

# Cinética de crecimiento y productividad lipídica del alga *Tetradismus wisconsinensis* S. obtenida en un cuerpo de agua de Paraguay

Growth kinetics and lipid productivity of algae *Tetradismus wisconsinensis* S. obtained in water bodies in Paraguay

Tomás Rodrigo López<sup>1\*</sup>, Edgar Fidel Galeano<sup>2</sup>, Melissa Dos Santos<sup>2</sup>, Sergio Rodriguez Bonet<sup>3</sup>, Alejandro Daniel Benitez<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biotecnología. <sup>2</sup> Departamento de Biología. <sup>3</sup> Departamento de Química. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FACEN).

<sup>4</sup> Ingeniería Ambiental. Facultad de Ciencias Agrarias (FCA), Universidad Nacional de Asunción (UNA).

\* Autor para correspondencia (tomaslopezfacen@gmail.com)

Recibido: 07/03/2016; Aceptado: 10/05/2016.

Doi:10.18004/investig.agrar.2016.junio.22-29

## RESUMEN

Se evaluaron las características biocinéticas y lipídicas de la microalga *Tetradismus wisconsinensis*. Se obtuvieron cepas puras aisladas del lago Ypacaraí, que posteriormente fueron cultivadas en medio líquido Bristol, y escaladas hasta volúmenes de 5 L. La cinética de crecimiento se realizó mediante el recuento en cámara de Neubauer. Las algas se cultivaron en dos condiciones de aireación, una por agitación manual tres veces por día, y otra con aireación forzada a 0,7 vvm, ambas por triplicado. Para la determinación del rendimiento lipídico se cosechó la biomasa por filtración al vacío, se determinó la humedad de la muestra y se procedió a la extracción de los aceites por el método de solventes utilizando alcohol y éter de petróleo; la eliminación del solvente se realizó en rotavapor. La cepa presentó una cinética de crecimiento prolongada, con tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) de 0,113 d<sup>-1</sup> en el medio agitado manualmente; 0,17 d<sup>-1</sup> a 0,7vvm y tiempos de duplicación (Td) de 6,13 y 4,02 días respectivamente. La productividad de biomasa fue de 0,044 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> y la volumétrica de lípidos 4,81 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, con porcentaje de lípidos extraídos de 11,85% (p/p) sobre base seca de biomasa. En cuanto al perfil lipídico se obtuvo mayor porcentaje de ácidos grasos insaturados, el linoleico y linolénico.

**Palabras clave:** biocombustibles, microalgas, lípidos.

## ABSTRACT

The biocinetic and lipidic characteristics of the microalgae *Tetradismus wisconsinensis* were assessed. Pure strains isolated from the Ypacaraí lake were obtained and later cultured in Bristol's medium and scaled up to volumes of 5 L. Growth kinetics was performed by Neubauer chamber counting. Algae were cultured in two ventilation conditions: one by manual stirring three times a day, and one by forced ventilation at 0.7 vvm, both in triplicate. For the determination lipid yield, biomass was harvested by vacuum filtration, sample's humidity level was measured and oils were extracted through solvent method using alcohol and petroleum ether; solvent was removed with a rotary evaporator. The strain showed prolonged growth, with a 0,113 d<sup>-1</sup> specific growth rate in the manually stirred medium and a 0,17 d<sup>-1</sup> specific growth rate at 0,7 vvm, and duplication times (Dt) of 6,13 and 4,02 days respectively. Biomass productivity was 0,044 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> and lipid productivity was 4,81 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, with a percentage of extracted lipids of 11,85% (p/p) on a dry-based biomass. As for the lipid profile, higher percentages of linoleic, linolenic and unsaturated fatty acids were obtained.

**Key words:** biofuels, microalgae, lipids.

## INTRODUCCIÓN

La búsqueda de suministros de energía limpia para el futuro es uno de los principales retos actuales en la sociedad, su consecución está fuertemente ligada a la estabilidad global, prosperidad económica y calidad de vida. Los combustibles convencionales (petróleo, carbón y gas) representan el 70% de la energía requerida a nivel mundial, y están destinadas principalmente al sector del transporte (Gouveia y Oliveira 2009). En este escenario surgen los biocombustibles que vienen a desempeñar un papel importante al disminuir la dependencia de los combustibles fósiles, reducir las emisiones de gases de efecto invernadero, los hidrocarburos y óxidos de azufre, en conformidad al acuerdo del protocolo de Kioto. El combustible biodiesel ha recibido especial consideración por sus ventajas ambientales de: ser biodegradable, renovable y no ser tóxico.

