



**JOSÉ EDUARDO ABRIL BONETT**

**AISLAMIENTO DE MICROALGAS Y SU CULTIVO EN  
SUERO DE LECHE**

**LAVRAS – MG**

**2018**

**JOSÉ EDUARDO ABRIL BONETT**

**AI SLAMI ENTO DE MICROALGAS Y SU CULTIVO EN SUERO DE LECHE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Whasley Ferreira Duarte

Orientador

Profa. Dra. Flávia F. Coelho

Coorientadora

**LAVRAS – MG**

**2018**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha  
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados  
pelo próprio autor.**

Bonett, José Abril.

Isolamento de microalgas e seu cultivo em soro de leite / José  
Abril Bonett - 2018.

46 p.

Orientador: Whasley Ferreira Duarte.

Coorientadora: Flávia Freitas de Coelho.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Isolamento de microalgas. 2. Avaliação do cultivo de  
microalgas. 3. Seleção de microalgas para seu cultivo em soro de  
leite. I. Duarte, Whasley Ferreira. II. Coelho, Flávia Freitas de. III.  
Título.

**JOSÉ EDUARDO ABRIL BONETT**

**ISOLAMENTO DE MICROALGAS E SEU CULTIVO EM SORO DE LEITE  
AISLAMIENTO DE MICROALGAS EM SUERO DE LECHE Y SU CULTIVO EN  
SUERO DE LECHE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação  
em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de  
Mestre.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2018

Dra Flávia de Freitas Coelho UFLA

Dr. Euziclei Gonzaga de Almeida UFMT

Dra Sara Maria Chalfoun de Souza EPAMIG

Prof. Dr. Whasley Ferreira Duarte

Orientador

**LAVRAS – MG**

**2018**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Jehová Dios por ayudarme en la realización de este proyecto, pues en los momentos difíciles me ha dado las fuerzas y la orientación para seguir adelante.

A mi madre Mariela y mis hermanos por todo el apoyo y el cariño dado, pues han estado apoyando con palabras de ánimo a pesar de la distancia.

A la Universidad Federal de Lavras (UFLA) y al sector de Microbiología Agrícola, por posibilitar mi formación académica y por ser el lugar en donde pude conocer nuevas personas y tener nuevas experiencias.

A la agencia de fomento de la investigación CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), por concederme la beca de estudios.

Al profesor Whasley Ferreira Duarte por la orientación amada y paciencia, quien fue de suma importancia para la conclusión de esta etapa de mi vida. También agradezco a la profesora Flávia Coelho por la orientación y ayuda dada en la realización de este proyecto.

A todas mis amistades formadas durante estos dos años de maestría, por ayudarme en las más diversas formas cuando necesitaba de apoyo y por proporcionarme momentos de alegría.

## RESUMO

Pretendeu-se, neste trabalho, isolar microalgas de duas lagoas localizadas na cidade de Ijací (Minas Gerais), para avaliar seu crescimento, ou seja, para saber se tais isolados crescem melhor em modo autotrófico, heterotrófico ou mixotrófico, com a finalidade de selecionar uma microalga que apresente maior produtividade de biomassa em soro de leite. Para isso, foram coletadas amostras de cada lagoa, as quais foram conservadas em frio e transportadas imediatamente para o laboratório de Fisiologia y Genética de Microrganismos da Universidade Federal de Lavras, setor de Microbiologia Agrícola. Foram feitas diluições seriadas das amostras de  $10^1$  e  $10^2$ , as quais foram plaqueadas nos meios BG11, Bold e Bold com extrato de solo, por duplicata. As amostras sem diluir ( $10^0$ ) também foram plaqueadas por duplicata. As condições de incubação foram as seguintes: 27 °C, fotoperíodo de 12h luz/escurecimento, por 7 dias de cultivo. Depois desse tempo obtiveram-se sete isolados, os quais foram caracterizados morfológicamente e identificados molecularmente por sequenciamento de regiões ITS. Quatro microalgas foram identificadas como *Chlorella sp*, duas como *Chlorella sorokiniana* e uma como *Desmodesmus sp*. Estas microalgas apresentaram maior crescimento em meio BG11 com 1% de glicose e em modo mixotrófico. Três isolados (dois identificados como *Chlorella sp* e um como *Desmodesmus sp*), foram selecionados por apresentar maior crescimento em BG11 e em mixotrofia, para serem cultivados em 10 mL de soro de leite, em modo mixotrófico a 27 °C por 7 dias de cultivo. No cultivo mixotrófico em soro de leite, *Desmodesmus sp*, apresentou maior crescimento, pois produziu 8 g/L de biomassa seca, e as outras duas microalgas produziram 1,03 g/L e 1,89 g/L de biomassa seca. Estes resultados mostram que o uso de soro de leite faz com que o processo de produção de biomassa de *Desmodesmus sp*, seja mais rentável economicamente, além de reduzir a alta carga orgânica de tal subproduto, diminuindo seu impacto negativo no ambiente.

**Palavras-chave:** Autotrofia. Heterotrofia. Mixotrofia. Soro de leite. *Desmodesmus sp*

## RESUMEN

Este trabajo tuvo como objetivo aislar microalgas de dos lagos ubicados en la ciudad de Ijací (Minas Gerais), para evaluar su crecimiento, con el fin de saber se crecen mejor en modo autotrófico, heterotrófico o mixotrófico, para luego seleccionar una microalga que presente mayor producción de biomasa en suero de leche. Para ello se recolectaron muestras de cada lago, las cuales fueron conservadas en frío y transportadas inmediatamente al laboratorio de Fisiología y Genética de Microorganismos de la Universidad Federal de Lavras, sector de Microbiología Agrícola. Se realizaron diluciones seriadas de las muestras de  $10^1$  e  $10^2$ , las cuales fueron plaqueadas en los medios BG11, Bold y Bold con extracto de suelo, por duplicado. Las condiciones de incubación fueron las siguientes: 27 °C, fotoperiodo de 12h luz/oscuridad, por 7 días de cultivo. Después de ese tiempo se obtuvieron siete aislados, los cuales fueron caracterizados morfológicamente e identificados molecularmente mediante secuenciamiento de regiones ITS. Cuatro microalgas fueron identificadas como *Chlorella sp*, dos como *Chlorella sorokiniana* y una como *Desmodesmus sp*. Estas microalgas presentaron mayor crecimiento en medio BG11 con 1% de glucosa y en modo mixotrófico. Tres aislados (dos identificados como *Chlorella sp* y otro como *Desmodesmus sp*), fueron seleccionados por presentar mayor crecimiento en BG11 y en mixotrofia, para ser cultivados en 10 mL de suero de leche, en modo mixotrófico a 27 °C por 7 días de cultivo. En el cultivo mixotrófico en suero de leche, *Desmodesmus sp*, presentó mayor crecimiento, pues produjo 8 g/L de biomasa seca, y las otras dos microalgas produjeron 1,03 g/L e 1,89 g/L de biomasa seca. Estos resultados muestran que el uso de suero de leche permite que el proceso de producción de biomasa de *Desmodesmus sp*, sea más rentable económicamente, además de reducir la alta carga orgánica de tal subproducto, disminuyendo su impacto negativo en el ambiente.

**Palabras clave:** Autotrofia. Heterotrofia. Mixotrofia. Suero de leche. *Desmodesmus sp*

## ABSTRACT

This work aimed to isolate microalgae from two lakes located in the city of Ijací (Minas Gerais), to evaluate their growth, in order to know if they grow better in autotrophic, heterotrophic or mixotrophic mode, and then select a microalgae that presents higher production of biomass in cheese whey. For this, samples of each lake were collected, which were kept cold and transported immediately to the laboratory of Physiology and Genetics of Microorganisms of the Federal University of Lavras. Serial dilutions were made of the samples from  $10^{-1}$  to  $10^{-2}$ , which were plated in BG11, Bold and Bold media with soil extract, in duplicate. The incubation conditions were: 27 °C, photoperiod of 12h light / dark, for 7 days of culture. After that time, seven isolates were obtained, which were morphologically characterized and molecularly identified by sequencing of ITS regions. Four microalgae were identified as *Chlorella sp*, two as *Chlorella sorokiniana* and one as *Desmodesmus sp*. These microalgae showed higher growth in BG11 medium with 1% glucose and in mixotrophic mode. Three isolates (two identified as *Chlorella sp* and another as *Desmodesmus sp*) were selected due to their greater growth in BG11 and mixotrophy, to be cultured in 10 mL of whey, in mixotrophic mode at 27 ° C for 7 days of culture. In the mixotrophic culture in whey, *Desmodesmus sp*, showed higher growth, since it produced 8 g/L of dry biomass, and the other two microalgae produced 1.03 g /L and 1.89 g /L of dry biomass. These results show that the use of whey allows the *Desmodesmus sp* biomass production process to be more economically profitable, besides reducing the high organic load of such by-product, decreasing its negative impact on the environment.

**Keywords:** Autotrophy. Heterotrophy. Mixotrophy. Whey. *Desmodesmus sp*



## CONTENIDO

<b>1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>10</b>
<b>2 MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>11</b>
2.1 ¿QUÉ SON MICROALGAS? .....	11
2.2 PRINCIPALES GRUPOS DE MICROALGAS .....	12
2.2.1 Cianobacterias .....	12
2.2.2 Microalgas eucariotas y su importancia biotecnológica .....	14
2.3 FORMAS DE CULTIVAR MICROALGAS.....	17
2.4 PIGMENTOS EN MICROALGAS .....	18
2.4.1 Ficobilinas .....	19
2.4.2 Clorofilas.....	19
2.4.3 Carotenoides.....	20
2.5 RESERVAS DE POLISACÁRIDOS EN MICROALGAS .....	22
2.6 PROTEÍNAS EN MICROALGAS .....	23
2.7 LÍPIDOS EN MICROALGAS .....	23
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>25</b>
<b>CAPÍTULO 2: AISLAMIENTO DE MICROALGAS Y SU CULTIVO EN SUERO DE LECHE .....</b>	<b>29</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
<b>2. METODOLOGÍA.....</b>	<b>31</b>
2.1 AISLAMIENTO DE LAS MICROALGAS .....	31
2.2 EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO.....	32
2.3 CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO EN MEDIO SINTÉTICO.....	32
2.4 CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO EN SUERO DE LECHE.....	33
2.5 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR .....	33
<b>3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>34</b>
<b>4. CONCLUSIONES .....</b>	<b>44</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>45</b>

## CAPÍTULO 1

### 1 INTRODUCCIÓN

El término microalga hace referencia a un grupo diverso de microorganismos procariotas y eucariotas que tienen la capacidad de realizar fotosíntesis oxigénica y algunas de ellas como las cianobacterias (microalgas procariotas) tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (Lee, 2008; Vincent, 2009). Por consiguiente, son microorganismos que poseen pigmentos y su biomasa está constituida por carbohidratos lípidos y proteínas. Tales componentes junto con los pigmentos, son de interés pues son usados en la industria farmacéutica, química y en la industria de alimentos (Oncel 2013).

A diferencia de las plantas, las microalgas tienen altas eficiencias fotosintéticas y no necesitan de terrenos cultivables pues crecen en agua. Por tanto, no generan competencia con la producción alimentaria por la utilización de áreas de cultivo. Además poseen mayores tasas de crecimiento. Esas características permiten controlar las condiciones de su cultivo, para optimizar la producción de metabolitos de interés (Markou y Nerantzis, 2013).

