoso, aumenta el estrés oxidativo en la célula (Li et al. 2006), produciéndose un incremento en la síntesis de moléculas antioxidantes que contienen azufre, como el glutatión (Nagalakshmi y Prasad 2001). Las moléculas del sistema antioxidante que contienen azufre suponen una reserva celular de grupos tiólicos en forma de cisteína, por tanto, una reserva de azufre útil en situaciones de carencia de dicho elemento, lo que

sería coherente con la viabilidad de los cultivos de *Coccomyxa* tras dos semanas en carencia de azufre.

Las clorofilas permiten obtener información sobre el crecimiento y la capacidad fotosintética de la microalga. La Figura 3.2 (superior) presenta la evolución en el tiempo de la concentración de clorofila celular referida a volumen de cultivo de *C. onubensis* incubada en carencia nutricional. Los datos de la Figura muestran diferentes tendencias a lo largo del tiempo. En la primera semana, se observa que todos los cultivos, excepto el carente en nitrógeno, mantienen una evolución constante de aumento de clorofilas. A partir de la segunda semana, el cultivo control aumenta la concentración de clorofilas respecto a los cultivos incubados en carencia de fósforo y azufre, mientras que el cultivo incubado en carencia de nitrógeno disminuye la concentración de clorofilas, señal de la inhibición del crecimiento por falta de nitrógeno inorgánico. La Figura 3.2 (inferior) muestra la evolución en el tiempo de la concentración de clorofila celular referida a peso seco de cultivos de *C. onubensis* incubados en carencia nutricional, lo que permite obtener información sobre la actividad de su biosíntesis. Salvo en la primera semana, se observa durante la experiencia que la concentración de clorofila celular referida a peso seco es superior en el cultivo control. La concentración de clorofila del cultivo en carencia de azufre se mantiene constante e inferior a la concentración del cultivo control y una tendencia similar se observa para el cultivo incubado en carencia de fósforo. Por último, los datos que representan la concentración intracelular de clorofilas del cultivo sometido a carencia de nitrógeno muestran durante todo el tiempo del ensayo una tendencia decreciente, produciéndose la caída más intensa durante la última semana. Tan sólo el cultivo control muestra una biosíntesis neta y significativa de clorofila en el experimento realizado.

Como se puede comprobar en ambas gráficas de la Figura 3.2 la carencia de nitrógeno es la que más influye en la evolución de la concentración de clorofilas de *C. onubensis*, tanto por volumen de cultivo como por peso seco de biomasa. Desde el inicio de la experimentación, las células no son capaces de sintetizar dichos pigmentos, que contienen nitrógeno en su estructura y son responsables primarios de la fotosíntesis. Los cultivos carentes de fósforo y azufre modifican la concentración de clorofilas en menor medida que el cultivo carente en nitrógeno,

manteniendo una concentración de clorofila celular referida a peso seco promedio relativamente estable durante el tiempo de incubación en las respectivas carencias.

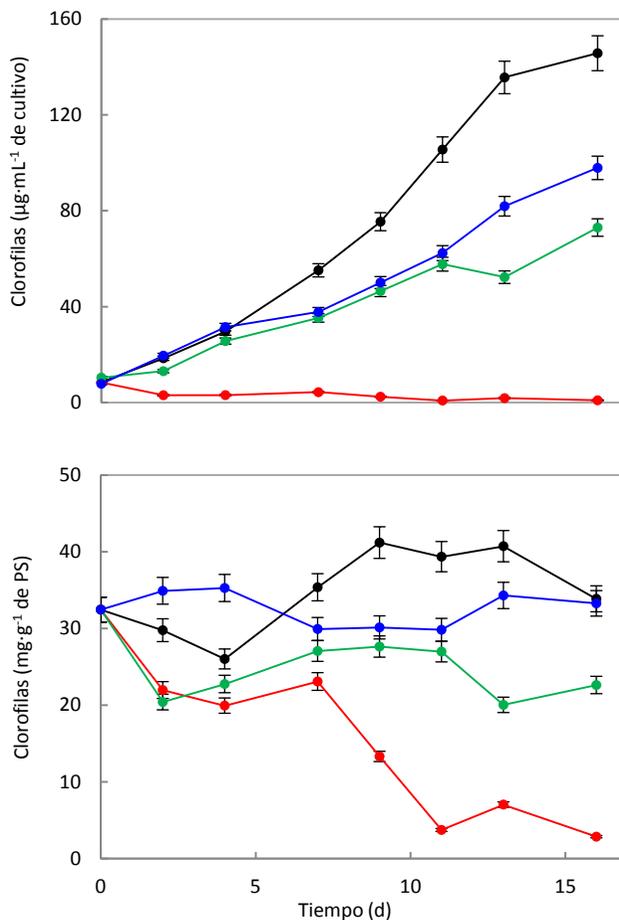


Figura 3.2. Evolución de la concentración de clorofilas de *Coccoomyxa onubensis* incubada en carencia nutricional. La gráfica superior representa la concentración de clorofila celular referida a volumen de cultivo y la gráfica inferior representa la concentración de clorofila celular referida a peso seco. Cultivos de *C. onubensis* incubados en condiciones estándar, se centrifugaron, lavaron y resuspendieron en medios sin nitrógeno (-●-), fósforo (-●-) ó azufre (-●-), respectivamente. Como control se utilizó un cultivo incubado en medio pleno de nutrientes (-●-). Los cultivos se incubaron con luz PAR continua de intensidad $140 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, a 25°C , pH 2,5 y con CO_2 a saturación, tal y como se detalla en Materiales y Métodos. PS: peso seco.

El aumento del contenido de clorofila celular referida a peso seco en un cultivo en modo baño indica biosíntesis del pigmento para sostener la mínima necesidad de clorofila para la captura de la luz, propia de cultivos

oscuros con alta demanda de luz PAR (Ritchie y Larkum 2012). Por añadidura, la estabilización del contenido de clorofila celular referida a peso seco puede indicar deficiencias en los complejos proteicos colectores de luz, que impliquen defectos en el número de complejos, en el de moléculas de clorofilas o en su capacidad fotoquímica (Melis 2007). Lo último puede evidenciarse mediante la determinación de la eficiencia del PSII, Q_y (*quantum yield*). La Figura 3.3 muestra la eficiencia del PSII de *C. onubensis* a lo largo de las primeras 96 h de incubación en las distintas carencias nutricionales. La tendencia de Q_y en los cultivos sometidos a carencia de fósforo y azufre es similar a la del cultivo control durante casi toda la experiencia, mostrando al final una leve tendencia descendente. De manera diferente, el cultivo incubado en carencia de nitrógeno muestra, a partir de las 24 h, una disminución de la eficiencia fotosintética, siendo siempre inferior que para los demás cultivos a lo largo de la experimentación.

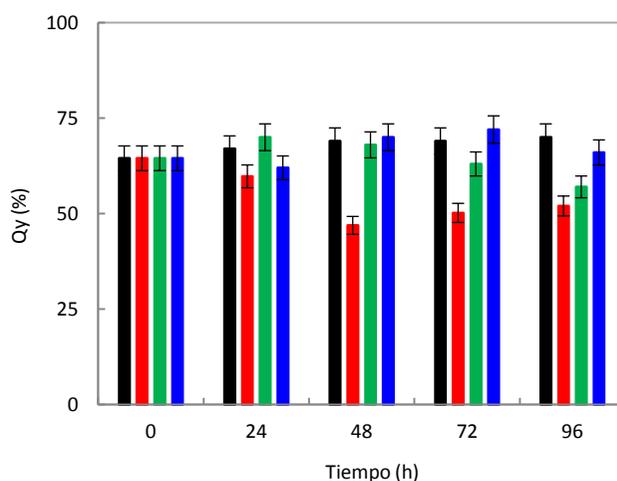


Figura 3.3. Eficiencia del PSII de *Coccoomyxa onubensis* incubada en carencia nutricional. Cultivos de *C. onubensis* incubados en condiciones estándar, se centrifugaron, lavaron y resuspendieron en medios sin nitrógeno (barra roja), fósforo (barra verde) ó azufre (barra azul), respectivamente. Como control se utilizó un cultivo incubado en medio pleno de nutrientes (barra negra). Cultivos se incubaron con luz PAR continua de intensidad $140 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, a temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 2,5 y con CO_2 a saturación, tal y como se detalla en Materiales y Métodos. La medida se realizó con un fluorómetro modelo PAM-210 WALZ, como se describe en Materiales y Métodos.

La eficiencia del PSII, medida en forma de fluorescencia al excitar las clorofilas de los fotosistemas, aporta información de la capacidad fotosintética y de la viabilidad celular de los cultivos. Como ya se ha descrito, la carencia de nitrógeno afecta a la fotosíntesis, entre otras acciones

mediante la reducción de la eficiencia de los captadores de luz, las moléculas de clorofila. Incubar cultivos en carencia de nitrógeno afecta a las proteínas del cloroplasto, incluidas las que forman parte de los centros de reacción del PSII (Parkhill et al. 2001, Berden-Zrimec et al. 2008), disminuyendo la eficiencia del PSII, tanto por contener menor número de clorofila antena como por la disfunción fotosintética derivada de las deficiencias en su estructura proteica.

En la Figura 3.2 (superior), el aumento de la concentración de clorofila celular referida a volumen de cultivo carente de azufre es coherente con la Figura 3.1, que muestra aumento del peso seco de dicho cultivo. El cultivo carente en azufre crece, aunque en menor medida que el cultivo control. Por contraste, la Figura 3.2 (inferior) que representa la evolución de la concentración de clorofila celular referida a peso seco del cultivo incubado en carencia de azufre, muestra constante dicho parámetro, lo que justifica en parte la desaceleración del crecimiento como consecuencia de la menor captura de energía lumínica y, por tanto, su traducción en menor cantidad de biomasa. La carencia de azufre impide la regeneración rápida de alguna subunidad proteica del PSII (Volgusheva et al. 2007), necesaria para producir la rotura del H₂O (Melis et al. 2007). Por lo tanto, la carencia de azufre, en el extremo, produce anaerobiosis e impide el crecimiento, como ha descrito Melis (2000) en *Chlamydomonas*, ya que afectaría necesariamente a la actividad fotosintética y al rendimiento de la fotosíntesis. En el caso de cultivos baño de *Coccomyxa* en carencia de azufre, no hay alteración del Q_y, lo que prueba la funcionalidad del PSII, es coherente con el crecimiento observado en tales cultivos (Figura 3.1) y redundante en la hipótesis de la posible existencia de reservas de azufre en la microalga que permiten regenerar el PSII.

En conclusión, *C. onubensis* crece de manera sostenida en el tiempo cuando se incuba en carencia de fósforo o azufre, manteniendo captura activa de luz y su conversión eficiente en energía química. Los resultados de esta Tesis y otros previos obtenidos por el equipo de investigación sugieren la posible disponibilidad de reservas de azufre en la microalga, necesarias para preservar la actividad del PSII en carencia de dicho elemento. Por el contrario, otros estudios, por ejemplo con *Chlamydomonas reinhardtii* o cianobacterias (Melis et al. 2000, Antal y Lindblad 2005), demuestran que

tras 24 h de incubación en carencia de azufre la actividad fotosintética cae a un nivel más bajo que la tasa respiratoria, entrando el cultivo en anaerobiosis como se ha indicado anteriormente.

3.2. Acumulación de lípidos en carencia nutricional.

Cuando todos los elementos necesarios para el crecimiento del cultivo están disponibles en el medio, las células de las microalgas se dividen rápidamente y sintetizan con preferencia lípidos de membrana y, en particular, lípidos del cloroplasto. La limitación nutricional ralentiza la fijación fotosintética del carbono y se caracteriza por la acumulación de lípidos neutros y no polares como los carotenoides (Geider et al. 1998, Phadwal y Singh 2003, Solovchenko 2012). Además, los lípidos no polares desempeñan un papel importante en la defensa frente al estrés inducido por las carencias nutricionales. Esto se debe a su elevado grado de insaturación, ya que los carotenoides son excelentes sumideros de radicales libres de oxígeno y de otras especies radicales libres que dañan el metabolismo celular al oxidar moléculas de muy diferente naturaleza, desde transportadores de electrones hasta lípidos de membrana (Del Campo et al. 2004). Por esta razón, factores físico-químicos que sean capaces de generar estrés oxidativo son, en principio, candidatos a estimular la biosíntesis de carotenoides.

Estudios previos han descrito que, en general, las microalgas incubadas en carencias nutricionales inducen la carotenogénesis; por ejemplo, *Dunaliella salina* o *Dunaliella tertiolecta* incrementan la concentración en β -caroteno tras ser incubadas en carencia de nitrógeno inorgánico (Rabinowitch et al. 1987, Lers et al. 1991, Phadwal y Singh 2003).

La Figura 3.4 (superior) muestra la evolución, a lo largo del experimento, de la concentración de carotenoides celulares referida a volumen de los cultivos de *C. onubensis* incubados bajo carencia nutricional. La Figura presenta diferentes tendencias a lo largo del tiempo. Desde el inicio, se observa en todos los cultivos, excepto el carente en nitrógeno, un aumento en la concentración de carotenoides totales. Tras dos semanas de experimentación, los cultivos incubados en carencia de fósforo y azufre

mantienen dicha tendencia al aumento en la concentración de carotenoides, siendo siempre inferior a la que presenta el cultivo control. El cultivo incubado en carencia de nitrógeno no acumula carotenoides, como es esperable por el cese del crecimiento (Figura 3.1). La Figura 3.4 (inferior) presenta la evolución en el tiempo de la concentración de carotenoides celulares referida a peso seco de los cultivos de *C. onubensis* incubados en carencia de nutrientes, que aporta información sobre la biosíntesis de tales moléculas. La Figura muestra, a lo largo de la primera semana, un aumento notable de la concentración de carotenoides celulares referida a peso seco del cultivo carente en nitrógeno, superior a los datos del cultivo control, disminuyendo posteriormente y de manera drástica por la degradación del cultivo. Por otro lado, ninguna de las otras condiciones de carencia indujo una biosíntesis neta de carotenoides cuya magnitud fuese notable y destacada respecto al cultivo control.

Tal y como se describe para otras microalgas, el contenido de carotenoides celulares referido a peso seco aumenta en carencia de nitrógeno (Cakmak et al. 2012). Los resultados obtenidos son coherentes con tales observaciones, limitándose la acumulación intracelular a una semana debido a la inhibición del crecimiento.

Si bien la carencia de nitrógeno pareciera ser una estrategia adecuada para inducir la síntesis de carotenoides, hay que tener en cuenta, por lo ya descrito anteriormente, que esta carencia provoca en *C. onubensis* una desaceleración del crecimiento celular y afecta negativamente a la síntesis de otros pigmentos, como las clorofilas. Como consecuencia, el aumento de la actividad de biosíntesis de carotenoides observado durante los primeros días en los cultivos carentes de nitrógeno no se traduce en altas productividades de carotenoides. La acumulación de carotenoides celulares referida a peso seco en cultivos de *Coccomyxa* carentes de nitrógeno, tendría más sentido como respuesta fisiológica a la necesidad de fijar carbono en forma de moléculas con elevado grado de insaturación, para mitigar los daños que provoca dicho estrés nutricional derivados de la generación de radicales libres (Solovchenko 2013), que en funciones de captura de luz para fotosíntesis.

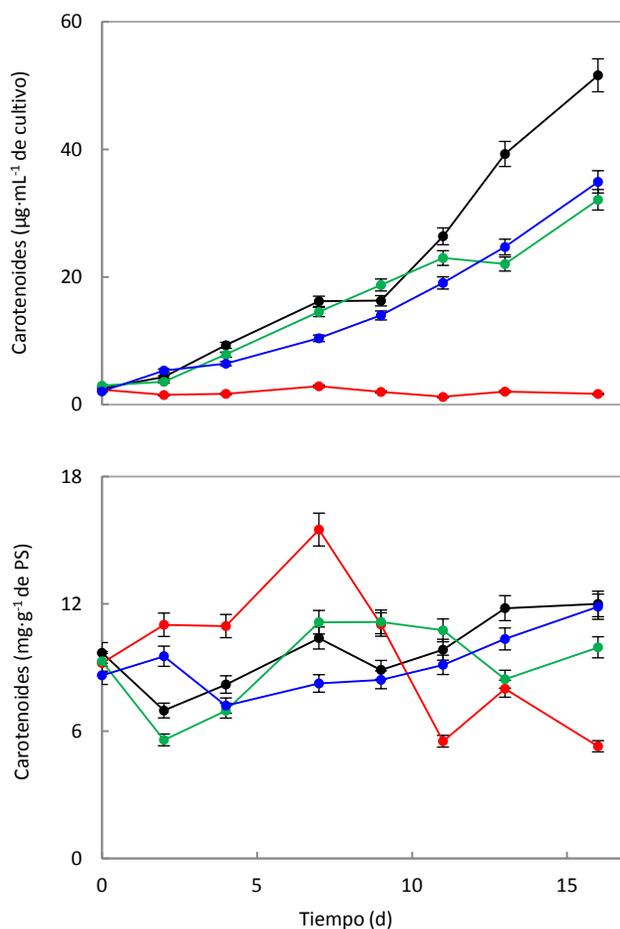


Figura 3.4. Evolución de la concentración de carotenoides totales de *Coccomyxa onubensis* incubada en carencia nutricional. La gráfica superior representa la concentración de carotenoides celulares referida a volumen del cultivo y la gráfica inferior representa la concentración de carotenoides celulares referida a peso seco. Cultivos de *C. onubensis* incubados en condiciones estándar, se centrifugaron, lavaron y resuspendieron en medios sin nitrógeno (-●-), fósforo (-●-) ó azufre (-●-), respectivamente. Como control se utilizaron cultivos incubados en medio pleno de nutrientes (-●-). Los cultivos se incubaron con luz PAR continua de intensidad $140 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, a 25°C , pH 2,5 y con CO_2 a saturación, tal y como se detalla en Materiales y Métodos. PS: peso seco.

Para confirmar los resultados anteriores, se procedió a la separación y cuantificación de pigmentos específicos con un papel antioxidante reconocido. Es el caso de luteína y β -caroteno en *C. onubensis*. La Figura 3.5 (superior) muestra la evolución de la concentración de luteína en los cultivos bajo las diferentes carencias nutricionales. Tras 48 h en tales condiciones, los cultivos incubados en carencia de nitrógeno y azufre alcanzan su máxima concentración intracelular de luteína, por encima del cultivo control. Sin

embargo, el cultivo sometido a carencia de fósforo mantiene la misma concentración de luteína que la del cultivo control, a lo largo de la experimentación.

La Figura 3.5 (inferior), representa la evolución de la concentración de β -caroteno en *C. onubensis* a lo largo de las primeras 72 h de incubación en carencias nutricionales. En este caso, de nuevo en coherencia con la Figura 3.4, el cultivo incubado en carencia de nitrógeno llega a aumentar la concentración intracelular de β -caroteno tras 48h de exposición. Los cultivos incubados en carencia de fósforo y azufre mantienen la concentración de la misma forma que el cultivo control.

La respuesta de *C. onubensis* incubada en carencia de nitrógeno encuentra similitud en otras microalgas. Muchas especies aumentan su concentración de terpenoides cuando están sometidas a condiciones no favorables de crecimiento, alcanzando hasta un 6 % del peso seco de la microalga en pigmentos secundarios, como β -caroteno en el caso de *Haematococcus pluvialis* (Wang et al. 2003). Las microalgas que componen el género *Dunaliella* acumulan β -caroteno también como respuesta a la alta salinidad del medio (Czygan 1970, Ben-Amotz et al. 1983). Especies de microalgas extremófilas, como *Chlorella nivali*, que habita en zonas de glaciares del Antártico, acumulan de forma natural altas concentraciones de astaxantina, demostrándose que ciertas especies que viven en lugares inhóspitos producen en mayor medida estos lípidos terpenoides probablemente por su función antioxidante (Remias et al. 2005).

En conclusión, los resultados muestran que la carencia de nutrientes no tiene una influencia determinante en la producción de carotenoides. En el caso del cultivo incubado bajo carencia de nitrógeno, se observa un aumento de la síntesis de luteína y β -caroteno, pero ocurre de forma puntual, ya que no se mantiene en el tiempo debido a la pérdida de viabilidad del cultivo. Los resultados obtenidos apuntan hacia la función antioxidante de la síntesis temporal más activa de carotenoides en cultivos carentes en nitrógeno, a la falta de productividad de carotenoides en carencia de nitrógeno, y a una productividad sostenida y similar a la de cultivos control en aquellos carentes en fósforo o azufre.

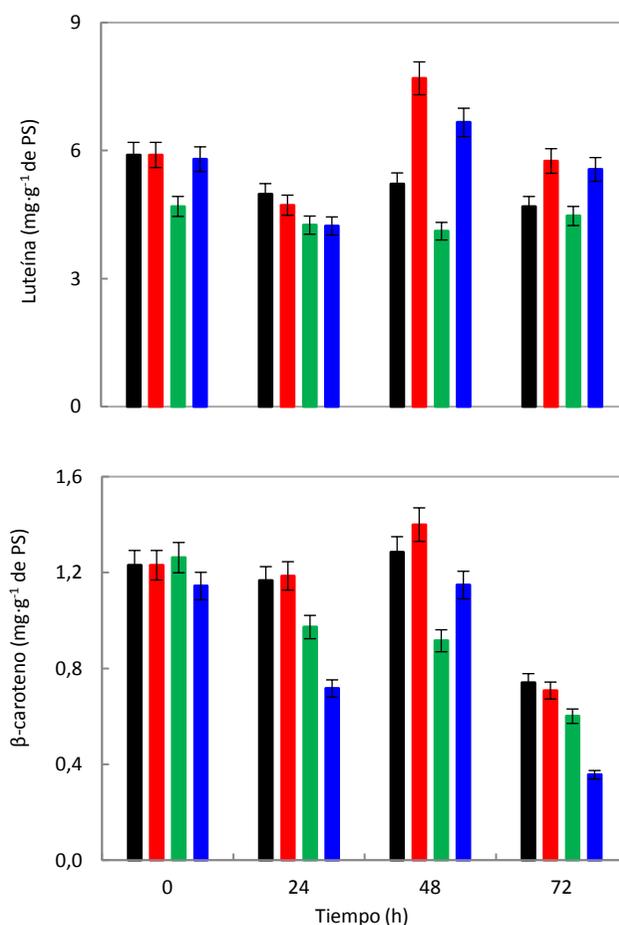


Figura 3.5. Evolución de la concentración de luteína y β -caroteno de *Coccomyxa onubensis* incubada en carencia nutricional. La gráfica superior representa la concentración intracelular de luteína y la gráfica inferior representa la concentración intracelular de β -caroteno. Cultivos de *C. onubensis* incubados en condiciones estándar, se centrifugaron, lavaron y resuspendieron en medios sin nitrógeno (barra roja), fósforo (barra verde) ó azufre (barra azul), respectivamente. Como control se utilizó un cultivo incubado en medio pleno de nutrientes (barra negra). Los cultivos se incubaron con luz PAR continua de intensidad $140 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 2,5 y con CO_2 a saturación, tal y como se detalla en Materiales y Métodos. Las medidas se realizaron por HPLC, como se describe en Materiales y Métodos. PS: peso seco.

Se analizó la influencia de las carencias nutricionales en la acumulación de lípidos totales de *Coccomyxa onubensis*. La carencia de nitrógeno es considerada como la estrategia más eficiente para incrementar el contenido de lípidos neutros en las microalgas (Guschina y Harwood 2006). Respuestas similares son inducidas en algunas microalgas por la carencia de fósforo o azufre. Sin embargo, la acumulación de lípidos en microalgas ante la restricción de nutrientes es considerablemente variable y,

por tanto, no es posible establecer un comportamiento generalizado entre las distintas especies (Ben-Amotz et al. 1985, Hu et al. 2008, Rodolfi et al. 2009, Widjaja et al. 2009).

La Figura 3.6 muestra el contenido en lípidos totales respecto al peso de biomasa seca de *C. onubensis* incubada bajo carencia de nitrógeno, fósforo o azufre. Como se observa en la Figura, la carencia de nitrógeno, fósforo ó azufre estimula la acumulación intracelular de lípidos durante las primeras 48h de experimentación. Posteriormente, tan sólo el cultivo carente en nitrógeno mantuvo concentraciones intracelulares de lípidos superiores a las del cultivo control, si bien tales cultivos carentes de nitrógeno se degradaron con rapidez.

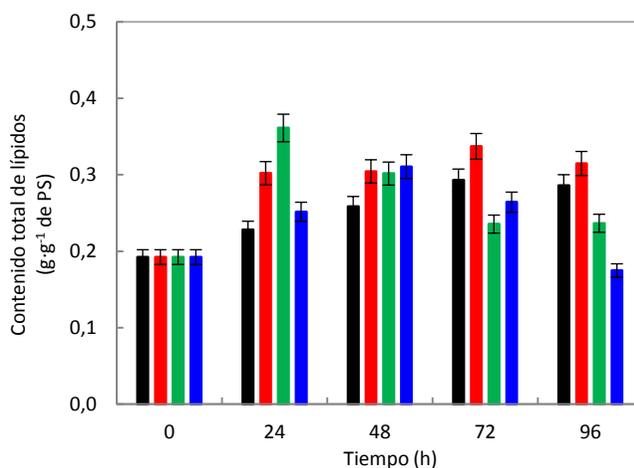


Figura 3.6. Contenido total de lípidos de *Coccothraux onubensis* incubada en carencia nutricional. Cultivos de *C. onubensis* incubados en condiciones estándar, se centrifugaron, lavaron y resuspendieron en medios sin nitrógeno (barra roja), fósforo (barra verde) ó azufre (barra azul), respectivamente. Como control se utilizó un cultivo incubado en medio pleno de nutrientes (barra negra). Los cultivos se incubaron con luz PAR continua de intensidad $140 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, a 25°C , pH 2,5 y con CO_2 a saturación. Los datos son calculados en gramos de lípidos totales respecto a los gramos de peso seco. La extracción de los lípidos totales se realizó mediante soxhlet usando como extractante disolventes orgánicos, tal y como se detalla en Materiales y Métodos. PS: peso seco.

Estos resultados sugieren que la carencia del medio de cultivo en nitrógeno, fósforo o azufre favorece, durante las primeras horas, el incremento de la fracción de carbono fijada cuyo destino final son moléculas lipídicas. Tal conclusión estaría soportada también por el hecho de que, en las mismas condiciones de incubación, el contenido celular en lípidos

terpenoides aumenta, lo cual sugiere en *Coccomyxa* una mayor expresión - en condiciones de carencia nutricional - de la función de reserva energética y, también, de la función antioxidante de la que forman parte los carotenoides.

En los cultivos sin fósforo ó azufre, el aumento de la concentración intracelular de lípidos ocurre de forma puntual en las primeras 48h. Los datos obtenidos siguen una evolución similar a la que presenta el cultivo control en la Figura 3.4, donde se representa la variación de la concentración intracelular de carotenoides en las distintas carencias nutricionales bajo las que se incuba *C. onubensis*. El comportamiento de *C. onubensis* incubada en carencia de nitrógeno, fósforo ó azufre se asemeja a lo publicado para microalgas no extremófilas, que generalmente tienden a acumular lípidos en carencia nutricional, particularmente de nitrógeno ó fósforo (Mandal y Mallick 2009, Scarsella 2010). La posible redistribución de azufre y fósforo desde reservas intracelulares (polifosfatos, grupos tiólicos) podrían justificar en parte la respuesta fisiológica observada, consistente en aumentos tan sólo moderados del contenido celular en lípidos, y crecimiento celular poco acorde con las situaciones de carencia impuestas.

Dentro del estudio sobre la estimulación de la producción de lípidos neutros y polares en *C. onubensis*, resulta particularmente relevante la síntesis de los ácidos grasos, debido a las distintas aplicaciones de estos ya descritas en la Introducción de la Tesis. Se determinó qué fracción de lípidos totales correspondía a dichas moléculas, en extractos obtenidos de *C. onubensis* incubada bajo las diferentes carencias nutricionales. Se ha publicado que el incremento en el total de lípidos de microalgas al incubarlas bajo condiciones de estrés corresponde principalmente al aumento de TAG, alcanzando máximos de hasta el 80% del total de los lípidos (Hu et al. 2008), dependiendo de especies y condiciones de cultivo. Por dicha razón se estudió la variación en el contenido de ácidos grasos esterificados de *C. onubensis* incubada bajo las distintas condiciones de estrés nutricional aplicadas en este apartado de la Tesis. Los resultados se muestran en la Figura 3.7, en forma de FAMES, obtenidos por transesterificación. Los valores de FAMES se calcularon como el sumatorio de las concentraciones de ácidos grasos mayoritarios respecto al peso seco de cada cultivo incubado en carencia nutricional. Los ácidos grasos fueron identificados y cuantificados con

patrones internos, a través de cromatografía de gases, como ya se ha descrito en Materiales y Métodos.

Se observa que la concentración de FAMES obtenida a partir de extractos de lípidos de los cultivos incubados en carencias de nitrógeno, fósforo ó azufre, aumenta respecto a los cultivos control en las primeras 48h, disminuyendo con posterioridad, de nuevo respecto a los cultivos control. Como diversos autores describen, la carencia nutricional en cultivos de microalgas puede favorecer la fijación de carbono en forma de lípidos de reserva energética (Phadwal y Singh 2003, Tan y Lin 2011, Solovchenko 2012).

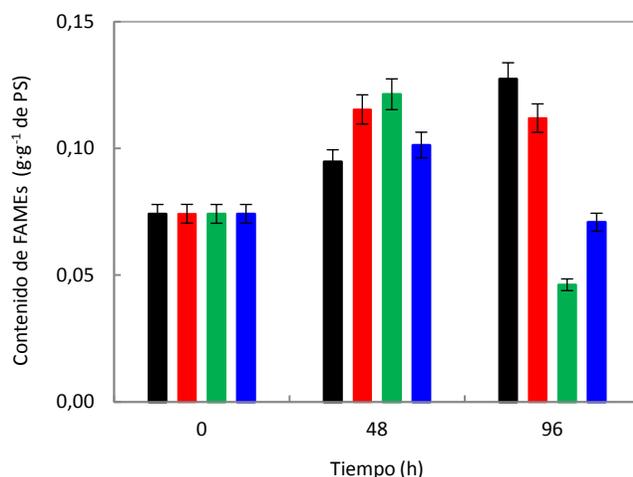


Figura 3.7. Contenido de FAMES de *Coccomyxa onubensis* incubada en carencia nutricional. Cultivos de *C. onubensis* incubados en condiciones estándar, se centrifugaron, lavaron y resuspendieron en medios sin nitrógeno (barra roja), fósforo (barra verde) ó azufre (barra azul), respectivamente. Como control se utilizó un cultivo incubado en medio pleno de nutrientes (barra negra). Los cultivos se incubaron con luz PAR continua de intensidad $140 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, a 25°C , pH 2,5 y con CO_2 a saturación, tal y como se detalla en Materiales y Métodos. Los datos se calcularon en gramos de ácidos grasos esterificados respecto a los gramos de peso seco de biomasa. La reacción de transesterificación, la identificación y cuantificación de ácidos grasos se realizaron tal y como se detalla en Materiales y Métodos. PS: peso seco.

La forma en la que se demuestra este aumento, entre otros compuestos lipídicos, es en la mayor síntesis de triacilglicéridos (TAG). Los ácidos grasos son las cadenas hidrocarbonadas que forman los TAG y parte de otros lípidos y son sintetizados en los cloroplastos. Diversas evidencias sugieren que la ruta de biosíntesis de TAG puede jugar un papel más activo

como respuesta al estrés, como almacenamiento extra de carbono y energía (Hu et al. 2008).

La enzima acetil-CoA carboxilasa (ACCCase) es clave en la regulación de la síntesis de ácidos grasos, catalizando la primera reacción de biosíntesis de ácidos grasos, la formación de malonil-CoA desde acetil-CoA, ATP y CO₂ (disuelto como HCO₃⁻). Ante condiciones ambientales desfavorables o condiciones de estrés para el crecimiento, muchas microalgas alteran la ruta de síntesis de lípidos incrementando la acumulación de lípidos neutros, principalmente de TAG. Desde la demostración de Page et al. (1994) donde se comprobó el control de la enzima ACCCase sobre la síntesis de ácidos grasos en plantas, esta enzima ha sido sobreexpresada en diferentes especies de plantas para mejorar la producción de ácidos grasos e indica uno de los caminos para la investigación en microalgas.

Son escasos los intentos de modificación genética de la ruta de síntesis de ácidos grasos que han tenido cierto éxito en microalgas (Sheenan et al. 1998). Los intentos iniciales de utilizar la ingeniería genética para estimular la síntesis lípidos consistieron en la sobreexpresión de acetil-CoA-carboxilasa (Dunahay et al. 1996), sin éxito. Se han utilizado recientemente mutantes de *Chlamydomonas reinhardtii* con la función de biosíntesis de almidón bloqueada, para demostrar que se puede desviar parte del flujo de fotosintatos del ciclo de Calvin hacia la biosíntesis de lípidos, consiguiendo con ello un aumento de acilglicéridos (Li et al. 2010). No obstante, los resultados no son aún prometedores si se comparan con la menor complejidad de las estrategias fisiológicas y sus resultados.

También se ha publicado que la carencia nutricional provoca cambios en el perfil de los ácidos grasos, modificando, en ciertos casos, la relación entre ácidos grasos saturados e insaturados (Courchesne et al. 2009), como se ha descrito que sucede por la incubación de ciertas microalgas en carencia de nitrógeno (James et al. 2011). Este hecho resulta determinante en el valor de los FAMES obtenidos para su uso como biodiesel. Para analizar el efecto de la carencia de nutrientes en el perfil de ácidos grasos de *C. onubensis* se representa en la Figura 3.8 (superior) la variación de dichas moléculas en las condiciones ensayadas. Esta Figura muestra la variación de los ácidos grasos mayoritarios respecto al contenido total de ácidos grasos obtenido en los

cultivos controles de *Coccomyxa onubensis*, a las 48 h de incubación en carencia de nitrógeno, fósforo o azufre

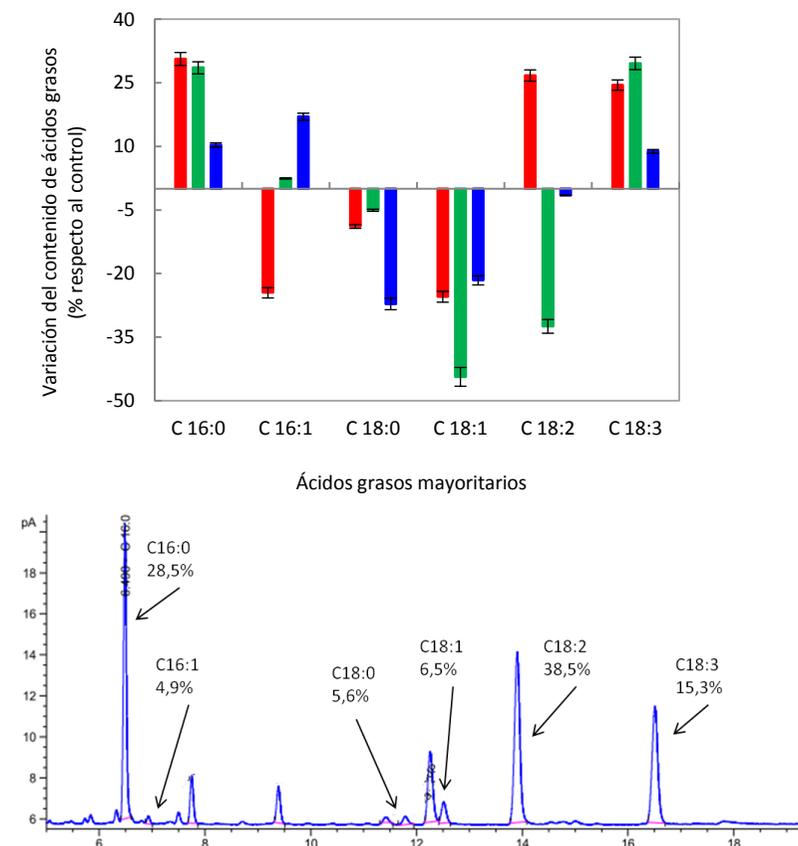


Figura 3.8. Variación del contenido de ácidos grasos mayoritarios de *Coccomyxa onubensis* incubada en carencia nutricional, en relación al contenido de ácidos grasos del cultivo control. Los datos del contenido de ácidos grasos fueron calculados tras las primeras 48h de incubación de la microalga en carencias nutricionales y expresadas respecto a peso seco de la microalga (PS). Se adoptó como referencia el contenido de ácidos grasos de los cultivos control. La gráfica superior muestra cultivos de *C. onubensis* incubados en condiciones estándar, se centrifugaron, lavaron y resuspendieron en medios sin nitrógeno (barra roja), fósforo (barra verde) ó azufre (barra azul), respectivamente. La gráfica inferior representa un cromatograma tipo de ácidos grasos de un cultivo control de *C. onubensis*. PS: peso seco.

Los cultivos incubados en carencia de nitrógeno, fósforo o azufre aumentan las concentraciones de los ácidos grasos C16:0 y C18:3 respecto a los datos del control, tomados estos últimos como valor cero en la Figura. Por otro lado, en cultivos carentes disminuyen las concentraciones de C18:0 y C18:1 respecto a los datos del control. La Figura 3.8 (inferior) muestra un

cromatograma tipo de ácidos grasos de un cultivo control de *C. onubensis*. Se muestran tanto la nomenclatura de cada ácido graso como el porcentaje de abundancia relativa al total de ácidos grasos integrados. Como puede observarse, los tres ácidos grasos mayoritarios son: palmítico (C16:0), linoléico (C18:2) y linolénico (18:3).

Por lo que se ha mostrado con los resultados de este capítulo de Tesis, la carencia nutricional, más en concreto la carencia de nitrógeno provoca una desaceleración en el crecimiento celular, afecta negativamente a la eficiencia fotosintética (Q_p) y al contenido intracelular de pigmentos fotosintéticos primarios. Sin embargo, se ha mostrado que dicha carencia produce un aumento del contenido intracelular de lípidos totales, particularmente de carotenoides, respuesta que se produce en la mayoría de células fotosintéticas de microalgas expuestas a condiciones no favorables de cultivo (Merzlyak et al. 2007, Solovchenko 2012 y 2013).

Numerosos autores definen las condiciones de estrés como aquellas no favorables para el crecimiento (Grossman 2000). En tales condiciones las células vegetales producen ROS, las llamadas especies reactivas de oxígeno, especialmente anión superóxido $O_2^{\bullet -}$ y H_2O_2 , que actúan como segundos mensajeros en muchos procesos asociados con el crecimiento y desarrollo de la célula (Foreman et al. 2003, Ledford y Niyogi 2005). Estas situaciones se denominan de “estrés oxidativo” (Doke et al. 1994). Los ROS son moléculas que pueden reaccionar con biomoléculas como ADN, proteínas o lípidos, impidiendo sus funciones fisiológicas (Halliwell 1996).

Se ha publicado que durante las primeras horas de incubación de una microalga bajo estrés por carencia de nitrógeno podría generarse un exceso de actividad en la cadena de transporte electrónico fotosintético e inducirse una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno, las cuales causan, como ya se ha mencionado, daño en lípidos, proteínas y otras macromoléculas (Hu et al. 2008). La formación de ácidos grasos es un sumidero de poder reductor; por ejemplo, la síntesis de C18:0 consume aproximadamente 24 unidades de NADPH derivado de la cadena de transporte de electrones, dos veces más poder reductor que en la formación de carbohidratos del mismo peso. Por tanto, favorecer la síntesis de ácidos grasos es una posible forma de mitigar el exceso de poder reductor y así

poder compensar el desequilibrio electrónico (Hu et al. 2008). Ello sería coherente con el aumento de lípidos observado en las primeras 48h, cuando los cultivos en carencia de nitrógeno muestran viabilidad fotosintética.