Los biocombustibles de tercera generación, se presentan como una alternativa diferente, desde el punto de vista de la materia prima utilizada, al producirse esta a partir de una biomasa distinta a las de primera y segunda generación. Su obtención está basada en tecnologías emergentes, que prometen elevados rendimientos por unidad de área, y menores costos de producción. En este sentido el aceite obtenido a partir de las microalgas aparece como una potencial fuente de biodiesel, debido a que el contenido lipídico de muchas especies de microalgas supera ampliamente al contenido de las demás fuentes vegetales utilizadas en los biocombustibles de primera y segunda generación (Plata et al. 2009, Sander y Murthy 2010).

Las microalgas son organismos unicelulares, autótrofos fotosintéticos, productores de oxígeno, viven en el agua o lugares muy húmedos, de distribución cosmopolita, pueden crecer en prácticamente todas partes, requiriendo simplemente luz solar, nutrientes sencillos, y suficiente aireación. Se pueden adaptar a vivir en una gran variedad de condiciones ambientales, y pueden alcanzar hasta un 70% de contenido de aceite en peso seco. (Wehr y Sheath 2003). *Tetrademus wisconsinensis* S., es una microalga fotosintética perteneciente a la clase Chlorophyceae, orden Sphaeropleales y la familia Scenedesmaceae. Es una especie muy característica de estanques y arroyos poco caudalosos. Forma colonias microscópicas libres de cuatro células, aunque también se observan que pueden formar colonias de dos células o encontrarlas solitarias. La morfología de las células varía ligeramente con la etapa de crecimiento en la que se encuentra; así las células

maduras tienen una forma más ovoide con sus extremos afilados ligeramente menos pronunciados que en las células jóvenes, donde éstas son mucho más agudas. No existe vacuola central, excepto para el núcleo y el pirenoide, toda la célula se llena con un citoplasma que es granular o rara y ligeramente alveolar en la estructura. Cada célula posee un solo pirenoide ubicado estrictamente en el centro de cada célula (Smith 1913, Streble y Krauter 1987).

La bioprospección de las microalgas, generalmente atraviesa por varias etapas, estas son: la identificación, *screening* y clasificación de las algas; estudios bioquímicos y fisiológicos de la producción de lípidos; la biología molecular e ingeniería genética de aquellas cepas productoras (Nascimento et al. 2013). Se establece especial atención a las especies resistentes a la contaminación y adaptadas a los cambios de los parámetros ambientales; en este sentido las especies nativas se consideran ya adaptadas a las condiciones locales, y por lo tanto son más resistentes y competitivas. Estas últimas son características críticas para la producción a gran escala. La bioprospección de las especies de algas autóctonas, es un área de investigación emergente en varios países, donde se busca algas apropiadas para la producción de biodiesel (Mutanda et al. 2011). Las informaciones útiles para evaluar el potencial de una cepa de un alga son las relacionadas a la productividad y el contenido de lípidos. El conocimiento de la productividad de biomasa, el contenido, la productividad y el perfil lipídico otorgan información suficiente a la hora de seleccionar las especies apropiadas para la producción de biocombustibles (Gouveia y Oliveira 2009).

Esta investigación evaluó las principales características biocinéticas y lipídicas de la microalga autóctona *Tetrademus wisconsinensis*, aislada de un cuerpo de agua superficial, aportando los primeros registros para este organismo fotosintético.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Toma de muestras ambientales y aislamiento de *Tetrademus wisconsinensis*

Se realizó un muestreo en la zona del Lago Ypacaraí (coordenadas 25°18'38.89"S; 57°18'10.33"O), se filtraron y concentraron volúmenes de 100 L de agua mediante una red para fitoplancton de 20 µm de poro. Posteriormente las muestras fueron trasladadas para su procesamiento al