En cuanto a la producción de productos de interés comercial, las microalgas han sido usadas en un enfoque llamado biorrefinería. Este concepto hace referencia al procesamiento de biomasa para la producción de biocombustibles, energía y productos de alto valor de forma simultánea (Chew *et al.*, 2017). Este enfoque es posible debido a la capacidad de las microalgas para sintetizar múltiples productos, tales como carbohidratos, lípidos, pigmentos y proteínas. Es algo parecido a lo que ocurre en una refinería de petróleo, pues se obtienen ciertos productos primarios, los cuales serán fraccionados en otros productos que tendrán diversos usos (Zhu 2015; Trivedi *et al.*, 2015).

Precisamente uno de los factores que afectan la eficiencia en una biorrefinería, es la selección de una cepa que tengan buena capacidad de producción (Chew *et al.*, 2017). Esto muestra entonces que el aislamiento y prospección de microalgas es una etapa previa que ha de llevarse a cabo en una biorrefinería, pues permite explorar el potencial biotecnológico de las microalgas. Además, el aislamiento realizado en diferentes ambientes acuáticos permite aprovechar la diversidad de las microalgas. Esto puede conducir al descubrimiento de nuevas cepas con potencial biotecnológico. Por esta razón, en este trabajo se plantea aislar microalgas

de ambientes naturales, con el fin de evaluar su potencial para producir metabolitos de interés, a saber, lípidos, proteínas, carbohidratos y pigmentos, en un cultivo en suero de leche.

## 2 MARCO TEÓRICO

### 2.1 ¿Qué son microalgas?

El término microalga no posee significado taxonómico, pues hace referencia a un grupo heterogéneo de microorganismos que presenta amplia diversidad de formas y estrategias de sobrevivencia y que no tienen origen monofilético. Pero en general se puede decir que engloba microorganismos que poseen pigmentos y realizan fotosíntesis oxigénica (Bicudo y Menezes, 2010). Es por ello que las microalgas son reconocidas como microorganismos capaces de captar la luz y el dióxido de carbono para producir los componentes de su biomasa, es decir, carbohidratos, proteínas y lípidos. Todos estos componentes son útiles como productos para la alimentación, y como materia prima en la industria farmacéutica, para la producción de biocombustibles y en la producción de nutracéuticos, como los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS's) y pigmentos (Koller *et al.*, 2014).

Las microalgas como grupo heterogéneo de microorganismos, incluye representantes procariotas y eucariotas. Las algas procarióticas están representadas por las divisiones Cyanophyta y Prochlorophyta, las cuales pertenecen al dominio Bacteria, pero poseen pigmentación y realizan fotosíntesis oxigénica. La diferencia entre estas dos divisiones, es el tipo de pigmentos que poseen. Todas las cianobacterias poseen clorofila a y la mayoría posee ficocianina y aloficocianina que son ficobiliproteínas azules, dándoles su color verde-azul característico. Sin embargo las microalgas clasificadas como Prochlorophyta, poseen tanto clorofila a como clorofila b, pero carecen de ficobiliproteínas. No obstante, de acuerdo a la clasificación basada en la secuencia de genes de la región 16S del ARN ribosomal, las algas que pertenecen tanto a la división Cyanophyta y Prochlorophyta constituyen un solo grupo de microalgas: las cianobacterias. Por otro lado, las algas eucarióticas a diferencia de las cianobacterias, poseen sistemas de locomoción. Ejemplo de ello son las microalgas diatomáceas y las dinoflageladas. (Vicent, 2009; Wojciechowski, 2013).

## 2.2 Principales grupos de microalgas

### 2.2.1 Cianobacterias

Las cianobacterias llamadas también como cianofíceas, cianófitas o algas verde-azuladas, son conocidas por ser procariotas. Pueden ser unicelulares o pluricelulares. Las cianobacterias unicelulares tienen formas esféricas, ovoides o cilíndricas y se reproducen por fisión binaria. Pueden aparecer en forma de células aisladas o agregadas en colonias irregulares. La forma filamentosa es típica en algunas cianobacterias y sus repetidas divisiones celulares dan lugar a una estructura multicelular llamada tricoma (conjunto de células dispuestas linealmente encerradas dentro de una capsula de mucílago) (Cameán y Repetto, 2012; Orvay, 1993).

Al igual que las algas eucariotas, las cianobacterias usan agua como donador de electrones y produce oxígeno; sin embargo algunas cepas de cianobacterias pueden usar el ácido sulfhídrico ( $H_2S$ ) como donador de electrones y lo convierten en azufre elemental. En general, las cianobacterias son capaces de crecer en ambientes acuáticos con bajo oxígeno disuelto y toleran concentraciones de  $H_2S$  que pueden ser tóxicas para las microalgas eucarióticas. Es por ello que son capaces de sobrevivir en condiciones anóxicas y en ambientes eutrofizados (Vincent, 2009).

Los ambientes en los que pueden crecer las cianobacterias son diversos. Pueden crecer en suelos húmedos, troncos muertos, cortezas de árboles y en ambientes acuáticos. Inclusive pueden crecer en ambientes considerados extremos, como fuentes termales, salinas, en la nieve y en el desierto (Wojciechowski, 2013).

Algunas especies poseen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, a partir de unos compartimentos especializados llamadas heterocitos, las cuales cuentan con paredes espesas que impide la difusión de oxígeno para su interior. La anoxia en el interior de los heterocitos permite el funcionamiento de la enzima nitrogenasa que es la responsable por la fijación del nitrógeno. El acineto es otro tipo de célula especializada la cual acumula sustancias de reserva (Wojciechowski, 2013).

#### 2.2.1.1 Cianotoxinas

Algunas especies de cianobacterias producen toxinas, conocidas como cianotoxinas. Los efectos tóxicos principales son: neurotóxicos, hepatotóxicos y dermatotóxicos (Tabla 1). Algunas cianobacterias que son capaces de formar floraciones en los cuerpos de aguas

producen cianotoxinas. Las floraciones consisten en el crecimiento acelerado de cianobacterias, principalmente debido a la eutrofización de las aguas (Vincent 2009).

La mayoría de las cianotoxinas son endotoxinas, pues son liberadas para el medio externo solamente a través del rompimiento de la pared celular. Sin embargo, la cilindropermopsina puede ser excretada en condiciones fisiológicas normales (Wojciechowski, 2013).

Tabla 1 - Cianotoxinas y mecanismos de toxicidad.

Mecanismos de toxicidade	Toxina	Gêneros
Neurotóxicas	Anatoxina-a	<i>Dolichospermum</i>
	Anatoxina-a(s)	<i>Cylindrospermopsis</i>
	Saxitoxina	<i>Aphanizomenon</i>
		<i>Lyngbya</i>
		<i>Planktothrix</i>
Hepatotóxicas	Microcistina	<i>Microcystis</i>
	Nodularina	<i>Nodularia</i>
	Cilindropermopsina	<i>Cylindrospermopsis</i>
		<i>Oscillatoria</i>
		<i>Aphanocapsa</i>
Dermatotóxicas	Lipopolissacarídeos (LPS)	Todas

Fuente: Wojciechowski (2013)

### 2.2.1.2 Importancia biotecnológica de las cianobacterias

Debido a su capacidad fotosintética, para fijar el nitrógeno atmosférico y para producir toxinas, las cianobacterias son cultivadas para diversos propósitos. Por ejemplo, son usadas para la producción de bioelectricidad y de varios biocombustibles, tales como biohidrógeno, biodiesel y bioalcoholes. La generación de bioelectricidad se vale de las reacciones fotosintéticas y las reacciones involucradas en la fijación del nitrógeno atmosférico pueden ser direccionadas para producir biohidrógeno (Sarma *et al.*, 2016).

Las cianotoxinas pueden ser usadas como algacidas, herbicidas e insecticidas. Un ejemplo de una cianotoxina de interés es la cyanobacterina, la cual es producida por *Scytonema sp*, que actúa como algacida para controlar las floraciones de cianobacterias indeseables en cuerpos de agua (Rajneesh *et al.*, 2017).

La biomasa de algunas cianobacterias es de interés para la industria alimentaria, pues son fuente de nutrientes para la alimentación animal. *Spirulina platensis* es una cianobacteria filamentosa que es rica en proteínas, minerales, vitaminas y ácido grasos poliinsaturados (Coca *et al.*, 2015).

## 2.2.2 Microalgas eucariotas y su importancia biotecnológica

Las microalgas eucariotas presentan mayor diversidad que las cianobacterias y están organizadas en cuatro grandes grupos, según Lee (2008): Estramenopilos, Discicristata, Alveolata y Viridiplantae.

### 2.2.2.1 Estramenopilos

Este grupo está conformado por individuos fototróficos y heterotróficos, los cuales poseen locomoción por flagelos. Las microalgas de este grupo filogenético presentan una coloración de marrón dorado, debido a la fucoxantina y a la clorofila c (Lee 2008) dentro de este grupo se encuentran las siguientes clases:

*Bacillariophyceae*. Las microalgas de esta clase son conocidas popularmente como diatomeas. Son reconocibles por su pared celular rígida de dos partes, en forma de caja, compuesta de sílice, conocida como frústula. Dicha estructura presenta patrones regulares, que hacen que estas microalgas se presenten en diferentes figuras geométricas (Lee 2008; Wojciechowski, 2013) (Figura 1). Debido a su capacidad para fabricar dicha estructura de sílice, las diatomáceas son de interés para la producción de nanopartículas (Lopez *et al.*, 2005). Por ejemplo, el trabajo de Jena *et al.*, (2014) reporta la biosíntesis de nanopartículas de plata mediante la diatomea *Amphora* sp, en un proceso dependiente de luz.

Figura 1 - Diatomeas.



Fuente: Wojciechowski (2013).

Las diatomáceas también producen metabolitos de interés, tales como pigmentos y lípidos. Los pigmentos presentes en las diatomeas, son la clorofila a, la clorofila c y la fucoxantina, la cual se presenta en mayor cantidad. Según Heo *et al.*, (2008) y Heo *et al.*, (2009), la fucoxantina tiene propiedades biológicas, tales como propiedades antioxidantes,

antimicrobianas y anticancerígenas. En cuanto a la producción de lípidos, las diatomeas sintetizan ácidos grasos monoinsaturados (MUFA's), los cuales son una alternativa a los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's) (que generalmente son producidos por microalgas de la clase chlorophyceae) para la producción de biodisel. Las MUFA's permitirían obtener un biodisel con características deseables que no se obtendrían usando PUFA's (Levitan *et al.*, 2014).

*Chrysophyceae*. Las microalgas de esta clase se distinguen por poseer clorofila a,  $c_1$  y  $c_2$ ; además poseen dos flagelos perpendiculares entre sí, y un fotoreceptor en el flagelo corto. La mayoría de las especies se encuentran en aguas dulces con concentraciones bajas de calcio. Las microalgas de esta clase sobreviven en periodos desfavorables como estatosporas (esporos de resistencia) (Lee 2008).

Filogenéticamente, la clase Chrysophyceae y la clase Syrunophyceae son muy cercanas. Ambas tienen la particularidad de cambiar sus estrategias nutricionales entre autotrofia, heterotrofia y fagotrofia, cuando en un ecosistema acuático las concentraciones de nutrientes son bajas y la penetración de la luz es reducida. Esto por tanto, representa una ventaja para su uso biotecnológico; sin embargo hay poca o ninguna información sobre el uso biotecnológico de tales microalgas (Friedl, *et al.*, 2013). No obstante, según Franceschini *et al.*, (2010), la orden Synurales tiene la capacidad de producir lípidos, lo cual la hace interesante para explorar su potencial biotecnológico.