También, los ácidos grasos polinsaturados tienen afinidad para reaccionar con los ROS. A mayor número de insaturaciones, mayor tasa de reacción con las especies oxidantes para terminar formando lípidos hidroperóxidos (Kiritsakis y Dugan 1985, Girotti y Kriska 2004), lo que, en principio, determina una disminución de la proporción de ácidos grasos insaturados. En este sentido, bajo carencia nutricional, *C. onubensis* no presenta un cambio definido en el perfil de ácidos grasos, como se observa en la Figura 3.8 (superior), lo que sugiere un bajo nivel de estrés oxidativo en carencia nutricional, la predominancia de otros mecanismos con capacidad antioxidante, por ejemplo, su elevada concentración intracelular de pigmentos antioxidantes como la luteína, o una alta actividad de enzimas antioxidantes que participan en la eliminación de ROS en condiciones de estrés. El vínculo entre carencia nutricional y estrés oxidativo requiere de la determinación de actividades enzimáticas propias de la respuesta antioxidante en microalgas.

3.3. Respuesta enzimática antioxidante.

Para determinar si la carencia nutricional produce dicho estrés oxidativo, se midieron actividades enzimáticas del sistema antioxidante de la microalga cuando ésta se incubó en carencia de nitrógeno, fósforo o azufre. Las llamadas enzimas antioxidantes son proteínas que catalizan la detoxificación de ROS. Estas enzimas, con el concurso de sustratos reducidos, como glutatión o ascorbato, participan en la disminución de dichos radicales oxidantes para la célula. Las enzimas analizadas fueron glutatión reductasa, ascorbato peroxidasa y catalasa. Los resultados obtenidos se muestran en las siguientes Figuras.

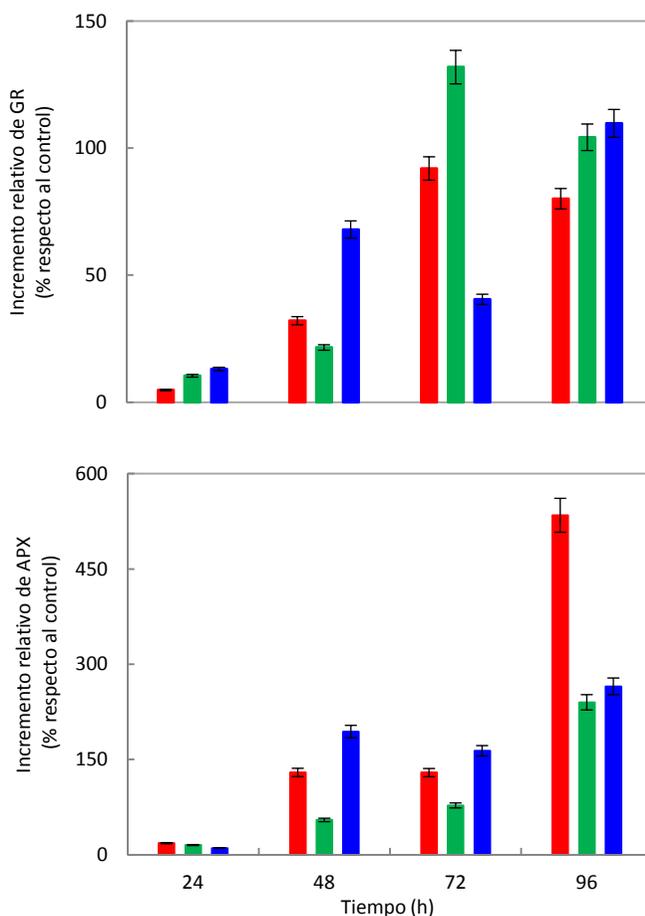


Figura 3.9. Incremento relativo de las actividades glutatión reductasa (GR) y ascorbato peroxidasa (APX) de *Coccomyxa onubensis* incubada en carencia nutricional. La gráfica superior representa el porcentaje de aumento de la actividad enzimática GR y la gráfica inferior representa el porcentaje de aumento de la actividad enzimática APX, ambos casos calculados respecto a los cultivos control de *C. onubensis* incubados en plenitud de nutrientes. La medida de las actividades enzimáticas se realizó en extractos crudos obtenidos de cultivos en carencia de nitrógeno (barra roja), fósforo (barra verde) ó azufre (barra azul), tal y como se detalla en Materiales y Métodos. Actividad GR del cultivo control a tiempo cero = $6,20 \text{ U GR} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteínas. Actividad APX del cultivo control a tiempo cero = $3,76 \text{ U APX} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteínas.

La Figura 3.9 (superior) muestra la variación de la actividad de la enzima glutatión reductasa (GR) presente en los extractos enzimáticos de *C. onubensis* incubada en carencia nutricional, calculada respecto a la actividad basal que presentan los extractos de los cultivos control crecidos en medio estándar. El aumento de la actividad GR es progresivo con el transcurso de la exposición de *C. onubensis* a carencia de nitrógeno, fósforo o azufre, lo que sugiere un aumento de la presencia de ROS en la célula derivado del estrés

nutricional. Aunque son muy escasos los trabajos que muestren la vinculación entre carencia nutricional y estrés oxidativo, algunos apuntan en la dirección sugerida por los resultados de esta Tesis (Foyer y Noctor 2005), si bien esta es la primera vez que se evidencian en una microalga de ambiente ácido.

La Figura 3.9 (inferior) presenta la variación de la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa (APX) presente en los extractos enzimáticos de *Coccomyxa*, calculada respecto a los valores basales observados en los cultivos control, tras incubar la microalga durante 96 h en carencia nutricional.

Las enzimas GR y APX están relacionadas en su actividad, ya que participan dentro del ciclo ascorbato-glutatión o ruta de Halliwell-Asada, donde se producen sucesivas reacciones de oxidación y reducción de ascorbato, glutatión y NADPH por las enzimas glutatión reductasa, ascorbato peroxidasa y dihidroascorbato reductasa (Mallick y Mohn 2000) para la eliminación de H_2O_2 . El ascorbato es el más importante reductor biológico del H_2O_2 a H_2O (Mehlhorn et al. 1996). La enzima ascorbato peroxidasa oxida moléculas de ascorbato regenerando poder reductor, NADPH, que se emplea para recuperar el glutatión reducido por acción de la enzima glutatión reductasa sobre glutatión oxidado (Noctor y Foyer, 1998). La glutatión reductasa (GR) es otra enzima de la ruta Halliwell-Asada. El monodehidroascorbato se reduce a ascorbato para a su vez reducir al glutatión (GSH), que es después oxidado. Para la mayoría de las funciones celulares el glutatión debería estar disponible en forma reducida (GSH). En dicha forma reside su potencial antioxidante. El aumento en el tiempo de las actividades GR y APX en extractos de cultivos carentes en nitrógeno, fósforo ó azufre respecto a la actividad de extractos del cultivo control, es, por tanto, consistente con el incremento del estado oxidativo celular ocurrido en medios sin nitrógeno, fósforo ó azufre.

Otra forma de eliminar H_2O_2 es mediante a la acción de la enzima antioxidante catalasa (CAT), la única enzima que degrada H_2O_2 sin consumir poder reductor. Por tanto, la catalasa es un mecanismo energéticamente eficiente para la célula en la eliminación de peróxido de hidrógeno (Mallick y Mohn 2000). La Figura 3.10 representa la variación relativa de la actividad

catalasa que participa en la detoxificación de H_2O_2 , en los cultivos de *C. onubensis* incubados en carencia de nitrógeno. Los datos fueron calculados a partir de la variación de la actividad CAT respecto a la misma actividad enzimática de los cultivos control. En extractos de cultivos carentes de fósforo ó azufre no se observó aumento de la actividad enzimática CAT (datos no mostrados).

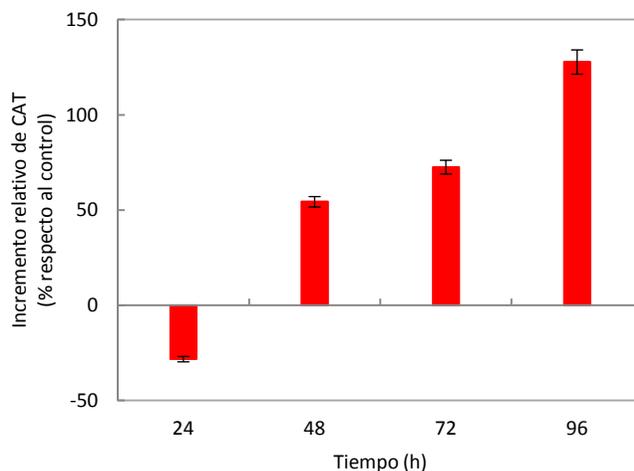


Figura 3.10. Incremento relativo de la actividad catalasa (CAT) de *Coccomyxa onubensis* incubada en carencia nitrógeno. La gráfica representa el porcentaje de aumento de la actividad enzimática CAT en extractos de cultivos carentes en nitrógeno respecto a la actividad en extractos de los cultivos control de *C. onubensis* incubados en plenitud de nutrientes. La medida de la actividad enzimática se realizó mediante la evolución de la producción de oxígeno producida en un electrodo de Clark cuando el peróxido de hidrógeno se descompone en O_2 y H_2O debido a la actividad de la enzima, tal y como se detalla en Materiales y Métodos. Actividad CAT del cultivo control a tiempo cero = $23,43 \text{ U CAT} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteínas.

Como se observa en la Figura, durante la incubación de la microalga en carencia de nitrógeno la actividad antioxidante CAT aumenta progresivamente. Esta respuesta, al igual que para las otras actividades enzimáticas medidas, demuestra que la incubación en carencia de nitrógeno de *C. onubensis* desencadena eventos que producen estrés oxidativo, con el consiguiente aumento de la actividad de dichas enzimas que participan en reacciones de defensa antioxidante (Ledford y Niyogi 2005), y ratifica experimentalmente la relación existente entre la carencia de nutrientes y la generación de estrés oxidativo. Estas observaciones son consistentes con el incremento observado en la intensidad de acumulación de carotenoides,

como respuesta al estrés oxidativo producido por la carencia de nutrientes en cultivos de *C. onubensis*.

Como conclusiones de este Capítulo de resultados, a diferencia de la mayoría de las microalgas no extremófilas, los cultivos de *C. onubensis* fueron viables durante semanas al incubarse en carencia de fósforo ó azufre. Las carencias nutricionales no fueron determinantes para la acumulación de carotenoides celulares referida a volumen de cultivo, aunque en los cultivos incubados en carencia de nitrógeno las concentraciones celulares referidas a peso seco de luteína y β -caroteno sí aumentaron durante unos días.

El perfil de ácidos grasos de *C. onubensis* bajo carencias nutricionales fue similar al de otras microalgas no extremófilas, siendo el ácido graso linolénico (C18:3) el más abundante de los identificados e integrados. Además, hay que destacar que *C. onubensis* se puede cultivar en medios altamente ácidos (pH 2,5, e incluso inferior) lo que permite su producción al aire libre y su preservación frente a cualquier tipo de contaminación por otras microalgas. El vínculo entre la carencia de nutrientes y el estrés oxidativo fue por primera vez puesto de manifiesto en una microalga acidófila.

Capítulo 4

**CRECIMIENTO, ACUMULACIÓN
DE LIPIDOS Y RESPUESTA
ANTIOXIDANTE DE *Coccomyxa
onubensis* EN FUNCIÓN DE LA
SALINIDAD**



Universidad
de Huelva

4. CRECIMIENTO, ACUMULACIÓN DE LÍPIDOS Y RESPUESTA ANTIOXIDANTE DE *Coccomyxa onubensis* EN FUNCIÓN DE LA SALINIDAD.

4.1. Crecimiento en función de la salinidad.

La salinidad es un factor de estrés que genera una respuesta celular dependiente de la adaptabilidad del microorganismo a la sal, lo que permite clasificarlo como halófilo o halotolerante (Richmond 1986). Las microalgas difieren en su adaptación a la salinidad según su tolerancia al estrés salino. Especies halófilas, como *Dunaliella*, sirven como ejemplo de microalga capaz de crecer en condiciones extremas de sal y como modelo de comprensión de las estrategias celulares de respuesta a altas concentraciones de sal (Rao et al. 2007, Takagi 2006). Altas concentraciones de sal pueden inducir, además, el aumento de las tasas de producción de biopolímeros y la acumulación de ciertos solutos orgánicos conocidos como osmoprotectores). Estos solutos protegen proteínas y membranas contra daños por las altas concentraciones de iones inorgánicos (Yancey et al. 1982). Algunos osmoprotectores que sofocan la presión osmótica derivada de la presencia de altas concentraciones de sal, también protegen la maquinaria metabólica contra el daño oxidativo a que da lugar el estrés salino. Así, se produce en algunas microalgas acumulación de alcoholes y de aminoácidos, algunos de valor comercial (Rathinasabapathi 2000).

Entre las respuestas de las microalgas al estrés salino se produce la acumulación de lípidos (Subramaniam et al. 2010). De hecho, se ha publicado que especies como *Monodus subterraneus* (Iwamoto y Sato 1986), *Dunaliella* sp. (Borowitzka y Borowitzka 1988), *Nannochloropsis* sp. (Pal et al. 2011) o *Scenedesmus obliquus* (Salama et al. 2013) mejoran su contenido en lípidos como resultado del incremento de salinidad en el medio. En el ámbito de las microalgas acidófilas, sin embargo, la respuesta a sal es desconocida (Fernández-Remolar et al. 2004). Del mismo modo, *Coccomyxa* podría mostrar cierta halotolerancia, ya que en su hábitat crece en un medio rico en sales, como sulfatos y altas concentraciones de cationes metálicos disueltos por el pH ácido del río Tinto, como ya se describió en la Introducción de esta Tesis. Estas condiciones de partida permiten sugerir que *C. onubensis* podría resistir una determinada fuerza iónica mostrando cierta halotolerancia en

comparación con otras especies de agua dulce. En este apartado de la Tesis se ha estudiado el efecto de la adición de varias concentraciones de NaCl al medio de cultivo de *C. onubensis*, como condición para favorecer la acumulación de lípidos, analizándose previamente el efecto de dicha condición sobre su crecimiento.

La experimentación se llevó a cabo tomando alícuotas de cultivos celulares en fase exponencial de crecimiento, incubados en condiciones estándar según se describe en Materiales y Métodos, con concentraciones iniciales de biomasa seca de $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Las células se lavaron previamente con medio fresco K9 siendo seguidamente resuspendidas en medios de cultivos estándar con concentraciones de 20, 50, 100, 200, 500 mM y 1M de NaCl, respectivamente. En total se inocularon siete cultivos, seis de ellos con cada una de las concentraciones de sal antes citadas y el séptimo como cultivo control de *C. onubensis* crecido con medio K9 estándar.

Para facilitar la comprensión al lector, se diferencian en este Capítulo de Tesis dos rangos de concentraciones de sal. Esta diferenciación se ha realizado a partir de los resultados preliminares obtenidos en *C. onubensis* tras su incubación bajo diferentes concentraciones de sal. Se determinó un rango de concentración de sal que permite viabilidad del cultivo (20, 50 y 100 mM de NaCl añadido al medio K9) y un rango de concentración de sal más elevado comprendido entre 200, 500 mM y 1 M de NaCl, que inhibe el crecimiento de *C. onubensis*.

A lo largo de cinco días de experimento, se tomaron muestras de los diferentes cultivos para determinar la evolución de parámetros específicos del crecimiento. Estos parámetros fueron la evolución del peso seco o densidad celular, la evolución del contenido en clorofila celular y la evolución del contenido en carotenoides celulares totales y específicos -luteína y β -caroteno-. Así mismo, se determinaron parámetros para conocer el estado del PSII, la tasa fotosintética y la evolución en el contenido de lípidos totales y de FAMES. En un último apartado también se estudió la actividad de enzimas que desempeñan un papel importante en la defensa del estrés oxidativo que pueda ser provocado por la adición de NaCl al medio de cultivo de *C. onubensis*.

La Figura 4.1 presenta la evolución en el tiempo del peso seco de cultivos de *C. onubensis* incubada bajo distintas concentraciones de NaCl. Como se observa en la Figura, el peso seco del cultivo control fue superior al de los cultivos incubados en rango de concentraciones altas de NaCl, a lo largo de todo el experimento. En particular, tras 48h de experiencia, todos los cultivos incubados bajo condiciones de alta salinidad disminuyeron significativamente la concentración de biomasa respecto al momento inicial. Los cultivos incubados en concentraciones bajas de sal muestran crecimiento estimulado tras 96 h de ensayo, siendo sus concentraciones de biomasa superiores a las de los cultivos control. El cultivo incubado bajo 100 mM de NaCl es el que mejores resultados presenta.

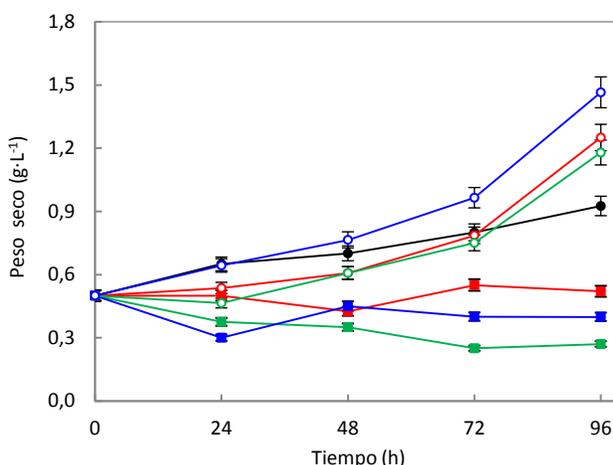


Figura 4.1. Evolución del peso seco de *Coccoomyxa onubensis* incubada bajo distintas concentraciones de NaCl. Los cultivos de *C. onubensis* incubados en condiciones estándar, se centrifugaron, lavaron y resuspendieron en medios con las siguientes concentraciones de sal (NaCl): 20 mM (-○-), 50 mM (-○-), 100 mM (-○-), 200 mM (-■-), 0,5 M (-■-) y 1 M (-■-), respectivamente. Como control se utilizó un cultivo incubado en medio pleno de nutrientes y sin sal añadida (-●-). Los cultivos se incubaron con luz PAR continua de intensidad $140 \mu\text{mol fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 2,5 y con CO_2 a saturación, tal y como se detalla en Materiales y Métodos.

En la Figura 4.2 se presentan los valores medios de las tasas de crecimiento (μ) de *C. onubensis* sometida a las diferentes concentraciones de NaCl, calculadas tras 96h de incubación en estas condiciones. Se comprueba que los valores de μ (d^{-1}) de *C. onubensis* más favorables son los obtenidos en aquellos cultivos incubados con 20, 50 y 100 mM de NaCl, por lo que la

baja salinidad en el medio K9 mejora la tasa de crecimiento de la microalga. A mayores concentraciones, la sal inhibe el crecimiento por completo.

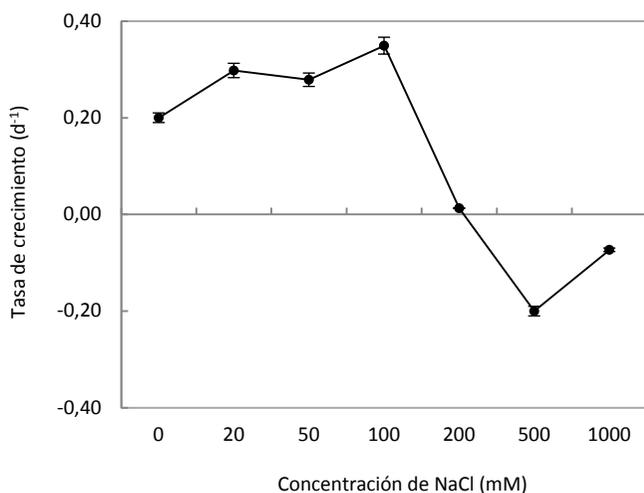


Figura 4.2. Tasas de crecimiento medias de *Coccomyxa onubensis* incubada bajo distintas concentraciones de NaCl. Los cultivos de *C. onubensis* incubados en condiciones estándar, se centrifugaron, lavaron y resuspendieron en medios con las siguientes concentraciones de sal (NaCl): 20 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 0,5 M y 1 M, respectivamente. Como control se utilizó un cultivo incubado en medio pleno de nutrientes y sin sal añadida. Los valores medios de tasas de crecimiento se obtuvieron en el inicio de la fase exponencial de los cultivos baño. Los cultivos se incubaron con luz PAR continua de intensidad $140 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, a 25°C , pH 2,5 y con CO_2 a saturación, tal y como se detalla en Materiales y Métodos.

Las clorofilas permiten obtener información sobre el crecimiento y sobre la capacidad fotosintética de la microalga. Los resultados de la Figura 4.3 muestran la evolución de la concentración de clorofila celular referida a volumen de cultivo y a peso seco de *C. onubensis*, respectivamente.

La Figura 4.3 (superior) presenta la evolución en el tiempo de la concentración de clorofila celular referida a volumen de cultivo de *C. onubensis* incubada bajo las distintas concentraciones de sal. Los datos de la Figura muestran dos tendencias principales a lo largo de la experiencia. El cultivo control aumenta su concentración volumétrica de clorofilas de forma paralela a su crecimiento, llegando a ser hasta un 50% superior a la inicial. La misma tendencia muestran los cultivos incubados en bajas concentraciones de sal. Sin embargo, los tres cultivos incubados bajo salinidades moderadas de 0,2 M, 0,5 M y 1 M de NaCl, respectivamente, mantienen una tendencia de disminución de clorofilas por volumen de cultivo a lo largo de toda la

experiencia. El descenso de clorofilas en tales cultivos es consecuencia directa de la inhibición del crecimiento producida en los mismos (Figura 4.1).

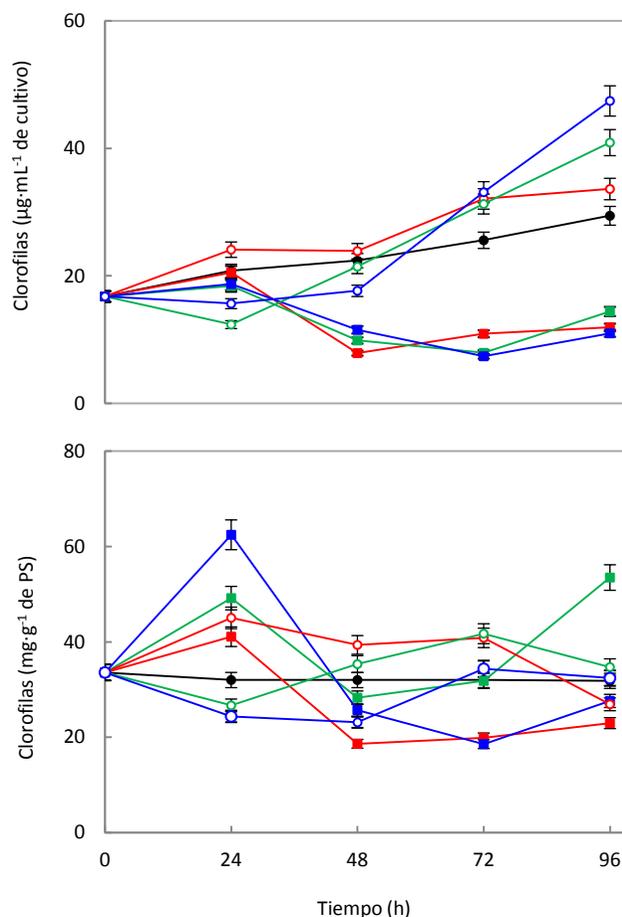


Figura 4.3. Evolución de la concentración de clorofilas de *Coccoomyxa onubensis* incubada bajo distintas concentraciones de NaCl. La gráfica superior representa la concentración de clorofila celular referida a volumen de cultivo y la gráfica inferior representa la concentración de clorofila celular referida a peso seco. Los cultivos de *C. onubensis* incubados en condiciones estándar, se centrifugaron, lavaron y resuspendieron en medios con las siguientes concentraciones de sal (NaCl): 20 mM (-○-), 50 mM (-◐-), 100 mM (-◑-), 200 mM (-■-), 0,5 M (-◒-) y 1 M (-◓-), respectivamente. Como control se utilizó un cultivo incubado en medio pleno de nutrientes y sin sal añadida (-●-). Los cultivos se incubaron con luz PAR continua de intensidad $140 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, a 25 °C, pH 2,5 y con CO₂ a saturación, tal y como se detalla en Materiales y Métodos. PS: peso seco.

Para conocer si la salinidad determina una biosíntesis de clorofilas más activa en los cultivos de baja concentración de NaCl, es necesario representar la evolución en el tiempo del contenido intracelular de las

clorofilas. La Figura 4.3 (inferior) muestra la evolución en el tiempo de la concentración de clorofila celular referida a peso seco de cultivos de *C. onubensis* incubados bajo las distintas concentraciones de NaCl. Estos resultados permiten obtener información sobre la actividad de su biosíntesis. Los datos que representan al cultivo control muestran una concentración de clorofilas por peso seco constante, por otra parte esperable durante los primeros días de cultivo de *Coccomyxa* bajo intensidad de luz limitante. Sorprendentemente, durante las primeras 24h de incubación de *Coccomyxa* bajo las tres concentraciones más altas de sal, la concentración de clorofila celular referida a peso seco aumenta, disminuyendo pasado el primer día de incubación hasta valores inferiores a los del inóculo inicial. Por el contrario, la concentración de clorofila celular referida a peso seco de las células de *C. onubensis* crecidas en baja salinidad (20 mM, 50 mM y 100 mM) muestra una tendencia similar a la del cultivo control, alcanzando valores incluso superiores a esta.

En este sentido, tanto PSI como PSII resultan afectados por la salinidad. La concentración de clorofilas de los complejos colectores de luz puede modificarse según la concentración de sal del medio y, especialmente, de la tolerancia de la especie de microalga a la sal. Por ejemplo, estudios previos en *Spirulina platensis* crecida en 0,8 M NaCl no mostraron modificación de la concentración de clorofila a (Lu y Vonshak 2002). Sin embargo, cultivos de la cianobacteria *Synechocystis* sp. mostraron incremento o descenso de clorofila a según la salinidad comprendida entre 0,3 y 1M (Schurtbert et al. 1993), revelando mayor sensibilidad a las variaciones de salinidad del medio.

Coccomyxa muestra cierta halotolerancia basada en una ligera estimulación del crecimiento, coherente además con una biosíntesis más activa de clorofilas que mantiene altas eficiencias en el uso de la luz en fotosíntesis. La Figura 4.4 muestra la eficiencia del PSII de *C. onubensis* a lo largo de cinco días de incubación en las distintas concentraciones de sal. Los cultivos incubados bajo concentraciones de sal comprendidas entre 20 mM y 0,5 M de NaCl, respectivamente, mantienen a lo largo de la experiencia valores de actividad del PSII similares a los del cultivo control. Por el contrario, el cultivo incubado bajo 1M en el medio de *Coccomyxa*, disminuye su Q_y en las primeras 24 h hasta un 40% al final de la experiencia. Estos

resultados evidencian que la inhibición del crecimiento observada para salinidades superiores a 200 mM, no parece tener su origen en una menor eficiencia de la conversión fotosintética de luz en energía química. Tan sólo para la salinidad más alta (1 M) se observan efectos negativos evidentes en el Q_y .

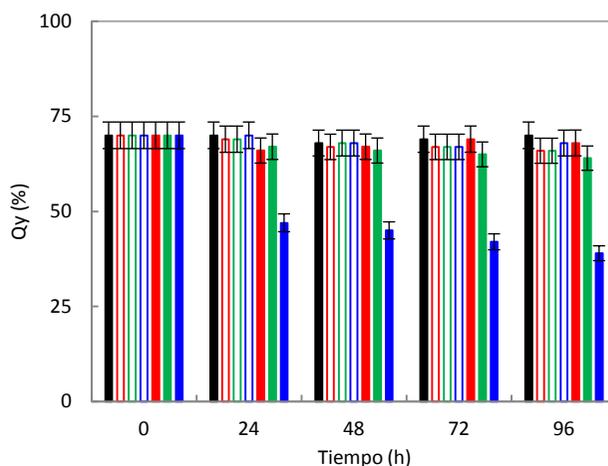


Figura 4.4. Eficiencia del PS II de *Coccomyxa onubensis* incubada bajo distintas concentraciones de NaCl. Cultivos de *C. onubensis* incubados en condiciones estándar, se centrifugaron, lavaron y resuspendieron en medios con las siguientes concentraciones de sal (NaCl): 20 mM (■), 50 mM (■), 100 mM (■), 200 mM (■), 0,5 M (■) y 1 M (■), respectivamente. Como control se utilizó un cultivo incubado en medio pleno de nutrientes y sin sal añadida (■). Los cultivos se incubaron con luz PAR continua de intensidad $140 \mu\text{mol foton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, a 25 °C, pH 2,5 y con CO_2 a saturación, tal y como se detalla en Materiales y Métodos. La medida de la actividad del PSII se realizó con un fluorómetro modelo PAM-210 WALZ, como se detalla en Materiales y Métodos.

Estudios previos demuestran que las proteínas D1 que forman parte del complejo D1/D2 del centro de reacción del PSII, son altamente sensibles a condiciones ambientales no favorables al crecimiento, como las carencias nutricionales, altas temperaturas, alta irradiancia de UV-B y visible o sequía, influyendo en las propiedades de dichas proteínas (Giardi et al. 1997). El estrés salino tiene efectos en la actividad del transporte fotosintético de electrones debido a alteraciones de dichas proteínas (Sudhir et al. 2005). El aumento de la concentración de Na^+ induce la degradación de proteínas asociadas al centro de reacción, como D1, y también produce alteraciones del complejo de la oxidación del agua (Sudhir y Murthy 2004). Sudhir et al. (2005) demostraron recientemente que el NaCl también induce la degradación de clorofilas antena del PSII, alterando así la transferencia de energía al centro de reacción del mismo. En plantas superiores, se han

probado efectos similares de la sal sobre el complejo de la oxidación del agua bajo estrés salino (Murata et al. 1992).

Varios autores sugieren que niveles moderados de sal estimulan en cultivos de microalgas la respiración y la actividad del PSI (Verma y Morhanty 2000, Lu y Vonshak 2002, Sudhir y Murthy 2004). En tales condiciones, algunos autores han descrito incrementos en los carotenoides en detrimento de la clorofila, sugiriendo a un tiempo, por tanto, intensificación de la respuesta antioxidante manteniendo la captura de luz del aparato fotosintético celular con la contribución de carotenoides a dicha función (Schurtbert et al. 1993).

En este estudio, la Figura 4.4 muestra prácticamente la misma eficiencia del PSII (Q_y), en todas las concentraciones de sal, de los cultivos de *C. onubensis* a lo largo de la experiencia, a excepción de aquellos incubados bajo 1 M NaCl. Esto sugiere, a pesar de la evidencia de otros estudios que confirman la alteración de la actividad del PSII por el estrés salino, que *C. onubensis* mantiene intacta la actividad fotoquímica del PSII durante algunos días, lo que facilitaría una cierta tolerancia a la salinidad. Por tanto, en cultivos incubados con salinidad superior a 100 mM de NaCl, si bien la evolución de la concentración intracelular de clorofilas disminuye, las células siguen siendo fotosintéticamente viables hasta concentraciones de 0,5 M de NaCl inclusive. La viabilidad fotosintética de microalgas en medios salinos se ha evidenciado con numerosas especies de microalgas no marinas. *Kirchneriella sp.* (Ferroni et al. 2007) o *Botryococcus braunii* (Rao et al. 2007) mejoran su crecimiento con la aportación de NaCl en sus medios de cultivos y no muestran efectos negativos en la fotosíntesis, aunque a concentraciones de sal menores de las que soporta *C. onubensis*.

La viabilidad de la fotosíntesis resulta relevante para poder explicar algunas posibles respuestas fisiológicas de la microalgas al estrés salino. La retención, por la célula fotosintética, de la capacidad de fijar energía lumínica en forma de poder reductor en situaciones de estrés, sugiere que la fracción de energía química no destinada a sintetizar nuevas estructuras celulares o nueva maquinaria metabólica debe utilizarse en rutas de almacenamiento de carbono y energía, evitando de esta forma los daños oxidativos derivados de la disipación de poder reductor no utilizado (Carrieri

et al. 2010). Esto es coherente con lo publicado por Rao et al. 2007, que demuestra el aumento intracelular de lípidos y carbohidratos en microalgas incubadas con aumento de salinidad y que mantienen la viabilidad de la fotosíntesis.

4.2. Acumulación de lípidos en función de la salinidad.

Diversos estudios muestran que el crecimiento de microalgas en medios con salinidad aumentada incrementa la concentración de lípidos, particularmente en el caso de carotenoides y acilglicéridos. Microalgas marinas, como *Dunaliella*, mejoran su contenido intracelular de lípidos hasta un 70 % del total de su peso seco al ser cultivadas con concentraciones de sal de entre 0,5 y 1 M (Takagi et al. 2006).

La Figura 4.5 (superior) muestra la evolución de la concentración de carotenoides celulares referida a volumen de los cultivos de *C. onubensis* incubados bajo distintas concentraciones de NaCl. La Figura presenta dos tendencias claras. Por un lado, el cultivo control junto con los cultivos de *C. onubensis* incubada en medios con concentraciones de 20, 50 y 100 mM de NaCl, muestran aumento en la concentración de carotenoides por volumen a lo largo de toda la experimentación. Por el contrario, los cultivos incubados en medios con las concentraciones de sal más elevadas (0,2, 0,5 y 1 M de NaCl), no muestran aumento en carotenoides, disminuyendo éstos datos al final de la experimentación.

La evolución en el tiempo de la concentración de carotenoides celulares referida a peso seco de los cultivos de *C. onubensis* incubados en medios salinos (Figura 4.5, inferior), revela que tan sólo el cultivo incubado bajo 0,5 M de NaCl presenta mayor biosíntesis de carotenoides, superior a los datos del cultivo control. Los demás cultivos mantienen concentraciones de carotenoides celulares referidas a peso seco constantes y parecidas entre ellas a lo largo del tiempo. Por tanto, la acumulación por volumen de cultivo está asociada al crecimiento y no parece inducida por la salinidad.

Siendo sobradamente conocido que numerosas especies de microalgas intensifican la acumulación de carotenoides para protegerse

contra la oxidación producida en condiciones de estrés, como la alta concentración de sales (Gouveia et al. 1996), la acumulación de carotenoides no parece ser en *C. onubensis* una de las respuestas principales de la microalga al estrés salino.

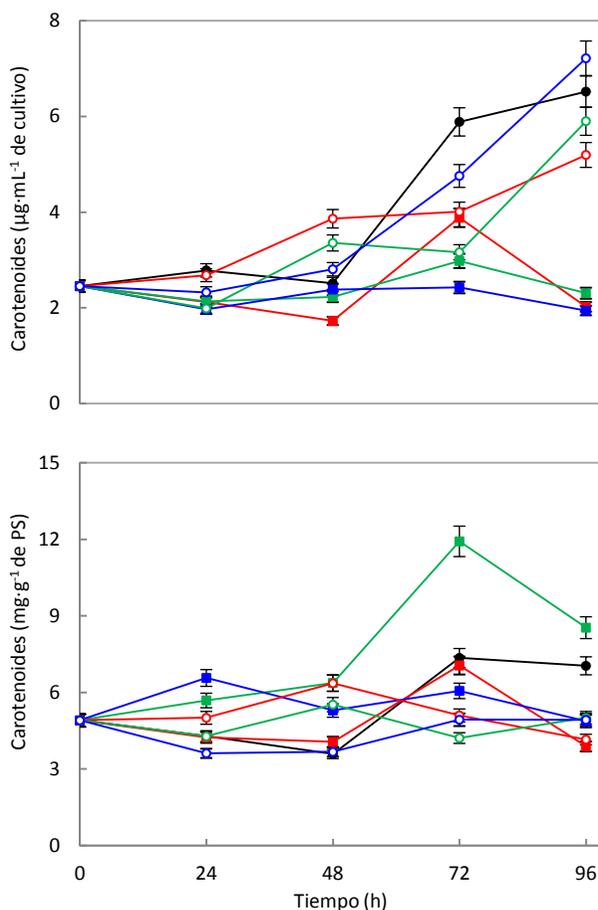


Figura 4.5. Evolución de la concentración de carotenoides totales de *Coccomyxa onubensis* incubada bajo distintas concentraciones de NaCl. La gráfica superior representa la concentración de carotenoides celulares referida a volumen de cultivo y la gráfica inferior representa la concentración de carotenoides celulares referida a peso seco. Cultivos de *C. onubensis* incubados en condiciones estándar, se centrifugaron, lavaron y resuspendieron en medios con las siguientes concentraciones de sal (NaCl): 20 mM (\circ), 50 mM (\ominus), 100 mM (\square), 200 mM (\blacksquare), 0,5 M (\blacksquare) y 1 M (\blacksquare), respectivamente. Como control se utilizó un cultivo incubado en medio pleno de nutrientes y sin sal añadida (\bullet). Los cultivos se incubaron con luz PAR continua de intensidad $140 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, a 25°C , pH 2,5 y con CO_2 a saturación, tal y como se detalla en Materiales y Métodos. PS: peso seco.

La evolución en el tiempo de los carotenoides mayoritarios en cada uno de los cultivos bajo estrés salino se muestra en las siguientes Figuras,

que representan las concentraciones intracelulares de luteína y β -caroteno, pigmentos antioxidantes (Campenni et al. 2013).

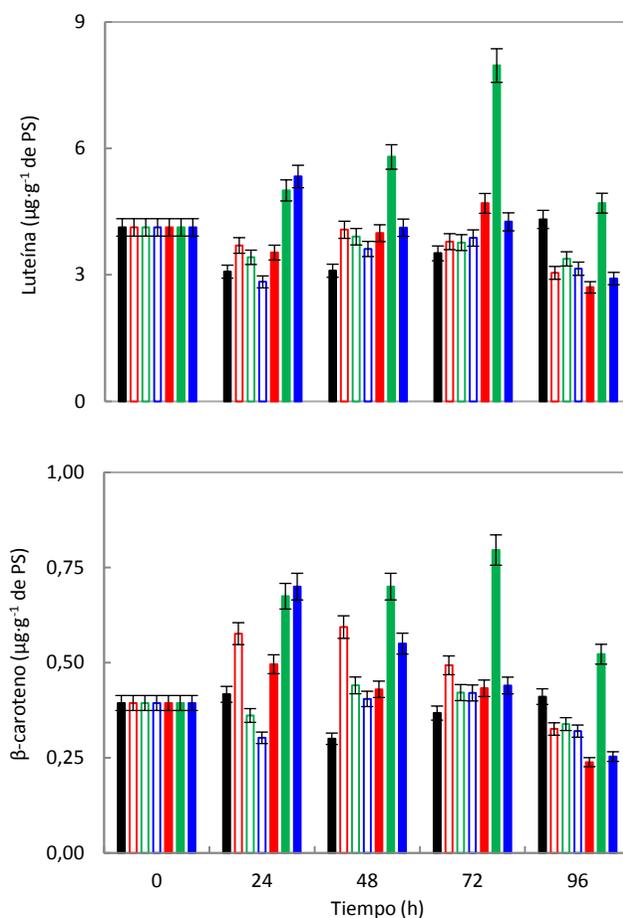


Figura 4.6. Evolución de la concentración de luteína y β -caroteno de *Coccomyxa onubensis* incubada bajo distintas concentraciones de NaCl. La gráfica superior representa la concentración intracelular de luteína y la gráfica inferior representa la concentración intracelular de β -caroteno. Los cultivos de *C. onubensis* incubados en condiciones estándar, se centrifugaron, lavaron y resuspendieron en medios con las siguientes concentraciones de sal (NaCl): 20 mM (\square), 50 mM (\square), 100 mM (\square), 200 mM (\blacksquare), 0,5 M (\blacksquare) y 1 M (\blacksquare), respectivamente. Como control se utilizó un cultivo incubado en medio pleno de nutrientes y sin sal añadida (\blacksquare). Los cultivos se incubaron con luz PAR continua de intensidad $140 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 2,5 y con CO_2 a saturación, tal y como se detalla en Materiales y Métodos. La separación y cuantificación de luteína y β -caroteno se realizó por HPLC, según se describe en Materiales y Métodos. PS: peso seco.