Laboratorio de Mutagénesis Ambiental del Departamento de Biología (FACEN-UNA). A partir del concentrado, se aisló el alga por el método de rayado en placa, para el efecto se transfirieron pequeñas gotas del filtrado con un asa de siembra, extendiendo por estrías sobre la superficie del medio sólido Agar-Bristol. El medio sólido se preparó con una solución nutritiva del medio Bristol (Starr y Zeikus 1993) para microalgas y con una relación de 1,5% p/v de agar-agar disuelto en el medio nutritivo. Posteriormente se procedió a incubar la placa con un fotoperiodo de 16:8h de luz: oscuridad, iluminadas con lámparas fluorescentes, con intensidad lumínica en la superficie de los vasos de 100  $\mu\text{mol}$  de fotones  $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y a una temperatura de 22°C, hasta que comenzaron a aparecer las colonias ( $\pm 10$  días). Seguidamente, se procedió a la observación microscópica de las colonias, y se volvieron a transferir a medios sólidos, hasta la obtención de cultivos clonales. Una vez establecido los cultivos puros, se transfirieron las colonias a medio líquido (medio Bristol) dispuestos en tubos de ensayo con tapa rosca de baquelita de 20 mL de capacidad; y se establecieron las cepas que mejor se adaptaban al nuevo cultivo líquido.

### Identificación taxonómica

Para la identificación a nivel de especie del alga microscópica aislada Tipo Paraguay, se utilizó el catálogo científico base de taxonomía clásica del grupo de las Chorophytas “Das Phytoplankton Des Süßwassers” de Komárek et al. (1983). Mientras que para la descripción de la especie se utilizó el material original del autor de la descripción científica de la especie *Tetrademus wisconsinensis* leptotipo de Wisconsin, Estados Unidos. Se observó la especie en microscopio óptico de campo claro y para las fotografías se utilizó una cámara especial acoplada al microscopio AmScope ToupView 3.2.

### Determinación de variables biocinéticas

Se prepararon cultivos de *T. wisconsinensis*, en medio líquido Bristol, en frascos Erlenmeyer de 250 mL. Los inóculos para cada tratamiento fueron ajustados hasta completar una densidad inicial de 10.000 cel.  $\text{mL}^{-1}$  en cada reactor. Se prepararon dos tratamientos, el primero con aireación (0,7 vvm) y el segundo sin aireación, pero con agitación manual tres veces por día, todo por triplicado. Se determinó la concentración celular de la muestra y la cinética del crecimiento de las microalgas mediante la cuantificación con cámaras de recuento de microorganismos (Neubauer). Los parámetros cinéticos

seleccionados fueron la tasa de crecimiento ( $\mu$ ), obtenida por regresión lineal a partir de la ecuación (1) y el tiempo de duplicación ( $T_d$ ) determinada mediante la expresión (2). Ambos parámetros se calcularon suponiendo un modelo exponencial de crecimiento.

$$\mu = (\ln X_2/X_1)/(t_2 - t_1) \quad (1)$$

$$T_d = \ln 2/\mu \quad (2)$$

Dónde:  $X_2$  y  $X_1$ , son el número de células en los tiempos  $t_2$  y  $t_1$  respectivamente.

A fin de evaluar el efecto de las tasas de remoción sobre la velocidad de crecimiento, se prepararon dos tratamientos por triplicado con cultivos que fueron operados en forma semicontinua alimentada, la primera con una tasa de remoción del 10% ( $t_{10\%}$ ) y la segunda del 20% ( $t_{20\%}$ ), ambos fueron alimentados de manera diferenciada a partir del día 15. Este procedimiento se realizó extrayendo un volumen constante en cada cultivo de la microalga (10 o 20% respectivamente), y reponiendo con medio Bristol nuevamente. Este modo de operación diferenciada se realizó por tres semanas (hasta el día 33).

Los datos obtenidos fueron procesados y ordenados en matrices, utilizando el software Excel 2007, para la determinación de las constantes de crecimiento y la realización de gráficos.

### Obtención de la biomasa

Para la obtención de la biomasa, *T. wisconsinensis* fueron cultivadas en reactores tipo columna de burbujeo de 5 L de capacidad, operados de forma discontinua. La separación de la biomasa se realizó por filtración al vacío, con un equipo compuesto de una bomba de 1/6 Hp de potencia, marca Vaccum Pump y un kitasato borosilicato con filtro de vidrio y vaso. Se utilizaron filtros de celulosa de 8 micras de diámetro de poros. La biomasa se acumuló en vidrio reloj y se llevó a la estufa para el secado, posteriormente se guardó en un recipiente de vidrio para su análisis.