#### **2.2.2.2 Discicristata**

Este grupo filogenético está constituido por las microalgas de la clase *Euglenophyceae*. Son microalgas unicelulares, flageladas, raramente coloniales y poseen clorofila a y clorofila b. Las euglenofíceas son de agua dulce, marinas o de aguas salobres (Franceschini *et al.*, 2010). En cuanto a su nutrición, aún no se ha demostrado que sean completamente fotoautotróficas, o sea, capaces de crecer en un medio desprovisto de todos los compuestos orgánicos, incluyendo vitaminas, usando  $CO_2$  como fuente de carbono, nitratos o sales de amonio como fuente de nitrógeno y luz como fuente de energía. Sin embargo, todas las euglenofíceas flageladas con pigmentación verde son fotoauxotróficas, pues son capaces de crecer en un medio sin nutrientes orgánicos, con  $CO_2$ , sales de amonio y luz, pero necesitando por lo menos una vitamina (Lee 2008).

En cuanto al potencial biotecnológico de las microalgas euglenofíceas, *Euglena gracilis* tiene un atractivo biotecnológico, pues produce altos contenidos de paramilo, cuando

crece heterotróficamente. Cuando crece fototróficamente, es fuente de un antioxidante, el  $\alpha$ -tocoferol (Friedl, *et al.*, 2013).

### 2.2.2.3 Alveolata

Este grupo filogenético está constituido por la clase *Dinophyceae*, compuesta por microalgas unicelulares. Las microalgas de esta clase son conocidas como dinoflageladas, pues la mayoría son flageladas; aunque existen formas inmóviles, ameboides o coloniales. Una característica de esta clase, es la presencia de un núcleo particular, el dinocarión. El dinocarión contiene poca cantidad de histonas, incluso durante mucho tiempo se pensó que no poseían histonas. Cerca del 50% de las especies son principalmente fagotróficas, las cuales capturan las presas en vacuolos digestivos. Diversos representantes como *noctiluca* son bioluminescentes, debido a la presencia de bacterias simbióticas dispuestas en la periferia del citoplasma (Franceschini et al 2010).

Las microalgas dinoflageladas pueden ser fotosintéticas o heterotróficas, las cuales son desprovistas de pigmentación. Las fotosintéticas poseen cloroplastos los cuales poseen clorofilas a y clorofila c<sub>2</sub>, siendo la peridinina y la neoperidina los principales carotenoides.

Según Friedl *et al.*, 2013 solo una especie de la clase dinophyceae es usada en aplicaciones comerciales, *Cryptothecodinium cohnii*. Esta microalga es conocida por su alto contenido de PUFA's, las cuales son usadas en la industria de alimentos, en acuicultura y en la industria farmacéutica.

### 2.2.2.4 Viridiplantae

La principal clase que compone este grupo es *Chlorophyceae*, comúnmente conocida como algas verdes y la mayoría son de agua dulce. Son microalgas fotosintéticas, con clorofila a y clorofila b como pigmento accesorio, razón por la cual poseen su color verde característico. Además de la clorofila b, poseen como pigmentos accesorios beta caroteno y xantofilas. La acumulación de carotenoides ocurre bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno, alta irradiación o alta salinidad (Franceschini, *et al.*, 2010; Lee 2008).

A partir de las algas verdes se han obtenido diversidad de productos de interés comercial, tales como sustancias antiinflamatorias, ácidos grasos poliinsaturados, producción de lípidos y etanol para la producción de biocombustibles. Esto se debe al hecho de que son relativamente fáciles de aislar y de manipular en los bioprocesos en los cuales son usadas (El Gamal, 2010; Koller *et al.*, 2014; Tale *et al.*, 2014; Bellou et al., 2014).



### 2.3 Formas de cultivar microalgas

Las microalgas pueden crecer en ausencia o en presencia de luz y pueden usar una fuente de carbono orgánico o inorgánico. De acuerdo con esas condiciones, existen tres formas de cultivarlas, que corresponden a diferentes estrategias nutricionales que tienen las microalgas. En la heterotrofia el carbono orgánico se usa como única fuente de carbono y energía para su crecimiento en ausencia de luz. Generalmente se usa glucosa para estimular el crecimiento heterotrófico. La mixotrofia consiste en cultivar microalgas en presencia de luz usando fuentes de carbono orgánicas e inorgánicas. En esta es forma de cultivo, el metabolismo respiratorio y el metabolismo fotosintético, actúan al mismo tiempo. En el cultivo fotoautotrófico la luz es la única fuente de energía, siendo convertida a energía química por medio de procesos fotosintéticos y el CO<sub>2</sub> es la fuente de carbono (Perez-Garcia *et al.*, 2011; Lee, 2004).

En el cultivo heterotrófico son usados fotobiorreactores. El principal objetivo de los fotobiorreactores es reducir los costos de producción de biomasa. Esto se logra controlando parámetros tales como pH, temperatura, y difusión de oxígeno y también controlando la asepsia del biorreactor (Perez-Garcia *et al.*, 2011). Por tanto, el cultivo heterotrófico tiene la ventaja de controlar el crecimiento de la microalga de interés, orientando su crecimiento hacia la producción de un metabolito deseado. Sin embargo, este tipo de cultivo presenta algunas desventajas: (1) solo un número limitado de microalgas crece heterotróficamente; (2) incrementa los costos debido al alto costo de la glucosa; (4) competición con otros microorganismos; (5) inhibición del crecimiento por exceso del sustrato orgánico (Chen, 1996). Sin embargo el cultivo heterotrófico es muy usado pues permite el escalado de bioprocesos a nivel industrial.

Como alternativa al cultivo heterotrófico, el cultivo mixotrófico presenta algunas ventajas que se pueden aprovechar, debido al hecho de que combina dos estrategias nutricionales: la autotrofia y la heterotrofia. La mixotrofia consiste en una etapa inicial de heterotrofia, debido al contenido de carbono orgánico inicial. Cuando el carbono orgánico disminuye a cierto nivel, la fotosíntesis es inducida y la microalga comienza a asimilar CO<sub>2</sub>, dando así inicio a la fase fotoautotrófica (Zhan *et al.*, 2016). Por tanto, este tipo de cultivo se ha utilizado con la idea de integrar las ventajas de la autotrofia y de la heterotrofia. De esa manera se han obtenido resultados positivos, como lo reporta Heredia-Arroyo *et al.*, (2011), cuyo estudio muestra que cuando *Chlorella vulgaris* crece en mixotrofia, mejora significativamente el rendimiento de biomasa en comparación con la autotrofia y la

heterotrofia. Sin embargo, también presenta desventajas, tales como alto costo y reducción de la eficiencia de la conversión energética, debido a pérdidas en la fotosíntesis (Zhan *et al.*, 2016).

Por otro lado, en el cultivo autotrófico o fotoautotrófico, se utilizan grandes tanques para cultivar microalgas, con el fin de aprovechar al máximo posible la irradiación solar. Tiene la ventaja de que a diferencia de las dos otras formas de cultivo, es menos costoso. Sin embargo, debido al hecho de que no permite controlar las condiciones ambientales, se ha tenido más preferencia hacia la heterotrofia y la mixotrofia para la producción de ciertos metabolitos (Perez-García *et al.*, 2010; Zhan *et al.*, 2016).

En cuanto a las fuentes de carbono orgánico, las microalgas son capaces de utilizar un amplio rango de fuentes, tales como azúcares, carbohidratos hidrolizados, melazas residuales, acetato y glicerol, así como carbono orgánico de aguas residuales (Pandey *et al.*, 2014).

## **2.4 Pigmentos en microalgas**

Los pigmentos de las microalgas tienen una importante función en la fotosíntesis y en la pigmentación de la microalga. El principal pigmento en los procesos fotosintéticos es la clorofila a, la cual está en todos los organismos que realizan fotosíntesis oxigénica, como es el caso de las microalgas. La principal función de la clorofila a, es la absorción de la luz requerida para la fotosíntesis, mientras que los pigmentos accesorios como clorofilas b y c, caroteno y ficobiliproteínas, absorben la luz en distintas longitudes de onda para aprovechar mejor la energía del sol (Streit *et al.*, 2005; Gonzalez-Silvera, *et al.*, 2010; Mazzuca, 2003).

Los pigmentos accesorios absorben la luz y ceden su energía a otras moléculas pero no pueden originar procesos químicos. La energía absorbida por los pigmentos (principales y accesorios) es transferida para sitios bien definidos, localizados sobre las membranas tilacoides, los llamados centros de reacción. Hay dos centros de reacción, uno que absorbe en 680 nm y otro en 700 nm, los cuales interactúan entre sí a través de transportadores de electrones (Streit *et al.*, 2005).

Los pigmentos sintetizados por microalgas tienen funciones que son benéficas para los humanos, tales como capacidad antioxidante, anticancerígena, anti-inflamatoria y neuroprotectora (D'Alessandro y Antoniosi, 2016). Existen tres clases de pigmentos en microalgas que son de interés: ficobilinas, clorofilas y carotenoides.

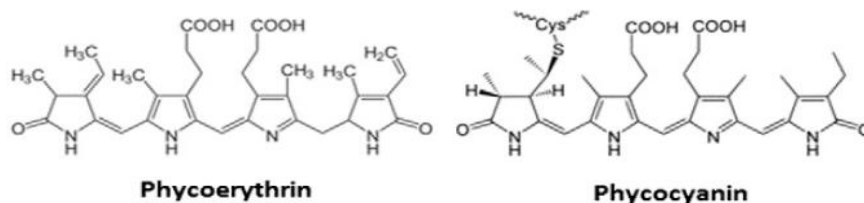
### 2.4.1 Ficobilinas

Las ficobilinas son solubles en agua y relativamente fáciles de aislar y purificar. Las ficobilinas actúan como pigmentos accesorios en la fotosíntesis. Existen cuatro clases de ficobilinas: aloficocianina (verde-azul), ficocianina (azul), ficoeritrina (púrpura) y ficoeritrocianina (naranja) (Figura 2) (D'Alessandro y Antoniosi, 2016). Esta clasificación se basa en la longitud de onda máxima de absorbancia: ficoeritrina ( $\lambda_{\max}$  = 490–570 nm), ficoeritrocianina ( $\lambda_{\max}$  = 560–600 nm), ficocianina ( $\lambda_{\max}$  = 610–625 nm) aloficocianina ( $\lambda_{\max}$  = 650–660 nm) (Manirafasha *et al.*, 2016).

Las microalgas de la división cyanobacteria se caracterizan por poseer ficocianina y aloficocianina, dándoles su coloración característica verde-azul, razón por la cual también son conocidas como algas verde-azules (Vincent 2009; Manirafasha *et al.*, 2016).

Las ficobilinas son ampliamente usadas en la industria y en los laboratorios de inmunología, debido a sus propiedades de absorción. Son empleadas generalmente en biología molecular como marcadores fluorescentes y en inmunoensayos como colorantes fluorescentes en microscopía (D'Alessandro y Antoniosi, 2016).

Figura 2 - Estructura molecular de la ficocianina y de la ficoeritrina.



Fuente: Koller *et al.*, (2014)

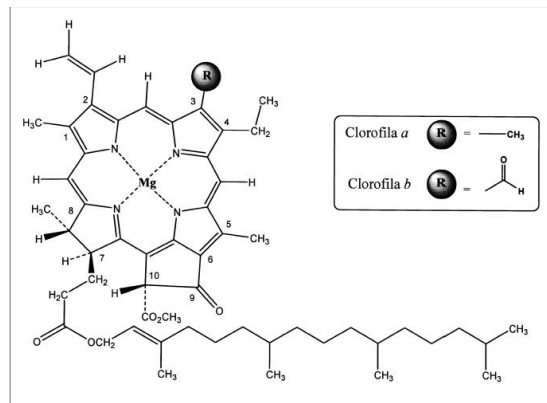
### 2.4.2 Clorofilas

Las clorofilas son pigmentos liposolubles y de color verdoso con un anillo de porina. Son las responsables de convertir la energía solar en energía química en la fotosíntesis. La microalgas de la clase chlorophyceae tienen clorofila a como pigmento principal y clorofila b como pigmento accesorio. Es por ello que poseen su coloración verde característica, razón por la cual son conocidas popularmente como algas verdes. Sin embargo otras clases o divisiones también poseen clorofilas. Por ejemplo la división Dinophyta posee clorofila b (Figura 3) y

clorofila c. las cianobacterias también poseen clorofilas, pues realizan fotosíntesis (D'Alessandro y Antoniosi, 2016; Franceschini, *et al.*, 2010; Lee 2008).