La Figura 4.6 (superior) muestra la evolución de la concentración intracelular de luteína en los cultivos de *Coccomyxa* en medios con las diferentes concentraciones de NaCl. El cultivo incubado en 0,5 M de NaCl

acumula, con diferencia, la mayor concentración intracelular de luteína, alcanzando el máximo tras 72 h de incubación. El cultivo con 1 M de NaCl responde con un aumento en luteína tras las primeras 24 h de exposición, disminuyendo después a lo largo de la experiencia, en su caso probablemente debido a la degradación del mismo. Los cultivos con concentraciones de sal inferiores a 200 mM incrementaron ligeramente el contenido en luteína respecto al control durante los primeros días, decreciendo posteriormente.

La Figura 4.6 (inferior) representa la evolución de la concentración intracelular de β -caroteno en *C. onubensis* a lo largo de las primeras 96 h de incubación en distintas concentraciones de NaCl. En este caso, de nuevo el cultivo incubado en 0,5 M de NaCl alcanza mayor concentración comparada con el cultivo control, a lo largo de toda la experimentación, mostrando un máximo tras 72 h de experiencia. Los cultivos incubados entre 20 y 200 mM de NaCl presentan mayores concentraciones intracelulares de β -caroteno que el cultivo control durante las primeras 72 h de experimentación, disminuyendo con posterioridad.

A modo de conclusión, la salinidad favoreció inicialmente la acumulación de luteína y β -caroteno, especialmente en los cultivos de mayor salinidad, si bien dicha acumulación cesó tras los primeros días, descenso ligado a la pérdida de viabilidad en los cultivos.

Se analizó también el contenido en lípidos totales y, particularmente, el de FAMES, de interés para la obtención de biocombustible de algas.

La Figura 4.7 muestra la evolución del contenido de lípidos totales respecto al peso de biomasa seca de *C. onubensis* incubada en medios con las diferentes concentraciones de NaCl antes citadas. Como se observa en la Figura, los cultivos incubados en concentraciones más bajas de NaCl, 20, 50, 100 y 200 mM, incrementan el contenido intracelular de lípidos durante la experiencia, respecto a los valores del cultivo control. El cultivo incubado con 0,5 M de NaCl aumenta su porcentaje de lípidos totales por peso seco de forma creciente desde el principio de la experimentación, alcanzado más del doble de la concentración de lípidos que contenía al inicio de la experiencia. Los cultivos incubados con 1 M de NaCl aumentan su concentración al inicio

de la experiencia, disminuyendo al final por debajo de los valores de los cultivos control, posiblemente como consecuencia de la falta de viabilidad de aquellos y su consiguiente degradación.

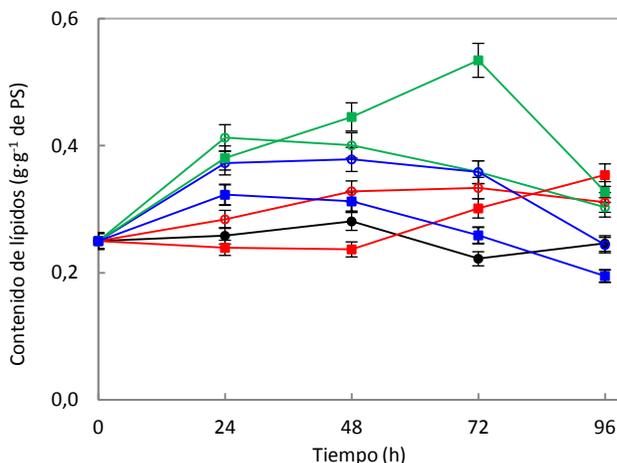


Figura 4.7. Contenido de lípidos totales de *Coccomyxa onubensis* incubada bajo distintas concentraciones de NaCl. Los cultivos de *C. onubensis* incubados en condiciones estándar, se centrifugaron, lavaron y resuspendieron en medios con las siguientes concentraciones de sal (NaCl): 20 mM (-○-), 50 mM (-○-), 100 mM (-○-), 200 mM (-■-), 0,5 M (-■-) y 1 M (-■-), respectivamente. Como control se utilizó un cultivo incubado en medio pleno de nutrientes y sin sal añadida (-●-). Los cultivos se incubaron con luz PAR continua de intensidad $140 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, a 25°C , pH 2,5 y con CO_2 a saturación, tal y como se detalla en Materiales y Métodos. Los datos son calculados en gramos de lípidos totales respecto a los gramos de peso seco. La extracción de los lípidos totales se realizó como se detalla en Materiales y Métodos. PS: peso seco.

De forma global, las concentraciones de NaCl usadas generan en los cultivos de *C. onubensis* una respuesta similar en la evolución de la concentración de carotenoides y del contenido de lípidos respecto a peso seco. Es el cultivo incubado bajo 0,5M de NaCl el que muestra mayor cambio en la concentración de lípidos.

La rentabilidad de la producción de lípidos de valor a partir de cultivos de microalgas, dependerá de que se obtenga el mejor resultado posible del producto de dos factores, la productividad de la biomasa y el contenido en lípidos, preferiblemente en cultivos que mantienen la viabilidad de la fotosíntesis. La Figura 4.8 representa el máximo contenido intracelular de lípidos alcanzado para cada concentración de sal junto con la productividad de los correspondientes cultivos.

La Figura 4.8 sugiere que la producción eficiente de lípidos en *C. onubensis* se alcanzaría a una concentración de sal para la cual el producto de los factores “contenido intracelular de lípidos” y “productividad de biomasa” fuese máximo. Atendiendo a los resultados de la Figura 4.8, se demuestra que salinidades entre 50 y 100 mM (aproximadamente entre 5 y 10 veces inferiores a la salinidad marina) permitirían alcanzar las mayores productividades de lípidos totales, en cultivos viables. Con concentraciones más elevadas de sal, como 0,5 M, aproximadamente la salinidad marina, el contenido intracelular de lípidos totales es superior pero la influencia de la sal es negativa en el crecimiento celular (ver Figura 4.1). Por tanto, la síntesis de lípidos y el crecimiento celular se ven favorecidos en *C. onubensis* con concentraciones moderadas de sal.

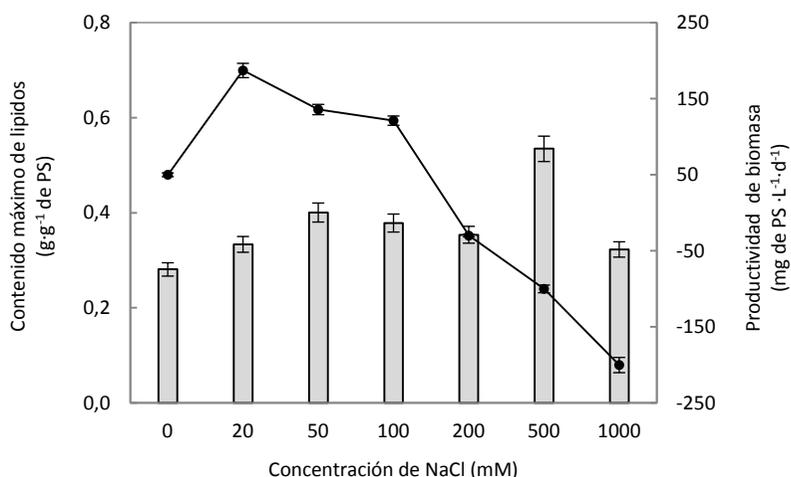


Figura 4.8. Máximo contenido intracelular de lípidos y productividad de biomasa correspondiente, de cultivos de *Coccomyxa onubensis* incubada bajo distintas concentraciones de NaCl. Cultivos de *C. onubensis* incubados en condiciones estándar, se centrifugaron, lavaron y resuspendieron en medios con las siguientes concentraciones de sal (NaCl): 20 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 0,5 M y 1 M, respectivamente. Como control se utilizó un cultivo incubado en medio pleno de nutrientes y sin sal añadida. Los valores máximos del contenido intracelular de lípidos totales (barra gris) y los valores de productividad de biomasa (-●-) se corresponden con días diferentes a lo largo de la experiencia. Los cultivos se incubaron con luz PAR continua de intensidad $140 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, a 25 °C, pH 2,5 y con CO₂ a saturación, tal y como se detalla en Materiales y Métodos. PS: peso seco.

Generalmente, el aumento moderado de la salinidad en los medios de cultivo, tanto de microalgas cuyo hábitat es el agua de mar como de microalgas denominadas de “agua fresca”, tiende a incrementar el contenido en lípidos totales en diversa extensión, dependiendo de géneros, especies y

de la salinidad aplicada, y no suele producir efectos positivos sobre el crecimiento de las microalgas (Ruangsomboon 2012, Santos et al. 2012, Campenni et al. 2013). Por aumento moderado de la salinidad se entendería el incremento de la fuerza iónica hasta valores siempre inferiores a los del agua de mar. El equilibrio osmótico de la célula requeriría de una cierta fuerza iónica en el medio, lo que justificaría crecimientos algo más rápidos en cultivos con salinidad superior a 0 psu (Ruangsomboon 2012). El hecho observado en *C. onubensis*, peculiar en relación a microalgas de ambiente no marino, de que limitar la fuerza iónica a la del propio medio de cultivo ralentice el crecimiento de la microalga, encuentra justificación en el hecho de la adaptación de la microalga al enorme gradiente de protones entre el interior y el exterior de la pared celular (Gross 2000). La alta concentración externa de protones permite esperar cierta halotolerancia de las microalgas de ambiente ácido. Aunque son muy escasos los estudios al respecto, algunos autores han publicado que, en efecto, las microalgas acidófilas o ácidotolerantes muestran una significativa halotolerancia o, del mismo modo, muestran crecimiento ralentizado al disminuir al mínimo posible la fuerza iónica del medio de cultivo (Musacchio et al. 1978, Albertano et al. 1990). Este hecho da a *Coccomyxa onubensis* una cierta ventaja competitiva para procesos de producción masiva de biomasa enriquecida en lípidos, al poder plantearse la posibilidad de utilizar en la preparación de medios de cultivo agua de mar diluida hasta salinidades apropiadas.

El efecto que produce la salinidad en la síntesis de ácidos grasos también ha sido estudiado en este Capítulo de Tesis. La sal produce cambios cuantitativos en el perfil de ácidos grasos, dependiendo de especies y de su adaptabilidad a la sal. Así, Rao et al. (2007) publican que un aumento de la concentración de sal del medio causó una disminución de la proporción de ácido esteárico y linoléico, y un aumento en ácido palmítico y oleico en la microalga *Botryococcus braunii*. Sin embargo, el ácido oleico se reduce en otra estirpe de dicho género, en *Botryococcus braunii* Kütz IPPAS H-252, después de ser cultivada en un medio altamente salino (hasta 700 mM).

Estas variaciones en la sensibilidad a la sal de microorganismos taxonómicamente tan cercanos hacen que no sea posible inferir, de manera más genérica, un efecto estimulador en la biosíntesis de ácidos grasos producido por la sal.

Dado el interés de la obtención de ácidos grasos en esta Tesis, se determinó qué fracción de los lípidos totales acumulados correspondía a dichas moléculas, en extractos obtenidos de *C. onubensis* incubada bajo las diferentes concentraciones de NaCl. Los resultados se muestran en la Figura 4.9 en forma de FAMES. El contenido de FAMES de cada cultivo se calculó como el sumatorio de las concentraciones de ácidos grasos mayoritarios respecto al correspondiente peso seco de la muestra de biomasa de la que estos procedían. Los ácidos grasos fueron identificados y cuantificados con una curva de patrones externos, a través de cromatografía de gases, como ya se ha descrito en Materiales y Métodos.

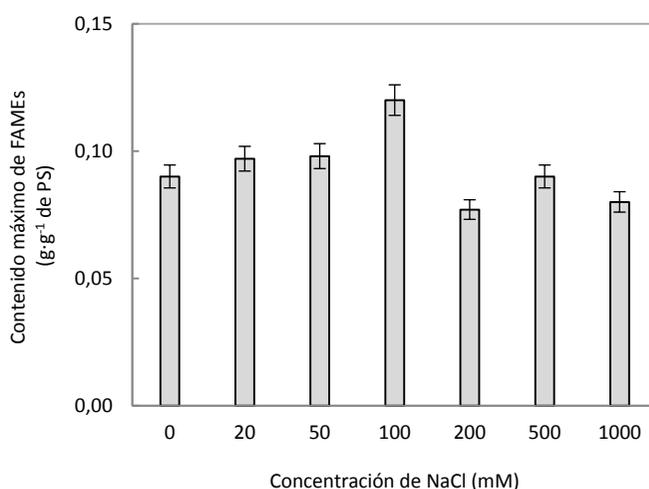


Figura 4.9. Máximo contenido intracelular de FAMES de *Coccomyxa onubensis* incubada bajo distintas concentraciones de NaCl. Cultivos de *C. onubensis* incubados en condiciones estándar, se centrifugaron, lavaron y resuspendieron en medios con las siguientes concentraciones de sal (NaCl): 20 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 0,5 M y 1 M, respectivamente. Como control se utilizó un cultivo incubado en medio pleno de nutrientes y sin sal añadida. Los cultivos se incubaron con luz PAR continua de intensidad $140 \mu\text{mol foton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, a 25°C , pH 2,5 y con CO_2 a saturación. Los datos se calcularon en gramos de ácidos grasos esterificados respecto a los gramos de peso seco de biomasa. La reacción de transesterificación, y la identificación y cuantificación de ácidos grasos se realizaron tal y como se detalla en Materiales y Métodos. PS: peso seco.

Se observa que las máximas concentraciones de FAMES se obtuvieron a partir de extractos de lípidos de los cultivos crecidos con concentraciones de sal de hasta 100 mM y en las primeras 48h de incubación en medios salinos, en coherencia con los datos de lípidos totales en Figura 4.7, disminuyendo al final de la experiencia. Las concentraciones de sal

superiores a 200 mM afectan de forma negativa al contenido intracelular de ácidos grasos, respecto a los valores de los cultivos control sin sal.

Ya se mencionó que las principales funciones de los ácidos grasos y lípidos polares en microalgas, al igual que en plantas, son estructural y energética, formando parte de la composición de membranas celulares y de almacenamiento como fuente de energía y carbono, respectivamente. Como se ha mencionado, estudios previos justifican que la incubación de microalgas bajo diferentes condiciones abióticas, entre ellas la salinidad, no sólo estimulan la producción de lípidos sino que modifican también el perfil de ácidos grasos (Lv et al. 2010, Lin y Lin 2011). Los ácidos grasos proporcionan el esqueleto carbonado principal de dichas membranas celulares por lo que una modificación en el perfil de estos puede dar lugar a cambios en la funcionalidad de la célula.

La Figura 4.10 muestra cómo afecta la salinidad del medio de *C. onubensis* al contenido máximo ácidos grasos presentes en los extractos de aceites de los cultivos incubados bajo las distintas concentraciones de NaCl. Los ácidos grasos mayoritarios obtenidos de cultivos bajo salinidad y de los cultivos control de *C. onubensis* son el ácido palmítico (C16:0) y el ácido linoleico (C18:2), con mayor producción en cultivos incubados con 100 mM de NaCl.

Ya se detalló en la Introducción de esta Tesis que si bien no existe información cuantitativa suficiente que permita proponer un perfil de ácidos grasos de aceites de microalgas claramente más adecuado para la obtención de biodiesel (Song et al. 2013), es preferible larga longitud de cadena y bajo grado de insaturación de los ácidos grasos para que el biodiesel tenga un buen comportamiento a baja temperatura y una buena estabilidad oxidativa (Refaat 2009, Francisco et al. 2010, Hoekman et al. 2012). Los ácidos grasos mayoritarios en microalgas presentan por lo general longitudes de cadena inferiores a 20 átomos de carbono (Song et al. 2013). La microalga *C. onubensis* presenta dicho perfil, y en todo caso el incremento de salinidad en el medio produce un ligero descenso del grado de insaturación de los ácidos grasos determinados como FAMES, por tanto un aumento de la relación de los ácidos grasos saturados y monoinsaturados respecto a los poliinsaturados. En todo caso, los cambios cuantitativos producidos no

justificarían, por sí solos, la incubación en medio con salinidad aumentada como estrategia para mejorar significativamente la calidad de los aceites obtenidos, de cara a su posterior utilización en la obtención de biodiesel. Las concentraciones bajas de sal dan lugar a células más ricas en linoléico (C18:2) y linolénico (C18:3), PUFAs esenciales en alimentación humana.

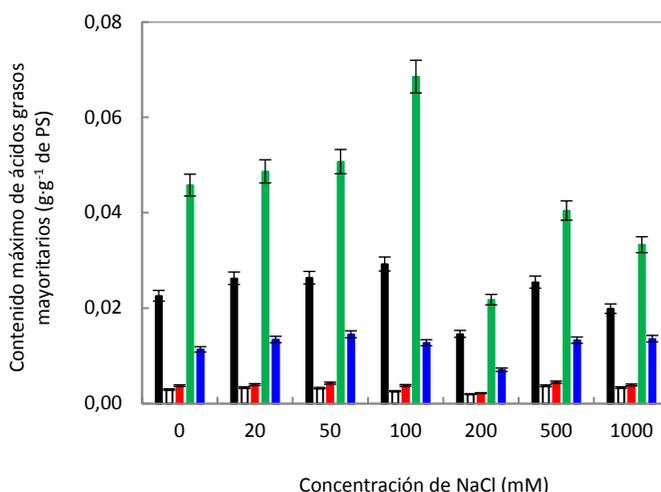


Figura 4.10. Contenido máximo de FAMES de *Coccomyxa oubensis* incubada bajo distintas concentraciones de NaCl. Los datos fueron calculados como valores máximos de ácidos grasos metilados a partir de extractos de lípidos obtenidos por Soxhlet. Los ácidos grasos representados son los mayoritarios identificados e integrados del perfil de *Coccomyxa oubensis*, incubada con varias concentraciones de NaCl en el medio de cultivo. Los ácidos grasos representados fueron: C16:0 o ácido palmítico (barra negra), C16:1 o palmitoleico (barra blanca), C18:1 o ácido oleico (barra roja), C18:2 o ácido linoléico (barra verde) y C18:3 o ácido linolénico (barra azul). PS: peso seco.

4.3. Respuesta enzimática antioxidante.

El siguiente bloque de estudio analiza la actividad de enzimas que participan en la detoxificación de ROS: la glutatión reductasa (GR), la ascorbato peroxidasa (APX) y la catalasa (CAT). Un aumento de la actividad de estas enzimas indicarían que el estrés salino provocado por la presencia de NaCl en el medio de cultivo de *C. oubensis* es, al menos parcialmente, de naturaleza oxidativa.

Se ha publicado que la salinidad produce estrés por la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 y $\bullet OH$ que interfieren con las proteínas, lípidos y ADN, y producen daños en las membranas celulares (Shalata y Neumann 2001, Mittler 2002, Parida y Das 2005, Jithesh et al. 2006). Como se detalló en el Capítulo 3 de esta Tesis, la producción y eliminación de ROS es controlada principalmente por mecanismos enzimáticos que secuestran radicales libres, incluyendo la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT) y ascorbato peroxidasa (APX) (Mittler 2002), de ahí que en este Capítulo de Tesis se incluyan determinaciones de tres enzimas que participan en la respuesta antioxidante. Tales actividades permiten evaluar el estado oxidativo de la microalga, información relevante en cultivos masivos semicontinuos o continuos, y establecer relaciones entre la posible acumulación de carotenoides y el estrés oxidativo.

Ya se explicó en esta Tesis que el ciclo de glutatión-ascorbato es el más importante protector de los sistemas antioxidantes para eliminar H_2O_2 generada en el citosol, mitocondria y cloroplasto (Miller et al. 2010). La Figura 4.11 (izquierda) muestra la variación de la actividad de la enzima glutatión reductasa (GR) presente en los extractos enzimáticos de *C. onubensis* incubada bajo tres concentraciones de sal (20, 50 y 1000 mM NaCl), calculada como variación respecto a la actividad de los extractos de los cultivos control. En general, el aumento de la actividad GR es progresivo a lo largo del tiempo de incubación en medio salino, lo que sugiere un aumento de ROS en la célula (Miller et al. 2010) por estrés salino, consistente con la menor actividad celular observada en los experimentos de crecimiento en cultivos con las mayores concentraciones de sal (Figura 4.2).

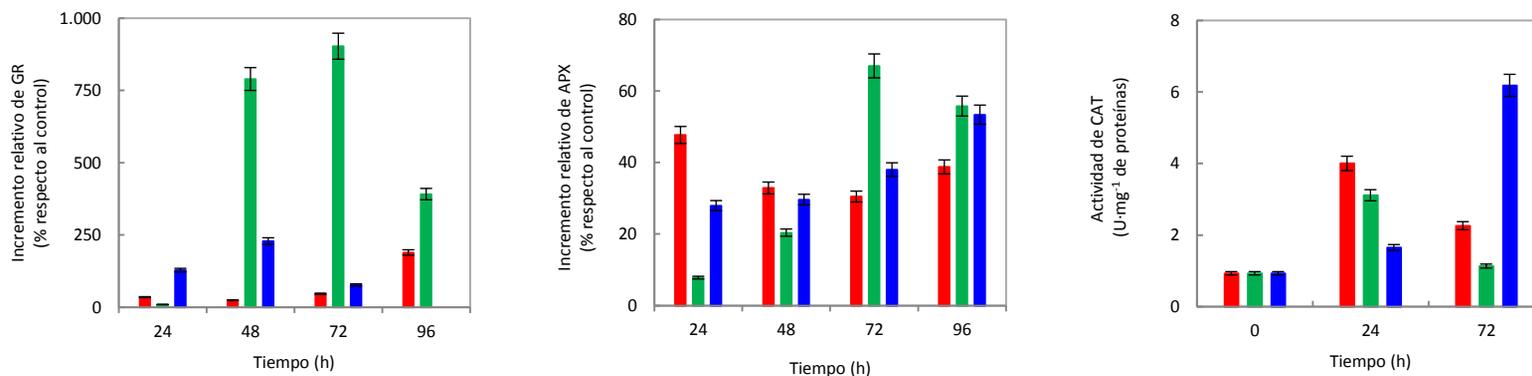


Figura 4.11. Incremento relativo de la actividad glutatión reductasa (GR) y ascorbato peroxidasa (APX) y actividad enzimática catalasa (CAT) de *Coccomyxa onubensis* incubada bajo distintas concentraciones de NaCl. La gráfica izquierda representa el porcentaje de aumento de la actividad enzimática GR y la grafica centro representa el porcentaje de aumento de la actividad enzimática APX, en ambos casos respecto a los cultivos controles de *C. onubensis* incubados sin NaCl añadida. La gráfica derecha representa la actividad enzimática CAT de los extractos crudos *C. onubensis*, en todos los casos la medida de las actividades enzimáticas se realizó en extractos crudos obtenidos de cultivos con concentraciones de sal de 0,2 M (barra roja), 0,5 M (barra verde) ó 1 M (barra azul), tal y como se detalla en Materiales y Métodos. Actividad GR del cultivo control a tiempo cero = 0,83 U mg⁻¹ proteínas. Actividad APX del cultivo control a tiempo cero = 2,17 U mg⁻¹ proteínas. Actividad CAT del cultivo control a tiempo cero = 0,93 U mg proteínas⁻¹.

La Figura 4.11 (centro), presenta de la misma manera, la variación de la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa (APX) en extractos crudos de *Coccomyxa* incubada bajo distintas concentraciones de sal, calculada respecto a los valores determinados en los cultivos control. En los tres casos de incubación de la microalga con sal se produce un aumento de la actividad de la enzima antioxidante respecto a los valores de los cultivos control. Este resultado indicaría, de nuevo, un aumento de ROS en el metabolismo de *C. onubensis*, generado por la presencia de sal en el medio de cultivo. Por tanto, la presencia de sal en determinadas concentraciones incrementa el estado oxidativo de la microalga.

Finalmente, la Figura 4.11 (derecha) muestra la actividad de la enzima catalasa de los extractos de *C. onubensis*, tras 24 h y 72 h de exposición a las salinidades ensayadas. Esta actividad no presenta cambios significativos respecto a la actividad de CAT determinada en los extractos crudos de los cultivos control. La atenuación de la presencia de ROS en células de *C. onubensis* parece estar catalizada, en mayor medida, por GR y APX (Figura 4.11 izquierda y centro) que por CAT.

La capacidad antioxidante de extractos de microalgas es un parámetro de referencia para conocer su estabilidad oxidativa en el uso alimentario o químico. La capacidad antioxidante se mide habitualmente al hacer reaccionar con DPPH –generador de radicales libres– los compuestos o extractos ensayados (Cerón et al. 2007). Los valores así obtenidos indican la presencia de compuestos de naturaleza antioxidante, entre los que pueden incluirse pigmentos, compuestos fenólicos y ácidos grasos. Sin embargo, éstos no son útiles para inferir si la respuesta antioxidante de la microalga se corresponde con una situación fisiológica de alta actividad antioxidante o, por el contrario, aquella deriva sobre todo de una acumulación de moléculas antioxidantes en células con baja viabilidad por las condiciones de cultivo. Las actividades enzimáticas del sistema antioxidante proporcionan dicha información y permiten, en consecuencia, poder actuar sobre el cultivo en procesos de producción continua de microalgas en los que puedan estar produciéndose condiciones de estrés negativas para la viabilidad del cultivo. La intervención sobre el cultivo puede consistir en mantener condiciones destinadas a sostener la respuesta antioxidante, que incluye acumulación de

compuestos de valor comercial, o en relajar la presión del estrés para mantener la productividad de biomasa.

Apenas existen en la bibliografía trabajos que relacionen condiciones de estrés con el estrés oxidativo que, en tantas ocasiones, se esgrime como razón para la acumulación de carotenoides y/o ácidos grasos en cultivos de microalgas (Garbayo et al. 2008). Uno de estos escasos trabajos publicados en los últimos años y que mejor identifica la relación entre acumulación de antioxidantes y capacidad antioxidante, relaciona la limitación en nitrógeno inorgánico con un incremento en las fracciones de xantofilas y de ácidos grasos en la microalga *Haematococcus* (Cerón et al. 2007), si bien se limita a la determinación de la capacidad antioxidante de diferentes fracciones obtenidas a partir de extractos de la microalga. La determinación de las actividades GR, APX y CAT en *C. onubensis* muestra su utilidad para revelar el aumento de estrés oxidativo celular y determinar acciones sobre los cultivos.

A modo de conclusión, por lo demostrado en este Capítulo del trabajo de Tesis, las salinidades moderadas, inferiores a 0,5 M, inducirían una respuesta antioxidante principalmente dependiente de las enzimas que utilizan glutatión y ascorbato reducidos, una respuesta que está acompañada de un biosíntesis más activa de carotenos y ácidos grasos y que permite, de este modo, relacionar una cierta halotolerancia de la microalga acidófila con un aumento de la respuesta antioxidante de la microalga, basado en un incremento de la batería de moléculas y actividades destinadas al efecto.

Capítulo 5

**AISLAMIENTO, SELECCIÓN Y
CARACTERIZACIÓN DEL
CRECIMIENTO Y LÍPIDOS DE
MICROALGAS DE LA REFINERÍA
LA RÁBIDA DE CEPESA**



Universidad
de Huelva

5. AISLAMIENTO, SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO Y LÍPIDOS DE MICROALGAS DE LA REFINERÍA LA RÁBIDA DE CEPSA.

En este y el próximo capítulo de la Tesis se recogen algunos de los principales resultados obtenidos en el proyecto ALGINCO2 de CEPSA, en el que han participado también la Universidad de Huelva, la Universidad de Cádiz y la empresa BioOils. El propósito de este trabajo fue aislar microalgas de distintas zonas de la Refinería, capaces de crecer de forma robusta en aguas residuales para después incubarlas bajo condiciones que estimularan la síntesis de lípidos (Subramaniam et al. 2010, Solovchenko 2012). A partir de los resultados obtenidos en productividades de biomasa y contenido de lípidos, se seleccionaron las mejores para futura experimentación relacionada con el escalado.

5.1. Establecimiento de puntos de muestreo.

Diversas visitas a la Planta de CEPSA-La Rábida permitieron establecer los puntos de muestreo en el interior y exterior de las instalaciones de la Refinería. Se determinó la conveniencia de tomar muestras de depósitos, canales y estanques que contuviesen una matriz acuosa, de agua dulce (preferentemente) o marina. Se expresó, igualmente, la preferencia por realizar la toma de muestra en aquellas de dichas localizaciones que estuviesen habitualmente expuestas a la luz solar, independientemente de que tuviesen mayor o menor carga de sustancias orgánicas.

Por tanto, para comenzar, se priorizó en el criterio de búsqueda la localización de microorganismos fotoautótrofos, fotoheterótrofos y mixótrofos (Liang et al. 2009), es decir: que utilizasen la luz como fuente primaria de energía para la fijación de dióxido de carbono (primer caso), o de compuestos orgánicos (segundo caso), o que obtuviesen la energía tanto de la luz como de compuestos orgánicos carbonados (tercer caso). En el

laboratorio se comenzaría específicamente la búsqueda de microorganismos fotoautótrofos.

La intención de buscar microalgas en aguas de la Refinería reside en la idea de que tal matriz, que necesariamente se utiliza a diario en las operaciones de planta, podría ser reciclada, en su momento, para servir de base al cultivo y obtención de biomasa de microalgas ya adaptadas a crecer en las condiciones físicas y químicas que tales aguas reúnen.

En función de tales consideraciones, se establecieron una serie de puntos de muestreo, que se relacionan seguidamente junto a alguna característica específica de cada ubicación y una fotografía (Figura 5.1):

1. Planta de tratamiento de residuos líquidos de Refinería. En la Figura 5.1 se identifica con el número 1. A grosso modo, se compone de:

- a. Una balsa de recepción y almacenamiento de aguas usadas de la Refinería.
- b. Una balsa de tratamiento anaerobio y una balsa de tratamiento aerobio, para la correspondiente degradación de materia orgánica.
- c. Un decantador circular, que recoge fangos y deriva el agua descontaminada a un segundo tanque de decantación, donde permanece unas 24h antes de su evacuación al exterior. Además, la planta de tratamiento posee una balsa de recepción de agua dulce de lluvia y de limpieza de planta, agua cruda de embalse.



Figura 5.1. Planta de tratamiento de efluentes acuosos de Refinería La Rábida de CEPSA. Fuente: *Google maps*.

2. Canal de desagüe. El agua depurada del segundo tanque de decantación vierte a un arroyo procedente de la laguna primera de Palos. En la Figura 5.1 aparece con el número 2.

3. Laguna primera de Palos. Se muestra en la Figura 5.2. Situada a la derecha de la vía de servicio que separa la Refinería de la planta de Bio-Oils S.L., transcurre perpendicular a la carretera Huelva-Mazagón, y en sentido Norte. Entorno natural de la planta de refino, a cuyo sostenimiento contribuye la propia Refinería. La laguna es de agua dulce, cuyos aportes dependen de la situación del nivel freático y, por tanto, de la pluviosidad.

Tras analizar la información facilitada por Refinería Cepsa-La Rábida, se tomó la decisión de realizar la primera toma de muestras de las localizaciones 1 y 2, donde teóricamente se podrían encontrar microalgas con mayor capacidad de adaptación al uso de sustancias orgánicas.



Figura 5.2. Fotografía de la Laguna Primera de Palos. Fuente: *Google maps*.

La capacidad de ciertos organismos fotosintéticos de crecer de forma heterótrofa es otra de las ventajas que pueden proporcionar las especies asiladas de las aguas tratadas de Refinería. El crecimiento heterótrofo supera las principales limitaciones de la producción a gran escala de microalgas, la dependencia de la luz y el uso de carbono inorgánico.

El cultivo fotoautotrófico complica el proceso de cultivo, aumentando los costes e, incluso y dependiendo de condiciones de cultivo, reduciendo la producción de compuestos potencialmente útiles como biocombustibles. Por el contrario, los cultivos heterótrofos permiten el uso de subproductos carbonados como glicerol, procedente de la transesterificación de acilglicéridos. Cultivar heterótroficamente requiere, en principio, de instalaciones menos complejas y de menor mantenimiento que los cultivos autótrofos a gran escala (Perez-García et al. 2011).

5.2. Aislamiento de microalgas.

Las muestras obtenidas se utilizaron para aislar microalgas, según el procedimiento indicado en Materiales y Métodos de esta Tesis. La primera semana de crecimiento en medio líquido, en aire, de las microalgas seleccionadas desde los teóricos monocultivos en placa, permitió observar ya diferencias en la velocidad de crecimiento entre unas y otras posibles microalgas. La Figura 5.3 muestra, a simple vista, diferencias entre distintos cultivos de esta primera tanda de crecimiento de microalgas en medio líquido.

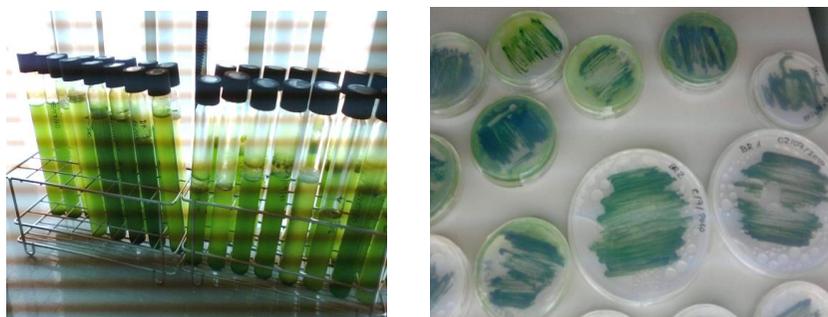


Figura 5.3. Recrecimiento en placas de Petri de colonias obtenidas de las primeras siembras (derecha) y cultivo en medio líquido (izquierda), de posibles microalgas seleccionadas tras la fase de aislamiento en medio sólido. El criterio de selección de colonias para proceder a las sucesivas siembras fue visual, en función de la velocidad de aparición y la apariencia de monocultivo de cada colonia. Las microalgas fueron cultivadas en medio sin fuente de carbono orgánico y con aire como única fuente de carbono inorgánico.

En base a los crecimientos de este experimento preliminar, se descartaron algunos de los cultivos, continuando la experimentación con el resto de ellos hacia la siguiente fase: el establecimiento de las curvas de crecimiento de microalgas seleccionadas, con un total de 17 (teóricos) monocultivos de posible interés en base al crecimiento más rápido. Antes de pasar a la fase de mayor volumen, se realizaron de nuevo sucesivas réplicas de cada uno de los 17 cultivos seleccionados. Estas réplicas se realizaron con el objetivo de confirmar los crecimientos observados y de preservar copias de las microalgas.

5.3. Selección de microalgas.

Para realizar la experiencia se generaron, en primer lugar, cultivos madre de las microalgas en frascos erlenmeyer de 100 mL de capacidad, con un volumen de cultivo de 50 mL en cada uno de ellos. Los erlenmeyer conteniendo los medios de cultivo (un total de 17, el mismo número que de colonias aisladas con las que iban a inocularse tales medios) se autoclavaron y se inocularon con muy poco volumen de cada uno de los cultivos de microalgas obtenidos previamente. La Figura 5.4 muestra los 17 cultivos de esta experiencia, realizados en erlenmeyer. Los medios y las condiciones de cultivo se han descrito en el apartado de Materiales y Métodos de esta Tesis.



Figura 5.4. Determinación de las cinéticas de crecimiento en medio líquido de las microalgas seleccionadas tras la fase de aislamiento en medio sólido. Los cultivos se realizaron en erlenmeyers que contenían 250 mL del medio mineral mínimo descrito en esta Tesis (imagen izquierda) y se inocularon con densidades celulares bajas para garantizar máximas velocidades iniciales de crecimiento en el modo baño utilizado. Las microalgas fueron previamente adaptadas a concentraciones altas de CO₂ en los cultivos madre de 50 mL (imagen derecha). Las condiciones de cultivo se detallaron en el capítulo de Materiales y Métodos.

5.4. Caracterización del crecimiento.

En función de los resultados obtenidos del aislamiento y crecimiento de microalgas en medio líquido, se seleccionaron cinco para continuar la experimentación. En relación al crecimiento, se determinó la velocidad específica y la productividad de estos cultivos en función del peso seco acumulado en la fase exponencial temprana. En relación al valor de las microalgas para obtención de aceites y otras moléculas de mayor valor, se realizaron las primeras determinaciones del contenido de las microalgas en

ácidos grasos (útiles para biodiesel) y carotenoides (valor para la salud). Las muestras seleccionadas se recogen en la Tabla 5.1.

Los criterios para seleccionar las cinco muestras de microalgas fueron los datos de tasas de crecimiento, de densidades ópticas alcanzadas en los cultivos en modo baño y de rapidez aparente para adaptarse a condiciones nutricionales y de luz cambiantes.

Tabla 5.1. Clasificación y codificación de las 5 microalgas seleccionadas.

Zona de muestreo	Balsa de recepción y almacenamiento de aguas ricas en hidrocarburos (BR)	Canal de desagüe (CN)	Decantadora de fangos (DEC)
Codificación muestras	BR1B y BR2D	CN1A y CN1D	DEC1B

El seguimiento del crecimiento se efectuó mediante la determinación del peso seco y de la densidad óptica de los cultivos. La Figura 5.5 recoge la evolución en el tiempo del peso seco y de la densidad óptica a 750 nm de los distintos cultivos, junto con la fotografía al microscopio óptico de dichas microalgas.

Los resultados ponen de manifiesto que todos los cultivos muestran en el peso seco y en la densidad óptica una evolución prácticamente idéntica. Todas las curvas de crecimiento muestran el perfil característico de un cultivo de microalga limitada por luz, y por tanto, en la disponibilidad de energía necesaria para satisfacer el incremento en la densidad celular propio de la fase exponencial avanzada.

Las productividades de los cultivos, inferidas de los datos de peso seco, variaron entre 120 y 250 mg·L⁻¹·d⁻¹. Esta productividad se obtuvo en condiciones de cultivo no saturantes en relación a la luz. Como se ha comentado, en cultivos en modo baño la productividad disminuye cuando aumenta la densidad celular hasta oscurecer los cultivos.