### Productividad de la biomasa

Se utilizó el método gravimétrico. Se cosecharon muestras del final de la fase exponencial. Las células se centrifugaron en un equipo Thermo Scientific MTX150 por 5 min a 5.000  $\text{g} \times 4^\circ\text{C}$  (Ranga Rao et al. 2007). Las muestras fueron lavadas dos veces en agua destilada, y posteriormente puestas a 70°C por dos horas, luego las cápsulas fueron enfriadas durante una hora, dentro de un desecador con sílicagel. Finalmente fueron pesadas y

devueltas a la estufa por 1 h, se repitió el proceso hasta verificar que mantengan un peso constante. La productividad de biomasa (Pb) se obtuvo al aplicar la ecuación (3), y se expresó como gramos por litro por día (Nascimento et al. 2013)

$$Pb = (pf - pi) / (t \times v) \quad (3)$$

Donde: *pf* y *pi* son los pesos secos final e inicial respectivamente; *t*, el tiempo de cultivo; y *v*, el volumen de cultivo.

### Lípidos totales, productividad volumétrica y perfil de lípidos

Para la determinación de los lípidos totales (Lt) se utilizó el método de solventes (González Delgado y Kafarov 2012). Se mezcló la biomasa de la microalga con etanol anhidro, en una proporción de 5 mL de etanol por cada gramo de muestra. La mezcla se introdujo dentro de un frasco Erlenmeyer y fue agitado con un agitador magnético por 24 horas. Seguidamente se agregó éter de petróleo 0,2 mL por cada mL de etanol utilizado previamente y un volumen igual al total de una solución de cloruro de sodio al 10% y se dejó decantar. La mezcla se agitó y luego fue centrifugada a 3000 rpm por 5 min, posteriormente la fase etérea fue separada por decantación, mientras que a la fase acuosa se le añadió el mismo volumen de éter de petróleo que en la primera etapa y se repitió el proceso anterior. La mezcla obtenida contenía una gran cantidad de clorofila y otros pigmentos, por lo que se la hizo pasar a través de una columna con relleno de sílicagel finamente pulverizado, para retener el pigmento.

Para la determinación del contenido total de lípidos (Lt), se pesó un balón de fondo redondo con cuello esmerilado limpio, seco y vacío, previamente tarado en estufa a 105°C por cuatro horas; se introdujo la mezcla obtenida después de la despigmentación dentro del balón y se evaporó el solvente con un rotavapor; posteriormente el balón se secó en estufa a 70°C por dos horas para eliminar restos de solvente y agua. Finalmente el balón se pesó y se determinó la cantidad de lípidos por diferencia de pesos.

La productividad volumétrica de lípidos (PvL) fue calculado de acuerdo a la ecuación (4)

$$PvL = Pb \times Lt \quad (4)$$

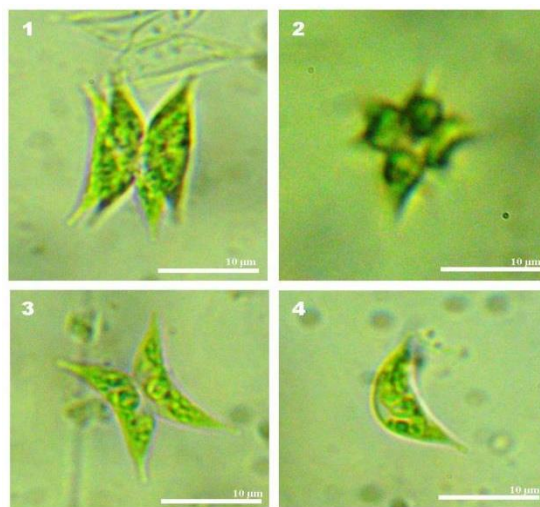
Donde: Pb, es la productividad de biomasa; y Lt, los lípidos totales.

Los resultados de la PvL se expresaron en miligramos por litro por día (Nascimento et al. 2013).