La clorofilina es un derivado de la clorofila en la que el magnesio es reemplazado por el sodio o por cadenas de cobre y las cadenas de fitol se pierden. Varios estudios encontraron que la clorofila y la clorofilina tienen acción antimutagénica y anticarcinogénica (D'Alessandro y Antoniosi, 2016).

Figura 3 - Estructura molecular de la clorofila a y de la clorofila b.



Fuente: Streit *et al.*, (2005).

### 2.4.3 Carotenoides

Los carotenoides son moléculas liposolubles que tienen colores variados que van desde el marrón, rojo, naranja y amarillo. Llevan a cabo dos funciones importantes en la fotosíntesis: absorber luz de las regiones del espectro visible, en las cuales la clorofila no absorbe eficientemente; y su otra función es la de proteger los sistemas fotosintéticos. Los mecanismos de fotoprotección remueven los estados más energéticos de la clorofila, como resultado de la excesiva absorción de la radiación lumínica. Por tanto, los mecanismos de fotoprotección impiden la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), lo cual hace de los carotenoides buenos antioxidantes. Los principales carotenoides encontrados en microalgas son:  $\beta$ -carotenos, licopenos, astaxantinas, zeaxantina, violaxantina y luteína (Figura 4). De todos ellos, los  $\beta$ -carotenos, la luteína y la astaxantina son los más estudiados (D'Alessandro y Antoniosi, 2016).

Los  $\beta$ -carotenos son pigmentos con una coloración entre el amarillo y el naranja, y son usados como colorantes para alimentos o suplementos nutricionales, porque es un precursor de la vitamina A (retinol). La demanda por este tipo de pigmentos está en aumento, debido a

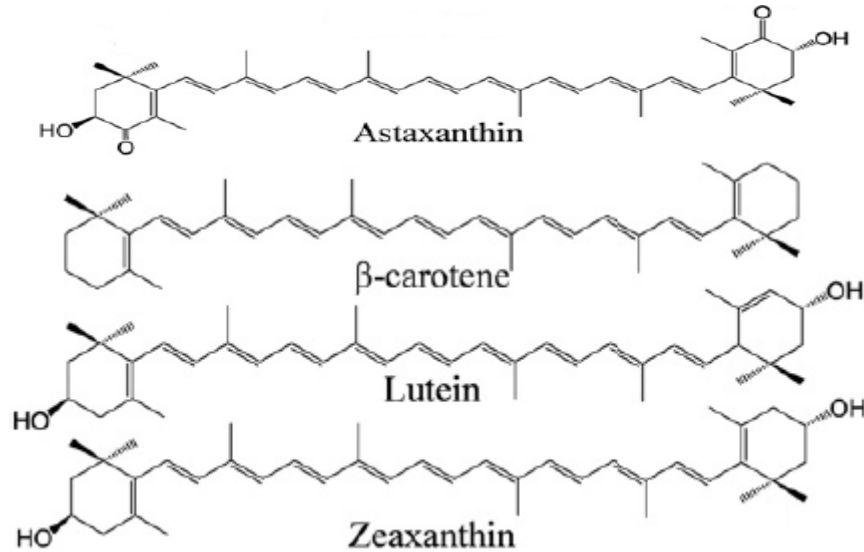
que poseen propiedades que los colorantes artificiales no tienen. Por ejemplo, los  $\beta$ -carotenos de *Dunaliella salina* causa una mayor tasa de apoptosis en las células de cáncer de próstata que la versión sintética (Jayappriyan *et al.*, 2013). *Dunaliella salina* es la principal microalga productora de carotenoides a nivel industrial. Produce por encima del 14% de su peso seco, lo cual quiere decir que produce de 10 a 100 veces más que la zanahoria, la cual es la segunda fuente de dicho pigmento (Markou y Nerantzis, 2013).

Las astaxantinas poseen un color rosa, son solubles en agua y es un subproducto del  $\beta$ -caroteno, ya que bajo estrés el  $\beta$ -caroteno se convierte en astaxantina a través de la  $\beta$ -caroteno oxidasa (CRTO) y  $\beta$ -caroteno hidroxilasa (CRTR-B). El pigmento es acumulado en vesículas lipídicas fuera del cloroplasto. La astaxantina secuestra radicales libres mediante la remoción del oxígeno reactivo y tiene alta actividad antioxidante. Debido a esto, es usada en tratamiento de enfermedades como arterosclerosis y enfermedades del corazón, diabetes, enfermedades crónicas inflamatorias y en la prevención de algunos cánceres (D'Alessandro y Antoniosi, 2016; Markou y Nerantzis, 2013).

La luteína es un pigmento de color amarillo y en altas concentraciones tiene una coloración entre rojo y anaranjado. Protege los tejidos de radicales libres y protege los fotoprotectores mediante la filtración de la luz azul (500 nm). Tal radiación es perjudicial para la retina del ojo, pero la luteína puede reducir en un 40% la incidencia de dicha luz. También puede prevenir la cataratas, la retinopatía diabética y la degeneración de la retina. *Muriellopsis sp* es una microalga de las más estudiadas para la producción de luteína. Puede producir una concentración que varía entre 0.4% a 0.6% por biomasa seca. Otras microalgas también han sido estudiadas, como *Chlorella zofingensis*, *Chlorella protothecoides* y *Scenedesmus almariensi* (D'Alessandro y Antoniosi, 2016; Markou y Nerantzis, 2013).

La mayoría de las microalgas usadas en la fabricación de carotenoides pertenecen a la división *Chlorophyta* (tal es el caso de *Dunaliella salina*); sin embargo otras divisiones o clases también sintetizan carotenoides: *Cyanobacteria* y *Euglenophyta* (D'Alessandro y Antoniosi, 2016; Lee, 2008).

Figura 4 - Estructura molecular de algunos carotenoides.



Fuente: Gong y Bassi (2016).

## 2.5 Reservas de polisacáridos en microalgas

Las microalgas almacenan polisacáridos como reservas de energía y carbono. Comúnmente tales polisacáridos están compuestos por unidades de glucosa. El almidón es la forma más común de reserva de glucosa entre la mayoría de las algas verdes, el cual está constituido por dos diferentes tipos de  $\alpha$ -poliglucano: amilosa y amilopectina en diferentes proporciones, dependiendo de la especie de microalga. La amilosa es la forma lineal del almidón y la amilopectina es la forma ramificada (Vitova *et al.*, 2015)

Algunas algas producen diferentes tipos de polisacáridos. Por ejemplo la crisolaminarina es sintetizada y almacenada en diatomeas; el almidón florideano y el glicógeno están presentes en algas rojas y el paramilo es un poliglucano de reserva presente en Euglenofita. En cianobacterias el glicógeno está presente a excepción de algunas cianobacterias como *Cyanobacterium sp.*, *Myxosarcina burmensis* y *Synechococcus sp.*, las cuales producen poliglucanos conocidos como  $\alpha$ -semiamilopectina. Por tanto, eso quiere decir que el perfil de carbohidratos depende de la especie de microalga (González-Fernández y Ballesteros, 2012)

Las reservas de polisacáridos tienen importancia biotecnológica, pues son una fuente de carbohidratos, los cuales pueden ser usados para la producción de biocombustibles (Dragone *et al.*, 2011).

## 2.6 Proteínas en microalgas

La biomasa microalgal es una fuente de proteína promisoría, pues de acuerdo con Becker (2007), la calidad de su proteína es igual y algunas veces superior comparada a la obtenida de plantas. Además, las microalgas permiten la producción en masa de proteína. Por ejemplo, la microalga *Dunaliella*, puede producir de 50 a 100 veces más proteína por unidad de área que las plantas y animales tradicionalmente usados para la alimentación. Es importante destacar que la proteína microalgal posee perfiles de aminoácidos bien balanceados, comparables a los del huevo y la soja. Sin embargo, pueden tener valores de digestibilidad, utilización neta de proteínas y de relación de eficiencia proteica, más bajos que la caseína y el huevo, considerados como patrones (Chukwunonso, *et al.*, 2017).

Generalmente en la producción de proteína microalgal, siempre se ha optado por no extraer el contenido proteico de las células, sino que el objetivo es aumentar la producción de biomasa, la cual acumula proteínas como reserva de energía. Una vez alcanzada la cantidad de biomasa deseada, esta debe ser deshidratada para poder ser consumida (Becker 2007). Sin embargo, recientemente, Muñoz *et al.*, (2015) desarrolló un procedimiento para la extracción de proteínas solubles en condiciones alcalinas, usando el método de Kale, (2011) (adaptado), antes de la remoción de los lípidos para la producción de biodiesel (Chukwunonso, *et al.*, 2017).

Por tanto, es posible extraer el contenido de proteínas de la biomasa microalgal, tal como lo evidencia el trabajo de Muñoz *et al.*, (2015). Especialmente esto se puede realizar en aquellos procesos en los que las fracciones proteicas son indeseables. Por ejemplo, la pirólisis rápida, una tecnología usada también en microalgas, convierte térmicamente carbohidratos y lípidos en syngas. Las fracciones de proteína son generalmente indeseables ya que la biomasa rica en proteínas crea lípidos ricos en nitrógeno, haciendo que se crean grupos NO<sub>x</sub> cuando el combustible es quemado. Entonces dichas fracciones proteicas indeseables se pueden recuperar a fin de ser aprovechadas para aplicaciones alimentarias (Chukwunonso, *et al.*, 2017).

En la producción de proteínas a gran escala, algunas microalgas han sido seleccionadas, tales como *Chlorella* sp, *Scenedesmus obliquuos* y la cianobacterias *Spirulina* sp y *Athrospira* sp (Becker 2007).

## 2.7 Lípidos en microalgas

Los lípidos actúan como metabolitos secundarios en microalgas y cumplen funciones relacionadas con el mantenimiento de la membrana celular y con la señalización celular. De

acuerdo con las condiciones ambientales, varía la cantidad, la composición y la proporción de los lípidos. Entre los factores ambientales que influyen en la síntesis de lípidos están la intensidad de la luz, la fase de crecimiento, fotoperiodo, temperatura, salinidad, concentración de CO<sub>2</sub>, nitrógeno y fósforo (Sibi *et al.*, 2016). Además según Berglund *et al.*, (2001) la calidad y la cantidad de lípidos también depende de la especie de microalga.

Las microalgas sintetizan lípidos en condiciones ambientales favorables y desfavorables. Dependiendo de tales condiciones, las rutas de síntesis son diferentes y por tanto los lípidos obtenidos cumplen diferentes funciones. En condiciones ambientales favorables, los lípidos son moléculas constituyentes de la membrana celular de las microalgas, pues forman parte de los glicolípidos y fosfolípidos. En condiciones adversas las microalgas cambian sus rutas metabólicas para producir lípidos neutros en su mayoría en forma de triacilglicerol que se almacena principalmente en cuerpos lipídicos citosólicos (Sibi *et al.*, 2016).