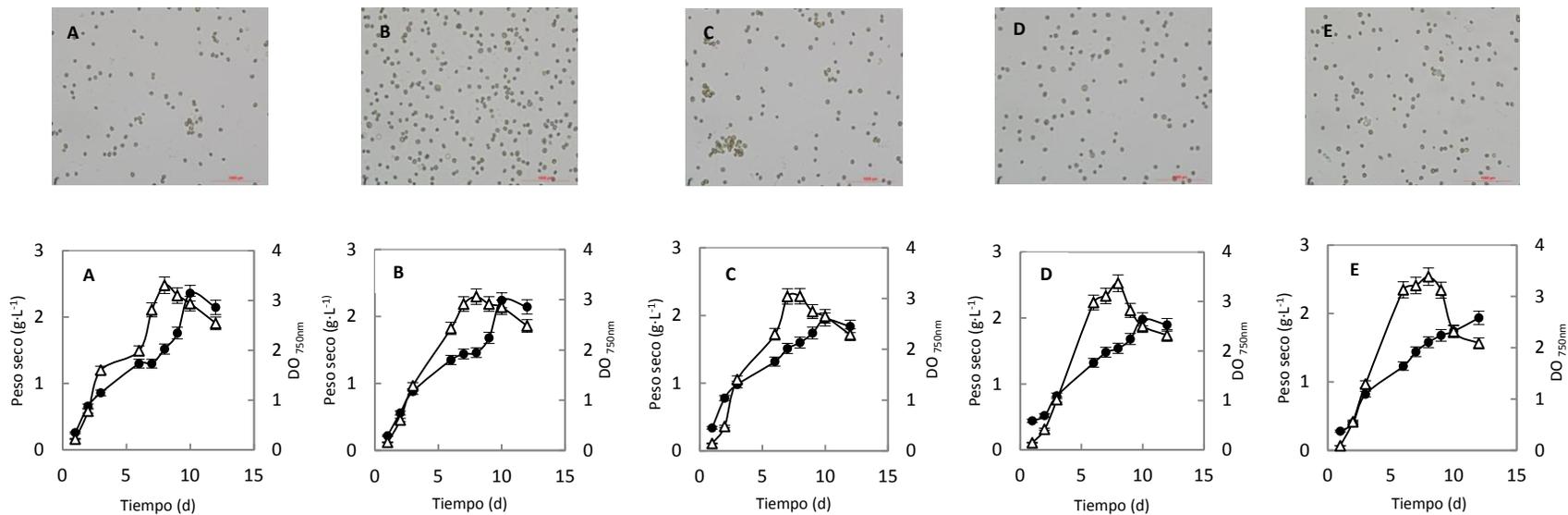


Figura 5.5. Determinación de la evolución del peso seco y la densidad óptica de las 5 microalgas aisladas de Refinería, en cultivo baño, junto con las fotografías al microscopio óptico de los distintos cultivos. En las Figuras inferiores se representan la evolución del peso seco (-Δ-) y de la densidad óptica a 750nm (-●-) de las 5 microalgas. De izquierda a derecha, las microalgas cultivadas son: A, BR1B; B, BR2D; C, CN1A; D, CN1D y E, DEC1B. Las condiciones de cultivo se detallaron en el capítulo de Materiales y Métodos.

No se observa en ningún caso fase de latencia claramente diferenciada, indicando la rápida adaptación de los cultivos al medio; el crecimiento exponencial se desarrolla aproximadamente a lo largo de una semana, y el agotamiento de los cultivos en modo baño ocurre de manera rápida tras alcanzar estos una concentración de biomasa superior a $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. La suave caída de los valores de densidad óptica revela un “blaqueamiento” del cultivo como consecuencia del agotamiento de nutrientes, entre ellos el nitrógeno inorgánico, que implica entre otros hechos la inhibición de la biosíntesis de clorofila (Parkhill et al. 2001, Berden-Zrimec et al. 2008). Los resultados apuntan a crecimientos intensos y con elevadas productividades, si se producen bajo intensidades de luz más altas y con la adecuación paulatina de la densidad de cultivo a altas irradiancias.

La Tabla 5.2 recoge los datos de tasa de crecimiento (d^{-1}) calculada para cada uno de los microorganismos fotosintéticos que crecieron en los cultivos estudiados, determinada en base a los datos de peso seco. Aunque a partir de los datos de tasa de crecimiento es difícil, establecer diferencias entre microorganismos, parece en principio que la microalga obtenida del decantador (DEC1B) presenta, con claridad, el crecimiento más rápido. Estos datos fueron obtenidos de los ensayos realizados en modo baño y en recipientes erlenmeyer de 500 mL. En estos recipientes el paso de luz es considerable en relación a las condiciones de luz no saturantes de la cámara ($140 \mu\text{mol foton}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$), que son suficientes para producir crecimiento rápido aunque limitante. Es esperable que intensidades de luz más altas mejoren las productividades de los cultivos y la síntesis de lípidos (Wahidin et al. 2013). La influencia de intensidades de luz más altas sobre dichos parámetros se analiza más adelante en esta Tesis.

Tabla 5.2. Tasas de crecimiento de las 5 microalgas seleccionadas. Las tasas de crecimiento se calcularon al principio de la fase exponencial. Los cultivos se crecieron en modo baño bajo las condiciones de cultivo descritas en el capítulo de Materiales y Métodos.

	Microalga				
	BR1B	BR2D	CN1A	CN1D	DEC1B
Tasa de crecimiento (d^{-1})	0,26	0,44	0,23	0,46	0,52

5.5. Caracterización de lípidos.

La selección final de las microalgas más adecuadas a los objetivos del trabajo se realizó en base al contenido en lípidos de valor comercial, aquellos útiles para la preparación de biodiesel (ácidos grasos) y otros de alto valor añadido como las xantofilas y los carotenoides. Como se explicó en la Introducción de esta Tesis, la obtención de biocombustibles de microalgas no es aún una actividad rentable. Para que resulte económicamente viable, se plantea actualmente hacer uso comercial de productos de alto valor añadido de las microalgas, carotenos y xantofilas entre ellos.

Por tanto, se realizaron tareas de extracción, separación, identificación y cuantificación de algunas moléculas lipídicas. Las moléculas extraídas e identificadas en este trabajo son ácidos grasos (acilglicéridos) y carotenoides. Los ácidos grasos serán necesarios para la obtención de biodiesel, y los carotenoides son moléculas de valor comercial que pueden, potencialmente, utilizarse para compensar los elevados costes de producción de la biomasa que hacen de la producción del biocombustible un proceso aún económicamente inviable.

Como ya se ha descrito en Materiales y Métodos, los lípidos totales se obtuvieron gravimétricamente a partir de los residuos aceitosos obtenidos en soxhlet. En la Tabla 5.3 se muestra el porcentaje de lípidos totales obtenidos en las 5 microalgas cultivadas en condiciones control, es decir, condiciones de cámara de cultivo controlada y con medio pleno de nutrientes (*Sueoka*). Tras 4 y 9 días de experimentación en modo baño se recogió biomasa suficiente para extraer aceites.

Por lo que se observa en los valores de lípidos totales, las muestras de microalgas seleccionadas presentan abundancia lipídica. Sus valores se encuentran dentro del rango de muchas de las *Chlorellas* descritas por diversos autores (Chisti 2007). El incremento en la acumulación de lípidos totales, por tanto también de acilglicéridos, es esperable en condiciones que limiten el crecimiento de la microalga, según lo publicado por numerosos autores (Hu et al. 2008). La estimulación de la biosíntesis de ácidos grasos puede realizarse siguiendo varias estrategias, entre las cuales están la

limitación de nutrientes, especialmente nitrógeno inorgánico, y la alta intensidad de luz. Este es uno de los fines de este capítulo de Tesis.

Tabla 5.3. Contenido de lípidos totales respecto a peso seco de biomasa de las 5 microalgas seleccionadas. Los valores se obtuvieron a partir de cultivos controles de las 5 microalgas cultivadas en condiciones ya descritas en Materiales y Métodos. Los datos de lípidos totales se obtuvieron después de 4 y 9 días de crecimiento de las microalgas en cultivos baños, y se expresan como g de lípidos \cdot g⁻¹ peso seco \cdot 100. Los pesos secos medios de cada estirpe variaron entre 0,6 y 1,2 g \cdot L⁻¹.

Tiempo (d)	Microalga				
	BR1B	BR2D	CN1A	CN1D	DEC 1B
4	21	24	27	30	38
9	31	31	35	39	41

Se determinó también el contenido en carotenoides de las microalgas estudiadas, con objeto de analizar el posible valor añadido de la biomasa. La Tabla 5.4 muestra el contenido de pigmentos específicos carotenoides en condiciones control, en modo baño y a lo largo de distintos momentos de la fase exponencial de crecimiento de cada una las microalgas. La Tabla representa los contenidos de luteína y β -caroteno en extractos de las microalgas obtenidos en disolvente orgánico (metanol). Los pigmentos se extrajeron mediante procedimientos que se describen en el apartado de Materiales y Métodos. La separación, identificación, y cuantificación de los pigmentos mayoritarios se realizó utilizando técnicas de cromatografía líquida (HPLC).

Tabla 5.4 Contenido en carotenoides mayoritarios de las 5 microalgas seleccionadas. Se resumen los contenidos medios en carotenoides. Los carotenoides se expresan como mg de pigmento \cdot g⁻¹ peso seco, encontrados en los extractos de las microalgas seleccionadas, crecidas en medio plenos de nutrientes. Los pesos secos medios de cada estirpe variaron entre 0,6 y 1,2 g \cdot L⁻¹.

Pigmentos	Microalga				
	BR1B	BR2D	CN1A	CN1D	DEC 1B
Luteína	2,01	1,77	1,65	1,62	1,50
β -caroteno	0,38	0,48	0,39	0,48	0,16

La composición de las microalgas en lípidos neutros y polares, a pesar de depender principalmente de la especie, resulta afectada por diversas condiciones físicas y químicas de cultivo, tales como la fase de crecimiento, la disponibilidad y la naturaleza de los nutrientes, la salinidad, el tipo, periodos e intensidad de luz, la temperatura o el pH. Frente a estas condiciones, las respuestas generales de las células fotosintéticas son cambios morfológicos y en la velocidad de división celular, alteraciones en la permeabilidad de las membranas, acumulación de lípidos y/o polisacáridos, cambios en la actividad fotosintética y modificación de procesos metabólicos (Thompson 1996).

La limitación de nitrógeno es considerada como la estrategia más eficiente para incrementar el contenido de las microalgas en lípidos neutros, en particular el de triglicéridos conformados por ácidos grasos con un elevado grado de saturación (Guschina y Harwood 2006, Solovchenko 2013).

La alta intensidad de luz es otra de las condiciones que favorecen la acumulación de triglicéridos con mayor grado de saturación. Los lípidos son uno de los constituyentes principales de los cloroplastos y las insaturaciones de los PUFAs funcionan como sumidero de radicales libres que se han producido en mayor medida por la pérdida del equilibrio electrónico en los fotosistemas (Hill et al. 2011) al aumentar la intensidad de luz. Altos contenidos de PUFA están relacionados con niveles bajos de irradiancias, esto sugiere que la composición bioquímica de los cloroplastos está adaptada a niveles de baja intensidad de luz, favoreciendo la síntesis de PUFA. En muchos estudios se confirma que el contenido de ácidos grasos como EPA (ácido eicosapentaenoico) es más elevado en cultivos incubados con bajas intensidades de luz. Sin embargo los contenidos celulares de DHA (ácido docosahexaenoico) aumentan bajo altas irradiancias (Guedes et al. 2010). Aunque la incubación bajo altas irradiancias atenúe la división celular, por tanto la productividad de los cultivos, esto es consecuencia de la asimilación de carbono orientada hacia la síntesis activa de ácidos grasos. Los lípidos acumulados bajo tales condiciones son una reserva celular de carbono y energía. Las condiciones de estrés hasta ahora mencionadas, favorecen la generación de radicales libres (Mallick y Mohn 2000). Entre

otras consecuencias, tal y como mencionan diversos autores, se favorece la acumulación relativamente mayor de ácidos grasos saturados, ya que los poliinsaturados tienen afinidad por ROS con las cuales reaccionan (Alexander-North et al. 1994) dando lugar a hidroperóxidos lipídicos, disminuyendo así la proporción de tales ácidos grasos en la célula (Abe et al. 2007).

En este capítulo se han aplicado algunas de dichas estrategias conocidas por favorecer la síntesis de lípidos: la carencia de nitrógeno en el medio y el cultivo bajo intensidades de luz saturantes ($650 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). La carencia de nitrógeno en el medio se realizó transfiriendo cultivos en modo baño, en fase exponencial de crecimiento, a medios carentes en nitrógeno inorgánico. La elección de la intensidad de la luz saturante se realizó seleccionando la mínima intensidad que asegura, teóricamente, saturación por luz de un cultivo de microalgas de densidad celular moderada (no superior a $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).

La Figura 5.6 muestra una curva de saturación por luz de la fotosíntesis en microalgas del género *Chlorella*. Como se explicará más adelante, las microalgas seleccionadas finalmente para escalar producción de biomasa enriquecida en lípidos identificados en esta Tesis pertenecen al género de *Chlorella*. En la mayoría de experiencias en fotobiorreactores, el flujo de fotones óptimo saturante para el crecimiento de microalgas ocurre entre 350 y $1100 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Subramaniam et al. 2010). Así, si se aplican irradiancias saturantes, no fotoinhedoras, la tasa fotosintética puede ser máxima, resultando en una mayor eficiencia en la fijación de carbono que en condiciones de luz no saturantes (Ho et al. 2012). Los cultivos control, sin embargo, son incubados bajo las condiciones de irradiancia de la cámara de cultivo, aproximadamente $140 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, por lo que se esperarían resultados más favorables en crecimiento y en síntesis de lípidos con la irradiancia superior utilizada en este apartado de Tesis.

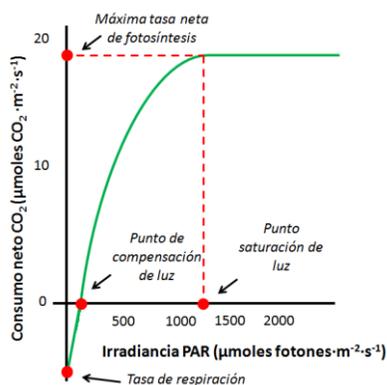


Figura 5.6. Curva de saturación de consumo de carbono inorgánico por luz en *Chlorella sp.* Modificado de Tredici 2010 y <http://www.koofers.com/flashcards/biology-physiological-lec-4/review>.

El siguiente bloque de resultados muestra la respuesta de las 5 microalgas seleccionadas al ser incubadas bajo carencia de nitrógeno y bajo luz saturante ($650 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), respectivamente. Tanto la carencia nutricional como la incubación bajo luz saturante influyen en el crecimiento celular y en la concentración de lípidos y FAMES de estos organismos. Así, la Figura 5.7 muestra, en la parte superior, la evolución del ratio de absorbancia a 680 y 750 nm respecto al tiempo de experimentación en cultivos controles de las 5 microalgas aisladas, en cultivos sometidos a carencia de nitrógeno y en cultivos crecidos con luz saturante de $650 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. En las Figuras inferiores, se representan la evolución del peso seco de las 5 microalgas en cultivos controles, en cultivos incubados bajo carencia de nitrógeno y en cultivos sometidos a luz saturante de $650 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

El ratio de absorbancias representa una relación aproximada de la cantidad de clorofilas que contienen las células (680 nm) y la concentración de biomasa presente en el cultivo (750 nm). En todos los casos se utilizaron cultivos en modo baño, en fase exponencial de crecimiento. Para la experiencia del cultivo bajo luz saturante, todas las estirpes fueron previamente crecidas en condiciones estándar y, pasado el tiempo pertinente de adaptación en fase exponencial, se aumentó la intensidad de 140 a $650 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ medidos en la superficie de los recipientes. Las microalgas se cultivaron en botellas de 5 L de volumen. Las tasas de crecimiento obtenidas fueron algo diferentes a las mencionadas

anteriormente, debido entre otras cosas a un mayor paso de luz que el de los cultivos controles de la experiencia antes descrita.

Los perfiles de las gráficas de la ratio de absorbancias correspondientes a las 5 microalgas siguen la misma tendencia. En los controles (línea discontinua negra), el ratio decrece con el paso del tiempo. Esto significa que la concentración de biomasa aumenta y el cultivo, por tanto, crece. La cantidad de clorofilas aumenta en menor medida durante la fase exponencial, si bien al final de la misma se observa un cierto repunte de la relación de absorbancias en tres de los cultivos, señal de aumento de la clorofila por limitación de luz.

Cuando los cultivos pasan a carencia de nitrógeno (línea azul), el ratio aumenta rápidamente en todos los casos, debido a la ralentización del crecimiento. Las gráficas inferiores representan la evolución de peso seco de las 5 microalgas en las mismas condiciones de incubación. Bajo carencia de nitrógeno, todos los cultivos sufren una desaceleración en el crecimiento celular, de manera inmediata. El nitrógeno es esencial para la síntesis de proteínas y para la división celular, entre otras cosas, y su ausencia afecta a estos parámetros durante las primeras horas de carencia, si bien no de forma drástica, observación coincidente con la de otros autores que identificaron reservas intracelulares de nitrógeno inorgánico en microalgas (La Russa et al. 2012). Las últimas horas de experimentación en carencia de nitrógeno se corresponde con la decoloración celular, probablemente debida al efecto negativo de la carencia de nitrógeno en la síntesis de las clorofilas.

En el caso de la incubación de las 5 microalgas en condiciones de luz saturante (línea roja), ocurre algo similar a lo anterior. Las graficas de la evolución de peso seco muestran que el tránsito a luz saturante induce una mayor productividad celular. Los cultivos crecen en mayor medida que los controles. Los ratios presentan en todos los casos la misma tendencia: primero aumentan y luego tienden a disminuir. La relación clorofila/biomasa es mayor al principio, al aumentar rápidamente la cantidad de clorofilas por aumento del número de células.

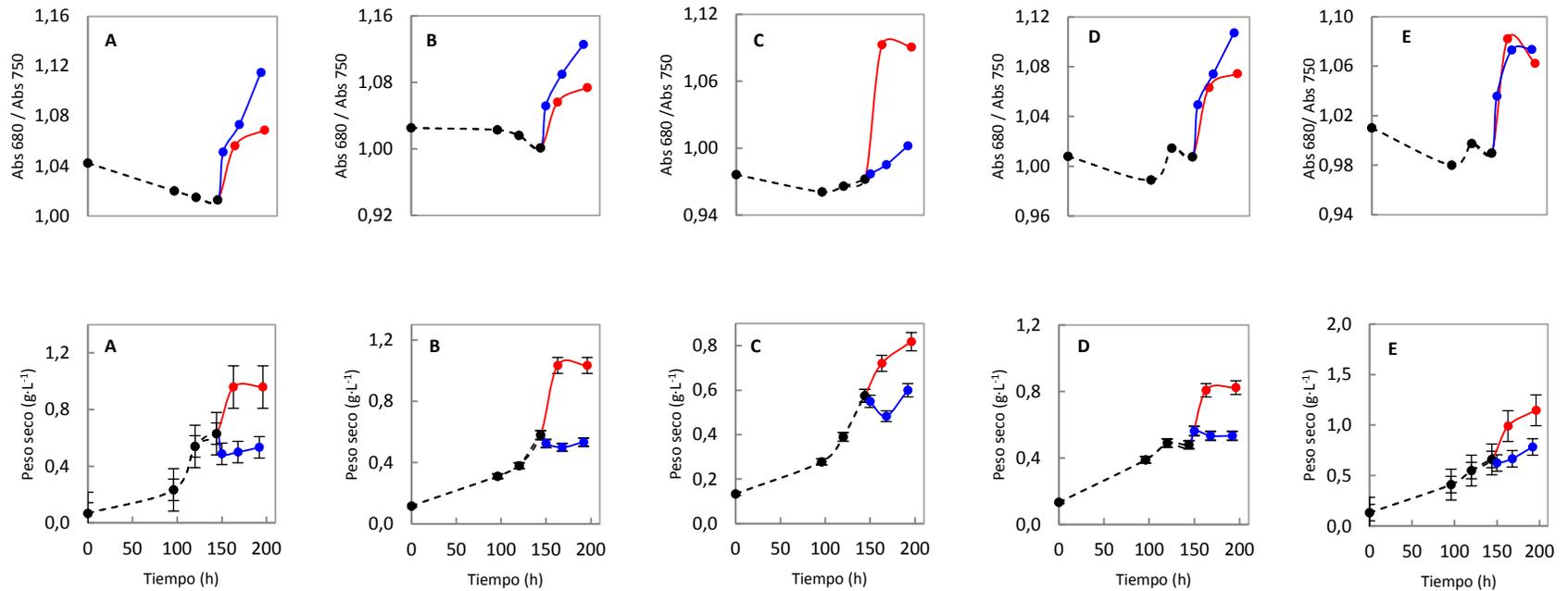


Figura 5.7. Evolución de la ratio de absorancias a 680 y 750nm y del peso seco de las 5 microalgas seleccionadas, en cultivo baño y bajo distintas condiciones de estrés. Las graficas superiores representan la evolución del ratio de absorancias a 680/750 nm. Las gráficas inferiores representan la evolución del peso seco. De izquierda a derecha las microalgas cultivadas son: A, BR1B; B, BR2D; C, CN1A; D, CN1D y E, DEC1B. Partiendo de cultivos en condiciones estándar (-●-), descritas en Materiales y Métodos, los cultivos se transfirieron a carencia de nitrógeno (-●-) ó luz saturante, 650 $\mu\text{mol fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (-●-), respectivamente.

Comparando las gráficas de los ratios de absorbancia de los cultivos incubados bajo carencia de nitrógeno y bajo luz saturante, en todos los casos excepto en los cultivos CN1A y DEC1B los datos obtenidos en carencia de nitrógeno son superiores a los datos obtenidos en luz saturante. La desaceleración del crecimiento de la mayoría de los cultivos en condiciones de carencia de nutrientes, en este caso de nitrógeno, es mayor que la de las clorofilas correspondientes, lo que tiene como resultado valores más altos de la relación clorofila/biomasa en comparación con los cultivos sometidos a alta irradiancia, que resultan estimulados en su crecimiento.

La siguiente Figura 5.8 representa el contenido de lípidos en las primeras 96h de incubación bajo carencia de nitrógeno y bajo luz saturante de $650 \mu\text{mol foton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Además, se representan en dichas gráficas los datos diarios de productividades de lípidos en dichas condiciones de incubación.

Los cultivos controles de cada una de las respectivas microalgas BR 1B, BR 2D, CN 1A, CN 1D y DEC 1B, rindieron, respectivamente, un contenido de lípidos totales respecto a su biomasa seca de 0,21; 0,14; 0,26; 0,39 y 0,38 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, antes de incubar los cultivos bajo las condiciones de carencia de nitrógeno y luz saturante.

Como se observa en la Figura 5.8 (gráficos superiores), cuando BR2D y CN1A (B y C, respectivamente) son incubadas en carencia de nitrógeno apenas modifican su contenido de lípidos totales, manteniendo ambos máximos alrededor de $0,20 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco. BR1B y CN1D aumentan su contenido de lípidos pasadas las primeras 48h de incubación en dicha carencia, alcanzando máximos de un 50 % de lípidos totales respecto a su peso seco. Estos valores caen durante las últimas horas de experimentación. Por último, DEC1B alcanza un 50% de su peso en lípidos totales tras 24h en carencia de nitrógeno, disminuyendo el tercer y cuarto día en condiciones de carencia de nitrógeno. La productividad de lípidos en los cinco cultivos incubados en carencia de nitrógeno muestra una tendencia similar, aumentando durante las primeras 48h.

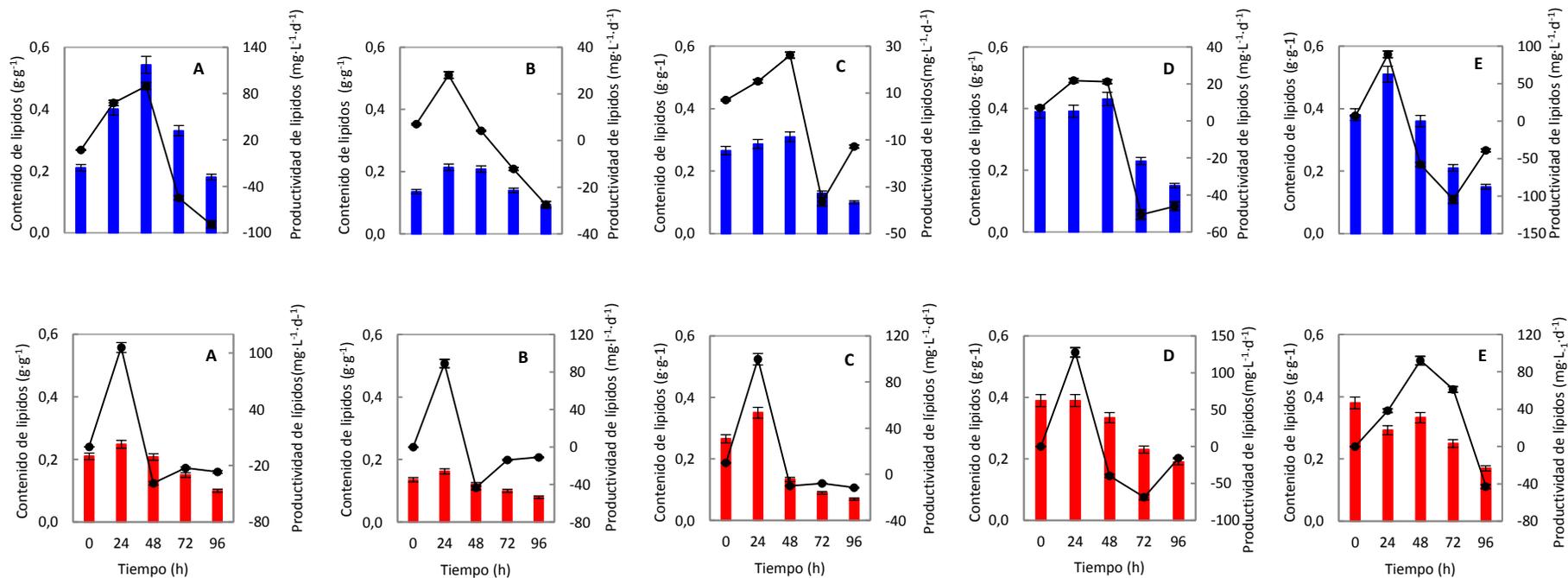


Figura 5.8. Evolución de la concentración de lípidos totales y de la productividad diaria de lípidos de las 5 microalgas seleccionadas, en cultivo baño y bajo distintas condiciones de estrés. Las figuras superiores representan la evolución de la concentración de lípidos totales (barra azul) y de la productividad diaria de lípidos (●-) en las 5 microalgas bajo carencia de nitrógeno. Las figuras inferiores representan la evolución de la concentración de lípidos totales (barra roja) y de la productividad diaria de lípidos (●-) en las 5 microalgas bajo luz saturante de $650 \mu\text{mol fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. De izquierda a derecha, las microalgas cultivadas son: A, BR1B; B, BR2D; C, CN1A; D, CN1D y E, DEC1B.

Las Figuras inferiores representan los 5 cultivos incubados bajo irradiancia saturante. La máxima acumulación de lípidos totales se produce durante las primeras 24-48h de incubación bajo esta condición de luz, por lo general con máximos próximos a $0,4 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco en CN1A, CN1D y DEC1B, respectivamente. Las productividades de lípidos en los 5 cultivos crecidos con luz saturante (línea continua gráficos inferiores) muestran un perfil similar, siendo superior el primer día de exposición y disminuyendo después, a excepción de DEC 1B, que aumenta la productividad de lípidos hasta 72h después de exposición a luz saturante.

Por los resultados obtenidos, incubar cultivos bajo carencia de nitrógeno favorece la acumulación y la productividad de lípidos en las microalgas aisladas. Aunque la carencia de nitrógeno favorece la síntesis de lípidos, ralentiza el crecimiento, si bien el metabolismo basal continúa fijando CO_2 en forma de lípidos y carbohidratos como reserva de energía y carbono (Subramaniam et al. 2010).

Por otro lado, la luz es crítica para el crecimiento celular y la acumulación de lípidos bajo condiciones fototróficas. La tasa específica de crecimiento aumenta con el incremento del flujo de fotones en el rango fotosintético (luz PAR de 400 a 700nm). En dicho rango, si el flujo de fotones es superior al valor óptimo, el exceso de energía lumínica puede ser disipado en forma de calor y exceso de poder reductor, y podría causar inhibición de funciones celulares (Ho et al. 2012). El tránsito de irradiancia moderada a saturante conlleva, temporalmente, una mayor producción de poder reductor en fotosíntesis que no se corresponde con la demanda metabólica, aún no adaptada a un anabolismo más activo. El exceso de poder reductor conduce a una mayor actividad respiratoria con el consiguiente incremento de la producción de ROS y del estado oxidativo de las células (Osmond et al. 1997). En esta situación, parte del poder reductor puede disiparse a través de la fijación de carbono en forma de lípidos, cuya biosíntesis demanda alta concentración de dicho poder reductor (Hu et al. 2008). La siguiente Tabla 5.5 muestra un resumen de valores máximos de parámetros de crecimiento y contenido de lípidos obtenidos en los ensayos con las 5 microalgas aisladas de Refinería. Como ya se ha mencionado anteriormente, la carencia de nitrógeno y la luz saturante aplicada favorecen la síntesis de lípidos neutros y de carotenoides.

Bajo luz saturante, en todos los casos las microalgas presentan un aumento de la productividad de biomasa con respecto a los cultivos control. Lógicamente, el incremento de la irradiancia facilita la penetración de la luz en el cultivo, incrementa la zona fótica y aumenta la dispersión de la luz, aumentando la productividad mientras la irradiancia no produzca fotoinhibición intensa (Wahidin et al. 2013).

Respecto a los datos de contenido en lípidos de la Tabla 5.5, todos los cultivos a excepción de BR2D y CN1A presentan valores máximos cuando son incubados bajo carencia de nitrógeno, pero la productividad de lípidos es mayor en las cinco microalgas bajo la condición de cultivo con irradiancia saturante ya que esta condición no inhibe el crecimiento de las microalgas, lo que conduce a una mayor producción de lípidos en términos cuantitativos (Liu J. et al. 2012).

Tabla 5.5. Valores máximos de parámetros de crecimiento y contenido en lípidos de las 5 microalgas seleccionadas. Se resumen los valores máximos obtenidos de las 5 microalgas sometidas a las distintas condiciones de incubación: carencia de nitrógeno ó exposición continua a intensidad de luz saturante ($650 \mu\text{mol fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). PS: peso seco.

Microalgas aisladas y condiciones de incubación		Tasa de crecimiento (d^{-1})	Productividad ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)	Contenido en lípidos ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ PS)	Productividad de lípidos ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)
BR1B	Control	0,31	306,67	0,27	12,80
	Carencia de nitrógeno	0,19	135,60	0,53	89,60
	Luz saturante	0,21	354,61	0,24	105,8
BR2D	Control	0,42	200,00	0,25	6,40
	Carencia de nitrógeno	0,18	120,89	0,21	28,04
	Luz saturante	0,23	366,31	0,16	89,16
CN1A	Control	0,39	180,50	0,35	11,25
	Carencia de nitrógeno	0,29	280,00	0,22	26,18
	Luz saturante	0,25	420,60	0,35	99,83
CN1D	Control	0,27	100,11	0,38	12,00
	Carencia de nitrógeno	0,23	170,55	0,43	21,78
	Luz saturante	0,22	280,25	0,39	127,5
DEC1B	Control	0,29	130,89	0,42	11,00
	Carencia de nitrógeno	0,17	116,71	0,51	88,96
	Luz saturante	0,30	885,56	0,33	92,11

Por el contrario, cultivar bajo carencia de nitrógeno provoca una ralentización del crecimiento, por lo que parámetros como las tasas de crecimiento y la productividad de lípidos disminuyen sus valores en casi todas las microalgas aisladas de Refinería en relación a los cultivos control. La carencia de nitrógeno afecta negativamente a la viabilidad de la célula y, aunque de forma puntual mejore el contenido intracelular en lípidos respecto a otras condiciones de incubación, dicha mejora no se mantiene en el tiempo porque las células no son viables y dejan de dividirse (Cakmak et al. 2012, Geider et al. 1998).

También se analizaron los ácidos grasos mayoritarios obtenidos en las diferentes condiciones de experimentación en las 5 microalgas aisladas, ya que los TAG (triacilglicéridos) no sólo son importantes como aceites destinados a alimentación, sino también para la producción de biocombustible por su contenido en ácidos grasos (% p/p) y la menor presencia de moléculas que interfieren en su producción, como fosfolípidos o glucolípidos (Breuer et al. 2012).

La Tabla 5.6 muestra el porcentaje de ácidos grasos mayoritarios presentes en cultivos control de las cinco microalgas seleccionadas. En el caso de los ácidos grasos saturados aparece como mayoritario C16:0 (palmítico), entre los ácidos grasos monoinsaturados los más abundantes son C14:1 (miristoleico), C16:1 (palmitoleico) y C18:1 (oleico), y en los poliinsaturados los más abundantes C18:2 (linoleico) y C18:3 (linolénico).

Por lo tanto, parece recomendable mejorar la productividad volumétrica de acumulación de ácidos grasos en las microalgas estudiadas mediante la producción de biomasa en fase de crecimiento exponencial, en condiciones óptimas, para ser luego sometidas a condiciones de carencia de nitrógeno o de incubación con luz saturante, con mayor rendimiento en ésta última condición.

Tabla 5.6. Composición de ácidos grasos principales de las 5 microalgas seleccionadas. Los valores fueron expresados como porcentaje de abundancia respecto al total de ácidos grasos integrados por cromatografía gaseosa de cultivos control de las 5 microalgas.

Ácidos grasos principales	Microalga				
	BR 1B	BR 2D	CN 1A	CN 1D	DEC 1B
Saturados					
C13:0	0,9	1,0	3,0	1,2	0,8
C14:0	3,1	2,0	3,1	1,4	1,9
C15:0		0,9		0,4	
C16:0	14,8	21,0	22,6	14,6	23
C17:0	7,2	7,3	13,1		4,6
C18:0	0,5	4,0	1,3	3,1	0,9
C20:0	0,7				
Mono-insaturados					
C14:1	2,2		2,8		1,2
C15:1		0,9		0,7	
C16:1	3,0	0,5	0,8	3,2	1,3
C17:1		0,4		5,2	
C18:1	4,4	6,6	1,3	24,4	7,2
Poli-insaturados					
C18:2	32,6	42,8	41,1	8,7	46,3
C18:3	33,7	12,4	11,2	39,7	14,1

La Tabla 5.7 muestra los máximos porcentajes de lípidos transesterificables obtenidos en las cinco microalgas aisladas de Refinería e incubadas bajo las distintas condiciones ya descritas.

La Tabla muestra que los mejores resultados de proporción de ácidos grasos metilados en el total de lípidos extraídos, se obtuvieron cuando los cultivos de las 5 microalgas eran incubados bajo carencia de nitrógeno en vez de bajo luz saturante. Según los resultados obtenidos, incubar bajo carencia de nitrógeno favorece el contenido de FAMES en mayor medida que bajo luz saturante, si bien se obtienen menores productividades como se ha discutido.

Tabla 5.7. Porcentaje máximo de FAMEs de las 5 microalgas seleccionadas. Los datos fueron calculados a partir del porcentaje total de ácidos grasos metilados respecto al total de lípidos obtenidos por soxhlet. Las 5 microalgas se incubaron bajo carencia de nitrógeno o bajo luz saturante ($650 \mu\text{mol fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).

Condiciones de incubación	Microalga				
	BR 1B	BR2D	CN1A	CN1D	DEC1B
Control	9	4	4	9	6
Carencia de nitrógeno	25	29	25	13	24
Luz saturante	4	6	6	5	10

De las cinco microalgas estudiadas, aquella que rindió mejores resultados de lípidos totales y FAMEs fue la codificada como DEC1B. Por tanto, la producción eficiente de lípidos útiles para obtener biodiesel con la microalga DEC1B consistirá en la incubación de la microalga bajo una condición que aúne productividad de biomasa y mayor contenido intracelular de lípidos (particularmente acilglicéridos), con el objetivo de conseguir la máxima productividad de lípidos, recogiendo la biomasa en el momento de máxima acumulación de estos.

La Figura 5.9 muestra la cinética de acumulación de lípidos y de producción de los correspondientes FAMEs de la microalga en las dos condiciones de incubación, carencia de nitrógeno o luz saturante.

En la Figura se evidencia que la máxima producción de FAMEs es de aproximadamente el 15% de la biomasa seca de la microalga, independientemente de la condición de incubación. El contenido en lípidos totales de la microalga cuando se alcanza dicho máximo de FAMEs varía considerablemente según la condición de incubación: en los cultivos incubados bajo irradiancia saturante ha de emplearse menos cantidad de disolvente para extraer la misma cantidad de FAMEs, pues el contenido de la microalga en lípidos es menor. Adicionalmente, la condición de irradiancia saturante permite crecimiento del cultivo, lo que no ocurre en carencia de nitrógeno inorgánico, como se puso de manifiesto en los datos de Figuras y tablas anteriores en este Capítulo.

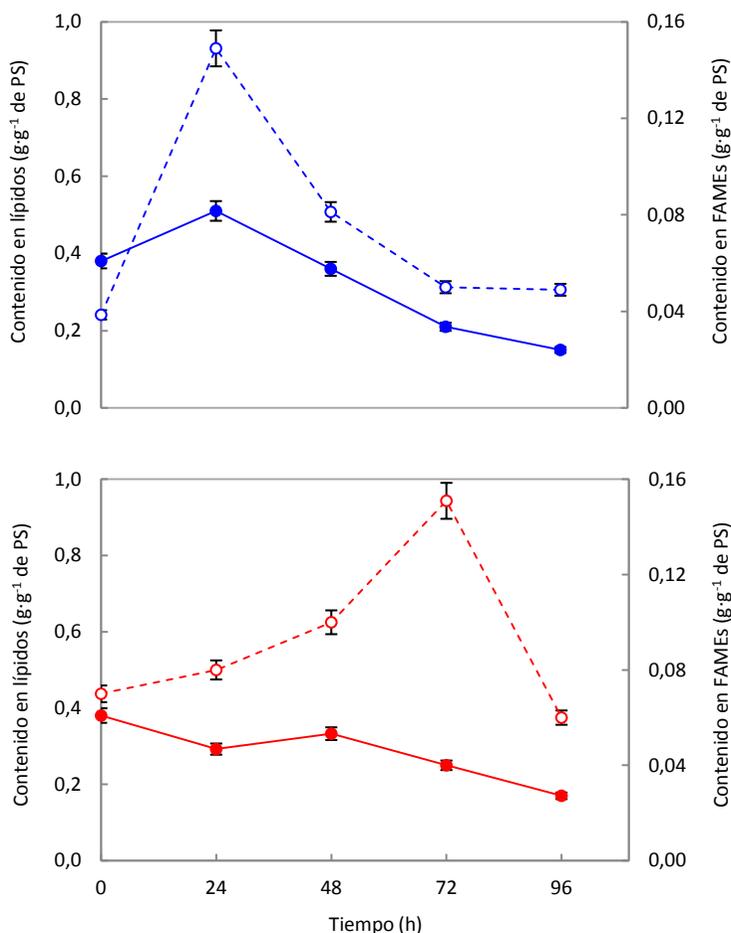


Figura 5.9. Evolución del contenido de lípidos totales y de FAMES de una de las microalgas seleccionadas, en cultivo baño bajo distintas condiciones de estrés. La gráfica superior representa la evolución del contenido de lípidos totales (-●-) y de FAMES (-○-) respecto a peso seco de la microalga DEC 1B bajo carencia de nitrógeno. La gráfica inferior representa la evolución del contenido de lípidos totales (-●-) y de FAMES (-○-) respecto a peso seco de la microalga DEC 1B bajo luz saturante de 650 μmol fotones · m⁻² · s⁻¹. PS: peso seco.

A modo de conclusión, de los resultados obtenidos se infiere que la producción de FAMES a partir de los aceites obtenidos de la microalga denominada DEC1B aislada de Refinería La Rábida, de CEPESA, posteriormente identificada como *Chlorella sp.*, se realiza de forma más eficiente si los cultivos - en condiciones fotoautotróficas - se someten a incubación bajo irradiancias saturantes, manteniendo mayor productividad de lípidos que cultivos sometidos a carencia nutricional como consecuencia de la mayor productividad de biomasa.

En las condiciones de máxima acumulación determinadas, la microalga *Chlorella sp.* objeto de estudio alcanza un contenido promedio de lípidos de un 40 % - 45 %, de los cuales un máximo de aproximadamente 30% son FAMES.

Capítulo 6

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y
ESTUDIOS FISIOLÓGICOS
PARA LA ESTIMULACIÓN DE
LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS DE
UNA MICROALGA AISLADA DE
LA REFINERÍA LA RÁBIDA DE
CEPSA**



Universidad
de Huelva

6. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y ESTUDIOS FISIOLÓGICOS PARA LA ESTIMULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS DE UNA MICROALGA AISLADA DE LA REFINERÍA LA RÁBIDA DE CEPESA.