Con el aceite obtenido se realizó la determinación del perfil lipídico, analizando los componentes de la misma con un equipo GC (Cromatógrafo Gaseoso), marca Agilent, modelo 7890A, con detector FID. La derivación de la muestra se realizó por el método descripto por Hartman y Lago (1973).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

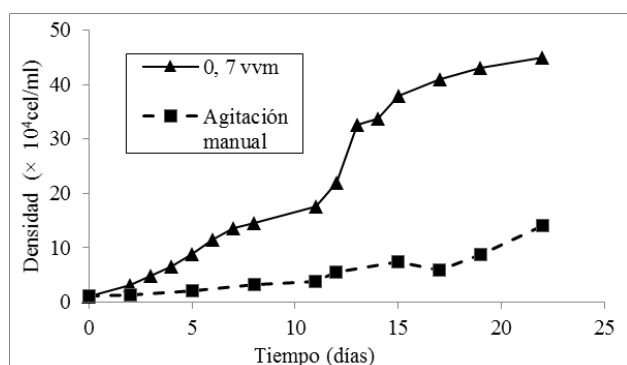
La especie *T. wisconsinensis* S aislada para este estudio, presenta las características particulares descritas por Smith en 1913. Se observaron preferentemente colonias de cuatro células, de dos células y células solitarias. Las medidas de las células ovoides van de entre 4 y 5,2 µm para el ancho de cada célula y de entre 12 a 14,5 µm de largo. Se identificaron dos morfologías (Figura 1); la forma más ovoide que corresponden a células maduras, y las que poseen extremos afilados ligeramente más pronunciados y agudas que corresponden a las más jóvenes (Smith 1913).



**Figura 1.** Microfotografías de *Tetrademus wisconsinensis*. 1, vista de plano de colonia con cuatro células. 2, vista del plano superior. 3 y 4 colonia de dos células, y una célula independiente (A=400x).

El crecimiento de la microalga presentó tendencias claramente diferentes en las dos condiciones de cultivo en medio líquido (Figura 2). En el medio con aireación forzada (0,7 vvm) se contabilizaron hasta 450.000 cel. mL<sup>-1</sup> a los 14 días de la inoculación inicial; por su parte en la condición sin aireación (agitación manual) en el mismo periodo se alcanzaron concentraciones de 50.000

cel. mL<sup>-1</sup>. En ambos medios evaluados, la latencia culminó el día 4; sin embargo la fase exponencial llegó hasta el día 15 (0,7 vvm), y en el medio sin aireación se extendió por encima de los 25 días. La tasa de crecimiento en los medios aireados llegó 0,193 d<sup>-1</sup>, y el tiempo de duplicación se redujo hasta 3,59 días respecto al cultivo con aireado por agitación manual (Tabla 1). Explicado de otra forma, estos resultados demuestran que los cultivos de *T. wisconsinensis* aireados a 0,7 vvm; se multiplican 1,7 veces más rápidos que en la condición sin aireación forzada.



**Figura 2.** Crecimiento de *Tetradesmus wisconsinensis* a diferentes condiciones de aireación.

Altos tiempos de duplicación corresponden a bajas tasas de crecimiento. En general la media para la tasa de duplicación en algas verdes es de 1 día, que corresponde a una tasa de crecimiento ( $\mu$ ) de 0,69 d<sup>-1</sup> (Griffiths y Harrison 2009). En la literatura se encuentran escasos estudios sobre la cinética de crecimiento de *T. wisconsinensis*. Kim et al. (2014) reportan una tasa de crecimiento de 0,4 d<sup>-1</sup> en medio de cultivo BG-11, y de 0,64 d<sup>-1</sup> con una combinación de medios (BG-11+ 6% de medio a partir de agua residual).

Al comparar las variables biocinéticas obtenidas en el medio Bristol para *T. wisconsinensis*, se observa que esta posee menores tasas de crecimiento, respecto a otras especies típicas. Dentro de la familia Scenedesmaceae, el género más ampliamente estudiado es *Scenedemus* sp., reportándose tasas de crecimiento 0,86 d<sup>-1</sup> en medio Algal; 1,41 d<sup>-1</sup> en medio Estándar 1 (de composición: 0,058; 0,0041 y 0,0002 g L<sup>-1</sup> de carbonato, nitrógeno y fósforo respectivamente) y 0,84 d<sup>-1</sup> en Estándar 2 (composición 5,44; 0,13 y 0,019 g L<sup>-1</sup> de carbonato, nitrógeno y fósforo respectivamente) (Quevedo et al. 2008). Por su parte Martínez et al. (1997) empleando *Scenedemus obliquus* cultivada a una temperatura de 30°C, obtuvieron  $\mu_{max}$  igual 1,12 d<sup>-1</sup>; y Hodaifa et al.