En vista de todo lo abordado en esta revisión bibliográfica, las microalgas ofrecen diversidad de posibilidades para la síntesis de metabolitos. Cada especie con su potencial, actúa como factorías en miniatura que permiten la fabricación de productos de valor comercial. Por tanto, las microalgas representan un campo interesante que debe ser explorado en el área de la microbiología aplicada.

Principalmente las algas de agua dulce son de interés biotecnológico en el estado de Minas Gerais, debido a la riqueza hídrica en dicho estado. Por tanto, con esta propuesta se pretende llevar a cabo la prospección de microalgas de agua dulce, a fin de explorar su potencial biotecnológico.



## REFERENCIAS

- Andersen, R. *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press. Oxford, UK., 2005
- Becker, E.W. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, p. 207-210, 2007
- Bellou, S; Baeshen, M; Elazzazy, A; Aggeli, D; Sayegh, F; Aggelis, G. Microbial lipids biochemistry and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances* V. 32 p. 1476-1493, 2014.
- Berglund, P. Larsson, G. Ewald, L. Okla. The effect of lake trophy on lipid content and PCB concentrations in planktonic food webs, *Ecology* v. 82 p. 1078-1088, 2001.
- Bicudo, M; Menezes, M. Introdução: As algas do Brasil. En: FORZZA, RC.,org., *et al.* INSTITUTO DE PESQUISAS JARDIM BOTANICO DO RIO DE JANEIRO. *Catálogo de plantas e fungo do Brasil*. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v.1, p. 49-60, 2010
- Cameán, A; Repetto, M. *Toxicología alimentaria*. Madrid 2006.
- Chen, F. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Trends Biotechnol.* v. 14, 412-426, 1996
- Chen, Y; Vaidyanathan, S. Simultaneous assay of pigments, carbohydrates, proteins and lipids in microalgae. *Analytica Chimica Acta*, 31-40, 2013.
- Chew, K; Yap, J; Show, P; Suan, N; Juan, J; Ling, T; Lee, D; Chang, J. Microalgae biorefinery: high value products perspectives. *Bioresource Technology*. Chukwunonso E; Collins, S, 2017.
- Coca, M; Barrocal, V; Lucas, S; González-Benito, G; García-Cubero, M.. Protein production in *Spirulina platensis* biomass using bett vinasse-supplemented culture media. Short communication. *Food and Bioproducts Processing* v. 94, p. 306-312, 2015.
- D'Alessandro, B; Antoniosi, F. Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, p. 832-841, 2016.
- Dragone, G; Fernandes, B; Abreu, A; Vicente, A; Teixeira, J. Nutrient limitation as a strategy for increasin starch accumulation in microalgae. *Applied Energy* p. 3331-3335, 2011
- Dreywood, R. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 18, p. 499-1946
- Ejike, C; Collins, S; Balasuriya, N; Swanson, A; Mason, B; Udenigwe, C. Prospects of microalgae proteins in producing peptide-based functional foods for promoting cardiovascular health. Review. *Trends in Food Science and Technology*, v. 59 p. 30-36, 2016.
- El Gamal, A. Biological importance of marine algae. *Saudi Pharmaceutical Journal* v. 18, p. 1-25. King Saud University, 2010
- Franceschini, I; Burliga, A; de Rievers, B; Prado, J, Hamlaoui. *Algas: Uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica*. Artmed Editora, 2010.
- Friedl, T; Rybalka, N; Kryvenda, Phylogeny and systematic of microalgae: An overview. En: (Posten, C., Walter, C. eds) *Microalgal Biotechnology: Potential and Production*. De Gruyter, Berlin, 2013.

- Gong, M; Bassi, A. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnology Advances* v. 34 p. 1396-1412, 2016.
- González-Fernández, C; Ballesteros, M. Linking microalgae and cyanobacteria cultura conditions and key-enzymes for carbohydrate accumulation. *Biotechnology Advances* p. 1655-1661, 2012
- Gonzales-Silvera, A; Millán-Nuñez, R; Santamaria-del-Angel, T. Absorción de luz y estructura del tamaño del fitoplancton. En: *Dinámica del ecosistema pelágico frente a Baja Californi 1997-2007*. G. Gaxiolay R. Durazo editores, 2010.
- Heo, S; Ko, S; Kang, S; Kang, H; Kim, J; Kim, S; Lee, K; Cho, M; Jeon, Y. Cytoprotective effect of fucoxanthin isolated from brown algae *Sargassum siliquastrum* against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell damage, *Eur. Food. Res. Technol.* v. 228 p. 145–151, 2008.
- Heo, S; Jeon, Y. Protective effect of fucoxanthin isolated from *Sargassum siliquastrum* on UV-B induced cell damage. *Photochem. Photobiol. B: Biol.* v. 95, p. 101–107, 2009.
- Heredia-Arroyo, T; Wei, W; Ruan, R; Hu B. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. *Biomass Bioenergy*; v. 35, 2011
- Jayappriyan KR; Rajkumar, R; Venkatakrishan, V; Nagaraj, S; Rengasamy, R. In vitro anticancer activity of natural  $\beta$ -caroteno from *Dunaliella salina*. *Biomed Prev. Nutr.*, p. 99–105, 2013.
- Jena, J; Pradhan, N; Dash, B; Panda, P; Mishar, B. Pigment mediated biogenic synthesis of silver nanoparticles using diatom *Amphora* sp. and its antimicrobial activity. *Journal of Saudi Chemical Society*, p. 661-666, 2014.
- Kale, A. Selective extraction of proteins from freshwater algae. Gilbert, AZ, USA: United States Patent Application, Heliae Development LLC, 2011.
- Koller, M; Muhr, A; Braunegg, G. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Research* 6, 2014.
- Lee, K . Algal nutrition. Heterotrophic carbon nutrition. In: Richmond, A. (Ed.), *Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Publishing, Oxford, UK, p. 116, 2004.
- Lee, R. *Phycology*. Fourth edition. Cambridge University Press, 2008.
- Levitan, O; Dinamarca, J; Hochman, G; Falkowski, P. (2014). Diatoms: a fossil fuel of the future. *Trends in Biotechnology*, Vol. 32, No. 3, 2014.
- Lopez, P; Desclés, J; Allen, A; Bowler C. Prospects in diatom research. *Current opinion in Biotechnology*, v. 16, p. 180-186, 2005.
- Manirafasha, E; Ndikubwimana, T; Zeng, X; Lu, Y; Jing, K. Phycobiliprotein: Potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. *Review. Biochemical Engineering Journal* v. 109, p. 282-296, 2016. Markou, G; Nerantzis, E. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions. *Biotechnology Advances*, p. 1532-1542, 2013.

- Mazzuca, T. Influencia de las condiciones hidrodinámicas y de la fracción molar de CO<sub>2</sub> en la fase gaseosa sobre el crecimiento celular en cultivos de microalgas. Tesis doctoral. Universidad de Almeida, Departamento de Ingeniería Química, 2003.
- Muñoz, R., Ciudad, G., Tessini, C., Jeison, D., Mella, R. Preliminary biorefinery process proposal for protein and biofuels recovery from microalgae. *Fuel*, v. 150, p. 425-433, 2015.
- Oncel, S. Microalgae for a macroenergy world. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, p. 241-264, 2013.
- Orvay, C. Acuicultura Marina: Fundamentos biológicos y tecnología de la producción. Universitat de Barcelona, 1993.
- Pacheco, R; Ferreira, A.F, Pinto, T; Nobre, B.P; Loureiro, D; Moura, P; Gouveia, L; Silva, C.M . The production of pigments and hydrogen through a *Spirogyra* sp. Biorefinery. *Energy Conversion and Management*, p. 789-797, 2015.
- Pandey, D; Lee, D; Chisti, Y; Soccol, C. *Biofuels From Algae*. Elsevier, 2014
- Perez-Garcia, O; Escalante, F; de-Bashan, L; Bashan, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research* 45 II-36, 2011.
- Rajneesh; Shailendra, P; Pathak, J; Shina, R. . Cyanobacterial factories for the production of green energy and value-added products: An integrated approach for economic viability. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* v. 69, p. 578-595, 2017.
- Sarma, M; Kaushik, S; Goswami. Cyanobacteria: A metabolic power house for harvesting solar energy to produce bio-electricity and biofuels. *Biomass and Bioenergy* v. 90, p. 187-201, 2016.
- Sibi, G; Shetty, V; Mokashi, K . Enhanced lipid productivity approaches in microalgae as an alternate for fossil fuels – A review. *Journal of the Energy Institute*, p. 330-334, 2016.
- Streit, N; Canterle, L; do Canto, M; Hecktheuer, H. As clorofilas. *Revisao bibliográfica.Ciencia Rural, Santa Maria*,v. 35, p. 748-755, 2005.
- Tale, M; Ghosh, S; Kapadnis, B; Kale, S. Isolation and characterization of microalgae for biodiesel production from Nisargruna biogas plant effluent. *Bioresource Technology* v. 169 p. 328-335, 2014.
- Trivedi, J; Aila, M; Bangwall, D; Kaul, S; Garg, M. Algae based biorefinery – How to make sense? *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, p. 295-307, 2015.
- Urbina-Suárez, Néstor-Andrés, Muñoz-Peñaloza, Yaneth, Jaimes-Duarte, Denis-Lorena, Velasco-Mendoza, Josman, Soler-Mendoza, Wilder, Characterization of Chlorophytas microalgae with potential in the production of lipids for biofuels CT&F *Ciencia, Tecnología y Futuro [en línea]* 2012, 5
- Vicent, W F. . Cyanobacteria. Laval University, Quebec City, QC, Canada. Elsevier inc, 2009.
- Vitova, M; Bisova, K; Kawano, S; Zachleder, V . Accumulation of energy reserves in algae: From cell cycles to biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, p.1204-1618, 2015.

Wang, Y; Hallenbeck, P; Leite, G; Paranjabe, K; Huo, D.. Growth and lipid accumulation of indigenous algal strains under photoautotrophic an mixotrophic modes at low temperature. *Algal Research*, p. 195-200, 2016.

Wojciechoski, J. Isolamento e cultivo de microalgas. Technical Report. Universidade Federal do Paraná, 2013.

Yemm, E; Willis, A . *Biochem. J.* 57, 1954.

Zhan, J; Rong, J; Wang, Q. Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospects. *International Journal of Hydrogen Energy I – 13*, 2016.

Zhu, L. Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: An innovative framework. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 1376-138,4.

## CAPÍTULO 2

**Artículo escrito de acuerdo con las normas de la revista Algal Research. Artículo en fase de envío a dicha revista.**

### AISLAMIENTO DE MICROALGAS Y SU CULTIVO EN SUERO DE LECHE

#### RESUMEN

En este trabajo fueron aisladas siete microalgas de dos lagos localizados en la ciudad de Ijací (Estado Minas Gerais). Para el aislamiento se usaron los medios BG11 y Bold. Se realizaron diluciones seriadas de las muestras de  $10^1$  e  $10^2$ , las cuales fueron plaqueadas en los medios BG11, Bold y Bold con extracto de suelo, por duplicado. Además, las muestras sin diluir ( $10^0$ ) fueron plaqueadas en tales medios. Las condiciones de incubación fueron las siguientes: 27 °C, fotoperiodo de 12h luz/oscuridad, por 7 días de cultivo. Se obtuvieron siete aislados, de los cuales cuatro fueron identificados como *Chlorella sp*, dos como *Chlorella sorokiniana* y uno como *Desmodesmus sp*. Fue realizada una evaluación de las condiciones de crecimiento, la cual permitió saber que todos los aislados son microalgas mixotróficas, que poseen buen crecimiento en BG11 con 1% de glucosa. Fueron seleccionadas tres microalgas para su cultivo en 10 mL de suero de leche, en un cultivo mixotrófico en las mismas condiciones de incubación mencionadas anteriormente. *Desmodesmus sp* presentó mayor producción de biomasa (8 g/L en siete días) y las otras dos microalgas produjeron 1,03 g/L e 1,89 g/L de biomasa seca. Por tanto, el uso de suero de leche permite que el proceso de producción de biomasa de *Desmodesmus sp*, sea más rentable económicamente, además de reducir la alta carga orgánica de tal subproducto, disminuyendo su impacto negativo en el ambiente.