6.1. Identificación molecular de microalgas aisladas de la Refinería La Rábida de CEPESA.

De las posibles distintas microalgas cuyo crecimiento se analizó en el Capítulo anterior de esta Tesis, las dos consideradas más prometedoras para el cultivo masivo y el análisis de la acumulación de lípidos - previamente denominadas DEC1B y CN1D - se identificaron mediante el uso de técnicas moleculares. De ellas, se seleccionó finalmente una para continuar la investigación. Las microalgas se aislaron y cultivaron en medio sólido y líquido como se indicó en apartados anteriores de esta Tesis, incluyendo Materiales y Métodos. De forma rutinaria se utilizó la microscopía óptica para asegurar, en lo posible, la pureza de los cultivos líquidos, de cara a la identificación molecular de las microalgas.

Para los estudios filogenéticos se utiliza habitualmente material genético nuclear; en el caso de las microalgas, se recurre al análisis de homologías de DNA correspondiente al RNA ribosómico de la subunidad 18S. Para la identificación de las microalgas de este trabajo se recurrió al análisis de homologías de DNA cloroplástico correspondiente a la subunidad grande de la ribulosa bisfosfato carboxilasa (Rubisco, gen *rbcL*), gen utilizado rutinariamente en análisis filogenéticos de plantas y del que se dispone de una gran base de datos de estirpes (Novis et al. 2009).

Los resultados obtenidos del análisis de homologías se han incluido en las bases de datos del GenBank con los números de acceso indicados en la siguiente Tabla, y las secuencias obtenidas para el gen *rbcL* de DEC1B y CN1D se muestran más abajo.

Tabla 6.1. Análisis de homología de secuencias del gen *rbcl* (subunidad grande de Rubisco) de las microalgas aisladas de Refinería mediante la herramienta Blast.

<i>Clon</i>	<i>Description</i>	<i>Max</i>	<i>Total score</i>	<i>Query cover %</i>	<i>Max ident %</i>	<i>Accession Number</i>
DEC1B	<i>Chlorella</i> sp. (posible <i>sorokiniana</i>)	944	944	99	100	AB260910.1
CN 1D	<i>Chlorella</i> sp. (posible <i>sorokiniana</i>)	917	917	100	100	AB260910.1

Secuencia rbcl para DEC1B

CACCAGAAGCTACTGGCATTGTACCTGGTAAAGAAACCCAGTCTTGAGTGAAG
TAAATACCACGGCTACGATCTTTTTCAATGTAGTCATCACGCATTAAGTCAACAA
AACCTAATGTTACTTCACGTTACCTTCTAATTTACCTACAACAGTACCTGAGTG
TAAGTGGTCACCACCTGATAAACGAAGAGCTTTTGCTAAAACACGGAAGTGAA
TACCGTGGTTTCTTTGACGGTCAATAACCGCGTGCATCGCACGGTGAATGTGTA
AAAGAAGACCATTGTCACGGCAGTAGTGAGCTAAACTTGTGTTGCTGTGAAA
CCACCAGTTAAGTAGTCGTGCATGATAATAGGTACACCTAAATCTTTAGCACAT
TCTGCACGTTTTAACATTTCTTCAGCAGTAGCTGCAGTAGCGTTTTAAATAGTGAC
CTTTAATTTACCTGTTTCTGCTTGAGATTTGTAAATAGCTTCAGCTACGAATAA
GAAACGATCTCTCCAACGCATGAAAT

Secuencia rbcl para CN1D

CACCAGAAGCTACTGGCATTGTACCTGGTAAAGAAACCCAGTCTTGAGTGAAG
TAAATACCACGGCTACGATCTTTTTCAATGTAGTCATCACGCATTAAGTCAACAA
AACCTAATGTTACTTCACGTTACCTTCTAATTTACCTACAACAGTACCTGAGTG
TAAGTGGTCACCACCTGATAAACGAAGAGCTTTTGCTAAAACACGGAAGTGAA
TACCGTGGTTTCTTTGACGGTCAATAACCGCGTGCATCGCACGGTGAATGTGTA
AAAGAAGACCATTGTCACGGCAGTAGTGAGCTAAACTTGTGTTGCTGTGAAA
CCACCAGTTAAGTAGTCGTGCATGATAATAGGTACACCTAAATCTTTAGCACAT
TCTGCACGTTTTAACATTTCTTCAGCAGTAGCTGCAGTAGCGTTTTAAATAGTGAC
CTTTAATTTACCTGTTTCTGCTTGAGATTTGTAAATAGCTTCAGCTACGAATAA
GAAACGATC

El resumen de los resultados obtenidos indica que se aislaron nuevas cepas de dos microalgas pertenecientes al género *Chlorella*, y posiblemente a la especie *sorokiniana*. En este Capítulo del Bloque de Resultados y Discusión de la Tesis se ha estudiado la acumulación de lípidos en la microalga denominada DEC1B, en adelante *Chlorella sp.*

La identificación como nuevas cepas de *Chlorella* de las microalgas seleccionadas es coherente con los datos de rápido crecimiento obtenidos en las experiencias de laboratorio y mostrados en el Capítulo anterior, y justifican la adecuada selección de microalgas en los trabajos de discriminación de estas en base a crecimiento rápido, estable y con un contenido de lípidos lo más alto posible en las condiciones experimentales. *Chlorella* aparece con frecuencia en la literatura reciente sobre estudios de obtención de lípidos de microalgas para la producción de biodiesel, con contenidos de estas moléculas variables por lo general entre un 10% y un 50% respecto al peso seco del microorganismo (Mata et al. 2011). Además, el aislamiento de las nuevas cepas desde aguas tratadas de Refinería La Rábida de CEPESA supone la ventaja añadida de la disponibilidad de un recurso acuoso económico al cual las microalgas identificadas están adaptadas, abriendo así la opción del uso de dicho recurso para el cultivo masivo de estas a la intemperie.

6.2. Estudios fisiológicos para la estimulación de la producción de lípidos de una microalga aislada de la Refinería La Rábida de CEPESA.

El objetivo del sexto Capítulo de esta Tesis es la obtención de conocimiento sobre las estrategias de estimulación de la acumulación de acilglicéridos en una microalga seleccionada durante el desarrollo de los trabajos. Se realizó una evaluación de la producción de tales lípidos útiles para producir biodiesel en cultivos de la microalga seleccionada, bajo la influencia de la alta irradiancia, de los efectos de la carencia nutricional de nitrógeno inorgánico y en condiciones heterotróficas (usando distintas fuentes de carbono orgánico). Adicionalmente, se realizó experimentación en cultivos a los que se adicionó el herbicida DCMU (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea), un inhibidor del fotosistema II, con el objetivo de

estudiar si a la síntesis de ácidos grasos puede contribuir la oxidación de reservas de carbono reducido.

En el Capítulo 5 de Resultados y Discusión de la Tesis se resumen los resultados de la investigación con cinco posibles microalgas que mostraban crecimiento más rápido y robusto. En este Capítulo 6 se estudió la evolución, en cámara de cultivo, del crecimiento de una de las microalgas seleccionadas (codificada como DEC1B e identificada como *Chlorella sp.*), en distintas condiciones de cultivo potencialmente adecuadas para favorecer la acumulación de acilglicéridos en las microalgas. La selección de esta especie se realizó entre las 5 estudiadas en el Capítulo 5 y se efectuó en base a los mejores datos de tasas de crecimiento y productividad de lípidos obtenidos y discutidos previamente en esta Tesis. Como ya se ha descrito en el primer epígrafe de este Capítulo 6, la microalga se identificó como una nueva estirpe perteneciente al género *Chlorella* y, posiblemente, a la especie *sorokiniana*.

El Capítulo se subdividirá en dos apartados, que son:

1. Estudio de la influencia de la combinación de alta irradiancia (LEDs) y carencia de nitrógeno en el medio de cultivo sobre la acumulación de lípidos útiles para la producción de biodiesel.
 2. Estudio de la influencia de condiciones heterotróficas en el crecimiento y en la acumulación de lípidos, particularmente ácidos grasos, obtenidos a partir del uso del precursor orgánico, acetato o glicerol. Estudio del efecto sinérgico de la carencia de nitrógeno y la heterotrofia.
- 6.2.1. Estudio de la influencia de la combinación de alta irradiancia y carencia de nitrógeno en el medio de cultivo sobre el crecimiento y la acumulación de lípidos

En este apartado se utilizó, como factor común en la experimentación con la microalga codificada como DEC1B e identificada

como *Chlorella sp.*, el uso de LEDs que suministraban una irradiancia de $1800 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ en la superficie de los cultivos. Estos fueron sometidos a dicha intensidad de luz en continuo durante cinco días de experiencia. Como se ha explicado en otros Capítulos de la Tesis, los cambios en la intensidad de la irradiancia pueden influir en la estimulación de la ruta de síntesis de lípidos. La transferencia de cultivos a una intensidad de luz significativamente más alta que aquella a la que están aclimatados, implica la incidencia de un repentino exceso de fotones no utilizado fotoquímicamente y de un exceso de poder reductor derivado del aumento de la actividad de la fase de luz de la fotosíntesis (Ho et al. 2011). Como se ha explicado en esta Tesis, el exceso de poder reductor encuentra en la biosíntesis de ácidos grasos una de las vías de disipación (Hu et al. 2008), evitando de este modo contribuir a incrementar el estrés oxidativo mediante excesiva actividad respiratoria endógena. Por lo tanto, se esperaba que la transferencia de los cultivos a alta irradiancia estimulase la acumulación de lípidos.

La carencia de nitrógeno produce dos efectos en las microalgas: (a) genera un desequilibrio en la asimilación de C y N, de modo que la síntesis de aminoácidos resulta negativamente afectada mientras el carbono se destina a incrementar la abundancia celular de carbohidratos y lípidos, y (b) produce estrés oxidativo, efecto escasamente mostrado en la literatura de microalgas y que ha sido evidenciado y discutido en esta Tesis para una microalga de ambiente ácido. Las situaciones de carácter físico-químico que producen estrés oxidativo en microalgas se han demostrado, en muchos casos, estimuladoras de la acumulación de lípidos. Así se ha publicado para el efecto producido por altas irradiancias o alta concentración de sal (Subramaniam et al. 2010, Salama et al. 2013, Wahidin et al. 2013).

Además de la intensidad, la calidad de la luz también juega un papel relevante en la tasa de crecimiento de las células (Ravelonandro et al. 2008, You y Barnett 2004). Se ha publicado que el crecimiento bajo la luz roja (600-700nm) podría intensificar la actividad del fotosistema II en relación con el fotosistema I, mientras que la luz azul (400-500nm) podría favorecer la actividad del fotosistema I (Ravelonandro et al. 2008, You y Barnett 2004). En este apartado de la Tesis se utilizaron paneles de luces

LEDs rojas de alta intensidad de luz, con el doble objetivo de estimular la acumulación de lípidos y de aumentar la actividad del fotosistema II, lo que aumentaría el estrés por oxígeno y el flujo fotosintético de electrones destinado a la producción de poder reductor, esencial para una mayor actividad anabólica de síntesis de ácidos grasos, como se ha discutido.

En definitiva, irradiación excesiva o carencia nutricional conducen -en el primer caso- a una sobre-reducción en la cadena de transporte de electrones de la fotosíntesis y -en ambos casos- a daños fotooxidativos (Foyer y Noctor 2000, Niyogi 1999). Muchos organismos autótrofos son capaces de canalizar el exceso de energía almacenándolo en forma de lípidos. Para numerosas especies de microalgas, entre ellas algunas pertenecientes a los géneros *Haematococcus* (Hu et al. 2008), *Chlorella* (Bar et al. 1995), *Scenedesmus* (Hanagata y Dubinsky 1999) y *Dunaliella* (Ben-Amotz et al. 1989), se han sugerido mecanismos fotoprotectores basados en síntesis de carotenoides secundarios y de lípidos de almacenamiento energético.

Adicionalmente a ambas condiciones de experimentación, se ha estudiado la influencia de aporte extra de CO₂ en el gaseo de los cultivos para conocer si se favorece la ruta de síntesis de lípidos. Como se explica en Materiales y Métodos, una de las condiciones de cultivo en cámara fue el empleo de aire enriquecido con CO₂ al 5% (v/v) como fuente de carbono, a excepción de los experimentos que usaban específicamente otra fuente orgánica como acetato o glicerol. En este apartado de la Tesis se estudia, por un lado, la combinación de la alta irradiancia y la carencia de nitrógeno en aire como única fuente de carbono inorgánico, y por otro lado se ha evaluado el efecto de la adición extra del 5% de CO₂ en la aireación.

Por último, se muestran en este apartado de Tesis resultados de experimentación en cultivos a los que se adicionó DCMU. Benemann et al. (1973) utilizaron inhibidores del PSII como DCMU para detener la producción de oxígeno en microalgas, produciendo así condiciones anóxicas. Esta idea fue entonces usada por varios autores (Zhang y Melis 2002, Fouchard et al. 2005) para obtener conocimiento que permitió entender mejor las dos principales vías metabólicas de producción de

hidrógeno, es decir, la vía PSII dependiente de la propia actividad del fotosistema, donde los electrones proceden directamente de la división de las moléculas de agua, y la vía vinculada al catabolismo de sustratos endógenos como el almidón, fuente adicional de electrones. El inconveniente de los inhibidores como DCMU es su efecto irreversible sobre la actividad del PSII. El objetivo de la utilización de DCMU es intentar determinar si la microalga seleccionada puede utilizar reservas de electrones almacenados como carbono reducido (carbohidratos), para incrementar la síntesis de ácidos grasos.

Para abordar la experimentación planificada, previamente se cultivó la especie seleccionada en condiciones estándar, es decir, con plenitud de nutrientes proporcionados con el medio *Sueoka* ya descrito en Materiales y Métodos, intensidad de luz de cámara de cultivo ($140 \mu\text{mol foton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de PAR) emitida por tubos fluorescentes de luz blanca, temperatura de 25°C y gaseo constante, cuya fuente de carbono se suministraba burbujeando los cultivos con una mezcla de aire procedente de un compresor y enriquecida, o no, según las condiciones de experimentación, en CO_2 al 5% (v/v). Dicha mezcla se conseguía adicionando a la corriente de aire CO_2 que tenía una pureza del 99,997%. Estos cultivos son los llamados *cultivos control*. Una vez preadaptados, tras al menos cinco días de cultivo estos se recogieron por centrifugación, se lavó la biomasa y se inocularon nuevos cultivos en las distintas condiciones de incubación previstas, con una concentración de biomasa seca inicial de $0,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. El volumen de los sistemas de cultivo, descritos en Materiales y Métodos, fue de 6 L.

Los primeros resultados que se muestran corresponden a los experimentos de incubación de la microalga seleccionada, en las siguientes condiciones: (a) cultivos control transferidos desde la irradiancia de la cámara de cultivo a alta intensidad de luz ($1800 \mu\text{mol foton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y en carencia de nitrógeno inorgánico; (b) cultivos control transferidos a alta intensidad de luz, en carencia de nitrógeno inorgánico y en limitación de carbono inorgánico (sólo aire); y (c) cultivos control transferidos a alta intensidad de luz, carencia de nitrógeno inorgánico y DCMU, en concentración $10 \mu\text{M}$, adecuada según experiencias previas y

aportaciones de la literatura del campo para mantener los cultivos viables (Zhang et al. 2002, Fouchard et al. 2005).

La Figura 6.1 muestra la evolución del ratio de absorbancias a 680 y 750nm y la evolución del peso seco de la microalga seleccionada, a lo largo de 96h de experimentación. En el Capítulo anterior de la Tesis se detalla que el ratio de absorbancias aporta información sobre la viabilidad de los cultivos a través de los cambios relativos producidos en el contenido de clorofilas (680 nm) y en la concentración de biomasa (750 nm), tras la incubación de los cultivos de microalgas bajo las distintas condiciones de estimulación de lípidos.

Para los cultivos de la microalga se observa que, tras la incubación en cualquiera de las tres condiciones elegidas para conocer las diferencias en la estimulación de síntesis de lípidos, el ratio 680/750 se mantiene en una cierta tendencia descendente y constante durante el tiempo de la experiencia. Los datos de peso seco observados en la gráfica inferior muestran una cierta tendencia creciente durante las primeras 48 h, disminuyendo hasta aproximadamente el 50 % de los valores iniciales tras 96 h de experiencia. Los factores comunes en todas las condiciones experimentales, la alta irradiancia y la carencia de nitrógeno, conllevan el cese del crecimiento, que comienza a observarse de manera efectiva tras el agotamiento de las reservas intracelulares de nitrógeno, responsables de un cierto incremento de biomasa durante las primeras horas tras el inicio del periodo de carencia. El cese del crecimiento se observa también en la estabilización del número de células del cultivo transcurridas 48 h (datos no mostrados). El ligero descenso de la relación de absorbancias paralelo al aumento de peso seco de los cultivos evidencia un aclaramiento de estos derivado del cese de la síntesis de clorofila y su degradación, consecuencias inmediatas de la carencia de nitrógeno impuesta.

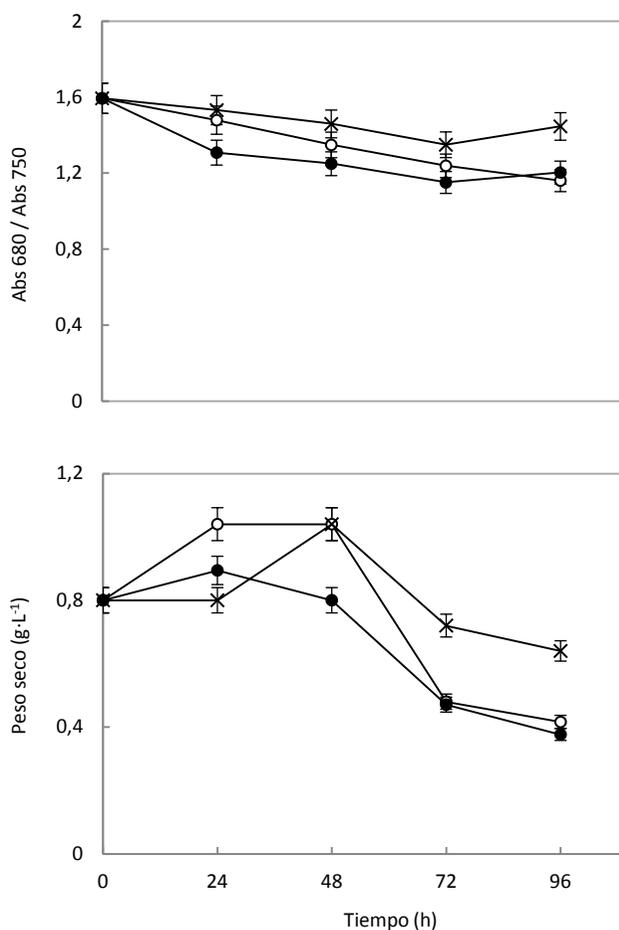


Figura 6.1. Evolución del ratio de absorbancias a 680 nm y 750 nm y del peso seco de la microalga seleccionada, en cultivo baño bajo alta irradiancia y otras condiciones de estrés. El gráfico superior representa la evolución del ratio de absorbancias a 680/750nm, y el gráfico inferior muestra la evolución del peso seco de la microalga. Cultivos incubados en condiciones estándar descritas en Materiales y Métodos, se centrifugaron, lavaron y resuspendieron en medio de cultivo para su incubación bajo las siguientes condiciones: alta irradiancia usando luces LEDs ($1800 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y: carencia nitrógeno en el medio de cultivo (-o-), carencia de nitrógeno más aire (-●-), o carencia de nitrógeno y DCMU $10 \mu\text{M}$ (-X-), respectivamente.

Los resultados de la Figura ponen de manifiesto hechos que se describen en la literatura científica y que son comunes en cultivos de microalgas incubados en alta intensidad de luz y carencia de nitrógeno inorgánico (Guschina y Harwood 2006, Hu et al. 2008, James et al. 2011). Los hechos comunes son: (1) Cese de la división celular transcurridas 48-72 h desde el inicio de la situación de carencia; (2) Aumento del tamaño

de las células tras 24-48h, observándose en algunos casos morfología celular anormal (James et al. 2011); (3) Autólisis con liberación de cuerpos lipídicos.

En la experimentación realizada en esta Tesis, apenas se ha observado morfología anormal en las células de la microalga bajo carencia de nitrógeno, pero sin embargo puede sospecharse la existencia de autólisis a partir del tercer día, aproximadamente, basándonos en el hecho de que el marcado descenso del peso seco de biomasa se ve acompañado de un ligero incremento en la relación de absorbancias, sugiriendo que el contenido en clorofilas en el cultivo desciende de modo menos rápido que el número de células y que, en coherencia, aquellas habrían sido parcialmente liberadas en procesos de rotura celular. La autólisis sería consistente con un debilitamiento de la pared celular derivado de la carencia de nitrógeno inorgánico (James et al. 2011). Estos resultados sugerirían que la recuperación de biomasa para la extracción de lípidos, en esta experimentación de la Tesis, podría no ser conveniente transcurridas más de 72 h desde el inicio de las condiciones de estrés. En la experimentación realizada no se observó la presencia de cuerpos lipídicos en los medios de cultivo.

Se determinó el contenido en clorofilas por célula y por volumen de cultivo (únicamente el contenido derivado de la clorofila existente en la biomasa centrifugada, no en el medio de cultivo). La Figura 6.2 (superior) presenta la evolución en el tiempo de la concentración de clorofila celular referida a volumen de los cultivos. Como se ha indicado, estos fueron incubados bajo alta irradiancia y: (a) carencia de nitrógeno, (b) carencia de nitrógeno y limitación de CO₂, o (c) carencia de nitrógeno y adición del inhibidor DCMU. Tras 24 h de exposición con LEDs y las condiciones adicionales ya mencionadas, la tendencia en la evolución de las clorofilas es descendente, tanto en el contenido referido a peso seco como a volumen de cultivo, siendo más aguda en este último caso y, particularmente, cuando comienza el descenso del peso seco en los cultivos. Estos datos son consistentes con la pérdida de biomasa en el tiempo derivada del cese del crecimiento, observándose los descensos de clorofila intracelular esperables correspondientes a la carencia de

nitrógeno (situaciones b y c) y a la irradiancia fotoinhibitoria (situación a).

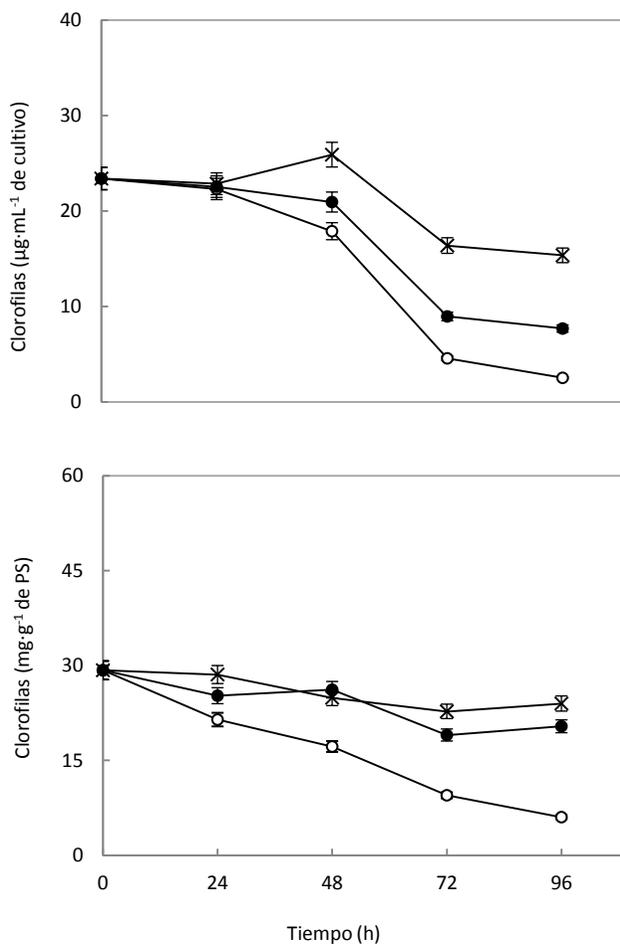


Figura 6.2. Evolución de la concentración de clorofilas de la microalga seleccionada, en cultivo bañó bajo alta irradiancia y otras condiciones de estrés. El gráfico superior representa la evolución de la concentración de clorofila celular referida a volumen de cultivo de la microalga, y el gráfico inferior muestra la evolución de la concentración de clorofila celular referida a peso seco de la microalga. Cultivos incubados en condiciones estándar descritas en Materiales y Métodos, se centrifugaron, lavaron y resuspendieron en medio de cultivo para su incubación bajo las siguientes condiciones: alta irradiancia usando luces LEDs ($1800 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$): carencia nitrógeno en el medio de cultivo (-o-), carencia de nitrógeno más aire (-●-), o carencia de nitrógeno y DCMU 10 μM (-X-), respectivamente.

Por tanto, una de las consecuencias derivadas de la aplicación simultánea de alta intensidad de luz y carencia de nitrógeno a los cultivos de la microalga es el descenso del contenido celular en clorofilas, que se

produce, particularmente, de manera inmediata desde el inicio de la incubación bajo las citadas condiciones de cultivo. Comparando las tendencias del contenido intracelular de clorofila y del peso seco en todos los cultivos desde dicho momento inicial, se observan evoluciones contrarias en las primeras 48h. Si bien la ausencia de nitrógeno inorgánico impide la síntesis de clorofila, el cese inmediato de su producción no es consistente con el aumento inicial del peso seco en el cultivo. Los resultados son diferentes a lo publicado por otros autores con varias especies de microalgas sometidas a carencia de nitrógeno (Yantao et al. 2010, James et al. 2011).

El distinto comportamiento en el caso de *Chlorella sp.* (posible *sorokiniana*) podría estar relacionado, a nuestro juicio, con el ajuste rápido del tamaño de la antena de clorofila del fotosistema II para disipar parte del excesivo flujo de fotones que no tendrá destino fotoquímico y que, por tanto, contribuiría a incrementar el estrés oxidativo y los problemas de fotoinhibición de la fotosíntesis (Osmond et al. 1997).

Tales fenómenos son propios de cultivos expuestos a intensidades de luz muy altas. Anteriormente ya se ha utilizado el término *intensidad de luz saturante*, intensidad que depende de la especie y del estado del cultivo del organismo fotosintético. La intensidad de luz saturante es la máxima intensidad de luz que puede gestionar el aparato fotosintético para obtener alto rendimiento fotoquímico. Su valor es variable entre 50 y 500 $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ para la mayoría de algas (Goldman 1979). La alta intensidad de luz aplicada en este apartado de Tesis es similar a las condiciones de radiación solar a mediodía en el sur de España, medida en la costa onubense (ESAT, INTA), entre 4 y 40 veces la intensidad de luz saturante de muchas especies.

Los pigmentos fotosintéticos, tales como clorofilas y carotenoides, absorben energía en los complejos colectores alrededor de los centros de reacción (Hu y Schulten 1997). Sin embargo, si las células fotosintéticas absorben más luz que la demandada por su capacidad fotosintética, este exceso de energía produce una sobre-reducción de la cadena de transporte de electrones, genera mayor poder reductor en fotosíntesis, demanda mayor cantidad de oxígeno para satisfacer la respiración

endógena, produce mayor cantidad de oxígeno en el fotosistema II e incrementa de esta manera el estrés oxidativo. En estas situaciones, la célula de la microalga tiende a minimizar los daños disminuyendo el tamaño de la antena (Kim y Lee 2001) y disminuyendo así la disipación no fotoquímica de luz, lo que justificaría un rápido descenso en el contenido intracelular de clorofilas en cultivos viables. Particularmente, no se ha encontrado en esta Tesis una explicación satisfactoria al hecho observado de un descenso más acentuado en el contenido intracelular de clorofilas del cultivo en alto CO₂.

Desde la perspectiva de la biosíntesis de lípidos, una de las principales consecuencias fisiológicas de los eventos descritos en alta intensidad de luz debería incluir una biosíntesis más activa de carotenoides, al menos en las primeras 48 h y como respuesta al aumento de estrés oxidativo (Solovchenko et al. 2013), y un aumento de la biosíntesis de lípidos neutros, útiles para la obtención de FAMES (Liu J. et al. 2012) pues sería esperable que la sobreproducción de poder reductor fuese parcialmente disipada en procesos anabólicos de alta demanda de NAD(P)H, minimizando así el aumento del estado oxidativo celular derivado de la alta actividad oxidativa mitocondrial (Hu et al. 2008).

Acumulación de carotenoides.

Se analizó, por tanto, la variación del contenido de carotenoides celulares referido a peso seco en la microalga objeto de estudio, incubada en las distintas condiciones descritas en este apartado de la Tesis. La siguiente Figura 6.3 (superior) muestra la evolución, a lo largo del experimento, de la concentración de carotenoides celulares referida a volumen de los cultivos de la *Chlorella sorokiniana* aislada de la Refinería CEPESA y sometida a alta irradiancia (LEDs) junto con las otras condiciones de incubación: carencia de nitrógeno, sin CO₂ añadido y presencia del inhibidor DCMU. La concentración de carotenoides por volumen de cultivo comienza a disminuir pasadas las 48 h de experiencia, descenso coherente con la pérdida de peso seco de microalgas en el cultivo ya discutida con anterioridad. La Figura 6.3 (inferior) presenta la evolución en

el tiempo de la concentración de carotenoides celulares referida a peso seco de *Chlorella sorokiniana* de la experiencia comentada.

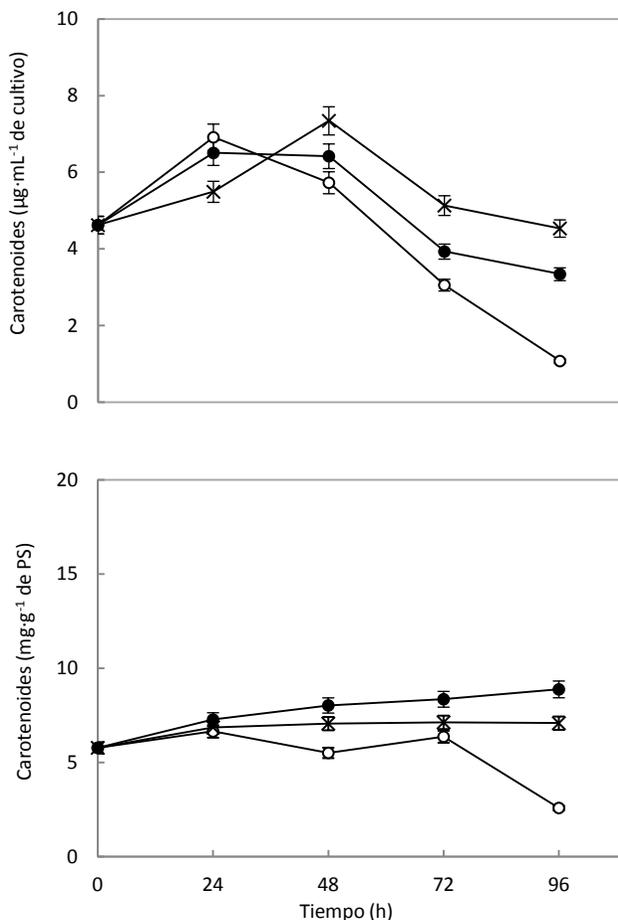


Figura 6.3. Evolución de la concentración de carotenoides de la microalga seleccionada, en cultivo baño bajo alta irradiancia y otras condiciones de estrés. El gráfico superior representa la evolución de la concentración de carotenoides celulares referida a volumen de cultivo de la microalga, y el gráfico inferior muestra la evolución de la concentración de carotenoides celulares referida a peso seco de la microalga. Cultivos incubados en condiciones estándar descritas en Materiales y Métodos, se centrifugaron, lavaron y resuspendieron en medio de cultivo para su incubación bajo las siguientes condiciones: alta irradiancia usando luces LEDs ($1800 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y: carencia nitrógeno en el medio de cultivo (-○-), carencia de nitrógeno y más aire (-●-), o carencia de nitrógeno y DCMU $10 \mu\text{M}$ (-X-), respectivamente. PS: peso seco.

Los resultados muestran una tendencia ligeramente contraria a los observados en la Figura 6.2 (inferior) correspondientes a la concentración de clorofila celular referida a peso seco: en todas las

condiciones experimentales, el contenido de carotenoides celulares referido a peso seco tiende a aumentar ligeramente y, en el caso menos favorable, a permanecer constante, durante el tiempo de experimentación. En dos de las condiciones ensayadas, la concentración de carotenoides celulares referida a peso seco aumenta de manera notable, alcanzando valores incluso cercanos al doble de los iniciales. Esta evolución se produce a pesar del descenso del peso seco en el cultivo producido por condiciones de estrés incompatibles con el crecimiento. Dicha respuesta, una biosíntesis más intensa de carotenoides, es característica en determinadas situaciones de estrés oxidativo (Gouveia et al. 1996, Bonente et al. 2012).

El aumento significativo de la concentración de carotenoides celulares referida a peso seco no tiene, esencialmente, una función de captura de luz como lo prueba el hecho de que el contenido de clorofila celular referido a peso seco no se incrementa. La necesidad de captura de luz para la actividad fotosintética implica un incremento del número de complejos colectores de luz y, con ello y simultáneamente, de las moléculas de clorofila y carotenoides asociadas a la estructura de dichos complejos (Dubinsky y Stambler 2009), lo que no se observa en la experimentación realizada, poniendo en evidencia una posible respuesta a estrés oxidativo.

Se analizó la evolución de los dos carotenoides mayoritarios de la microalga estudiada, *Chlorella sp.* La Figura 6.4 representa la evolución de la concentración de luteína (superior) y β -caroteno (inferior) a lo largo de 96 h de incubación bajo las diferentes condiciones impuestas a los cultivos en medio líquido. En general, se observa que la acumulación de luteína tiende a aumentar con el tiempo transcurrido en las diferentes condiciones de estrés, mientras que el nivel intracelular de β -caroteno se mantiene aproximadamente constante. Tras 4 días de incubación en condiciones incompatibles con el crecimiento, el contenido celular de ambos pigmentos inicia una tendencia descendente, probable consecuencia de las condiciones limitantes de cultivo que impiden el mantenimiento de la actividad anabólica básica de la microalga, como demuestran los valores de actividad fotosintética de los cultivos, que

disminuyen desde máximos de 450-500 $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ clorofilas hasta valores alrededor de 150-200 $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ clorofilas, tras 72 h.

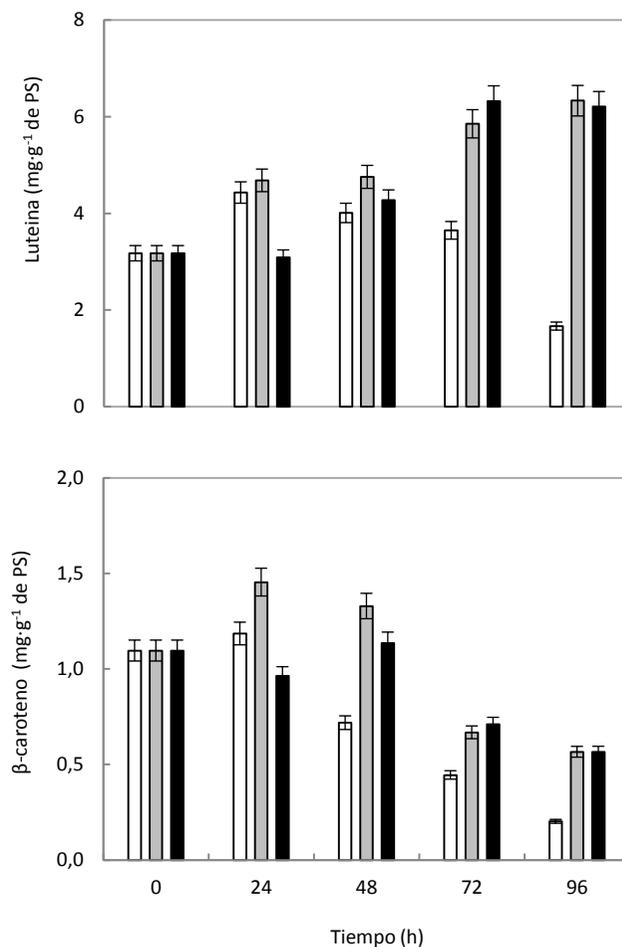


Figura 6.4. Evolución de la concentración de luteína y β-caroteno de la microalga seleccionada, en cultivo baño bajo alta irradiancia y otras condiciones de estrés. La gráfica superior representa la concentración intracelular de luteína y la inferior muestra la concentración intracelular de β-caroteno, de la microalga seleccionada. Cultivos de la microalga incubados en condiciones estándar descritas en Materiales y Métodos se centrifugaron, lavaron y resuspendieron en medio de cultivo para su incubación bajo condiciones de alta irradiancia usando luces LEDs ($1800 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) y bajo las siguientes condiciones adicionales: carencia de nitrógeno inorgánico en el medio de cultivo (barra blanca), carencia de nitrógeno más aire (barra gris), o carencia de nitrógeno más $10 \mu\text{M}$ del inhibidor DCMU (barra negra), respectivamente. Los datos de lípidos totales se expresan en gramos respecto a peso seco (PS) de la microalga.

Los carotenoides fotosintéticos están asociados a la membrana del tilacoide y en los organismos fotosintéticos ejercen funciones de captura de luz y de protección frente al daño fotooxidativo y estructural que pueda producirse en el aparato fotosintético (Ladygin y Shirshikova 2006) durante la incidencia de alta irradiancia o de incrementos notables de la misma. Entre sus funciones, diversos autores explican la actividad que ejercen los carotenoides en la disipación del exceso de PAR (Ben-Amotz et al. 1989, Solovchenko y Merzlyak 2008) y en la detoxificación del exceso de ROS (Lemoine y Schoefs 2010). De acuerdo con las condiciones experimentales aplicadas y con los efectos fisiológicos producidos por ROS en las microalgas, la biosíntesis más activa de luteína debiera estar ligada, en buena lógica, a estas últimas funciones de detoxificación.

Acumulación de lípidos totales y de ácidos grasos.

Se evaluó también la acumulación de lípidos, que como se mencionó con anterioridad sería, en principio, una de las respuestas de la microalga esperable en las situaciones de estrés aplicadas.

La Figura 6.5 muestra el contenido en lípidos totales respecto al peso de la microalga, incubada en alta irradiancia y: bajo carencia de nitrógeno, bajo carencia de nitrógeno y ausencia del aporte adicional de CO₂, o bajo carencia de nitrógeno más el inhibidor del PSII, DCMU. Como se observa en la Figura, la microalga incrementa la concentración intracelular de lípidos, en distinta medida, bajo las tres condiciones de incubación, alcanzándose mayor porcentaje de lípidos respecto a peso seco en los cultivos incubados en condiciones de carencia de nitrógeno y presencia del inhibidor DCMU. La máxima concentración se observa a las 48 y 72 h de exposición de los cultivos a tales condiciones, disminuyendo con posterioridad.

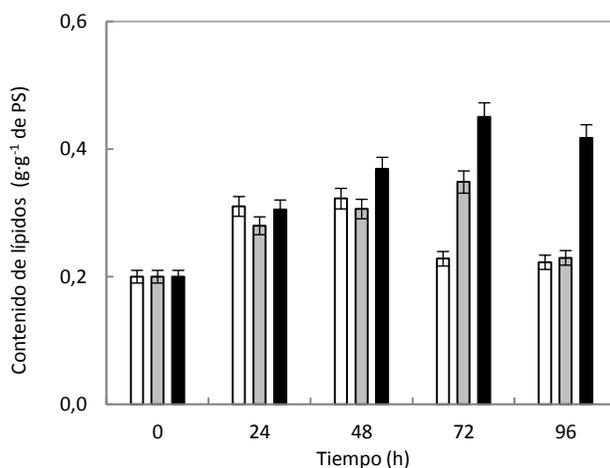


Figura 6.5. Contenido de lípidos totales de la microalga seleccionada, en cultivo baño bajo alta irradiancia y otras condiciones de estrés. Cultivos incubados en condiciones estándar descritas en Materiales y Métodos, se centrifugaron, lavaron y resuspendieron en medio de cultivo para su incubación bajo condiciones de alta irradiancia usando luces LEDs ($1800 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y bajo las siguientes condiciones adicionales: carencia nitrógeno inorgánico en el medio de cultivo (barra blanca), carencia de nitrógeno más aire (barra gris), o carencia de nitrógeno más $10 \mu\text{M}$ del inhibidor DCMU (barra negra), respectivamente. Los datos de lípidos totales se expresan como contenido en gramos respecto a peso seco (PS) de la microalga.