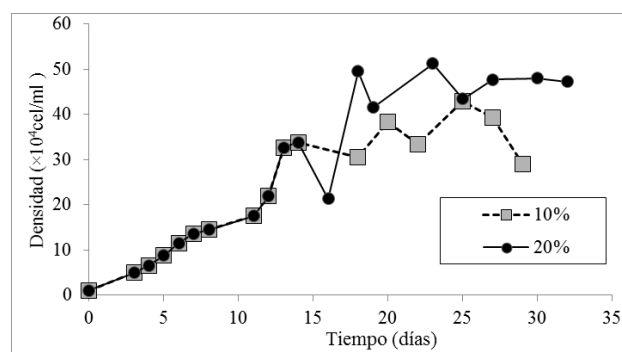
(2008) reportaron valores de de 1,056 d<sup>-1</sup>, con adición de CO<sub>2</sub> por aireación en medio Algal.

**Tabla 1.** Valores de constantes de velocidad de crecimiento en fase exponencial para *Tetradesmus wisconsinensis*.

Régimen de aireación	Variables biocinéticas	
	$\mu$	Td
Sin aireación	0,113	6,13
Aireación a 0,7 vvm	0,193	3,59

$\mu$  = Tasa de crecimiento(d<sup>-1</sup>); Td= Tiempo de duplicación(d).

En lo referente a las tasas de remoción, el cultivo t10% demuestra un crecimiento en la biomasa hasta el día 18, luego se estabiliza y llega hasta 420.930 cel. mL<sup>-1</sup>, manteniéndose esta tendencia hasta el final del ensayo (Figura 3). El cultivo t20%, sin embargo fue el que mostró mejor desempeño llegando hasta 512.700 cel. mL<sup>-1</sup> el día 23 del ensayo.



**Figura 3.** Crecimiento de *Tetradesmus wisconsinensis* en cultivos semicontinuos a diferentes tasas de remoción.

La productividad de lípidos, es una variable crítica para la evaluación de especies de algas que puedan ser utilizados en la producción de biocombustibles, como es el caso del biodiesel (Abomohra et al. 2013). Los valores de productividad y rendimiento obtenidos en el presente estudio se reportan en la tabla 2.

**Tabla 2.** Productividad de biomasa, lípidos totales y productividad volumétrica de lípidos de *Tetradesmus wisconsinensis*.

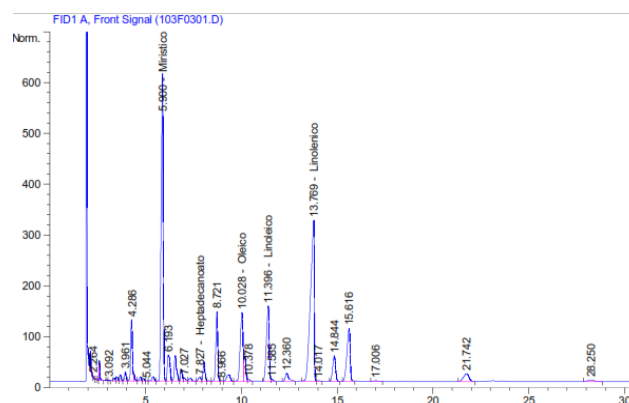
Variables	Valores
Productividad de biomasa Pb (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	0,04
Lípidos totales (% p/p)	11,85
Productividad volumétrica de lípidos PvL (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	4,81

Generalmente el contenido de lípidos es reportado como porcentaje de peso seco (%p/p). Es importante mencionar

que el peso de la muestra de microalgas no solo está compuesto por microalgas, sino que además contiene otros compuestos como sales provenientes del medio de cultivo, por lo que el resultado obtenido del proceso de extracción es en base al peso bruto de la biomasa utilizada y no en base al peso neto de microalgas.