**Palabras clave:** Microalgas, Mixotrofia, suero de leche, evaluación del crecimiento.

## 1. Introducción

Las microalgas son un grupo diverso microorganismos procarióticos y eucarióticos con la capacidad de realizar fotosíntesis [1]. Estos microorganismos se caracterizan por su capacidad de fijar CO<sub>2</sub> y por presentar requerimientos nutricionales simples [2]. Por tanto, en vista de ello y por su capacidad de realizar fotosíntesis, estos microorganismos poseen importancia industrial, pues su biomasa está constituida por carbohidratos, clorofila, lípidos y proteínas. Estos componentes son usados como materia prima para obtener productos de interés comercial, tales como biocombustibles y productos nutraceúticos [3,4].

La cantidades de tales componentes en la biomasa microalgal depende de la especie y también de la condiciones de cultivo. Es por eso que existen diferentes formas de cultivar microalgas, pues tales microorganismos usan diferentes estrategias nutricionales dependiendo de la fuente de carbono y de la disponibilidad de luz. En la heterotrofia el carbono orgánico es usado en oscuridad. En el crecimiento fotoautotrófico la fuente de energía es la luz y el CO<sub>2</sub> es la fuente de carbono. En la mixotrofia la fuente de carbono es orgánica y el crecimiento se da en periodos de luz y de oscuridad alternados [5].

En vista de que la mixotrofia permite a las microalgas usar de forma alternada carbono orgánico y CO<sub>2</sub> como fuente de carbono orgánico, es posible su crecimiento en medios de cultivo alternativos, como es el caso de residuos agroindustriales [5,6] Esto es de gran importancia, pues permite que la producción de biomasa microalgal y de compuestos bioactivos sea más barato que usar medios de cultivo convencionales [7,8].

Uno de los residuos agroindustriales usados para el cultivo de microalgas es el suero de leche debido a su alta concentración de carbohidratos. Este subproducto posee un alto contenido de materia orgánica, lo cual lo convierte en un potencial contaminante si no es tratado de la manera adecuada [8,9]. Por tanto, el uso de suero de leche además de permitir que la producción biomasa microalgal sea más viable económicamente, también permite

reducir el impacto negativo de este subproducto en el ambiente. Por ejemplo, trabajos como el de Girard [10] y Salati [11] reportan el uso de microalgas para tratar efluentes agroindustriales, entre ellos suero de leche.

En vista de lo anterior, el objetivo de este trabajo fue aislar microalgas de dos lagos, y caracterizar su crecimiento en medio BG11, para luego caracterizar su crecimiento en suero de leche. Esto con el fin de saber cuál de todos los aislados es el que produce mayor cantidad de biomasa en suero de leche.

## **2. Metodología**

### *2.1 Aislamiento de las microalgas*

Las microalgas fueron aisladas de dos lagos localizados en la ciudad de Ijaci (Minas Gerais, Brasil), siendo recolectadas dos muestras por cada lago (denominadas A y B). En seguida, se realizó el respectivo aislamiento en los diferentes medios de cultivo (BG11, Bold basal, y Bold con extracto de suelo), en el laboratorio de Fisiología y Genética de Microorganismos, de la Universidad Federal de Lavras (Lavras, Brasil). Para cada una de las muestras se realizaron diluciones seriadas de  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ , cada una en duplicado. Una alícuota de 500  $\mu$ L de cada dilución y también de las muestras sin diluir ( $10^0$ ) fue esparcida sobre la superficie del medio sólido, con la ayuda de un asa de Drigalsky. Las condiciones de incubación fueron las siguientes: fotoperiodo de 12h luz/oscuridad a una temperatura de 27 °C por 7 días.

Fue seleccionado el medio BG11 con pH 7.4, y con ampicilina con concentraciones que variaron de 50, 70, 80, 90 a 100 mg/L, a fin de detener la persistencia de la contaminación por bacterias, hasta obtener cultivos axénicos. Se realizaron observaciones microscópicas para la caracterización morfológica.

## *2.2 Evaluación de las condiciones de cultivo*

Una vez obtenidos cultivos axénicos, se realizó un acondicionamiento a los diferentes modos de cultivo, es decir, autotrofia, heterotrofia y mixotrofia. Las microalgas fueron cultivadas en BG11 sin glucosa y en presencia de luz (autotrofia); en BG11 con 1% de glucosa y en oscuridad, para lo cual los tubos fueron cubiertos con papel aluminio, (heterotrofia); y en BG11 con 1% de glucosa y en presencia de luz (mixotrofia). Todos los tratamientos se realizaron en tubos con 4 mL de medio, en los cuales se transfirió una porción de colonia de cada uno de los aislados, con la ayuda de un asa microbiológica. Las condiciones de incubación fueron las siguientes: fotoperiodo de 12h luz/oscuridad, a 27 °C durante 7 días, después de los cuales se realizaron lecturas de absorbancia a 540 nm [12,13].

Una vez conocida cual es la mejor forma de crecimiento, se prepararon inóculos de 10 mL, (los cuales fueron padronizados por espectrofotometría a 540 nm, con 7 días de crecimiento), para realizar un cultivo en 100 mL. En este cultivo fueron tomadas muestras de 1 mL cada día para realizar la lectura en absorbancia (540 nm), hasta estabilizarse el crecimiento. Todo esto con el fin de construir curvas de calibración para conocer el crecimiento de las microalgas en función de la densidad óptica, durante los días de cultivo. Todos los cultivos en 10 y 100 mL fueron realizados por duplicado.

## *2.3 Caracterización del crecimiento en medio sintético*

Al finalizar el cultivo en 100 mL, fueron construidas curvas de calibración para caracterizar el crecimiento de cada una de las microalgas. La biomasa de cada cultivo en 100 mL fue centrifugada a 7000 rpm, 4 °C, por 5 minutos, después de lo cual fue retirado el sobrenadante para realizar un lavado del pellet con agua destilada estéril, descartando de nuevo el sobrenadante. Los pellets de cada microalga fueron resuspendidos en agua destilada estéril para distribuir 3 mL en tres recipientes de aluminio previamente pesados por triplicado. Para realizar la medición en peso seco, la biomasa fue sometida a 60 °C durante 28 h en el



horno, después de lo cual los recipientes con la biomasa seca fueron pesados por triplicado. El cálculo de la biomasa se realizó por diferencia de peso.

Paralelamente, se realizaron diferentes diluciones de los inóculos para obtener lecturas de absorbancia a 540 nm para relacionarlas con el peso de la biomasa seca, con el fin de construir curvas de calibración. Las ecuaciones obtenidas fueron usadas para el cálculo de biomasa seca en la etapa de caracterización del crecimiento en suero de leche.

#### *2.4 Caracterización del crecimiento en suero de leche*

El suero usado en esta etapa fue obtenido de una fábrica de productos lácteos de la ciudad de Lavras, el cual es un suero no concentrado. La esterilización se llevó a cabo en autoclave, a 15 libras de presión, 121 °C durante 15 minutos. Después de lo cual fue centrifugado a 4000 x g durante 7 minutos para la remoción de agregados de proteínas [14].

Los inóculos fueron padronizados por espectrofotometría a 540 nm y cultivados en tubos de vidrio con 10 mL de suero, con un fotoperiodo de 12h luz/oscuridad, a 27 °C durante 7 días y en duplicado. Se tomaron muestras de 1mL del tiempo inicial y del séptimo día de cultivo para la realización de lecturas de absorbancia, las cuales fueron usadas para calcular la cantidad de biomasa seca, mediante las ecuaciones obtenidas en la elaboración de las curvas de calibración.

#### *2.5 Identificación molecular*

La extracción de ADN total fue realizada siguiendo el método de extracción con CTAB. Para ello, 10 mL de células en suspensión fueron centrifugadas a 3000 rpm a 4 °C durante 5 minutos. Los pellets fueron resuspendidos en tampón TE (tris, HCl, EDTA), colocando 1 mL en cada tubo, para centrifugar de nuevo en eppendorfs en las mismas condiciones. En los pellets obtenidos se agregó 300 µL de CATB 0.2%, los cuales en seguida fueron vortexados y colocados en baño maría a 60 C durante 30 min, homegenizando a cada 10 minutos, con el fin de lisar las células. Después de enfriar a temperatura ambiente, fueron

agregados 300  $\mu\text{L}$  de alcohol isoamílico (24:1) homogenizando en vórtex durante 15 segundos. De nuevo se realizó una centrifugación a 12000 rpm a 4 C durante 10 minutos. 100  $\mu\text{L}$  de la fase acuosa obtenida fueron colocados en criotubos para ser precipitados con 120 $\mu\text{L}$  de isopropanol durante 15 minutos a -80 C, después de lo cual fue realizada otra centrifugación a 12000 rpm a 4 C durante 10 minutos. Los pellets fueron lavados con 300  $\mu\text{L}$  de etanol 70% (12000 rpm a 4 C durante 10 minutos). Las muestras se centrifugaron de nuevo y el sobrenadante fue descartado para resuspender los pellets con 40  $\mu\text{L}$  de agua miliq para guardar en congelación [15].

Para la amplificación de la región del gen 18s rRNA se usaron dos primers. Para visualizar la extracción fue realizada una electroforesis en gel con el fin de extraer las bandas de ADN, las cuales fueron secuenciadas. Los resultados del secuenciamento fueron analizados usando la base de datos GenBank.

### **3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### *3.1 Aislamiento e identificación de las microalgas*

Del aislamiento realizado de las muestras de los dos lagos, fueron obtenidos siete aislados, los cuales son de la clase Chlorophyceae, pues además de poseer pigmentación verde debido a la presencia de clorofila a y b, no poseen una estructura pericelular denominada película. Dicha estructura es característica de la clase Euglenophyceae, pues existen representantes de esta clase que también poseen clorofila. Solamente las clases Chlorophyceae y Euglenophyceae poseen clorofila, mas en vista de que no poseen una estructura pericelular (película), estas microalgas pertenecen a la clase Chlorophyceae [16].

Morfológicamente casi todos los aislados presentan un mismo formato (cocoide), indicando al inicio que posiblemente pertenecen al género *Chlorella*. Se presentaron dos morfotipos aparentemente diferentes de una misma colonia (L2A BG11 M1 y L2A BG11

M2). El morfotipo 2 (L2A BG11 M2) presentó una coloración más clara que el morfotipo 1 (L2A BG11 M1). Del medio Bold con extracto de suelo (B+E) solamente se obtuvo un aislado (Tabla 1).

**Tabla 1**

Aislados obtenidos de dos lagos y medios de cultivo con los que fueron aislados.

AISLADO	LAGO	MUESTRA	MEDIO DE CULTIVO	COLONIA	MORFOLOGIA
L1A BG11	1	A	BG11	Verde, circular	Cocoide
L2A BG11 M1	2	A	BG11	Verde, circular	Cocoide
L2A BG11 M2	2	A	BG11	Verde claro, circular	Cocoide
L1A BOLD	1	A	BOLD	Verde, circular	Cocoide
L2A BOLD	2	A	BOLD	Verde, circular	Cocoide
L2B BOLD	2	B	BOLD	Verde oscuro, circular	Ovoide
L1B B+E	1	B	B+E	Verde, circular	Cocoide

De acuerdo con estos resultados, la mayoría de los aislados pertenecen al género *Chlorella*, menos un aislado (L2B Bold) que presenta una morfología diferente (ovoide), pues las microalgas del género *Chlorella* se caracterizan por ser unicelulares, esféricas y desprovistas de motilidad [17]. Por tanto, para saber con más certeza el género y la especie de todos estos aislados, fue realizada la identificación mediante el secuenciamiento de la región ITS. Los resultados de la identificación se presentan a continuación en la Tabla 2.