La Figura 6.6 representa el contenido de ácidos grasos metilados a partir de una determinada cantidad de lípidos totales de la microalga. Se observa que la tendencia principal es la disminución de la concentración de FAMES respecto al contenido de lípidos totales, transcurrido el tiempo de incubación bajo las tres condiciones de estudio. No obstante, durante las primeras 24h se observa un ligero aumento en la fracción de FAMES en las muestras correspondientes a los cultivos sometidos a incubación con aire, por tanto con menor disponibilidad de carbono, uno de ellos, además, en presencia de DCMU. Tras 24 h se produce una disminución muy notable en la fracción de FAMES del contenido de lípidos totales de la microalga, en todos los cultivos. El máximo contenido en FAMES respecto al total de lípidos extraídos se sitúa alrededor del 60%, tras 24h en las condiciones de estrés mencionadas –ausencia de nitrógeno inorgánico, alta intensidad de luz, aire como fuente de carbono y DCMU–.

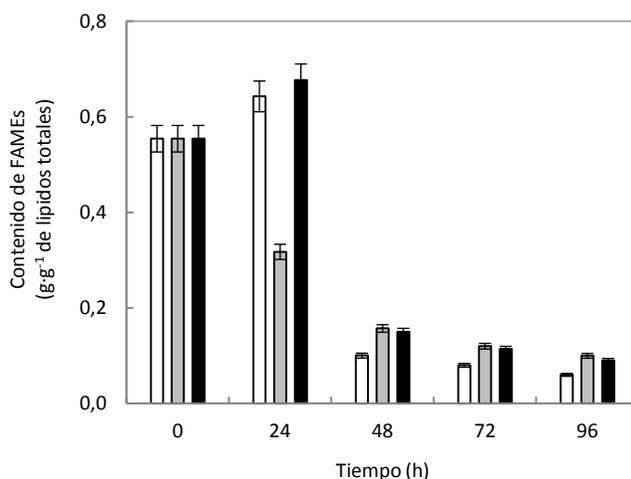


Figura 6.6. Contenido de FAMES de la microalga seleccionada, en cultivo baño bajo alta irradiancia y otras condiciones de estrés. Cultivos incubados en condiciones estándar descritas en Materiales y Métodos, se centrifugaron, lavaron y resuspendieron en medio de cultivo para su incubación bajo condiciones de alta irradiancia usando luces LEDs ($1800 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y bajo las siguientes condiciones adicionales: carencia nitrógeno de inorgánico en el medio de cultivo (barra blanca), carencia de nitrógeno más aire (barra gris), o carencia de nitrógeno más $10 \mu\text{M}$ del inhibidor DCMU (barra negra), respectivamente. Los datos de FAMES se expresan en gramos de lípidos totales metilados respecto a los gramos totales de lípidos obtenidos por extracción en soxhlet.

La siguiente Figura 6.7 representa los valores máximos obtenidos de lípidos totales y FAMES respecto a peso seco en las tres condiciones de incubación bajo alta irradiancia. Estos valores no coinciden en el tiempo, es decir, los máximos valores de lípidos se obtienen tras 48 y 72 h de incubación, mientras que los máximos en FAMES se alcanzaron tras las primeras 24 h de experimentación, cayendo drásticamente después.

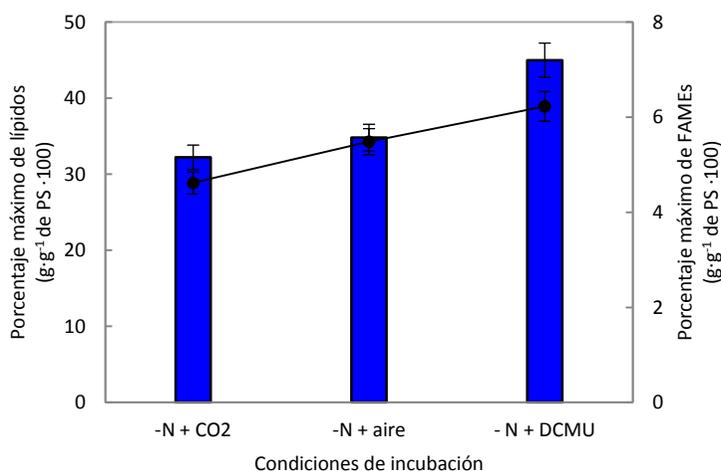


Figura 6.7 Máximo porcentaje intracelular de lípidos totales y FAMES de la microalga seleccionada, en cultivo baño bajo alta irradiancia y otras condiciones de estrés. La Figura representa el porcentaje intracelular máximo de lípidos (barras) y el porcentaje intracelular máximo de FAMES (-●-) de la microalga. Cultivos incubados en condiciones estándar descritas en Materiales y Métodos, se centrifugaron, lavaron y resuspendieron en medio de cultivo para su incubación bajo condiciones de alta irradiancia usando luces LEDs ($1800 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y bajo las siguientes condiciones adicionales: carencia nitrógeno inorgánico en el medio de cultivo, carencia de nitrógeno más aire, o carencia de nitrógeno más $10 \mu\text{M}$ del inhibidor DCMU, respectivamente. Los datos de lípidos se expresan como gramos de lípidos respecto a gramos de peso seco y los datos de FAMES como gramos de lípidos totales metilados respecto a los gramos totales de peso seco.

La Tabla 6.2 muestra el porcentaje de abundancia relativa de los principales ácidos grasos integrados por cromatografía de gases respecto al total de ácidos grasos identificados. Los datos se obtuvieron tras 72 h de incubación en las diferentes condiciones ya indicadas.

Ya se ha explicado que las microalgas tienden a acumular triacilglicéridos en situaciones de estrés como alta intensidad de luz y carencia de nutrientes (Guschina y Harwood 2006; Hu et al. 2008, James et al. 2011). El flujo de carbono inorgánico fijado por la fotosíntesis se reparte entre la biosíntesis de almidón y de lípidos. De hecho, las rutas de biosíntesis de almidón y de lípidos comparten intermediarios comunes de 3 átomos de carbono procedentes de la fijación fotosintética de carbono en el ciclo de Calvin (Work et al. 2012). Este hecho se demostró mediante la obtención de mutantes de *Chlamydomonas* en la biosíntesis de almidón, observándose en tales mutantes una desviación hacia la biosíntesis de lípidos del flujo de carbono en condiciones autotróficas y

fotoheterotróficas, no así en heterotrofia (Wang et al. 2009, Li et al. 2010).

Tabla 6.2. Composición de ácidos grasos principales de FAMES de la microalga seleccionada, en cultivo baño bajo alta irradiancia y otras condiciones de estrés. Los valores fueron expresados como porcentaje de abundancia relativa al total de ácidos grasos integrados por cromatografía de gases, tras 72 h de incubación bajo alta irradiancia ($1800 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y las condiciones adicionales indicadas.

Ácidos grasos principales	Carencia de nitrógeno	Carencia de nitrógeno más aire	Carencia de nitrógeno y $10 \mu\text{M DCMU}$
Saturados			
C16:0	36,70	36,21	18,17
C17:0	0,50	3,14	3,11
C18:0	0,3	0,5	0,4
Mono-insaturados			
C16:1	15,70	18,54	15,17
C18:1	60,10	39,37	48,26
C 24:1	0,6	0,50	9,34
Poli-insaturados			
C18:2	0,9	2,73	6,00

La experimentación realizada pone de manifiesto que la cantidad de lípidos totales acumulada por la microalga bajo las condiciones de estrés aplicadas, alta irradiancia y carencia de nitrógeno inorgánico, no está determinada, aparentemente, por la concentración de dióxido de carbono disponible (Figura 6.7). Así se infiere de los resultados obtenidos en cultivos incubados en aire, y en aquellos incubados en aire suplementado con dióxido de carbono, no observándose diferencias relevantes entre ambas condiciones en la cinética de lípidos totales acumulados por la microalga en carencia de nitrógeno inorgánico. Los resultados de peso seco de ambos cultivos (Figura 6.1) ya revelaron que la mayor disponibilidad de dióxido de carbono no daba lugar a mayores rendimientos de biomasa en la condición de carencia de nitrógeno – apenas un 10% de diferencia-, probable consecuencia de los efectos negativos de esta sobre la fotosíntesis y, por tanto, sobre la generación de

poder reductor para mantener una fijación de carbono muy activa (Deng et al. 2011). Esto sería coherente con el hecho de que la cantidad de lípidos acumulados por *Chlorella* en carencia de nitrógeno aumente y sea similar con independencia de la concentración de carbono inorgánico disponible, sugiriendo que la inhibición de la fotosíntesis actuaría como inductora de la acumulación de reserva de carbono en forma de lípidos (Liu W. et al. 2012).

Cuando se utilizó el inhibidor del fotosistema II, DCMU, para bloquear por completo la producción de poder reductor en la cadena de transporte electrónico, la cantidad de lípidos acumulada por *Chlorella* aumentó significativamente. Considerando que la variación, a lo largo de la experimentación, del peso seco de los cultivos con DCMU no es diferente de la observada para los otros cultivos, se deduce que el aumento de lípidos debería proceder, en buena lógica, de la conversión de reservas de carbono de la célula, puesto que no se utilizaron fuentes de carbono reducido añadidas al carbono inorgánico disponible con el gaseo. Los cultivos con DCMU pondrían de manifiesto que la acumulación de lípidos en la *Chlorella* seleccionada y cultivada bajo alta irradiancia y en carencia de nitrógeno no dependería de la cantidad de carbono inorgánico disponible y sugeriría, al mismo tiempo, que parte de dicho carbono podría proceder de reservas de carbono reducido de la microalga.

El contenido en lípidos totales y el contenido en FAMES evolucionan de manera contraria; mientras el primero muestra una cierta tendencia a aumentar en las primeras 72 h de incubación de los cultivos en carencia de nitrógeno, el segundo tiende a descender de forma drástica tras las primeras 24 h de incubación. Estos resultados sugieren que la incubación de los cultivos de la microalga en carencia de nitrógeno afecta a la actividad de las rutas de biosíntesis de lípidos de manera diferenciada, de modo que la acumulación de acilglicéridos estaría favorecida sólo en el corto plazo, durante 24h, tornándose a partir de entonces más activa la biosíntesis de otros lípidos. Según refiere la bibliografía, la síntesis de acilglicéridos estaría favorecida para numerosas microalgas cuando estas se cultivan en carencia de nitrógeno (Wang et al. 2009, Li et al. 2010), si bien los acilglicéridos constituirían tan sólo una

fracción del total de lípidos que variaría con el tiempo de incubación en las condiciones elegidas y que incluiría también esteroides y ésteres de esteroides (Li et al. 2010 y 2011). Según dichos trabajos, los acilglicéridos constituirían, como máximo, entre un 30% y un 60% del total de lípidos acumulados.

Los resultados discutidos plantean la posibilidad de que la heterotrofia pudiese resultar adecuada para estimular la acumulación de lípidos totales en la microalga objeto de estudio. Para ello se desarrolló la experimentación que se muestra y discute en el siguiente apartado.

6.2.2. Estudio de la influencia de condiciones heterotróficas sobre el crecimiento y la acumulación de lípidos a partir del uso de un precursor orgánico, acetato o glicerol. Estudio del efecto sinérgico de la carencia de nitrógeno y la heterotrofia.

Los resultados obtenidos previamente con *Chlorella* bajo condiciones autótrofas y en carencia de nitrógeno sugerían que la heterotrofia podría resultar adecuada para aumentar el contenido intracelular de lípidos de la microalga.

Por ello, se planteó el siguiente bloque de experimentos, en el cual se utilizan precursores de carbono orgánico para estimular la biosíntesis de acilglicéridos y conseguir un mayor conocimiento sobre la acumulación de lípidos en la microalga objeto de estudio. El factor común en todos los cultivos es la incubación bajo oscuridad. La heterotrofia presenta ventajas frente a las condiciones autótrofas, y es que las condiciones heterotróficas contribuyen a la disminución de costes en la producción de lípidos de microalgas. En heterotrofia, las microalgas se cultivan en condiciones de oscuridad y la fuente de carbono es orgánica, tales como azúcares y ácidos orgánicos. La glucosa, acetato o glicerol son ejemplos de posibles fuentes orgánicas de carbono útiles en cultivos heterótrofos. La heterotrofia elimina la necesidad de luz y, por lo tanto, ofrece la posibilidad de aumentar la densidad celular y la productividad de biomasa y de lípidos en microalgas, al margen de la eventual mayor o menor disponibilidad de luz (Chen 1996, Xu et al. 2006, Li et al. 2007).

Además, la adición de carbono en forma de CO₂ es menos económica en comparación con el uso de fuentes de carbono reducido, siempre que estos sustratos procedan de desechos de otras actividades industriales y no incrementen, por lo tanto, los costes de producción de la biomasa algal.

Se ha expresado en esta Tesis que el crecimiento autotrófico se caracteriza principalmente porque los microorganismos, al ser fotosintéticos, son capaces de capturar la energía solar y transformarla en productos de valor a partir de moléculas naturales y sencillas como el CO₂ y H₂O (Carvalho et al. 2006), además de contribuir a la reducción global del CO₂. Sin embargo, con este modo de cultivo la consecución de altas densidades celulares y su mantenimiento en el tiempo depende de algunos factores que requieren de un control preciso. Por ejemplo, la penetración de la luz es inversamente proporcional a la concentración celular (Chen y Johns 1991, 1995) y el sombreado de la propia biomasa afecta negativamente a la fijación de dióxido de carbono y, por tanto, a la productividad de las moléculas objeto de producción (Martinez y Orus 1991). Además, los costes del cosechado dependen de la productividad de los cultivos (Wen y Chen 2003), por lo que una productividad variable encarece el proceso e, incluso, bajas densidades celulares pueden hacer el cosechado inviable. En consecuencia y como ya se detalló en el apartado de Introducción, la heterotrofia ofrece algunas ventajas que pueden hacerla competitiva para la producción de biomasa en comparación con la autotrofia, dependiendo de géneros y especies.

Chlorella aparece como uno de los géneros con mayor número de especies con capacidad metabólica para crecer en heterotrofia con alta productividad (Pérez-García et al. 2011). Dado que la microalga finalmente seleccionada para los trabajos mostrados en este Capítulo de la Tesis pertenece al género *Chlorella* y considerando los resultados obtenidos en luz, se realizaron experimentos para evaluar la acumulación de lípidos de la microalga en heterotrofia.

Para la condición de heterotrofia estudiada en este apartado, se eligieron dos fuentes de carbono orgánico, acetato y glicerol. Ambas son moléculas usadas en heterotrofia con microalgas (Bollman y Robinson 1977, Richmond 1986) y, en particular, el glicerol es recientemente usado

en este tipo de experiencias por ser un subproducto derivado de los procesos de producción de biodiesel. Bio-Oils es una Empresa dedicada a la obtención de biodiesel a partir de aceites vegetales y es una de las entidades colaboradoras en el proyecto, liderado por CEPESA, que ha dado lugar a los resultados de este apartado de la Tesis. Bio-Oils produce, por tanto, glicerol a gran escala. La utilización del glicerol como fuente de carbono en procesos heterotróficos de obtención de la biomasa algal implicaría una reducción en los costes de producción de biomasa de microalgas a mayor escala, en un eventual proceso de obtención masiva de biodiesel de microalgas vinculado a las propias infraestructuras de una Empresa de obtención de dicho combustible a partir de aceites vegetales. Por su parte, el acetato se ha demostrado eficiente en la producción heterótrofa de biomasa de microalgas, habiéndose realizado durante décadas extensa investigación al respecto (Bollman y Robinson 1977, Pérez-García et al. 2011). Por esta razón se ha elegido como fuente de carbono control en las experiencias en heterotrofia.

Los experimentos de estimulación de la acumulación de lípidos en los cultivos de *Chlorella sp.* se realizaron en ausencia de fuente de carbono inorgánico. Para ello, los cultivos se burbujearon con aire que se hacía pasar por una trampa de KOH 3 M para asegurar la eliminación de todo el CO₂. Con el uso de acetato se utilizó, adicionalmente, la condición de carencia de nitrógeno inorgánico para analizar si la limitación nutricional incrementaba el contenido en lípidos totales y/o FAMES. Todos los inóculos procedían de cultivos madre de la especie seleccionada, *Chlorella sp.*, crecidos en condiciones estándar descritas en Materiales y Métodos, con plenitud de nutrientes proporcionada con el medio *Sueoka*, intensidad de luz de cámara de cultivo (140 μmol fotones·m⁻²·s⁻¹ de PAR), temperatura de 26 °C y gaseo constante burbujearando los cultivos con una mezcla de aire enriquecida en CO₂ al 5% (v/v). Se recogió biomasa de cultivos en fase exponencial y con ella se inocularon nuevos cultivos en las distintas condiciones de incubación heterotrófica, con una concentración de biomasa seca inicial de 0,5 g·L⁻¹ en todos los recipientes. La condición de oscuridad se verificó con el fotómetro descrito en Materiales y Métodos. Finalmente, se incluyó un cultivo en carencia de nitrógeno, en oscuridad y con CO₂, como control para la acumulación de lípidos en los

cultivos con acetato y en carencia de nitrógeno. A continuación se presentan todos los resultados obtenidos en estas experiencias.

La Figura 6.8 muestra, en la parte superior, la evolución del ratio de absorbancias a 680 y 750 nm. Este factor representa valores relacionados con la evolución de la concentración de clorofilas (680 nm) y la concentración de biomasa (750 nm). Se observa como en todas las condiciones ensayadas el ratio mantiene el mismo perfil a partir de las primeras 24h, a excepción del cultivo de *Chlorella sp.* incubado en acetato y carencia de nitrógeno en el medio, cuyo ratio cae rápidamente pasado el primer día de experiencia. La misma Figura 6.8 presenta, en la parte inferior, la evolución de peso seco en las cuatro condiciones de incubación bajo oscuridad a lo largo de 96 h de experimentación.

En todos los cultivos, tras una fase inicial de adaptación a la oscuridad, se observa un aumento de biomasa seca, en mayor medida en el cultivo de *Chlorella sp.* incubado con acetato como fuente orgánica de carbono, aumentando en más de tres veces la concentración de peso seco del inóculo inicial. Los cultivos con glicerol, y con acetato y carencia de nitrógeno, mantienen una evolución de biomasa similar, si bien la tendencia en el tiempo del cultivo en glicerol es de claro crecimiento, al mismo ritmo que el cultivo en acetato. Por último, el cultivo incubado bajo oscuridad y burbujeado con aire enriquecido en CO₂ y carencia de nitrógeno apenas experimenta aumento de biomasa, como era de esperar.

El cultivo en acetato y carencia de nitrógeno inorgánico muestra inicialmente una cierta tendencia al crecimiento, algo ya observado en las experiencias con luz y achacable, en principio, a reservas intracelulares de nitrógeno inorgánico (LaRoche et al. 1993, Geider et al. 1998), pues en condiciones de heterotrofía las microalgas no disponen de amonio procedente de la fotorrespiración, cuya producción depende de luz (Di Martino Rigano et al. 1998).

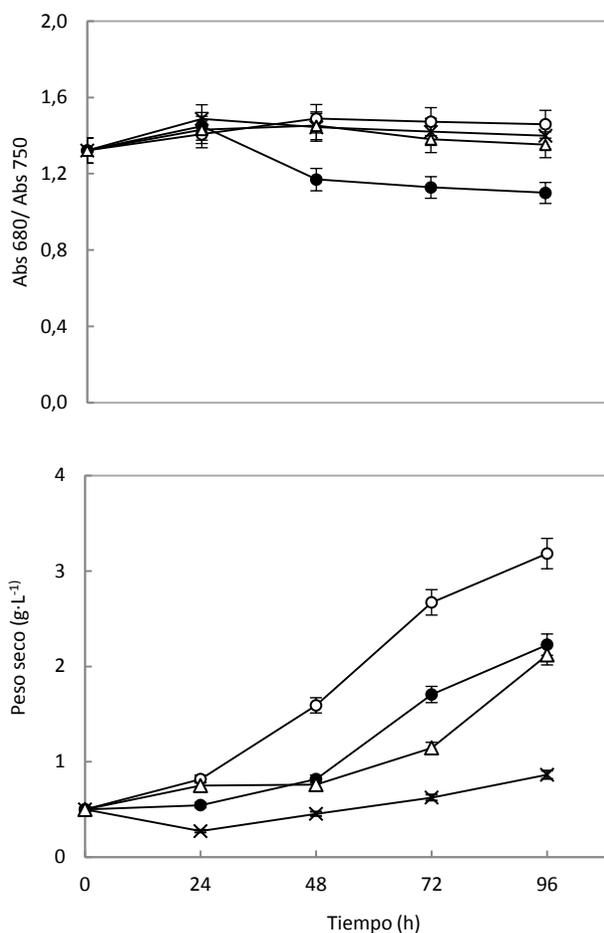


Figura 6.8. Evolución del ratio de absorbancias a 680 nm y 750 nm y del peso seco de la microalga seleccionada de Refinería, en cultivo baño bajo oscuridad y otras condiciones de estrés. La gráfica superior representa la evolución del ratio de absorbancias a 680/750nm y la gráfica inferior muestra la evolución del peso seco de la microalga identificada como *Chlorella sp.* Los cultivos de *Chlorella sp.* incubados en condiciones estándar descritas en Materiales y Métodos, se centrifugaron, lavaron y resuspendieron en medio de cultivo para su incubación bajo condiciones de oscuridad combinada con otras condiciones: 1% (p/v) de acetato como única fuente de carbono (○), 1% (v/v) de glicerina como única fuente de carbono (△), carencia de nitrógeno y 1% (p/v) de acetato (●) y carencia de nitrógeno más 5% v/v de CO₂ en aire (×), respectivamente.

Los cultivos crecidos bajo condición heterotrófica y sin limitación nutricional son, en definitiva, los que alcanzan mayores tasas de crecimiento, aunque que de forma puntual sea el cultivo incubado en acetato más carencia de nitrógeno el que presente una mayor tasa de crecimiento, inicialmente. El cultivo incubado con acetato y plenitud de nutrientes alcanza una tasa de crecimiento media de $0,43 \text{ d}^{-1}$ y máxima de

0,67 d⁻¹, y el cultivo incubado con glicerol rinde una tasa de crecimiento media de 0,37 d⁻¹ y máxima de 0,62 d⁻¹.

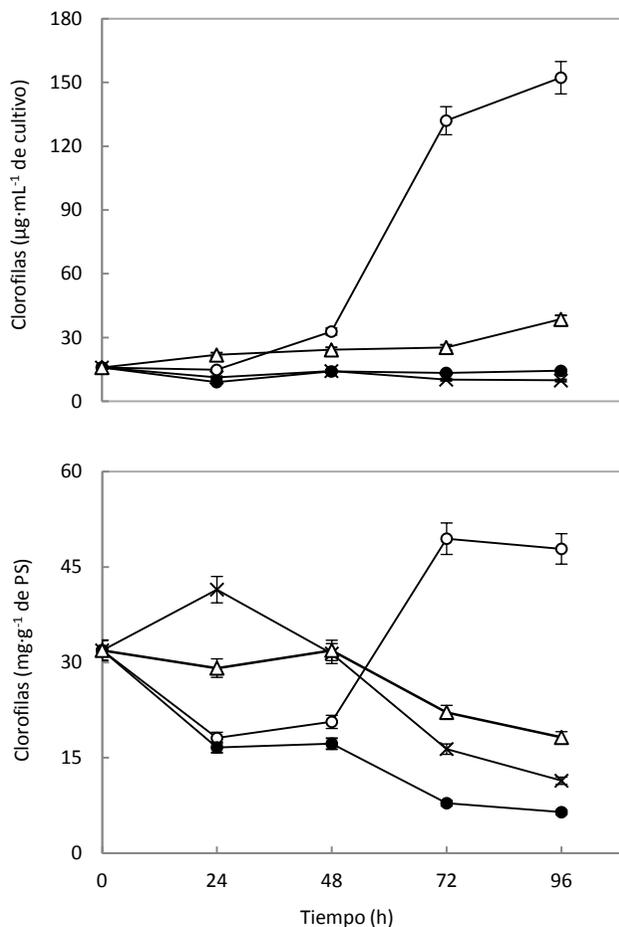


Figura 6.9. Evolución de la concentración de clorofilas de de la microalga seleccionada de Refinería, en cultivo baño bajo oscuridad y otras condiciones de estrés. La gráfica superior representa la concentración de clorofila celular referida a volumen de cultivo y la gráfica inferior muestra la concentración de clorofila celular referida a peso seco de la microalga identificada como *Chlorella* sp. Los cultivos de *Chlorella* sp. incubados en condiciones estándar descritas en Materiales y Métodos, se centrifugaron, lavaron y resuspendieron en medio de cultivo para su incubación bajo condiciones de oscuridad combinados con otras condiciones: 1% (p/v) de acetato como única fuente de carbono (-○-), 1% (v/v) de glicerina como única fuente de carbono (-△-), carencia de nitrógeno y 1% (p/v) de acetato (-●-) y carencia de nitrógeno más 5% v/v de CO₂ en aire (-X-), respectivamente. PS: peso seco.

La Figura 6.9 (superior) representa la evolución en el tiempo de la concentración de clorofila celular referida a volumen de los cultivos de *Chlorella* sp. En todos los casos se observa una evolución constante en la

concentración de clorofilas por volumen, a excepción del cultivo crecido en acetato como fuente de carbono, el cual multiplica por cinco la concentración de clorofilas en el medio. La gráfica inferior de la Figura 6.9 muestra la evolución, en 96 h de experiencia, de la concentración de clorofila celular referida a peso seco de *Chlorella sp.* El cultivo incubado con acetato es el único que muestra un aumento de la actividad de biosíntesis de clorofilas, pasadas 48h de experiencia. Los demás cultivos muestran una clara tendencia a la disminución del contenido de clorofila celular referida a peso seco a lo largo de la experiencia.

Acumulación de carotenoides.

Se analizó también la evolución de carotenoides en los cultivos heterotróficos. La Figura 6.10 (superior) representa la evolución en el tiempo de la concentración de carotenoides celulares referida a volumen de los cultivos de *Chlorella sp.* De forma similar, los cultivos de la microalga crecidos en condiciones heterotróficas, tanto con acetato como con glicerol, generan un perfil parecido de aumento en carotenoides. Los cultivos en carencia nutricional acumulan concentraciones volumétricas de carotenoides más bajas. El cultivo incubado en acetato más carencia de nitrógeno mantiene la concentración de carotenoides, con una tendencia ascendente al final de la experiencia. Por último, el cultivo de *Chlorella sp.* incubado en alto CO₂ y carencia de nitrógeno revela una caída suave del contenido de carotenoides desde el principio de la experiencia.

La Figura 6.10 (inferior) muestra la evolución de la concentración de carotenoides celulares referida a peso seco de *Chlorella sp.* respecto a biomasa seca. Todas las condiciones de cultivo dan lugar a una disminución de la biosíntesis de carotenoides. La comparación de ambas gráficas de la Figura 6.10 revela que la acumulación de carotenoides en aquellos cultivos en que se produce, es consecuencia del crecimiento celular y no de una biosíntesis activa de dichos pigmentos.

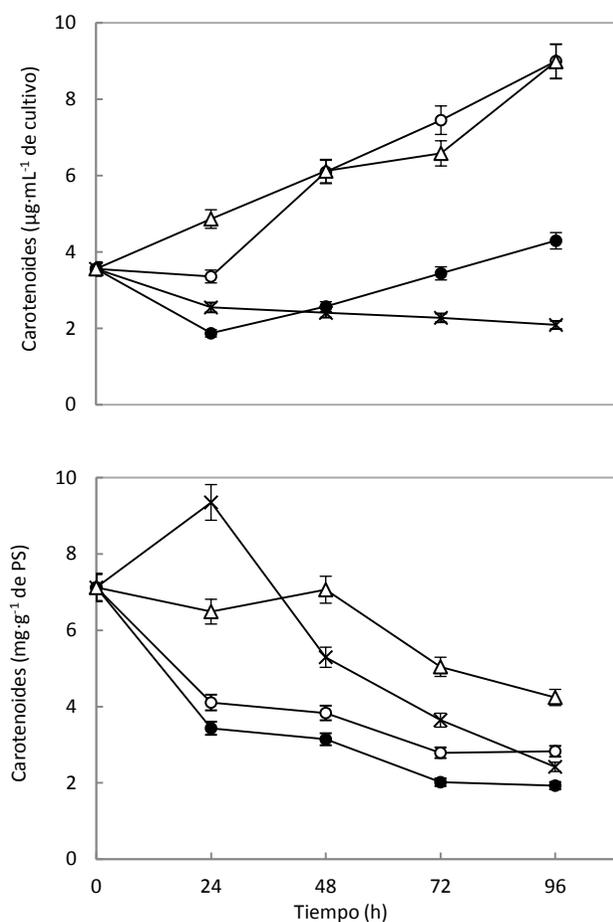


Figura 6.10. Evolución de la concentración de carotenoides de la microalga seleccionada de Refinería, en cultivo baño bajo oscuridad y otras condiciones de estrés. La gráfica superior representa la concentración de carotenoides celulares referida a volumen de cultivo y la gráfica inferior muestra la concentración de carotenoides celulares referida a peso seco de la microalga identificada como *Chlorella sp.* Los cultivos de *Chlorella sp.* incubados en condiciones estándar descritas en Materiales y Métodos, se centrifugaron, lavaron y resuspendieron en medio de cultivo para su incubación bajo condiciones de oscuridad combinados con otras condiciones: 1% (p/v) de acetato como única fuente de carbono (-○-), 1% (v/v) de glicerina como única fuente de carbono (-△-), carencia de nitrógeno y 1% (p/v) de acetato (-●-) y carencia de nitrógeno más 5% v/v de CO₂ en aire (-X-), respectivamente. PS: peso seco.

Se analizaron igualmente los contenidos intracelulares de los dos carotenoides mayoritarios de la microalga, luteína y β-caroteno. La Figura 6.11 representa, en la gráfica superior, la evolución de la concentración intracelular de luteína de *Chlorella sp.* a lo largo de 96 h de incubación en oscuridad y bajo diferentes condiciones nutricionales. Se observa que todas las condiciones de incubación dan lugar a un decrecimiento de la

concentración intracelular de luteína. Tan sólo los cultivos incubados con acetato o glicerol y sin limitación nutricional presentan inicialmente una menor tendencia a la disminución del contenido intracelular en luteína, si bien dicha disminución se produce avanzada la experiencia. Por otro lado, la gráfica inferior, muestra la evolución de la concentración intracelular de β -caroteno en *Chlorella sp.* bajo las cuatro condiciones ya mencionadas. Se observa en casi todas las condiciones ensayadas una biosíntesis más intensa de β -caroteno durante las primeras 48-72 h, con tendencia a la disminución posterior.

La continua disminución del contenido de clorofila celular referida a peso seco observada en todas las condiciones experimentales aplicadas, con excepción puntual de los cultivos incubados en acetato y sin limitación nutricional, es coherente con el hecho de la falta de luz.

Si bien los pigmentos auxiliares, carotenoides y xantofilas, se producen en condiciones fotoautotróficas, sorprendentemente algunos son acumulados por las microalgas también en condiciones heterotróficas en oscuridad. La xantofila astaxantina es acumulada por *Chlorella zofingiensis* cultivada heterotróficamente con glucosa, y lo hace con un rendimiento notablemente superior al de la microalga *Haematococcus* en condiciones fotoautotróficas (Lp y Chen 2005). Similares resultados se han publicado para la acumulación de ficobilinas con cianobacterias cultivadas en condiciones heterotróficas, entre ellas *Spirulina platensis* (Sloth et al. 2006). Si bien no hay muchos trabajos relacionados con la acumulación de carotenoides y xantofilas en cultivos heterotróficos, lo publicado hasta la fecha revela que aún en ausencia de luz la carencia de nitrógeno inorgánico sigue siendo elemento estimulador de la biosíntesis (Wang y Peng 2008). En especies de microalgas del género *Chlorella* se ha vinculado la acumulación de xantofilas mayoritarias, principalmente luteína, al crecimiento fotoautotrófico activo y, por tanto, a la asimilación de carbono (Fernandez-Sevilla et al. 2010), si bien la limitación o carencia de nitrógeno inorgánico podría actuar como factor estimulador de la acumulación. De hecho, tales observaciones ya se constataron en el apartado previo de esta Tesis, la experimentación con LEDs, con la microalga objeto de estudio.

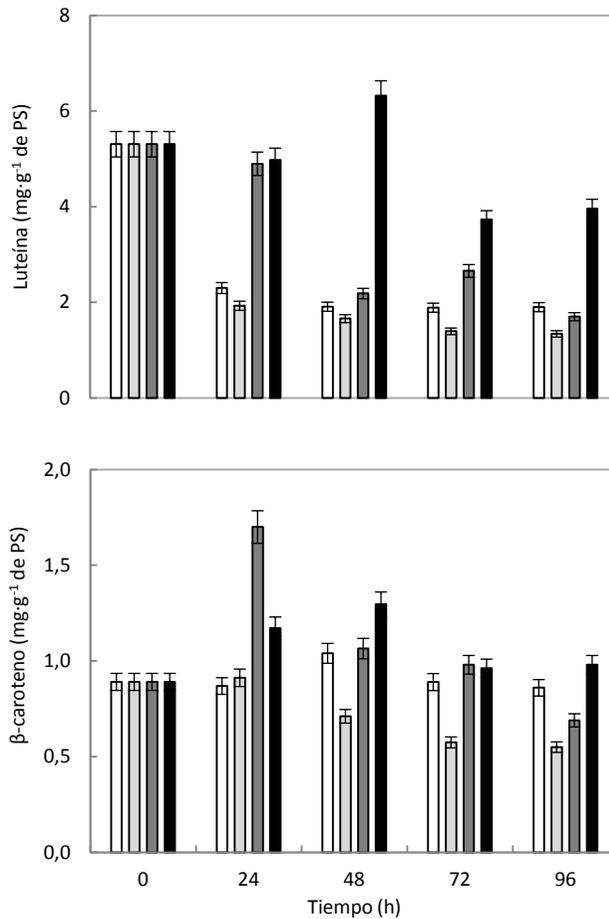


Figura 6.11 Evolución de la concentración de luteína y β-caroteno de la microalga seleccionada de Refinería, en cultivo baño bajo oscuridad y otras condiciones de estrés. La gráfica superior representa la concentración intracelular de luteína y la gráfica inferior muestra la concentración intracelular de β-caroteno de la microalga identificada como *Chlorella sp.* Los cultivos de *Chlorella sp.* incubados en condiciones estándar descritas en Materiales y Métodos, se centrifugaron, lavaron y resuspendieron en medio de cultivo para su incubación bajo condiciones de oscuridad combinados con otras condiciones: 1% (p/v) de acetato en el medio como única fuente de carbono (barra blanca), carencia de nitrógeno y 1% (p/v) de acetato (barra gris clara), carencia de nitrógeno más 5% (v/v) de CO₂ en aire (barra gris oscura) y 1% (v/v) de glicerina como única fuente de carbono (barra negra), respectivamente. PS: peso seco.

En condiciones heterotróficas, el hecho de la acumulación de carotenoides asociada al crecimiento es por tanto coherente con lo publicado en la bibliografía. Particularmente, el uso de acetato o glicerol en condiciones no limitantes de nutrientes da lugar a mayor producción de carotenoides como consecuencia de la acumulación de biomasa en el cultivo (Figura 6.8, inferior), pero no como consecuencia de una

estimulación de la biosíntesis (Figuras 6.10, inferior). La limitación nutricional en oscuridad no resultó ser un factor determinante para estimular la acumulación de carotenoides que, en el caso de la microalga estudiada, se mostró claramente dependiente de la disponibilidad de carbono (inorgánico u orgánico) y de luz.

Acumulación de lípidos totales y de ácidos grasos.

La acumulación de lípidos totales y de FAMEs en microalgas no tiene por qué seguir el mismo patrón cinético que los carotenoides y las xantofilas. Este hecho ya se ha observado en diferentes microalgas (Pignolet et al. 2013) e incluso en este mismo trabajo de Tesis, donde se puso de manifiesto que el contenido intracelular en luteína tendía a aumentar en *Chlorella sp.* a lo largo del tiempo de incubación bajo alta irradiancia y limitación en nitrógeno inorgánico, de manera similar a la evolución de los lípidos totales pero de forma contraria a la evolución del contenido en ácidos grasos (FAMEs, Figura 6.6). Las rutas de biosíntesis de ácidos grasos y de carotenoides comparten intermediarios comunes, como se explicó en esta Tesis, pero los factores que aumentan su actividad difieren, como se ha puesto de manifiesto en este trabajo.

Para determinar la influencia de las condiciones de heterotrofia sobre la acumulación de lípidos, se siguió la evolución de estos durante el tiempo de experimentación. La Figura 6.12 representa la evolución del contenido intracelular de lípidos totales obtenidos de *Chlorella sp.* bajo las cuatro condiciones estudiadas. Como se observa de forma evidente, la incubación con glicerol como fuente de carbono es la que más favoreció la acumulación intracelular de lípidos totales. Las demás condiciones, en una lectura general, producen algún incremento en la concentración de lípidos durante las primeras 24h, particularmente el cultivo incubado en oscuridad, con CO₂ y carencia de nitrógeno, disminuyendo con el tiempo de forma continua.

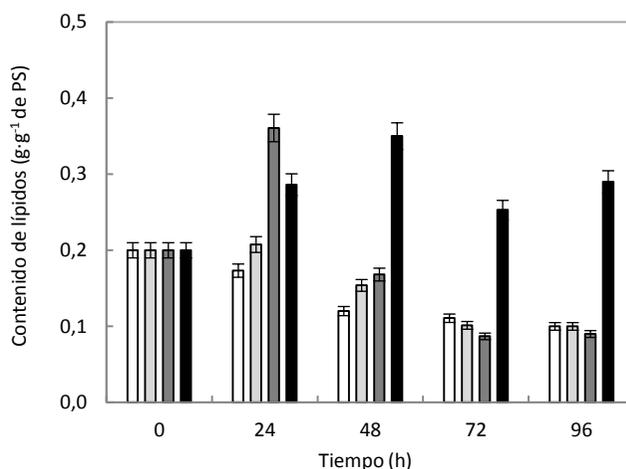


Figura 6.12 Contenido de lípidos totales de la microalga seleccionada de Refinería, en cultivo baño bajo oscuridad y otras condiciones de estrés. Los cultivos de *Chlorella sp.* incubados en condiciones estándar descritas en Materiales y Métodos, se centrifugaron, lavaron y resuspendieron en medio líquido para su incubación bajo condición de oscuridad combinada con otras condiciones: 1% (p/v) de acetato en el medio como única fuente de carbono (barra blanca), carencia de nitrógeno y 1% (p/v) de acetato (barra gris clara), carencia de nitrógeno más 5% (v/v) de CO₂ en aire (barra gris oscura) y 1% (v/v) de glicerina como única fuente de carbono (barra negra), respectivamente. PS: peso seco.