El porcentaje de lípidos extraídos (Lt) con el método de solventes combinados arrojó un valor de 11,85% (p/p) sobre base seca de biomasa (Tabla 2). Esto es semejante a valores reportados en la bibliografía, sobre el rendimiento de extracción de lípidos en otras cepas de microalgas. Arias et al. (2013) reportan valores de 8 a 12% en base seca para algas *Scenedesmus incrassatulus*, 10 a 43% para *Scenedesmus obliquus* y 7 a 53% para *Scenedesmus* sp. En medios con cantidades apropiadas de nutrientes, el contenido de lípidos suele ser entre 13% y 31% (p/p), con un promedio de 23% para las algas verdes; mientras que bajo privación de nitrógeno el contenido medio de lípidos es 41%, mostrando un incremento de casi el doble (Griffiths y Harrison 2009). El rendimiento de lípidos extraído a partir de biomasa de microalgas puede mejorarse mediante aplicación de técnicas para someter al cultivo a condiciones que favorezcan el aumento de la producción de lípidos dentro de las células, mediante el estrés con ciertos nutrientes limitantes (Arias et al. 2013).

Los valores de Pb ( $0,04 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) y de PvL ( $4,81 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) obtenidas en esta investigación se compararon con los conseguidos en otros trabajos. Abomohra et al. (2013), obtuvieron resultados de productividad de biomasa de  $0,25 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  con *Scenedesmus obliquus*, pero muy superior en lo referente al contenido de lípidos (40% p/p), y la productividad lipídica de  $41 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  durante la fase exponencial. En otro trabajo, da Silva et al. (2009) cultivaron *S. obliquus* en fotobiorreactores de 50 L, utilizando medio Bristol, obteniendo  $0,26 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . En un *screening* de microalgas para la producción de biodiesel, Nascimento et al. (2013) estudiaron la tasa de crecimiento, productividad lipídica de 12 especies, e indican que la productividad de biomasa, no siempre se corresponde con los mejores productores de lípidos. Estos mismos autores trabajando con medio CHU 13 modificado para *Chlamydocapsa bacillus* reportan rendimientos de lípidos totales entre 13,52%, productividad de biomasa de  $0,32 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  y  $43,26 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  de productividad volumétrica de lípidos, valores similares a los obtenidos en el presente estudio con *T. wisconsinensis* (Tabla 2).



**Figura 4.** Cromatograma de fracción lipídica de *Tetrademus wisconsinensis*.

En la Figura 4 se muestra el cromatograma del perfil lipídico del aceite obtenido de la microalga *T. wisconsinensis* analizado en un GC. A partir del mismo se estudiaron el contenido de cinco ácidos grasos, generando los siguientes resultados: ácido mirístico (23,94%), ácido esteárico (0,93%), ácido oleico (7,38%), ácido linoleico (7,96%), ácido linolénico (23,57%). Los ácidos grasos saturados totalizaron un 24,87%, mientras que los insaturados el 38,91%. Un criterio para el uso de los aceites extraídos de las microalgas como materia prima para la elaboración de biocombustibles, es su composición de ácidos grasos insaturados. La norma British Estándar (BS EN 14214:2008+A1:2009 2010) recomienda que la concentración de ácido linolénico (C18:3) no supere el 12% del contenido total de lípidos; en este trabajo se encontró que el aceite extraído de *T. wisconsinensis* excede ampliamente este límite con un valor de 23,57%. Según Montero-Sánchez (2012); el incremento del número de insaturaciones de los ácidos grasos provoca una mayor inestabilidad del biodiesel por su tendencia a la oxidación; considerando que el porcentaje de ácidos grasos insaturados fue elevado, se puede inferir que esta especie no sería recomendable para la obtención de este tipo de producto.

## CONCLUSIONES

La especie *Tetrademus wisconsinensis*, ha sido poco estudiada como materia prima para obtención de lípidos por lo que se espera que este trabajo contribuya con el conocimiento de este organismo. En términos generales, utilizando medio de cultivo Bristol se reportan resultados que muestran cinéticas de cultivo prolongadas, y bajas tasas de crecimiento, en contraste con los obtenidos en estudios con otros medios de cultivo para *T. wisconsinensis*. Las productividades de biomasa y la lipídica son consideradas bajas en comparación con otras