**Tabla 2**

Resultado de la identificación molecular de los aislados.

AISLADO	IDENTIFICACIÓN	IDENTIDAD (%)	REFERENCIA GenBank
L1A BG11	<i>Chlorella sp.</i>	99	<a href="#">KM061458.1</a>
L2A BG11 M1	<i>Chlorella sorokiniana</i>	96	<a href="#">KU170645.1</a>
L2A BG11 M2	<i>Chlorella sorokiniana</i>	99	<a href="#">KJ676113.1</a>
L1A BOLD	<i>Chlorella sp.</i>	99	<a href="#">JQ710683.1</a>
L2A BOLD	<i>Chlorella sp.</i>	100	<a href="#">JQ710683.1</a>
L2B BOLD	<i>Desmodesmus sp.</i>	98	<a href="#">KT778088.1</a>
L1B B+E	<i>Chlorella sp.</i>	99	<a href="#">KM061458.1</a>

En el caso de los aislados con código L1A BG11, L1A BOLD, L2A BOLD y L1B B+E, no fue posible identificar hasta el nivel de especie. Esto muestra que es necesario en ocasiones usar otras regiones del genoma además de las regiones ITS, para realizar una identificación hasta el nivel de especie. Por ejemplo, en los estudios de Hadi [18] y Da Silva [19], son usados las regiones ITS-1, ITS-2 y el gen RbcL para identificar microalgas de la clase Chlorophyceae. Aun así, no siempre se llega a una identificación definitiva, pues como comenta Hadi [18], existe una necesidad urgente de depositar secuencias de referencia en las base de datos, que permitan una clasificación taxonómica precisa. Por tal razón, otros autores han usado la técnica de MALDI-TOF para complementar los resultados de secuenciamiento de ADN o cuando no es posible realizar una identificación confiable usando más de una región del genoma [20].

De acuerdo con la información presentada en las tablas 1 y 2, el lago que presentó mayor diversidad fue el lago 2. Esto puede deberse a las características de cada lago. En el caso del lago 1, se presenta un ambiente eutrofizado, lo cual lo convierte en un ambiente selectivo que solamente permiten el crecimiento de microalgas con la capacidad de crecer en altas concentraciones de nutrientes (generalmente nitrógeno y fósforo) [21,22].

Los resultados del aislamiento en las muestras del lago 1, mostraron que en los tres medios usados (BG11, BOLD y BOLD con extracto de suelo), crecieron microalgas identificadas como *Chlorella sp.* Estos medios han sido usados en otros trabajos para el aislamiento y cultivo de especies del género *Chlorella*. Por ejemplo Purkayastha [23], compararon el crecimiento de *Chlorella ellipsoidea* en varios medios entre ellos BOLD y BG11, y encontraron que el medio BG11 permitió obtener una mayor cantidad de biomasa, debido a que posee una mayor concentración de nitrógeno en la forma de  $\text{NaNO}_3$ , en comparación con los otros medios que fueron usados. Justamente en este trabajo, todas las microalgas, la mayoría de las cuales son del género *Chlorella*, presentaron mayor crecimiento

en BG11. Igualmente George [24] también usaron varios medios de cultivo entre ellos BG11 y BOLD, para estudiar los efectos de las composiciones de diferentes medios en el cultivo de *Ankistrodesmus falcatus*, una microalga clorófito, y encontraron que hubo una mayor tasa de crecimiento en medio BG11, mientras que en el medio BOLD hubo una menor tasa de crecimiento. Estos autores señalan que esto es debido a la baja concentración de nitrato en el medio BOLD. Además, Bayona y Garcés [25] obtuvieron mayor cantidad de biomasa de *Botryococcus braunii* usando medio BG11.

En concordancia con lo anterior, Wen [26], usó el medio BG11 para aislar *Chlorella vulgaris* de aguas residuales porcinas, las cuales poseen grandes concentraciones de nitrógeno. Por tanto, en vista de que el medio BG11 posee una alta concentración de nitrógeno (en comparación con el medio BOLD), facilita el aislamiento de una microalga proveniente de un ambiente de alta concentración de nitrógeno. Entonces, esto permite entender por qué la microalga aislada del lago 1, identificada como *Chlorella sp*, aun siendo aislada en el medio BOLD con y sin extracto de suelo, presentó mayor crecimiento en BG11, pues, de acuerdo con Andersen [21], *Chlorella spp* es una microalga que tiene la capacidad de crecer en ambientes con altas concentraciones de nutrientes.

Otro factor que hay que tener en cuenta es que el lago 1 no presenta conexión con otros cuerpos de agua, como ocurre en el caso del lago 2, que presenta conexión con un río. Este factor pudo contribuir a que en el lago 2 se presentó mayor diversidad de microalgas (*Chlorella sorokiniana*, *Desmodesmus spinosus* y *Chlorella sp*), pues las diferentes especies de microalgas pudieron haber provenido de otros cuerpos de agua, contribuyendo a la biodiversidad en dicho lago. Además, este lago no presenta eutrofización, lo cual no lo convierte en un ambiente selectivo, como es el caso del lago 1.

### 3.2 Evaluación de las condiciones de cultivo

Se realizaron cultivos en 4 mL de medio BG11 con 1% con pH 7.4 para saber cuál es el mejor modo de crecimiento. Como se puede notar en la Tabla 3, todas las microalgas sin excepción mostraron mayor crecimiento en el cultivo mixotrófico (medido por absorbancia). También puede notarse que la autotrofia es la condición menos favorable para el cultivo de estas microalgas.

**Tabla 3**

Resultados de la evaluación de las condiciones de cultivo.

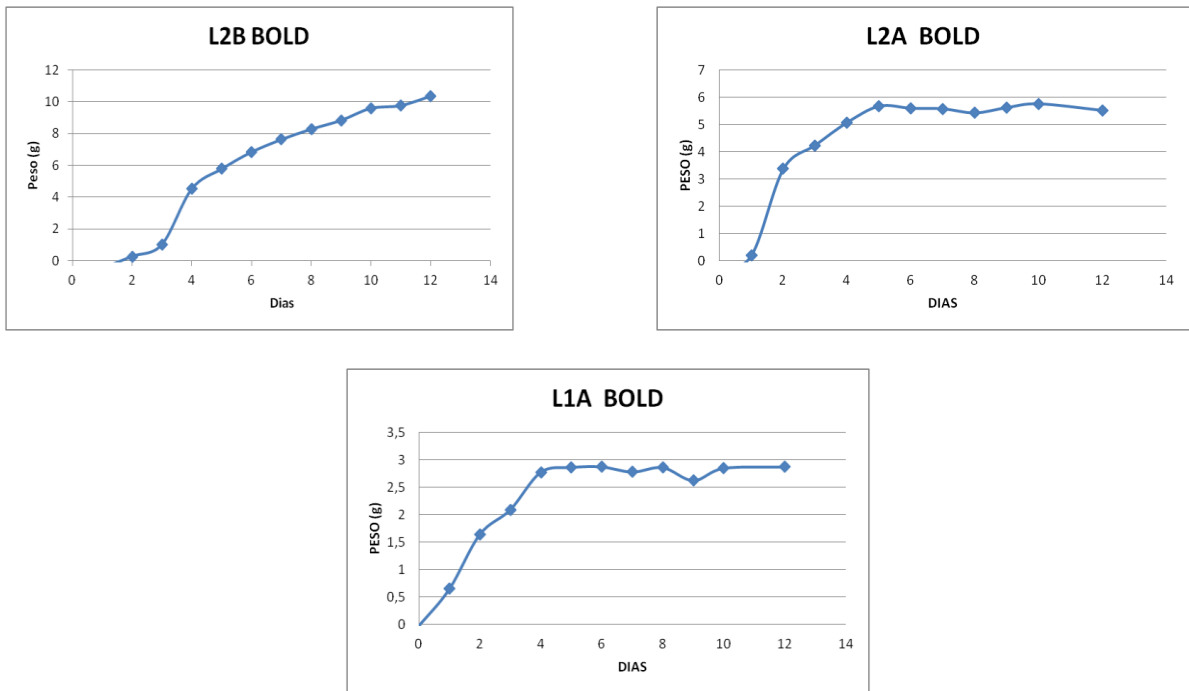
AISLADO	CONDICIÓN DE CULTIVO	ABSORBANCIA
L1A BG11	Mixotrofia	1.606
	Heterotrofia	0.579
	Autotrofia	0.488
L2A BG11 M1	Mixotrofia	1.32
	Heterotrofia	0.684
	Autotrofia	0.473
L2A BG11 M2	Mixotrofia	1.33
	Heterotrofia	0.598
	Autotrofia	0.217
L1A BOLD	Mixotrofia	1.5
	Heterotrofia	0.383
	Autotrofia	0.217
L2A BOLD	Mixotrofia	1.752
	Heterotrofia	0.689
	Autotrofia	0.185
L2B BOLD	Mixotrofia	1.245
	Heterotrofia	0.321
	Autotrofia	0.124
L1B B+E	Mixotrofia	0.033
	Heterotrofia	0.02
	Autotrofia	0.027

Como se ha comentado anteriormente, el lago 1 presenta eutrofización debido a la presencia de macrófitas y el lago 2 constituye un ambiente no eutrofizado. Teniendo esto en cuenta, la mixotrofia es un modo importante de nutrición para el fitoplancton en hábitats oligotróficos y además, muchas microalgas de estuarios eutróficos, crecen mixotróficamente [27]. Los incrementos de biomasa obtenidos en los siete aislados pueden ser entendidos teniendo que la mixotrofia es la combinación de la fotoautotrofia y heterotrofia, pues permite a las microalgas realizar fotosíntesis durante el periodo de luz, consumiendo CO<sub>2</sub>, y consumir fuentes de carbono orgánicas heterotróficamente, durante el período de oscuridad. Generalmente cuando la fuente de carbono orgánico comienza a agotarse, las microalgas realizan fotosíntesis para fijar CO<sub>2</sub> a fin de continuar creciendo. Por lo tanto, la mixotrofia permite la sinergia de dos formas diferentes de crecimiento, haciendo posible incrementos de biomasa superiores a los obtenidos de forma fotoautotrófica y heterotróficamente [5].