De nuevo, para conocer qué condición de cultivo es más productiva de cara a la acumulación de lípidos totales, además del contenido intracelular de lípidos ha de considerarse la evolución de la concentración de biomasa a lo largo de la experimentación. De esta forma, es fácil determinar que la mayor producción de lípidos, en términos absolutos de cantidad, se obtendría siempre en condiciones de crecimiento heterotrófico –acetato o glicerol, sin limitación nutricional-. Muchas microalgas aumentan su nivel intracelular de lípidos en limitación o carencia de nitrógeno inorgánico desde 20-30% hasta 60-70% , respecto a su biomasa seca, pero aunque se alcancen buenos resultados en esta condición, la tasa de crecimiento se reduce notablemente por la limitación nutricional y por la acumulación de carbono en forma de lípidos de reserva (Liang et al. 2009). Eso hace que el momento del cosechado resulte clave de cara a la producción de lípidos, si se emplean condiciones limitantes para el crecimiento. En cultivos en crecimiento, el momento adecuado para el cosechado ocurre cuando el producto matemático de la productividad de biomasa por el contenido intracelular en lípidos es máximo.

La Figura 6.13 muestra el máximo valor de productividad obtenido en las cuatro condiciones de incubación bajo oscuridad y su contenido de lípidos correspondiente a ese valor de productividad, calculado respecto a su peso seco. Como se puede observar, los cultivos incubados bajo condición heterotrófica usando glicerol como fuente de carbono, son los que presentan mejores resultados. Esta incubación da lugar a elevada productividad de biomasa además de acumular lípidos de forma eficiente.

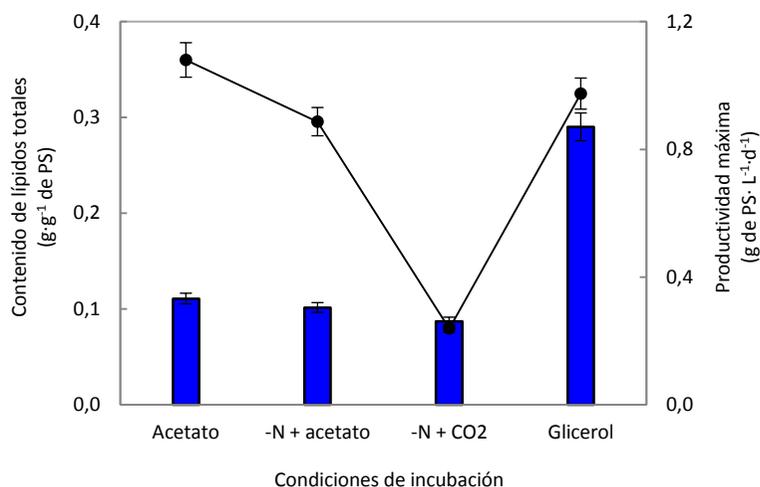


Figura 6.13. Máxima productividad de biomasa y contenido intracelular de lípidos correspondiente de la microalga seleccionada de Refinería, en cultivo baño bajo oscuridad y otras condiciones de estrés. La Figura representa la máxima productividad de biomasa (-●-) y su correspondiente valor de contenido intracelular de lípidos totales (barras) de la microalga identificada como *Chlorella sp.* Los cultivos de *Chlorella sp.* incubados en condiciones estándar descritas en Materiales y Métodos, se centrifugaron, lavaron y resuspendieron en medio líquido para su incubación bajo condición oscuridad combinada con otras condiciones: 1% (p/v) de acetato en el medio como única fuente de carbono, carencia de nitrógeno y 1% (p/v) de acetato, carencia de nitrógeno más 5% (v/v) de CO₂ en aire y 1% (v/v) de glicerina como única fuente de carbono, respectivamente. PS: peso seco.

Al contrario de lo que sucedía en la experimentación con alta irradiancia y carencia de nitrógeno inorgánico, en heterotrofia la evolución del contenido intracelular de lípidos totales y de acilglicéridos (determinados estos como FAMES) sigue una evolución paralela. La Figura 6.14 representa el contenido de lípidos transesterificables respecto al total de lípidos en las cuatro condiciones ensayadas. Los cultivos de *Chlorella sp.* incubados con acetato y glicerol mantienen un perfil similar de dicho parámetro. Con el transcurso de la experiencia, la proporción de FAMES por lípidos totales en estos dos casos, acetato y glicerol como

fuentes de carbono, es mayor, al contrario de lo que ocurre en los cultivos con limitación de nutrientes. En heterotrofia, por tanto, el factor determinante en la acumulación de lípidos, incluidos FAMES y carotenoides, es la disponibilidad de carbono. El uso de una fuente u otra de carbono, acetato o glicerol, influye notablemente en la cantidad de lípidos y FAMES obtenidos, con mayor rendimiento cuando se utiliza glicerol.

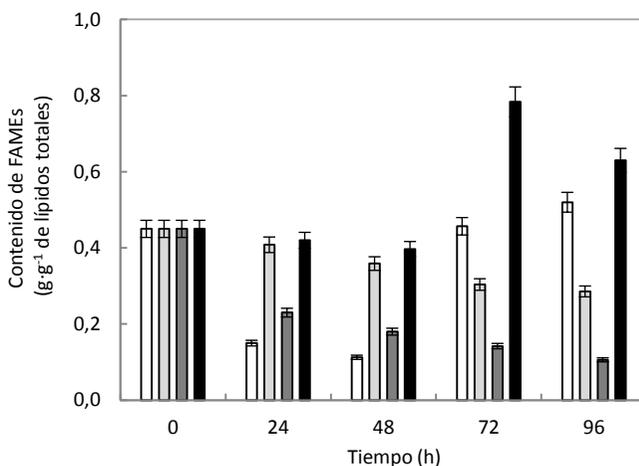


Figura 6.14. Contenido de FAMES de la microalga seleccionada de Refinería, en cultivo baño bajo oscuridad y otras condiciones de estrés. Los cultivos de *Chlorella sp.* incubados en condiciones estándar descritas en Materiales y Métodos, se centrifugaron, lavaron y resuspendieron en medio de cultivo para su incubación bajo condición de oscuridad combinada con otras condiciones: 1% (p/v) de acetato en el medio como única fuente de carbono (barra blanca), carencia de nitrógeno, 1% (p/v) de acetato (barra gris claro), carencia de nitrógeno más 5% (v/v) de CO₂ en aire (barra gris oscuro) y 1% (v/v) de glicerina como única fuente de carbono (barra negra), respectivamente.

La siguiente Figura 6.15 representa los valores máximos obtenidos de lípidos totales y FAMES respecto a peso seco, en las cuatro condiciones de incubación bajo oscuridad. Estos valores no coinciden en el tiempo, es decir, los máximos valores de lípidos se obtienen tras 24 h de incubación a excepción del cultivo incubado heterotróficamente con glicerol, cuyo máximo se obtuvo a las 96 h. Por su parte, los valores máximos de FAMES se obtuvieron en los últimos días de experimentación en todos los casos.

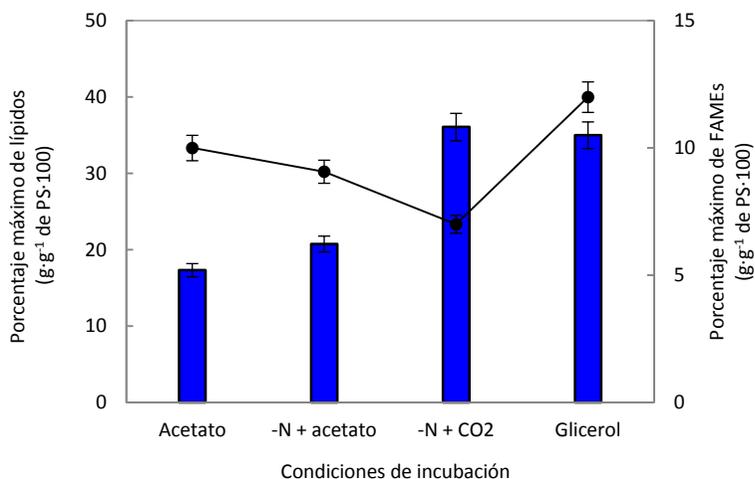


Figura 6.15. Máximo porcentaje intracelular de lípidos totales y FAMES de la microalga seleccionada, en cultivo baño bajo oscuridad y otras condiciones de estrés. La Figura representa el porcentaje intracelular máximo de lípidos (barras) y el porcentaje intracelular máximo de FAMES (—●—) de la microalga. Los cultivos de *Chlorella sp.* incubados en condiciones estándar descritas en Materiales y Métodos, se centrifugaron, lavaron y resuspendieron en medio de cultivo para su incubación bajo condición de oscuridad combinada con otras condiciones: 1% (p/v) de acetato en el medio como única fuente de carbono, carencia de nitrógeno y 1% (p/v) de acetato, carencia de nitrógeno más 5% (v/v) de CO₂ en aire y 1% (v/v) de glicerina como única fuente de carbono, respectivamente. Los datos de lípidos se expresan como gramos de lípidos respecto a gramos de peso seco y los datos de FAMES como gramos de lípidos totales metilados respecto a los gramos totales de peso seco. PS: peso seco.

La Tabla 6.3 muestra de forma pormenorizada, la composición de ácidos grasos de la microalga *Chlorella* objeto de estudio tras incubación en las diferentes condiciones ensayadas en oscuridad. El uso de glicerol produce un cambio significativo en dicha composición de ácidos grasos, incrementando notablemente la abundancia relativa de linoléico y linolénico, ambos de valor comercial.

El glicerol se ha mostrado como un sustrato adecuado para el crecimiento de microalgas (Pérez-García et al. 2011). El glicerol es una sustancia con capacidad para aumentar la fuerza osmótica de una disolución y, consecuentemente, mantener el equilibrio osmótico en la célula. Además, es una fuente de carbono económica y útil para satisfacer los requerimientos energéticos y de carbono celulares, y es un soluto compatible con la acción de las enzimas y las estructuras de las membranas, sin efectos tóxicos incluso a altas concentraciones (Richmond

1986). Las microalgas pueden producir glicerol como producto de la hidrólisis de acilglicéridos y otros glicerolípidos. Algunas especies pueden utilizarlo como fuente de carbono, con una serie de consecuencias relacionadas fundamentalmente con el tamaño del fotosistema II y el número de tilacoides por célula (Lewitus et al. 1991) que no inhiben la actividad metabólica basal.

Tabla 6.3. Composición de ácidos grasos principales de FAMES de la microalga seleccionada, en cultivo baño bajo oscuridad y otras condiciones de estrés. Los valores están expresados como porcentaje de abundancia de cada ácido graso relativa al total de ácidos grasos, integrados por cromatografía de gases tras 72 h de incubación las condiciones indicadas en la Tabla.

Ácidos grasos principales	Acetato	Carencia de nitrógeno y acetato	Carencia de nitrógeno y CO ₂	Glicerol
Saturados				
C13:0	--	--	3,91	--
C16:0	33,60	38,0	32,80	26,60
C17:0	13,78	10,2	23,18	--
C18:0	3,0	1,62	--	4,70
C24:0	3,26	17,0	34	--
Mono-insaturados				
C16:1	37,43	28,20	2,82	7,10
C18:1	2,0	0,4	0,4	11,74
Poli-insaturados				
C18:2	2,0	0,8	0,87	38,3
C18:3	4,13	3,45	2,13	11,50

La entrada del glicerol se ha descrito en plantas y ocurre por difusión. El glicerol es inicialmente fosforilado a glicerolfosfato, lo cual sucede en plantas mediante la acción de una glicerol quinasa y el concurso de ATP. Posteriormente, una glicerol-3-fosfato-NAD⁺ oxidoreductasa produce la oxidación de glicerolfosfato a gliceraldehído-3-fosfato. Se ha demostrado que el glicerol-3-fosfato inhibe la gluconeogénesis, y se ha sugerido que inhibe también la vía de las pentosas fosfato (Aubert et al. 1994). Se ha demostrado mediante algunas especies de microalgas que estas pueden utilizar glicerol de forma

mixotrófica (Kaplan et al. 1986), sin aporte de CO₂ externo y en luz. Algunos autores han publicado resultados de productividad en cultivos con glicerol y luz, notablemente superiores a los obtenidos con cultivos en condiciones autotróficas (Cerón et al. 2000). Los mismos autores describieron que el crecimiento en glicerol, a diferencia de lo que sucede en glucosa, produce una fase de adaptación prolongada, coincidente con lo observado en nuestras experiencias.

La acumulación de lípidos en heterotrofia puede superar la producida en condiciones autotróficas (Xu et al. 2006). Los resultados obtenidos en esta Tesis no muestran diferencias cuantitativas notables entre condiciones autotróficas y heterotróficas.

Los mecanismos que inducen una mayor acumulación de lípidos varían entre géneros y especies. En el caso de microalgas del género *Chlorella* se ha sugerido que la acumulación en condiciones autotróficas y heterotróficas, podría no depender tanto de la carencia de nitrógeno como de la cantidad de carbono disponible (De Swaaf et al. 2003). En los resultados obtenidos en la Tesis este hecho se observa de manera más clara en las condiciones heterotróficas. La inhibición de la gluconeogénesis por el uso de glicerol daría lugar a un mayor flujo de carbono para la formación de lípidos, a partir de gliceraldehído-3-fosfato, piruvato y acetil-CoA, favoreciendo la síntesis de ácidos grasos y de carotenoides, como se ha observado en esta Tesis para *Chlorella sp.* De otra parte, la acumulación de excesos de carbono derivada de la carencia de nitrógeno inorgánico daría lugar a la conversión de azúcares en lípidos (Ratledge y Wynn 2002, De Swaaf et al. 2003). Tal efecto no se ha observado en las experiencias de este trabajo realizadas en heterotrofia. Con especies de microalgas adecuadas, el glicerol puede resultar de alto valor para la obtención de biodiesel. Los escasos trabajos publicados al respecto revelan que los rendimientos de lípidos obtenidos con microalgas eficientes en la asimilación de glicerol pueden ser notablemente superiores a los obtenidos cuando se emplea glucosa o fructosa como fuente de carbono (Wood et al. 1999). El análisis de los resultados obtenidos permite concluir que los máximos rendimientos de producción de ácidos grasos en heterotrofia se obtendrían, para *Chlorella*

sp., cultivándola con glicerol y en plenitud de nutrientes, alcanzándose los máximos de acumulación de lípidos y de proporción de ácidos grasos.

A modo de conclusiones, se aisló una microalga de rápido crecimiento desde aguas tratadas de la Refinería La Rábida, de CEPESA, que se identificó mediante técnicas moleculares como una nueva cepa del género *Chlorella*, posiblemente perteneciente a la especie *sorokiniana*. En las condiciones experimentales de esta Tesis, la microalga acumuló en forma de lípidos máximos cercanos al 50% de su peso seco. Los resultados obtenidos en condiciones limitantes para la fotosíntesis sugieren que la microalga podría utilizar reservas de carbono reducido para incrementar la acumulación de lípidos en dichas condiciones.

Chlorella sp. resultó ser una microalga acumuladora natural de luteína, cuyos contenidos intracelulares máximos, considerado de interés para producción industrial, se alcanzaron en cultivos limitados en su crecimiento por carencia de nitrógeno y alta irradiancia ó en condiciones de heterotrofía con glicerol como fuente de carbono. Estas condiciones, especialmente la heterotrofía, abren una vía de estudio para la producción masiva de luteína a mayor escala.

La producción de lípidos en *Chlorella sp.* resultó similar, desde el punto de vista cuantitativo, tanto en condiciones autotróficas como heterotróficas de crecimiento. En condiciones heterotróficas, la mayor producción de lípidos - hasta un 35% del peso seco de la microalga- y de FAMES - hasta un 60% del peso total de lípidos- se obtuvo utilizando glicerol como fuente de carbono en oscuridad y en cultivos sin limitación nutricional. La alta productividad de biomasa obtenida en heterotrofía y los menores costes de producción esperables en dichas condiciones sugieren que tales condiciones de cultivo serían de especial valor en la obtención de FAMES (biodiesel) a partir de la *Chlorella sp.* estudiada.



Universidad
de Huelva

IV. CONCLUSIONES

Conclusiones

1. *C. onubensis* crece de manera sostenida en el tiempo cuando se incuba en carencia de fósforo o azufre, manteniendo captura activa de luz y su conversión eficiente en energía química. Los resultados de esta Tesis junto a otros previos obtenidos por el equipo de investigación sugieren la posible disponibilidad de reservas de azufre en la microalga, que permiten la actividad fotosintética y el crecimiento del cultivo en carencia de dicho elemento.
2. La carencia del medio de cultivo en nitrógeno, fósforo o azufre favorece, durante las primeras horas, el incremento de la fracción de carbono fijada en forma de lípidos, tanto terpenoides como ácidos grasos, siendo el ácido graso linolénico (C18:3) el más abundante de los identificados e integrados. Por vez primera en una microalga de ambiente ácido extremo, se ha puesto de manifiesto el vínculo entre carencia de nutrientes y estrés oxidativo.
3. *Coccomyxa* muestra cierta halotolerancia basada en una ligera estimulación del crecimiento, coherente además con una biosíntesis más activa de clorofilas que mantiene altas eficiencias en el uso de la luz en fotosíntesis. Una salinidad moderada, inferior a la del mar, favorece temporalmente la acumulación de luteína, β -caroteno y ácidos grasos, particularmente linoléico y linolénico, ambos esenciales en alimentación humana.
4. Salinidades moderadas, inferiores a la del mar, inducen una respuesta antioxidante principalmente dependiente de las enzimas que utilizan glutatión y ascorbato reducidos, respuesta que está acompañada de una biosíntesis temporalmente más activa de luteína, β -caroteno y ácidos grasos - especialmente linoléico y linolénico - lo que permite relacionar una cierta halotolerancia con el incremento de la respuesta antioxidante de la microalga.
5. Se aisló una microalga de rápido crecimiento desde aguas tratadas de la Refinería La Rábida de CEPSA, que se identificó mediante técnicas moleculares como una nueva cepa del género *Chlorella*,

posiblemente perteneciente a la especie *sorokiniana*. En las condiciones experimentales de esta Tesis la microalga acumuló, en forma de lípidos, máximos cercanos al 50 % de su peso seco. Los resultados obtenidos en condiciones limitantes para la fotosíntesis sugieren que la microalga podría utilizar reservas de carbono reducido para incrementar la acumulación de lípidos en dichas condiciones.

6. La productividad de FAMES obtenidos a partir de los aceites de la microalga *Chlorella sp.* aislada de Refinería La Rábida de CEPESA y cultivada en condiciones fotoautotróficas, es mayor en cultivos sometidos a incubación bajo irradiancias saturantes que en cultivos sometidos a carencia nutricional, como consecuencia de la mayor productividad de biomasa. En las condiciones de máxima acumulación determinadas, la microalga *Chlorella sp.* objeto de estudio alcanza un contenido promedio de lípidos de un 40%-45%, de los cuales un máximo de aproximadamente 30% son FAMES.
7. *Chlorella sp.* resultó ser una microalga con potencial para la acumulación de luteína, cuyos contenidos intracelulares máximos, considerados de valor para producción industrial, se alcanzaron en cultivos limitados en su crecimiento por carencia nutricional y alta irradiancia ó en condiciones de heterotrofia con glicerol como fuente de carbono. Estas condiciones, especialmente la heterotrofia, abren una vía de estudio para la producción masiva de luteína a mayor escala.
8. La producción de lípidos en *Chlorella sp.* resultó similar, desde el punto de vista cuantitativo, tanto en condiciones autotróficas como heterotróficas de crecimiento. En condiciones heterotróficas, la mayor producción de lípidos - hasta un 35% del peso seco de la microalga - y de FAMES - hasta un 60% del peso total de lípidos - se obtuvo utilizando glicerol como fuente de carbono en oscuridad, en cultivos sin limitación nutricional. La alta productividad de biomasa obtenida en heterotrofia y los menores costes de producción esperables en dichas condiciones sugieren que tales condiciones de cultivo serían de especial valor en la obtención de FAMES (biodiesel) a partir de la *Chlorella sp.* estudiada.

Conclusions

1. *C. onubensis* grows steadily over time when incubated in lack of phosphorus or sulfur, keeping light capture active and converting it into chemical energy efficiently. The results of this thesis with other previously obtained by the research team suggest the possible sulfur stocks availability in the microalga, allowing for photosynthetic activity and culture growth to take place in sulfur-lacking culture medium.
2. Lack of culture medium in nitrogen, phosphorus or sulfur favors, during the first hours, the increase of that carbon fraction fixed in the form of lipids, including fatty acids and terpenoids, linolenic acid (C18: 3) being the most abundant identified and integrated fatty acid. For the first time in an extreme acidic environment microalga, the link between nutrient deficiency and oxidative stress has been shown.
3. *Coccomyxa* showed halotolerance based on slight growth stimulation, also consistent with a more active chlorophyll biosynthesis maintaining high efficiencies in the use of light in photosynthesis. Moderate salinity, below that of the sea, temporarily promotes accumulation of lutein, β -carotene and fatty acids, particularly linoleic and linolenic acids, both essential in human nutrition.
4. Moderate salinity, below that of the sea, induces an antioxidant response mainly dependent on enzymes using reduced glutathione and ascorbate. Such a response is accompanied by a temporarily more active biosynthesis of lutein, β -carotene and fatty acids, especially linoleic and linolenic - allowing for relating the observed halotolerance with the increased antioxidant microalga response.
5. A fast-growth microalga was isolated from CEPESA's La Rabida Refinery treated wastewaters, which was identified by molecular techniques as a new strain of the genus *Chlorella*, possibly belonging to *sorokiniana* species. Under the experimental conditions of this

thesis, the microalga accumulated about 50% of its dry weight in the form of lipids. The results obtained for photosynthesis limiting conditions suggest that the microalga could use stocks of reduced carbon to increase lipid accumulation in these conditions.

6. FAMES productivity from *Chlorella* sp. oils, microalga isolated from CEPESA's La Rabida Refinery and cultivated in photoautotrophic conditions, is higher in cultures under saturating irradiances than in those cultures subjected to nutrient deficiency, as a result of the higher biomass productivity. Under those conditions for maximal accumulation, the microalga *Chlorella* sp. reached an average lipid content of about 40%-45%, of which a maximum of about 30% are FAMES.
7. *Chlorella* sp. proved a potential for lutein accumulation, whose intracellular maximum contents, considered valuable for industrial production, were reached in growth-limited cultures by nutrient deficiency and high irradiance, or heterotrophic conditions with glycerol as carbon source. These conditions, especially the heterotrophy, open a research line for mass production of lutein at larger scale.
8. Lipid production in *Chlorella* sp. was quantitatively similar in grown cultures under autotrophic and heterotrophic conditions. In heterotrophic conditions, the highest contents of lipids -up to 35% of the algal dry weight- and FAMES -up to 60% of the total weight of lipids- were obtained by using glycerol as a carbon source in darkness, in cultures with no nutrient limitation. High productivity of biomass obtained under heterotrophy and lower production costs to be expected in these conditions suggest that such culture conditions would be of particular value for obtaining FAMES (biodiesel) from *Chlorella* sp.



Universidad
de Huelva

V. BIBLIOGRAFÍA

A

- Abe, K., Hattori, H. y Hirano, M. (2007). Accumulation and antioxidant activity of secondary carotenoids in the aerial microalga *Coelastrella striolata* var. *multistriata*. *Food Chemistry*, *100*, 656-661.
- Albertano, P., Pinto, G., Pollio, A. y Taddei, R. (1990). Morphology, ultrastructure and ecology of an acidophilic alga, *Pseudococcomyxa simplex* (Mainx) Fott (Chlorococcales). *Algological Studies*, *59*, 81-95.
- Alexander-North, L.S., North, J.A., Kiminyo, K.P., Buettner, G.R. y Spector, A.A. (1994). Polyunsaturated fatty acids increase lipid radical formation induced by oxidant stress in endothelial cells. *Journal of Lipid Research*, *35*, 1773-1785.
- Almodóvar, G.R. y Sáez, R. (2004). Los sulfuros masivos de la Faja Pírica Ibérica. En J.A. Vera (Ed.), *Geología de España* (pp. 207-209). Madrid: SGE-IGME.
- Amako, K., Chen, G.X. y Asada, K. (1994). Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. *Plant and Cell Physiology* *35*, 497-504.
- Antal, T. K. y Lindblad, P. (2005). Production of H₂ by sulphur-deprived cells of the unicellular cyanobacteria *Gloeocapsa alpicola* and *Synechocystis* sp PCC 6803 during dark incubation with methane or at various extracellular pH. *Journal of Applied Microbiology*, *98*, 114-120.
- Apt K.E. y Behrens P.W. (1999). Commercial developments in microalgal biotechnology. *Journal of Phycology*, *35*, 215-226.
- Asada, K. (1984). Chloroplasts: formation of active oxygen and its scavenging. *Methods in Enzymology*, *105*, 422-429.
- Aubert, S., Gout, E., Bligny, R. y Douce R. (1994). Multiple effects of glycerol on plant-cell metabolism. Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies. *Journal of Biological Chemistry*, *269* (34), 21420-21427.

B

Bar, E., Rise, M., Vishkautsan, M. y Arad, S. (1995). Pigment and structural changes in *Chlorella zofingiensis* upon light and nitrogen stress. *Journal of Plant Physiology*, *146*, 527-534.

Becker, E.W. (2004). Microalgae in human and animal nutrition. En A. Richmond (Ed.) *Handbook of microalgal culture* (pp. 312-351). Oxford: Blackwell.

Ben-Amotz, A. (1996). Effect of low temperature on the stereoisomer composition of β -carotene in the halotolerant alga, *Dunaliella bardawil* (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, *32*, 272-275.

Ben-Amotz, A. y Avron, M. (1983). On the factors which determine massive β -carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiology*, *72*, 593-597.

Ben-Amotz, A. y Avron, M. (1989). The biotechnology of mass culturing *Dunaliella* for products of commercial interest. En R.C. Creswell, T. A. Rees y N. Shah (Eds) *Algal and Cyanobacterial Biotechnology* (pp. 90-114). UK: Longman Scientific y Technical Press.

Ben-Amotz, A., Gressel, M. y Avron M. (1987). Massive accumulation of phytoene induced by norflurazon in *Dunaliella bardawil* prevents recovery from photoinhibition. *Journal of Phycology*, *23*, 176-181.

Ben-Amotz, A., Tornabene, T. G. y Thomas, W. H. (1985). Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. *Journal of Phycology*, *21*, 72-81.

Benemann, J.R., Berenson, J.A., Kaplan, N.O. y Kamen M.D. (1973). Hydrogen evolution by a chloroplast-ferredoxin-hydrogenase system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *70* (8), 2317-2320.

Berden-Zrimec, M., Drinovec, L., Molinari, L., Zrimec, A., Umani, S. F. y Monti, M. (2008). Delayed fluorescence as a measure of nutrient limitation in *Dunaliella tertiolecta*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B. Biology*, *92*, 13-18.

Bligh, E.G. y Dyer, W.J. (1959). A rapid method for total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, *37*, 911-917.

Bollman, R.C. y Robinson, G.G.C. (1977). The kinetics of organic acid uptake by three Chlorophyta in axenic culture. *Journal of Phycology*, 13, 1-5.

Bonente, G., Pippa, S., Castellano, S., Bassi, R. y Ballottari, M. (2012). Acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to different growth irradiances. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(8), 5833-5847.

Borowitzka, M. A. y Borowitzka, L. J. (1988). *Dunaliella*. En M.A. Borowitzka y L.J. Borowitzka (Eds.) *Microalgal Biotechnology* (pp. 27-58). Cambridge, UK: University Press.

Bouvier F., Backhaus R.A. y Camara B. (1998). Induction and control of chromoplast-specific carotenoid genes by oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 30651–30659.

Bozbas, K. (2008). Biodiesel as an alternative motor fuel: production and policies in the European Union. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 12, 542-52.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

Breuer, G., Lamers, P.P., Martens, D.E., Draaisma, R.B. y Wijffels, R.H. (2012). The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. *Bioresource Technology*, 124, 217-226.

Brinkman, R., Margaria, R. y Roughton, F.J.W. (1933). The kinetics of the carbon dioxide–carbonic acid reaction. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 232, 65-97.

Brown, M.R., Dunstan, G.A., Norwood, S.J. y Miller, K.A. (1996). Effects of harvest stage and light on the biochemical composition of the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Journal of Phycology*, 32, 64-73.

C

Cakmak, T., Angun, P., Demiray, Y. E., Ozkan, A. D., Elibol Z. y Tekinay, T. (2012). Differential effects of nitrogen and sulfur deprivation on growth and biodiesel feedstock production of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology and Bioengineering*, 109 (8), 1947-1957.

Campenni, L., Nobre, B. P., Santos, C. A., Oliveira, C., Aires-Barros, M. R., Palabra, A. M. F. y Gouveia, L. (2013). Carotenoid and lipid production by the autotrophic microalga *Chlorella protothecoides* under nutritional, salinity, and luminosity stress conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 1383-1393.

Cardol, P., Forti, G. y Finazzi, G. (2011). Regulation of electron transport in microalgae. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1807, 912-918.

Cardozo, K.H., Guaratini, T., Barros, M.P., Falcão, V.R., Tonon, A.P., Lopes, N.P., Campos, S., Torres, M.A., Souza, A.O., Colepicolo, P. y Pinto, E. (2007). Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology. Pharmacology*, 146 (1-2), 60-78.

Carrieri, D., Momot, D., Brasg, I. A., Ananyev, G., Lenz, O., Bryant, D. A. y Dismukes, G. C. (2010) Boosting autofermentation rates and product yields with sodium stress cycling: application to production of renewable fuels by cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (19), 6455-6462.

Carvalho, A.P., Luis, A., Meireles, A. y Malcata, F.X. (2006). Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnology Progress*, 22, 1490-1506.

Cerón, M.C., García-Malea, M.C., Rivas, J., Acien F.G., Fernandez, J.M., Del Río, E., Guerrero, M.G. y Molina, E. (2007). Antioxidant activity of *Haematococcus pluvialis* cells grown in continuous culture as a function of their carotenoide and fatty acid content. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 1112-1119.

Cerón-García, M.C., Fernández-Sevilla, J.M., Acien-Fernandez, F.G., Molina- Grima, E. y García-Camacho, F. (2000). Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on glycerol: growth rate and fatty acid profile. *Journal of Applied Phycology*, 12, 239-248.

Chen, F. (1996). High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Trends in Biotechnology*, 14, 421-426.

Chen, F. y Johns, M.R. (1991). Effect of C/N ratio and aeration on the fatty acid composition of heterotrophic *Chlorella sorokiniana*. *Journal of Applied Phycology*, 3, 203-209.

Chen, F. y Johns, M.R. (1995). A strategy for high cell density culture of heterotrophic microalgae with inhibitory substrates. *Journal of Applied Phycology*, 7, 43-46.

- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25, 294-306.
- Cohen, Z. y Khozin-Goldberg, I. (2005). Searching for PUFA-rich microalgae. En Z. Cohen y C. Ratledge (Eds.), *Single cell oils* (pp. 53-72). Champaign: American Oil Chem. Society.
- Courchesne, N.M.D., Parisien, A., Wang, B. y Lan, C.Q. (2009). Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. *Journal of Biotechnology*, 141, 31-41.
- Cvengros, J y Povazanec, F. (1996). Production and treatment of rapeseed oil methyl esters as alternative fuels for diesel engines. *Bioresource Technology*, 55, 145-152.
- Czygan, F. C. (1970). Blood Rain and blood snow: nitrogen- deficient cells of *Haematococcus pluvialis* and *Chlamydomonas nivalis*. *Archives of Microbiology*, 74, 69-76.

D

- Davila, A.F., Fairén, A.G., Gago-Duport, L., Stoker, C., Amils, R., Bonaccorsi, R., Zavaleta, J., Lim, D., Schulze-Makuch, D. y McKay, C.P. (2008). Subsurface formation of oxidants on Mars and implications for the preservation of organic biosignatures. *Earth and Planetary Science Letters*, 272, 456-463.
- De Swaaf, M. E., Sijtsma, L. y Pronk, J. T. (2003). High-cell density fed-batch cultivation of the docosahexaenoic acid producing marine alga *Cryptocodinium cohnii*. *Biotechnology and Bioengineering*, 81, 666-672.
- Del Campo J. A., Rodríguez H., Moreno J., Vargas M. A., Rivas, J. y Guerrero, M. G. (2004). Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 848-854.
- Deng, X., Fei, X. y Li, Y. (2011). The effects of nutritional restriction on neutral lipid accumulation in *Chlamydomonas* and *Chlorella*. *African Journal of Microbiology Research*, 5 (3), 260-270.
- Di Martino-Rigano, V., Vona, V., Esposito, S., Carillo, P., Carfagna, S. y Rigano, C. (1998). The physiological significance of light and dark NH_4^+ metabolism in *Chlorella sorokiniana*. *Phytochemistry*, 47, 177-181.

Dietz, K.J., Baier, M. y Kramer, U. (1999). Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. En M.N.V. Prasad y J. Hagemeyer (Eds.), *Heavy metal stress in plants - From molecules to Ecosystems* - (pp. 73–97). Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.

Doke, N., Miura, Y., Sanchez, L. y Kawakita, K. (1994). Involvement of superoxide in signal transduction, responses to attack by pathogens, physical and chemical shocks, and UV irradiation. En C.H. Foyer y P. Mullineaux (Eds), *Causes of photooxidative stresses and amelioration of defense systems in plants* (pp. 177-198). Boca Raton, FL, USA: CRC Press.

Dubinsky, Z. y Stambler, N. (2009). Photoacclimation processes in phytoplankton: mechanisms, consequences, and applications. *Aquatic Microbial Ecology*, 56, 163-176.

Dunahay, T. G., Jarvis, E. E., Dais, S. S. y Roessler, P. G. (1996). Manipulation of microalgal lipid production using genetic engineering. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 57-58 (1), 223-231.

E

Eisenreich, W., Rohdich, F. y Bacher A. (2001). Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends in Plant Science*, 6(2), 78-84.

Espejo, R.T., Pizarro, J., Jedliki, E., Orellana, O. y Romero, J. (1995). Bacterial population in the bioleaching of copper as revealed by analysis of DNA obtained from leached ores and leaching solutions. En C.A. Jerez, T. Vargas, H. Toledo y J.V. Wiertz (Eds.), *Biohydrometallurgical Processing* (pp. 1-8). Santiago: University of Chile.

F

Fernández-Remolar, D., Gómez-Elvira, J., Gómez, F., Sebastián, E., Martín, J., Manfredi, J. A., Torres, J., Kesler, C. G. y Amils, R. (2004). The Tinto river, an extreme acidic environment under control of iron, as an analog of the Terra meridiani hematite site of Mars. *Planetary and Space Science*, 52, 239-48.

- Fernandez-Sevilla, J.M., Acien-Fernandez, F.G., Molina-Grima, E. (2010). Biotechnological production of lutein and its applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86 (1), 27-40.
- Ferris, F.G., Hallbeck, L., Kennedy, C.B. y Pedersen, K. (2004). Geochemistry of acidic Rio Tinto headwaters and role of bacteria in solid phase metal partitioning. *Chemical Geology*, 212, 291-300.
- Ferroni, L., Baldisserotto, C., Pantaleoni, L., Billi, P., Fasulo, M. P. y Pancaldi, S. (2007). High salinity alters chloroplast morpho-physiology in a freshwater *Kirchneriella* species (*Selenastraceae*) from Ethiopian Lake Awasa. *American Journal of Botany*, 94 (12), 1972-1983.
- Florencio, F.J. y Vega, J.M. (1983). Utilization of nitrate, nitrite and ammonium by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*, 158, 288-293.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J. H., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M. A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J. D., Davies, J. M. y Dolan, L. (2003.) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*, 27, 442-446.
- Fouchard, S., Hemschemeier, A., Caruana, A., Pruvost, J., Legrand, J., Happe, T., Peltier, G. y Cournac, L. (2005). Autotrophic and mixotrophic hydrogen photoproduction in sulfur-deprived *Chlamydomonas* cells. *Applied and Environmental microbiology*, 71(10), 6199-6205.
- Foyer, C.H. y Noctor, G. (2000). Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. *New Phytologist*, 146, 359-388.
- Foyer, C.H. y Noctor, G. (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants, a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment*, 28, 1056-1071.
- Francisco, E.C., Neves, D.B., Jacob-Lopes, E. y Franco, T.T. (2010). Microalgae feedstock for biodiesel production: carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85, 395-403.
- Fryer, M.J. (1992). The antioxidant effects of thylakoid Vitamin E (α -tocopherol). *Plant, Cell and Environment*, 15, 381-392.
- Fukuda, H., Kondo, A. y Noda, H. (2001). Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92 (5), 405-416.

G

Garbayo, I., Cuaresma, M., Vilchez, C. y Vega, J. M. (2008). Effect of abiotic stress on the production of lutein and β -carotene by *Chlamydomonas acidophila*. *Process Biochemistry*, 43(10), 1158-1161.

Garbayo, I., Torronteras, R., Forjan, E. Cuaresma, M., Casal, C., Mogedas, B., Ruiz-Domínguez, M.C., Márquez, C., Vaquero, I., Fuentes-Cordero, J.L. Fuentes, R. González-del-Valle, M. y Vilchez, C. (2012). Identification and physiological aspects of a novel carotenoid-enriched, metal-resistant microalga isolated from an acidic river in Huelva (Spain). *Journal of Phycology*, 48, 607-614.

Gaur, J. P. y Rai, L.C. (2001). Heavy metal tolerance in algae. Algal adaptation to environmental stresses. En L.C. Rai y J. Gaur (Eds.), *Physiological, biochemical and molecular mechanisms* (pp. 363-388). Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.

Geib, K., Gollmack, D. y Gimmler, H. (1996). Is there a requirement for an external carbonic anhydrase in the extremely acid-resistant green alga *Dunaliella acidophila*?. *European Journal of Phycology*, 31, 273-284.

Geider, R. J., La Roche, J., Greene, R. M. y Olaizola, M. (1993). Response of the photosynthetic apparatus of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) to nitrate, phosphate and iron starvation. *Journal of Phycology*, 29, 755-766.

Geider, R. J., MacIntyre, H., Graziano, L. M. y McKay, R.M. (1998). Responses of the photosynthetic apparatus of *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) to nitrogen and phosphorus limitation. *European Journal of Phycology*, 33, 315-332.

Giardi, M. T., Masojidek, J. y Godde, D. (1997). Effects of abiotic stresses on the turnover of the D1 reaction center II protein. *Physiology Plant*, 101, 635-642.

Gimmler, H. y Weis, U. (1992). *Dunaliella acidophila* – life at pH 1.0. En M. Avron y A. Ben-Amotz (Eds.), *Dunaliella - physiology, biochemistry and biotechnology* (pp. 99-133). Boca Raton: CRC Press.

Gimmler, H., Weiss, U. y Weiss, C. (1989). pH-Regulation and membrane potential of the extremely and resistant green alga *Dunaliella acidophila*. En J. Dainly (Ed.), *Plant membrane transport* (pp. 389-390). Venice: Elsevier Science Publ.

Girotti A. W. y Kriska T. (2004) Role of lipid hydroperoxides in photo-oxidative stress signaling. *Antioxidants and Redox Signaling*, 6, 301-310.