microalgas más estudiadas. Según los datos obtenidos en el perfil lipídico, esta microalga posee niveles de ácidos grasos linoleico y linolénicos, en cantidades importantes, por lo que podría considerarse su uso como potencial suplemento nutricional antes que como materia prima para la elaboración de biodiesel.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abomohra, AE; Wagner, M; El-Sheekh, M; Hanelt, D. 2013. Lipid and total fatty acid productivity in photoautotrophic fresh water microalgae: screening studies towards biodiesel production. *Journal Applied Phycology* 25:931-936.
- Arias, M; Martinez, A; Cañizares, R. 2013. Producción de Biodiesel a partir de Microalgas: parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. *Acta Biológica Colombiana* 18(1):43-68.
- BSI (British Standards Institutions, UK). 2010. BS EN 14214:2008+A1: Automotive fuels: fatty acid methyl esters (FAME) for diesel engines: requirements and test methods. UK, BSI. 20 p.
- Da Silva, TL; Reis, A; Medeiros, R; Oliveira, AC; Gouveia, L. 2009. Oil production towards biofuel from autotrophic microalgae semicontinuous cultivations monitored by flow cytometry. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 159(2):568-78.
- González, ÁD; Kafarov, V. 2012. Design and adjustment of coupled microalgae oil extraction methods for the development of a topology of biorefinery. *Prospect* 10(1):113-123.
- Gouveia, L; Oliveira, AC. 2009. Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 36(2):269-74.
- Griffiths, MJ; Harrison, STL. 2009. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology* 21:493-507.
- Hartman, L; Lago, RA. 1973. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practical Journal* 22(6):475-476.
- Hodaifa, G; Martínez, MAE; Sánchez, S. 2008. Use of industrial wastewater from olive-oil extraction for biomass production of *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology* 99(5):1111-7.
- Kim, M; Han, M; Jin, E; Lee, CG. 2014. Microalgae with high-efficient ability to remove carbon dioxide and use thereof (en línea). s.l. s.e. Consultado 25 mar. 2015. Disponible en <http://www.google.com/patents/US8679508>
- Komárek, J; Fott, B. 1983 Chlorophyceae (Grünalgen), Ordnung Tetrasporales. In Huber- Pestalozzi ed. *Das Phytoplankton des Süßwassers*, DE, s.e, v. 16, pt 7/1, p. 1-1001
- Martínez, M; Jiménez, JM; El Yousfi, F. 1997. Influence of phosphorus concentration on the growth kinetics and stoichiometry of the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Process Biochemistry* 32(8):657-664.
- Montero-Sánchez, Y. 2012. Productividad de lípidos y composición de ácidos grasos de cinco especies de microalgas. *Investigación y Saberes* 1(2):37-43.
- Mutanda, T; Ramesh, D; Karthikeyan, S; Kumari, S; Anandraj, A; Bux, F. 2011. Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. *Bioresource Technology* 102(1):57-70.
- Nascimento, IA; Marques, SSI; Cabanelas, ITD; Pereira, SA; Druzian, JI; de Souza, CO; Vich, DV; de Carvalho, GC; Nascimento, MA. 2013. Screening microalgae strains for biodiesel production: lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria. *Bioenergy Research* 6:1-13.
- Plata, V; Kafarov, V; Moreno, N. 2009. Desarrollo de una metodología de transesterificación de aceite en la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas Development of a methodology of transesterification of oil in the production line of biodiesel from microalgae. *Prospect* 7(2):35-41.
- Quevedo, C; Morales, SP; Acosta, A. 2008. *Scenedesmus* sp growth in different culture mediums for microalgal protein production. *Vitae* 15 (1):25-31.
- Ranga Rao, A; Sarada, R; Ravishankar, GA. 2007. Influence of CO<sub>2</sub> on growth and hydrocarbon production in *Botryococcus braunii*. *Journal Microbiology and Biotechnology* 17(3):414-419.

- Sander, K; Murthy, GS. 2010. Life cycle analysis of algae biodiesel. The International Journal of Life Cycle Assessment 15:704-714.
- Smith, GM. 1913. Tetrademus, a new four-celled coenobic alga. Bulletin of the Torrey Botanical Club 40(2):75-87.
- Starr, RC; Zeikus, JA. 1993. UTEX-The culture collection of algae at the University of Texas at Austin 1993 list of cultures. Journal of Phycology 29(s2):1-106.
- Streble, H; Krauter, D. 1987. Atlas de los microorganismos de agua dulce. Barcelona, ES, Omega. 372 p.
- Wehr, JD; Sheath, RG. 2003. Freshwater algae of North America. US, Elsevier Science. 917 p.