- Goldman, J. C. (1979). Outdoor algal mass cultures—II. Photosynthetic yield limitations. *Water Research*, *11*, 119-136.
- Gould, S.B., Waller, R.F. y McFadden, G.I. (2008). Plastid evolution. *Annual Review of Plant Biology*, *59*, 491-517.
- Gouveia, L. y Oliveira, A.C. (2009). Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *36* (2), 269-74.
- Gouveia, L., Veloso, V., Reis, A., Fernandes, H.L., Empis, J. y Novais, J.M. (1996). Evolution of the pigments in *Chlorella vulgaris* during carotenogenesis. *Bioresource Technology*, *57*, 157-163.
- Greenwell, H. C., Laurens, L. M. L, Shields, R. J., Lovitt, R. W. y Flynn K. J. (2010). Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *Journal of the Royal Society Interface*, *7*, 703-726.
- Griffiths, M.J. y Harrison, S.T.L. (2009). Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, *21*, 493-507.
- Gross, W. (2000). Ecophysiology of algae living in highly acidic environments. *Hydrobiologia*, *433*, 31-37.
- Grossman, A. (2000). Acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to its nutrient environment. *Protist*, *151*, 201-224.
- Grossman, A. y Takahashi, H. (2001). Macronutrient utilization by photosynthetic eukaryotes and the fabric of interactions. *Annual Revision of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, *52*, 163-210.
- Guedes, A.C., Meireles, L.A., Amaro, H.M. y Malcata, F.X. (2010). Changes in lipid class and fatty acid composition of cultures of *Pavlova lutheri*, in response to light intensity. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, *87*, 791-801.
- Guerin, M., Huntley, M. E. y Olaizola, M. (2003). *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology*, *21*, 210-216.
- Gunstone, F.D. y Harwood, J.L. (2007). En F.D. Gunstone, J.L. Harwood y A.J. Dijkstra (Eds.), *The Lipid Handbook 3rd* (pp. 125-128). Boca Raton: CRC Press.

Guschina I. A. y Harwood J.L. (2006). Lipids metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research*, 45, 160-186.

H

Halbach, S. (1977). Catalase activity measured with a micro oxygen electrode in a pressurized reaction vessel. *Analytical Biochemistry*, 80 (2), 383–391.

Halim, R., Gladman, B., Danquah, M.K. y Webley, P.A. (2011). Oil extraction from microalgae for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 102 (1), 178-185.

Halliwell, B. (1996). Cellular stress and protection mechanisms. *Biochemistry Society Transactions*, 24, 1023-1027.

Hallman, R., Friedrich, A., Koops, H.P., Pommerening-Röser, A., Rhode, K., Zenneck, C. y Sand, W. (1992). Physiological characteristics of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans* and physicochemical factors influence microbial metal leaching. *Geomicrobiology Journal*, 10, 193-206.

Hanagata, N. y Dubinsky, Z. (1999). Secondary carotenoid accumulation in *Scenedesmus komarekii* (Chlorophyceae, Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 35, 960-966.

Heredia-Arroyo, T., Wei, W. y Hu, B. (2010). Oil Accumulation via heterotrophic/Mixotrophic *Chlorella protothecoides*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162, 1978-1995.

Hill, W.R., Rinchar, J. y Czesny, S. (2011). Light, nutrients and the fatty acid composition of stream *Periphyton*. *Freshwater Biology*, 56, 1825-1836.

Hirata, K., Tsuji, N. y Miyamoto, K. (2005). Biosynthetic regulation of phytochelatin, heavy metal-binding peptides. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100 (6), 593-599.

Ho, S.H., Chen, C.Y. y Chang, J.S. (2012). Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource Technology*, 113, 244-252.

Ho, S.H., Chen, C.Y., Lee, D.J. y Chang, J.S. (2011). Perspectives on microalgal CO₂-emission mitigation systems - A review. *Biotechnology Advances*, 29, 189-198.

Hoekman, S.K., Broch, A., Robbins, C., Cenicerros, E. y Natarajan, M. (2012). Review of biodiesel composition, properties and specifications. *Renewable and Sustainable Energy Review*, 16, 143-169.

Hsueh, H.T., Ki, W. J., Chen, H.H. y Chu, H. (2009). Carbon bio-fixation by photosynthesis of *Thermosynechococcus* sp. CL-1 and *Nannochloropsis oculata*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 95, 33-39.

Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M. y Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal*, 54, 621-639.

Hu, Q. (2004). Environmental effects on cell composition. En A. Richmond (Ed), *Handbook of microalgal culture* (pp. 83-93). Oxford, UK: Blackwell Science.

Hu, X. y Schulten, K. (1997). How nature harvests sunlight. *Phys*, 50, 28-34.

Huang, G.H., Chen, F., Wei, D., Zhang, X.W. y Chen, G. (2010). Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy*, 87, 38-46.

Hutner, S. H., Provosoli, L., Schatz, A. y Haskins, C. P. (1950). Some approaches to the study of the role of metals in the metabolism of microorganisms. *Proceedings of the American Philosophical Society*, 94, 152-170.

I

Irianto, A. y Austin, B. (2002). Probiotics in aquaculture. *Journal Fish Diseases*, 25, 633-642.

Iwamoto, H. y Sato, S. (1986). EPA production by freshwater algae. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 63, 434.

J

James, G. O., Hocart, C. H., Hillier, W., Chen H., Kordbacheh, F., Price G. D. y Djordjevic, M.A. (2011). Fatty acid profiling of *Chlamydomonas reinhardtii* under nitrogen deprivation. *Bioresource Technology*, 102, 3343-3351.

Jithesh, M. N., Prashanth, S.R., Sivaprakash, K.R. y Parida, A.K. (2006). Antioxidative response mechanisms in halophytes: their role in stress defence. *Journal of Genetics*, 85 (3), 237-254.

K

Kaplan, D., Richmond, A.E., Dubinsky, Z. y Aaronson, S. (1986). Algal nutrition. En A. Richmond (Ed.), *Handbook for Microalgal Mass Culture* (pp. 147-198). Boca Raton, FL., USA: CRC Press.

Kelly, D.O. y Harrison, A.P. (1989). Genus *Thiobacillus*. En N.R. Krieg y J.G. Holt (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (pp.1842-1858). Baltimore: Williams & Wilkins.

Khotimchenko, S.V. y Yakovleva, I.M. (2005). Lipid composition of the red alga *Tichocarpus crinitus* exposed to different levels of photon irradiance. *Phytochemistry*, 66, 73-79.

Kim, N.J. y Lee, C.G. (2001). A theoretical consideration on oxygen production rate in microalgal cultures. *Biotechnology, Bioprocess and Engineering*, 6, 352-358.

Kiritsakis, A. K. y Dugan, L. R. (1985). Studies in photooxidation of olive oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 62, 892-896.

Kneer, R. y Zenk, M. H. (1992). Phytochelatins protect plant enzymes from heavy metal poisoning. *Phytochemistry*, 31, 2663- 2667.

Knothe, G. (2011). A technical evaluation of biodiesel from vegetable oils vs. algae. Will algae-derived biodiesel perform? *Green Chemistry*, 13, 3048-3065.

Koberg, M., Cohen, M., Ben-Amotz, A. y Gedanken, A. (2011). Bio-diesel production directly from the microalgae biomass of *Nannochloropsis* by microwave and ultrasound radiation. *Bioresource Technology*, 102, 4265-4269.

Kurat, C.F., Natter, K., Petschnigg, J., Wolinski, H., Scheuringer, K., Scholz, H., Zimmermann, R., Leber, R., Zechner, R. y Kohlwein, S.D. (2006). Obese yeast: triglyceride lipolysis is functionally conserved from mammals to yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 491-500.

L

La Russa, M., Bogen, C., Uhmeyer, A., Doebbe, A., Filippone, E., Kruse, O. y Mussgnug, J.H. (2012). Functional analysis of three type-2 DGAT homologue genes

for triacylglycerol production in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biotechnology*, 162,13-20.

Ladygin, V.G. y Shirshikova, G. (2006). Carotenoid functions in eukaryote chloroplasts – recent concepts. *Zhurnal Obshchei Biology (Journal of General Biology)*, 67, 163-190.

Lamers, P. P., Janssen, M., De Vos, R. C., Bino, R. J. y Wijffels, R. H. (2012). Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*, a unicellular green microalga. *Journal of Biotechnology*, 162, 21- 27.

Lamotte, F, Vianey-Liaud, N, Duviau, M.P. y Kobrehel, K. (2000). Glutathione reductase in wheat grain. 1. Isolation and characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4978- 4083.

LaRoche, J., Geider, R. J., Graziano, L. M., Murray, H. y Lewis, K. (1993). Induction of specific proteins in eukaryotic algae grown under iron-, phosphorus-, or nitrogen-deficient conditions. *Journal of Phycology*, 29,767-77.

Ledford, H. K. y Niyogi, K. K. (2005). Singlet oxygen and photo-oxidative stress management in plants and algae. *Plant, Cell and Environment*, 28, 1037-1045.

Lee, S.J., Yoon, B.D. y Oh, H.M. (1998). Rapid method for the determination of lipid from the green algae *Botryococcus braunii*. *Biotechnology Techniques*, 7, 553–6.

Lemoine, Y. y Schoefs, B. (2010). Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress. *Photosynthesis Research*, 106, 155-177.

Lers, A., Levy, H. y Zamir, A. (1991). Co-regulation of a gene homologous to early light-induced genes in higher plants and β -carotene biosynthesis in the alga *Dunaliella bardawil*. *The Journal of Biological Chemistry*, 266, 13698-13705.

Lewitus, A.J., Caron, D.A. y Miller, K.R. (1991). Effects of light and glycerol on the organization of the photosynthetic apparatus in the facultative heterotroph *Pyrenomonas salina* (Cryptophyceae). *Journal of Phycology*, 27 (5), 578-587.

Li, M., Hu, C., Zhu, Q., Chen, L., Kong, Z. y Liu, Z. (2006). Copper and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in the microalga *Pavlova viridis* (Prymnesiophyceae). *Chemosphere*, 62, 565-572.

Li, X.F., Xu, H. y Wu, Q.Y. (2007). Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnology Bioengineering*, 98, 764-771.

Li, Y., Han, D., Sommerfeld, M. y Hu Q. (2011). Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococcum* sp (Chlorophyceae) under nitrogen-limited conditions. *Bioresource Technology*, 102 (1), 123-129.

Li, Y., Han, D., Hu, G., Sommerfeld, M. y Hu, Q. (2010). Inhibition of starch synthesis results in overproduction of lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology and Bioengineering*, 107 (2), 258-268.

Liang, Y., Sarkany, N. y Cui, Y., (2009). Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters*, 31, 1043-1049.

Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymology*, 148, 350-382.

Lichtenthaler, H.K. (1999). The 1-deoxy-d-xylulose- 5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 47-65.

Lin, Q. y Lin, J. D. (2011). Effects of nitrogen source and concentration on biomass and oil production of a *Scenedesmus rubescens* like microalga. *Bioresource Technology*, 102, 1615-1621.

Liu, J., Yuan C., Hu, G. y Li, F. (2012). Effects of light intensity on the growth and lipid accumulation of microalga *Scenedesmus* sp. 11-1 under nitrogen limitation. *Applied Biochememistry and Biotechnology*, 166, 2127-2137.

Liu, W., Huang, Z., Li, P., Xia, J. y Chen, B. (2012). Formation of triacylglycerol in *Nitzschia closterium* f. minutissima under nitrogen limitation and possible physiological and biochemical mechanisms. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 418, 24-29.

López-Archilla, A.I. (2005). Rio Tinto: un universo de mundos microbianos. *Ecosistemas*, 14 (2), 52-65.

López-Archilla, A.I. y Amils, R. (1999). A comparative ecological study of two acidic rivers in southwestern Spain. *Microbial Ecology*, 38, 146-156.

López-Archilla, A.I., Marín, I. y Amils, R. (1993). Bioleaching and interrelated acidophilic microorganisms from Río Tinto, Spain. *Geomicrobiology Journal*, *11*, 223-233.

López-Archilla, A.I., Marín, I. y Amils, R. (2001). Microbial community composition and ecology of an acidic aquatic environment: The Tinto River, Spain. *Microbial Ecology*, *41*, 20-35.

López-Archilla, A.I., Marín, I., González, A. y Amils, R. (1995). Identification of fungi from an acidic river. En L. Rossen, V. Rubio, M.T. Dawson y J. Frisvad (Eds), *Fungal Identification Techniques* (pp. 202-211). Luxemburg: European Commission.

Lp, P.F. y Chen, F. (2005). Production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in the dark. *Process Biochemistry*, *40* (2), 733-738.

Lu, C. y Vonshak, A. (2002). Effects of salinity on photosystem II function in cyanobacterial *Spirulina platensis* cells. *Physiology Plant*, *114*, 405-413.

Lv, J.M., Cheng, L.H., Xu, X.H., Zhang, L. y Chen, H.L. (2010). Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. *Bioresource Technology*, *101*, 6797-6804.

M

Ma, F. y Hanna, M.A. (1999). The effect of mixing on transesterification of beef tallow. *Bioresource Technology*, *69*, 289-293.

Mallick, N. y Mohn, F.H. (2000). Reactive oxygen species: response of algal cells. *Journal of Plant Physiology*, *157*, 183-193.

Mandal, S. y Mallick, N., (2009). Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *84*, 281-291.

Martinez, F. y Orus, M.I. (1991). Interactions between glucose and inorganic carbon metabolism in *Chlorella vulgaris* strain UAM 1011. *Plant of Physiology*, *95*, 1150-1155.

Masojídek, J., Kiblízek, M. y Torzillo, G. (2004). Photosynthesis in microalgae. En A. Richmond (Ed), *Handbook of microalgal culture* (pp. 21-39). Oxford, UK: Blackwell Science.

- Mata, T.M., Martins, A. y Caetano, N.S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 217- 232.
- Mata, T.M., Martins, A.A., Sikdar, S.K. y Costa, C.A.V. (2011). Sustainability considerations of biodiesel based on supply chain analysis. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 13 (5), 655-671.
- Mehlhorn, H., Lelandais, M., Korth, H. G. y Foyer, C. H. (1996). Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases, *FEBS Letters*, 378,203-206.
- Melis, A. (1999). Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage?. *Trends in Plant Science*, 4, 130-135.
- Melis, A. (2007). Photosynthetic H₂ metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii* (unicellular green algae). *Planta*, 226, 1075-1086.
- Melis, A. (2009). Solar energy conversion efficiencies in photosynthesis: minimizing the chlorophyll antennae to maximize efficiency. *Plant Science*, 177, 272-280.
- Melis, A., Zhang, L., Forestier, M., Ghirardi, M. L. y Seibert, M. (2000). Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 122, 127-135.
- Mendes, R.L., Coelho, J.P., Fernandes, H.L., Marrucho, I.J., Cabral, J.M., Novais, J.M., et al. (1995). Applications of supercritical CO₂ extraction to microalgae and plants. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 62, 53-9.
- Mendes, R.L., Nobre, B.P., Cardoso, M.T., Pereira, A.P. y Palabra, A.F. (2003). Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. *Inorganica Chimica Acta*, 357, 328-34.
- Mendes, R.L., Reis, A.D. y Palabra, A.F. (2006). Supercritical CO₂ extraction of gamma-linolenic acid and other lipids from *Arthrospira* (*Spirulina*) *maxima*: comparison with organic solvent extraction. *Food Chemistry*, 99, 57-63.
- Merchant, S.S., Kropat, J., Liu B., Shaw, J. y Warakanon, J. (2012). TAG, You're it! *Chlamydomonas* as a reference organism for understanding algal triacylglycerol accumulation. *Current Opinion in Biotechnology*, 23, 352-363.

- Merchant, S.S., Allen, M.D., Kropat, J., Moseley, J.L., Long, J.C., Tottey, S. y Terauchi, A.M. (2006). Between a rock and a hard place: trace element nutrition in *Chlamydomonas*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763, 578-594.
- Merzlyak, M. N., Chivkunova, O. B., Gorelova, O. A., Reshetnikova, I. R. y Solovchenko, A. E. (2007). Effect of nitrogen starvation on optical properties, pigments and arachidonic acid content of the unicellular green alga *Parietochloris incisa* (Trebouxiophyceae, chlorophyta). *Journal of Phycology*, 43, 833-843.
- Messerli, M.A., Amaral-Zettler, L.A., Zettler, E., Jung, S.K., Smith, P.J.S. y Sogin, M.L. (2005). Life at acidic pH imposes an increased energetic cost for a eukaryotic acidophile. *The Journal of Experimental Biology*, 208, 2569-2579.
- Miao, X. y Wu, Q., (2006). Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology*, 97, 841-846.
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S. y Mittler, R. (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell and Environment*, 33 (4), 453-467.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7 (9), 405-410.
- Mohammed, G.H., Binder, W.D. y Gillies, S.L. (1995). Chlorophyll fluorescence- a review of its practical forestry applications and instrumentation. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 10 (4), 383-410.
- Molina-Grima, E., Robles-Medina, A., Gimenez-Gimenez, A., Sanchez-Perez, J.A., Garcia-Camacho F. y Garcia-Sanchez J.L. (1994). Comparison between extraction of lipids and fatty acids from microalgal biomass. *Journal of the American Oils Chemist's Society*, 71(9), 955-9.
- Morelli, E. y Scarano, G. (2004). Copper-induced changes of non-protein thiols and antioxidant enzymes in the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Science*, 167, 289-296
- Moroney, J. V. y Somanchi, A. (1999). How do algae concentrate CO₂ to increase the efficiency of photosynthetic carbon fixation?. *Plant Physiology*, 119, 9-16.
- Murata, N., Mohanty, P. S., Hayashi, H. y Papageorgiou, G.C. (1992). Glycinebetaine stabilizes the association of extrinsic proteins with the photosynthetic oxygen evolving complex. *FEBS Letters*, 296, 187-189.

Musacchio, A., Pinto, G., Sabato, S. y Taddei, R. (1978). Aloresistenza in diversi ceppi di *Cyanidium caldarium* forma A et forma B. *Delpinoa.*, 18-19, 37-44.

N

Nagalakshmi, N. y Prasad, M.N.V. (2001). Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. *Plant Science*, 160, 291-299.

Naik, P.S, Chanemougasoundharam, A., Paul-Khurana, S.M. y Kalloo, G. (2003). Genetic manipulation of carotenoid pathway in higher plants. *Current Science*, 85, 1423-30.

Nichols, D. S. (2003). Prokaryotes and the input of polyunsaturated fatty acids to the marine food web. *FEMs Microbiology Letters*, 219,1-7.

Niyogi, K.K. (1999). Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annual Review of Plant Molecular and Biology*, 50, 333-359.

Noctor, G. y Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and glutathione, keeping active oxygen under control. *Annual Revision of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 249-279.

Norsker, N.H., Barbosa, M.J., Vermuë, M.H., y Wijffels R.H. (2011). Microalgal production - A close look at the economics. *Biotechnology Advances*, 29, 24-27.

Novis, P.M., Halle, C., Wilson, B. y Tremblay L.A. (2009). Identification and characterization of freshwater algae from a pollution gradient using *rbcl* sequencing and toxicity testing. *Archives of Environment Contamination and Toxicology*, 57, 504-514.

O

Ohlrogge, J. y Browse, J. (1995). Lipid biosynthesis. *Plant Cell*, 7, 957-970.

Ort, D.R., Zhu, X. y Melis, A. (2011). Optimizing antenna size to maximize photosynthetic efficiency. *Plant Physiology*, 155, 79-85.

Osmond, B., Badger, M., Maxwell, K., Bjorkman, O. y Leegood, R. (1997). Too many photons: photorespiration, photoinhibition and photooxidation. *Trends in Plant Science*, 2(4), 119-121.

Ota, M., Kato, Y., Watanabe, H., Watanabe, M., Sato, Y., Smith, R. L. Jr y Inomata, H. (2009). Fatty acid production from a highly CO₂ tolerant alga, *Chlorococcum littorale*, in the presence of inorganic carbon and nitrate. *Bioresource Technology*, 100 (21), 5237-42.

Otsuka, H. (1961) Changes of lipid and carbohydrate contents of *Chlorella* cells during the sulfur starvation, as studied by the technique of synchronous culture. *Journal of General and Applied Microbiology*, 7, 72-77.

P

Padley, F.B., Gunstone, F.D. y Harwood, J.L. (1986)., En F.D. Gunstone, J.L. Harwood, y F.B. Padley (Eds.), *The Lipid Handbook*, 1st ed. (pp. 55-113). London: Chapman Hall.
Page, R. A., Okada, S. y Harwood, J. L. (1994). Acetyl-CoA carboxylase exerts strong flux control over lipid synthesis in plants. *Biochimica et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism*, 1210 (3), 369-372.

Pal, D., Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z. y Boussiba, S. (2011). The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90, 1429-1441.

Parida, A. K. y Das, A. B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60 (3), 324-349.

Parkhill, J. P., Maillet, G., y Cullen, J. J. (2001). Fluorescence-Based maximal quantum yield for psii as a diagnostic of nutrient stress. *Journal of. Phycology*, 37, 517-529.

Pérez-García, O., Escalante, F.M.E., de-Bashan, L.E. y Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water research*, 45, 11 - 36.

Phadwal, K. y Singh, P.K. (2003). Effect of nutrient depletion on β -carotene and glycerol accumulation in two strains of *Dunaliella* sp. *Bioresource Technology*, 90 (1), 55-58.

Pignolet, O., Jubeau, S., Vaca-Garcia, C. y Michaud, P. (2013). Highly valuable microalgae: biochemical and topological aspects. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 40 (8), 781-796.

Polle, J.E.W., Kanakagiri, S.D. y Melis, A. (2003). tla1, a DNA insertional transformant of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* with a truncated light-harvesting chlorophyll antenna size. *Planta*, 217, 49-59.

Prabakaran, P. y Ravindran, A. D. (2011). A comparative study on effective cell disruption methods for lipids extraction from microalgae. *Letter in Applied Microbiology*, 53 (2), 150-154.

Pulz, O. y Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, 635-648.

R

Rabinowitch, H.D., Privalle, C.T. y Fridovich, I. (1987). Effects of paraquat on the green alga *Dunaliella salina*: protection by the mimic of superoxide dismutase, desferal-Mn(IV). *Free Radical Biology and Medicine*, 3, 125-31.

Rao, A. R., Dayananda, C., Sarada, R., Shamala, T. R. y Ravishankar, G. A. (2007). Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresource Technology*, 98, 560-564.

Rathinasabapathi, B. (2000). Metabolic engineering for stress tolerance: installing osmoprotectant synthesis pathways. *Annals of Botany*, 86, 709-716.

Ratledge, C. y Wynn, J.P. (2002). The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in applied Microbiology*, 51, 1-51.

Ravelonandro, P.H., Ratianarivo, D.H., Joannis-Cassan, C., Isambert, A. y Rahehimandimby, M. (2008). Influence of light quality and intensity in the cultivation of *Spirulina platensis* from Toliara (Madagascar) in a closed system. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83, 842-848.

Raven, J.A. y Geider, R.J. (1988). Temperatura and algal growth. *New Phytologist*, 110, 441-461.

Raven, J. A., Beardall, J. y Johnston, A.M. (1982). Inorganic carbon transport in relation to H⁺ transport at the plasmalemma of photosynthetic cells. En D. Marmé, E.

- Marrè y R. Hertel (Eds.), *Plasmalemma and tonoplast: their functions in the plant cell* (pp. 41-47). Amsterdam: Elsevier Biomedical Press.
- Refaat, A.A. (2009). Correlation between the chemical structure of biodiesel and its physical properties. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 6 (4), 677-694.
- Remias, D., Lütz Meindl, U. y Lütz, C. (2005). Photosynthesis, pigments and ultrastructure of the alpine snow alga *Chlamydomonas nivalis*. *European Journal of Phycology*, 40, 259-268.
- Renaud, S.M., Thinh, L.V., Lambrinidis, G. y Parry, D.L. (2002). Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*, 211, 195-214.
- Richmond, A. (1986). Cell response to environmental factors. En A. Richmond (Ed.), *CRC Handbook of microalgal mass culture* (pp. 89-95). Florida: CRC Press Inc.
- Richmond, A. (2004). Biological Principles of mass cultivation. En A. Richmond (Ed.) *Handbook of microalgal culture* (pp. 125-177). Oxford: Blackwell Press.
- Riekhof, W. R., Sears, B. B. y Benning, C. (2005) Annotation of genes involved in glycerolipid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*: discovery of the betaine lipid synthase BTA1Cr. *Eukaryotic Cell*, 4, 242-252.
- Ritchie, R. J. y Larkum, A. W. D. (2012). Modelling photosynthesis in shallow algal production ponds. *Photosynthetica*, 50 (4), 481-500.
- Rivas, M. O, Vargas, P. y Riquelme, C. E. (2010). Interactions of *Botryococcus braunii* cultures with bacterial biofilms. *Microbial Ecology*, 60 (3), 628-635.
- Rodolfi, L., Zittelli, G.C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G. y Tredici, M.R. (2009). Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102, 100-112.
- Roessler, P.G., Brown, L.M., Dunahay, T.G., Heacox, D.A., Jarvis, E.E., Schneider, J.C., Talbot, S.G. y Zeiler, K.G. (1994). Genetic engineering approaches for enhanced production of biodiesel fuel from microalgae. En M.E. Himmel, J. Baker y R.P. Overend (Eds.) *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production* (pp. 256-270). American Chemical Society.

Rontani, J.F., Marty J.C., Miquel, J.C., John, K. y Volkman, J.K. (2006). Free radical oxidation (autoxidation) of alkenones and other microalgal lipids in seawater. *Organic Geochemistry*, 37, 354-368.

Ruangsomboon, S. (2012). Effect of light, nutrient, cultivation time and salinity on lipid production of newly isolated strain of the green microalga, *Botryococcus braunii* KMITL 2. *Bioresource technology*, 109, 261-265.

S

Salama, el-S., Kim, H.C., Abou-Shanab, R.A., Ji, M.K., Oh, Y.K., Kim, S.H. y Jeon, B.H. (2013). Biomass, lipid content, and fatty acid composition of freshwater *Chlamydomonas mexicana* and *Scenedesmus obliquus* grown under salt stress. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36, 827-833.

Santos, A. M., Janssen, M., Lamers, P. P., Evers, W. A. y Wijffels, R. H. (2012). Growth of oil accumulating microalga *Neochloris oleoabundans* under alkaline-saline conditions. *Bioresource Technology*, 104, 593-599.

Sato, N., Hagio, M., Wada, H. y Tsuzuki, M. (2000) Environmental effects on acidic lipids of thylakoid membranes. En J.L. Harwood y P.J. Quinn (Eds). *Recent Advances in the Biochemistry of Plant Lipids* (pp. 912-914). London: Portland Press Ltd.

Scarsella, M. (2010). Study on the optimal growing conditions of *Chlorella vulgaris* in bubble column photobioreactors. *Chemical Engineering Transactions*, 17, 85-90.

Schreiber, U., Hormann, H., Asada, K. y Neubauer, C. (1995). O₂-dependent electron flow in spinach chloroplasts: Properties and possible regulation of the Mehler-Ascorbate Peroxidase Cycle. *Photosynthesis. Light to Biosphere Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*. 2, 813-818.

Schubert, H., Fulda, S. y Hagemann, M. (1993). Effects of adaptation to different salt concentrations on photosynthesis and pigmentation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6083. *Journal of Plant Physiology*, 142, 291-295.

Schützendübel, A. y Polle, A. (2002). Plant responses to abiotic stress: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*, 53, 1351-1365.

- Schwender J., Seemann M., Lichtenthaler H.K. y Rohmer M. (1996). Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehydes 3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Biochemical Journal*, 316, 73-80.
- Shalata, A. y Neumann, P. M. (2001). Exogenous ascorbic acid (vitamin C) increases resistance to salt stress and reduced lipid peroxidation. *Journal of Experimental Botany*, 52, 2207-2211.
- Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J. y Roessler, P. (1998). A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program – Biodiesel From Algae, Golden, CO, National Renewable Energy Institute, NREL/TP-580-24190, pp. 328.
- Silverman, M. P. y Lundgren, D. G. (1959). Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology*, 77, 642-647.
- Sloth, J.K., Wiebe, M.G. y Eriksen, N.T. (2006). Accumulation of phycocyanin in heterotrophic and mixotrophic cultures of the acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 168-175.
- Solovchenko, A. E. (2012). Physiological role of neutral lipid accumulation in eukaryotic microalgae under stresses. *Russian Journal of Plant Physiology*, 59 (2), 167-176.
- Solovchenko, A. E. (2013). Physiology and adaptive significance of secondary carotenogenesis in green microalgae. *Russian Journal of Plant Physiology*, 60, 1.
- Solovchenko, A.E. y Merzlyak, M.N. (2008). Screening of visible and UV radiation as a photoprotective mechanism in plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 55, 719-737.
- Solovchenko, A.E., Chivkunova, O.B., Semenova, L.R., Selyakh, I.O., hcherbakov, P.N., Karpova E.A. y Lobakova E.S. (2013). Stress induced changes in pigment and fatty acid content in the microalga *Desmodesmus* sp. isolated from a White Sea Hydroid. *Russian Journal of Plant Physiology*, 60 (3), 313-321.
- Song, M., Pei, H., Hu, W. y Ma, G. (2013). Evaluation of the potential of 10 microalgal strains for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 141, 245-51.

Spijkerman, E. y Wacker, A. (2011). Interactions between P-limitation and different C conditions on the fatty acid composition of an extremophile microalga. *Extremophiles*, 15,597-609.

Subramaniam, R., Dufreche, S., Zappi, M. y Bajpai, R. (2010). Microbial lipids from renewable resources: production and characterization. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37, 1271-1287.

Sudhir, P. y Murthy, S. D. S. (2004). Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. *Photosynthetica*, 42 (4), 481-486.

Sudhir, P., Pogoryelov, D., Kovacs, L., Garab, G. y Murthy, S. D. S. (2005). The effects of salt stress on photosynthetic electron transport and thylakoid membrane proteins in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 38 (4), 481-485.

Sueoka, N. (1959). Replication of deoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas*. *Genetics*, 44 (4), 540-540.

Sukenik, A., Yamaguchi, Y. y Livne, A. (1993). Alterations in lipid molecular species of the marine eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *Journal of Phycology*, 29, 620-626.

T

Takagi, M. (2006). Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101, 223-226.

Tan, Y.X. y Lin, J. (2011). Biomass production and fatty acid profile of a *Scenedesmus rubescens*-like microalga. *Bioresource Technology*, 102, 10131–10135.

Tans, P. (2009). Trends in atmospheric carbon dioxide. Earth system research laboratory. National Oceanic Atmospheric Administration. Department of Commerce, U.S.

Thompson G.A.Jr. (1996). Lipids and membrane function in green algae. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1302, 7-45.

Toplin, J.A., Norris, T.B., Lehr, C.R., McDermott, T.R. y Castenholz, R.W. (2008). Biogeographic and phylogenetic diversity of thermoacidophilic *cyanidiales* in yellowstone National Park, Japan, and New Zealand. *Applied of Environmental and Microbiology*, 74 (9), 2822-2833.

Tredici, M.R. (2010). Photobiology of microalgae mass cultures: understanding the tools for the next green revolution. *Biofuels*, 1(1), 143-162.

V

Van den Burg, B. (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, 6, 213-218.

Van den Hoek, C., Mann, D.G. y Jahns, H.M. (1995). Algae. An introduction to phycology. Cambridge: University Press.

Vaquero, I., Ruiz-Domínguez, M.C., Márquez, M. y Vílchez, C. (2012) Cu-mediated biomass productivity enhancement and lutein enrichment of the novel microalga *Coccomyxa onubensis*. *Process Biochemistry*, 47, 694 -700.

Verma, K. y Mohanty, P. (2000). Alterations in the structure of phycobilisomes of the cyanobacterium, *Spirulina platensis* in response to enhanced Na⁺ level. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 795-798.

Volgusheva, A. A., Zagidullin, V.E. ,Antal, T.K., Korvatovsky, B.N, Krendeleva, T.E, Paschenko, V.Z. y Rubín, A.B. (2007). Examination of chlorophyll fluorescence decay kinetics in sulfur deprived algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1767, 559-564.

W

Wahidin, S., Idris, A. y Shaleh, S.R. (2013). The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. *Bioresource Technology*, 129, 7-11.

Waltz, E. (2009). Biotech's new gold? *Nature Biotechnology*, 27, 15-18.

Wang, B., Zarka, A., Trebst, A. y Boussiba, S. (2003). Astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* (chlorophyceae) as an active photoprotective process under high irradiance. *Journal of Phycology*, 39, 1116–1124.

Wang, L. y Weller, C.L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science and Technology*, 17, 300-12.

Wang, Y. y Peng, J. (2008). Growth-associated biosynthesis of astaxanthin in heterotrophic *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24 (9), 1915-1922.

Wang, Z.T., Ullrich, N., Joo, S., Waffenschmidt, S. y Goodenoug, U. (2009). Algal Lipid Bodies: Stress Induction, Purification, and Biochemical Characterization in Wild-Type and Starchless *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic cell*, 8 (12), 1856-1868.

Wen, Z.Y. y Chen, F. (2003). Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid. *Biotechnology Advances*, 21, 273-294.

Widjaja, A., Chien, C.C. y Ju, Y. H. (2009). Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 40, 13-20.

Wijffels, R.H, Barbosa, M.J. y Eppink M.H.M. (2010). Microalgae for the production of bulk chemicals and biofuels. *Biofuels bioproducts and biorefining-biofpr.*, 4 (3), 287-295.

Wijffels, R.H. y Barbosa, M.J. (2010). An Outlook on Microalgal Biofuels. *Science*, 329 (5993), 796-799.

Wood, B. J. B., Grimson, P. H. K., German, J. B. y Turner, M. (1999). Photoheterotrophy in the production of phytoplankton organisms. *Journal Biotechnology*, 70, 175-183.

Work, V.H., D'Adamo, S., Radakovits, R., Jinkerson, R.E. y Posewitz, M.C. (2012). Improving photosynthesis and metabolic networks for the competitive production of phototroph-derived biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*, 23 (3), 290-297.

X

Xu, H., Miao, X.L. y Wu, Q.Y. (2006) High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal Biotechnology*, 126, 499-507.

Y

Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D. y Somero, G. N. (1982). Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. *Science*, *217*, 1214-1222.

Ye, Z.W., Jiang, J.G. y Wu, G.H. (2008). Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: Progresses and prospects. *Research review paper, Biotechnology Advances*, *26*, 352-360.

You, T. y Barnett, S.M. (2004). Effect of light quality on production of extracellular polysaccharides and growth rate of *Porphyridium cruentum*. *Biochemical Engineering Journal*, *19*, 251-258.

Young, A., Orset, S. y Tsavalos, A. (1997). Method for carotenoids analysis. En M. Pessaraki (Ed.), *Handbook of photosynthesis* (pp. 597-622). New York: Marcel Dekker.

Z

Zhang, L., Happe, T. y Melis, A. (2002). Biochemical and morphological characterization of sulfur-deprived and H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga). *Planta*, *214*, 552-561.



Universidad
de Huelva

VI. ANEXOS

Producción Científica

1. Publicaciones

- **Ruiz, M.D.C.**, Gálvez, A.C., De la Morena, B., Vílchez, C. y Casal, C. (2009). Different covering plastic films used for low tunnels affect the strawberry yield in southern Spain. *New Biotechnology*, 25S, S316.
- Vázquez, M., Vaquero, I., **Ruiz, M.C.**, Márquez, M., Mogedas, B. y Vilchez, C. (2011). Hacia nuevos alimentos funcionales: producción de microalgas enriquecidas en caroteno. *Alimentaria*, 427, 83-87.
- Vaquero, I., **Ruiz-Domínguez, M.C.**, Márquez, M. y Vílchez, C. (2012) Cu-mediated biomass productivity enhancement and lutein enrichment of the novel microalga *Coccomyxa onubensis*. *Process Biochemistry*, 47, 694 -700.
- Garbayo, I., Torronteras, R., Forjan, E. Cuaresma, M., Casal, C., Mogedas, B., **Ruiz-Domínguez, M.C.**, Márquez, C., Vaquero, I., Fuentes-Cordero, J.L. Fuentes, R. González-del-Valle, M. y Vílchez, C. (2012). Identification and physiological aspects of a novel carotenoid-enriched, metal-resistant microalga isolated from an acidic river in Huelva (Spain). *Journal of Phycology*, 48, 607-614.
- Sánchez, F.J., Meeßen, J., **Ruiz, M.C.**, G^a Sancho, L., Ott, S., Vílchez, C., Horneck, G. y de la Torre, R. (2013). UV-C tolerance of symbiotic *Trebouxia sp.* in the space-tested lichen species *Rhizocarpon geographicum* and *Circinaria gyrosa*: role of the hydration state and cortex/screening substances. *International Journal of Astrobiology*, 1-18.

2. Publicaciones enviadas.

- Forján, E., Vaquero, I., **Ruiz-Domínguez, M.C.**, Gojkovic, Ž, Vázquez, M., Márquez, M. Mogedas, B., Bermejo, E., Girlich, S., Domínguez, M.J., Navarro, F., Cuaresma, M., Vílchez, C. y Garbayo, I. (2013). Microalgae: fast-growth sustainable green factories. *Algal Research*.
- **Ruiz-Domínguez, M.C.**, Vaquero, I., Obregón, V., de la Morena, B., Vega, J.M. y Vílchez, C. (2013). Growth and lipid accumulation of an acidophile microalga under nutrient deprivation. *Process Biochemistry*.
- Vaquero, I., Vázquez, M., **Ruiz-Domínguez, M.C.** y Vílchez, C. (2013). Efficient inorganic carbon utilization as a tool to enhance acid environment microalgal growth. *Journal of Applied Microbiology*.
- Vaquero, I., Mogedas, B., **Ruiz-Domínguez, M.C.** y Vílchez, C. (2013). Light-mediated lutein enrichment of an acid environment microalga. *Process Biochemistry*.

3. Participación en Congresos, Cursos y en Eventos de Difusión Científica.

- XIV Congreso Internacional de Biotecnología, Barcelona, Septiembre 2009.
Participación mediante PÓSTER: “Different covering plastic films used for low tunnels affect the strawberry yield in southern Spain”
- III International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology, Lisboa (Portugal), Diciembre 2009.
Participación mediante PÓSTER: Compared production of lutein-enriched biomass from a new strain of microalgae in different photobioreactors”.

- 5th International Meeting on Biotechnology, BioSpain 2010, Pamplona (España), Septiembre 2010.
Participación mediante PÓSTER: “Productivity and lipid accumulation of a novel acidophile microalgae”.
Colaboración COMUNICACIÓN ORAL: Productivity and lipid accumulation of a novel acidophile microalgae”.
- “Semana Onubense de la Ciencia y la Tecnología”, Universidad de Huelva, 2009.
Participación mediante PÓSTER: “Microalgas: alimentación, salud y biocombustibles” Primer Premio de dicha actividad científica.
- “Semana Onubense de la Ciencia y la Tecnología”, Universidad de Huelva, 2010.
Participación mediante PÓSTER: “Microalgas: alimentación, salud y biocombustibles”.
- 1st International Symposium Young Algaeneers, Wageningen (Holanda), Junio 2012.
Participación mediante PÓSTER: “Increased lipid content and modified fatty acid profile of *Coccomyxa onubensis*, an acidotolerant microalga from Río Tinto (Huelva, Spain)”.
Participación mediante PÓSTER: “*Coccomyxa onubensis*, a novel lutein producer acidotolerante microalga from Rio Tinto”.
- 9th International Congress of Extremophiles, Sevilla (España). Septiembre 2012.
Participación mediante PÓSTER: “Enhancement of polyunsaturated fatty acids and carotenoid production in the extremophile microalga *Coccomyxa onubensis* by UVA radiation”
- 1^o Workshop Universidad de Wageningen-AlgaePARK-CEPSA-FERTIBERIA (CIECEM-UHU) Matalascañas, Almonte (España). Julio 2012.
Colaboración COMUNICACIÓN ORAL: “Lipid production of microalgae: ALGINCO2 project”

- III Congreso Latinoamericano, BIORREFINERIAS, Pucón (Chile). Noviembre 2012.
Participación mediante PÓSTER: “Proyecto CEPESA-ALGINCO2: Producción de lípidos de valor energético con microalgas cultivadas con CO₂ industrial”.
- 2º Workshop Internacional ALGAENET. Energías Renovables y Obtención de Productos de Interés. Julio 2013.
- 5th Congress of European Microbiologists. Leipzig, (Alemania). Julio 2013.
Participación mediante PÓSTER: “Biomass and lipid production of *Chlorella sp.* and *Scenedesmus sp.* isolated from a CEPESA refinery and a natural area in Andalucía.”