### 3.3 Caracterización del crecimiento en medio sintético

Las Figuras 1 y 2 muestran el comportamiento del crecimiento de las siete microalgas en medio BG11. De estas microalgas, tres mostraron mayor crecimiento en cuatro días, mientras que las cuatro restantes mostraron un crecimiento más demorado. Como se puede observar en la Figura 1, el aislado que presentó mayor crecimiento en el medio BG11 fue el aislado L2B Bold, identificado como *Desmodesmus sp.* Puede notarse que a partir del día 3 de crecimiento, este aislado tiene un crecimiento exponencial hasta el cuarto día, alcanzando una biomasa de 5g/L aproximadamente, cantidad que es alcanzada por L2A Bold, (identificada como *Chlorella sp*) en el mismo día. Sin embargo, *Desmodesmus sp* a partir del día 4 hasta el día 12 crece de forma constante hasta alcanzar una biomasa de 10 g/L; mientras que *Chlorella sp* (L2A Bold), presenta un valor de biomasa constante (6 g/L), desde el día 5 hasta el día 12. El aislado L1A Bold, identificado también como *Chlorella sp*, crece de forma exponencial

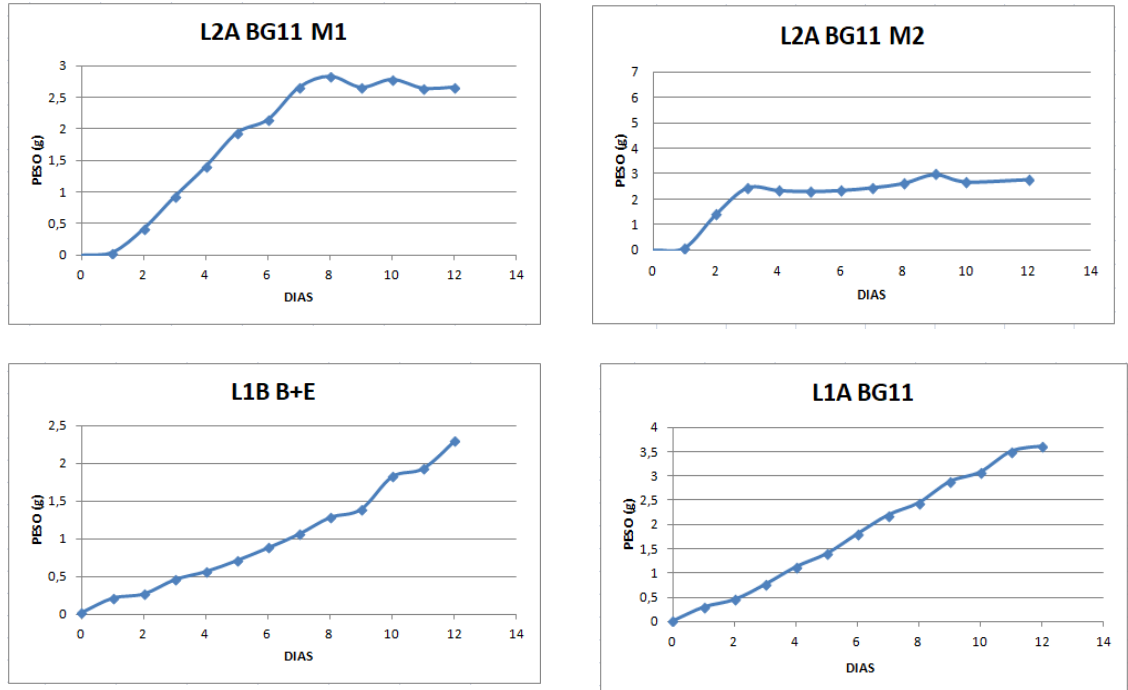
desde el día 0 hasta el día 4, alcanzando una biomasa de casi 3 g/L, manteniendo ese valor hasta el último día de cultivo.



**Fig. 1.** Crecimiento de los aislados que presentaron mayor crecimiento en BG11.

En cuanto a los otros cuatro aislados (Figura 2), estos presentaron menor crecimiento, pues para alcanzar una biomasa de 3 g/L demoran entre ocho y nueve días, como es el caso de los aislados L2A BG11 M1, L2A BG11 M2 (ambos identificados como *Chorella Sorokiniana*) y L1A BG11 (identificado como *Chlorella sp*). En el caso del aislado L1B B+E, (identificado como *Chlorella sp*), alcanzó un valor de biomasa menor de 2.5 g/L durante los doce días de cultivo.





**Fig. 2.** Crecimiento de los aislados que presentaron menor crecimiento en BG11.

Rocha [28] caracterizó morfológica, molecular y bioquímicamente diez cepas, entre ellas microalgas del género *Chlorella*, tales como *C. sorokiniana* y *C. vulgaris* y una microalga del género *Desmodesmus* (*Desmodesmus communis*). Aunque estas microalgas fueron cultivadas en modo autotrófico, los resultados que obtuvieron también mostraron que en medio BG11 una microalga del género *Desmodesmus* (*D. communis*) produjo mayor cantidad de biomasa que aislados del género *Chlorella* (Alrededor de 1.8 mg/L para *D. communis*, aproximadamente 1.5 mg/L para *C. sorokiniana* y alrededor de 1.0 mg/L para *C. vulgaris*). De manera parecida, en este trabajo una microalga del género *Desmodesmus* (*Desmodesmus sp*) produjo también en medio BG11 una cantidad de biomasa superior a microalgas del género *Chlorella*. Dicha cantidades son inferiores a las obtenidas del cultivo mixotrófico de este trabajo. Rocha [28] cita otros trabajos en los cuales muestran que varias de las microalgas que estudiaron presentaron mayor crecimiento en modo mixotrófico. Algunos de tales trabajos, son los realizados por Li [29] el cual reporta que para *C.*

*sorokiniana* se obtuvo una biomasa de 3.55 g/L en medio Kuhl y el trabajo de Girard [30], quienes cultivaron *S. obliquus* en medio Bold, obteniendo una biomasa de 1.9 g/L. Por otro lado, las microalgas estudiadas en este trabajo, mostraron mayor producción de biomasa que los trabajos anteriormente comentados, en modo mixotrófico y en medio BG11. Esto puede indicar que posiblemente microalgas de la clase Chlorophyceae producen mayor cantidad de biomasa en modo mixotrófico y en medio BG11.

Con base en los resultados obtenidos, fueron escogidos los aislados L2B Bold, L2A Bold y L1A Bold, para ser cultivados en suero de leche, debido a su buen crecimiento en medio BG11, a fin de caracterizar su crecimiento en tal subproducto.

En la elaboración de las curvas de calibración fueron obtenidas ecuaciones que permiten calcular la cantidad de biomasa en g/L (Y) en función de la absorbancia (X). Estas ecuaciones fueron usadas para calcular la cantidad de biomasa de los aislados seleccionados, en un cultivo mixotrófico en 10 mL de suero de leche, obtenida en siete días de cultivo. Para ello fue medida la absorbancia para las muestras del día siete, de cada uno de los aislados.

$$Y = 7.449X - 1.2064 \quad (R^2 = 0,9344) \quad \text{L2B BOLD}$$

$$Y = 1,8431X - 0,2242 \quad (R^2 = 0,9567) \quad \text{L2A BOLD}$$

$$Y = 4.4257X - 0,8867 \quad (R^2 = 0,9065) \quad \text{L1A BOLD}$$

### 3.3 Caracterización del crecimiento en suero de leche

Los resultados del crecimiento en suero de leche de los aislados L2B Bold, L2A Bold y L1A Bold, están representados en la tabla 4. Como se puede notar en la Tabla 4, el aislado que presentó un mayor aumento de biomasa en comparación con los otros, fue L2B Bold con 8,00 g/L en el séptimo día de cultivo. Es interesante notar que en el cultivo en medio BG11, la biomasa de este aislado en el séptimo día fue de 7,63 g/L. Por tanto, el suero de leche

representa una buena alternativa para el cultivo de *Desmodesmus sp*, haciendo el proceso de cultivo menos costoso.

**Tabla 4**

Crecimiento en 10 mL de suero de leche durante siete días de cultivo.

<b>AISLADO</b>	<b>BIOMASA DIA 7 (g/L)</b>
L2B BOLD	8,00
L2A BOLD	1,03
L1A BOLD	1,89

Es interesante también que en otros trabajos [11,30] también usaron suero de leche enriquecido con medio Bold para el cultivo de *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella protothecoides*, es decir, usaron un medio constituido por 40% de suero y 60% de medio Bold. Además, Salati [11], usó varios subproductos entre ellos suero de leche enriquecido con medio BG11, esto con el fin de alcanzar una concentración de carbono de 2.2 g/L, para cultivar *Chlorella vulgaris*. Por tanto, este trabajo muestra que es posible usar el suero de leche sin ser diluido con medio sintético para obtener biomasa microalgal, pues las tres microalgas cultivadas lograron adaptarse y aumentar su biomasa.

Los resultados obtenidos para el aislado *Desmodesmus sp* con suero de leche, demuestran la viabilidad del uso de este subproducto sin el costo adicional del proceso de concentración realizado en las industrias lácteas. El suero no concentrado usado en este trabajo permitió la obtención de cantidad de biomasa microalgal superior a las reportadas en trabajos como el de Girard [30], quienes obtuvieron  $2.6 \pm 0.1$  g/L en siete días de cultivo y  $4.9 \pm 0.2$  g/L en trece días de cultivo, de *S. obliquus*. La cantidad de biomasa obtenida en este trabajo también fue superior a la obtenida en el estudio de Girard [10], quienes obtuvieron  $6.2 \pm 0.4$  g/L de *C. protothecoides* en seis días de cultivo y a la obtenida por Salati [11] quienes

reportan que obtuvieron 2.59 g/L de *C. vulgaris*. Todos estos autores citados realizaron sus cultivos en modo mixotrófico al igual que en este trabajo.

Además, en vista de que se obtuvo una cantidad de biomasa de 8,00 g/L en suero de leche, muy cercana a la obtenida en medio BG11 (7,63 g/L) en siete días de cultivo, es más ventajoso usar tal subproducto en vez del medio BG11, pues hace que el cultivo de *Desmodesmus sp* sea más rentable en términos económicos.

#### **4. CONCLUSIONES**

Del aislamiento de microalgas de dos lagos permitió obtener siete aislados, de los cuales seis pertenecen al género *Chlorella*, excepto uno, que fue identificado como *Desmodesmus sp*. Todas las microalgas mostraron un crecimiento en medio BG11 y en mixotrofia inclusive superior a los reportados en otros trabajos. Además, el uso de suero de leche no concentrado y no enriquecido con medio sintético permitió obtener una cantidad de biomasa de *Desmodesmus sp* ligeramente superior a la obtenida en medio BG11, en modo mixotrófico. Inclusive se obtuvo una cantidad de biomasa superior a los reportados en otros trabajos sobre cultivo de microalgas clorófitas en suero de leche. Esto representa una ventaja en términos económicos haciendo posible la producción de biomasa de dicha microalga económicamente más rentable.

#### **AGRADECIMIENTOS**

Los autores agradecen a las agencias de fomento CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) y FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), por el apoyo financiero.

## REFERENCIAS

- [1] W.F. Vicent, Cyanobacteria, Elsevier inc Laval University, Quebec City, QC, Canada. 2009.
- [2] C.H.T. Vu, H-G. Lee, Y.K.C. Chang, H-M Oh, Axenic cultures for microalgal biotechnology: Establish, assessment, maintenance, and applications, *Biotechnology Advances* 36 (2018) 380-396.
- [3] M. Koller, A. Muhr, G. Braunegg, Microalgae as versatile cellular factories for valued products, *Algal Research* 6 (2014) 52-63.
- [4] C. Paliwal, M. Mitra, K. Bhayani, S.V.V. Bharadwaj, T. Ghosh, S. Dubey, S. Mishra, Abiotic stress as tools for metabolites in microalgae, *Bioresource Technology* 244 (2017) 1216-1226.
- [5] J. Zhan, J. Rong, Q. Wang, Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospects, *International Journal of Hydrogen Energy* 42 (2017) 8505-8517.
- [6] T.M. Mata, A.A. Martins, N.S. Caetano, Microalgae for biodiesel production and other applications: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14 (2010) 217-232.
- [7] D.B. Rodrigues, E.M.M. Flores, J.S. Barin, A.Z. Mercandante, E. Jacobo-Lopes, L.Q. Zepka. Production of carotenoids from microalgae cultivated using agroindustrial wastes, *Food Research International* 65 (2014) 144-148.
- [8] R.G. de Melo, A.F. de Andrade, R.P. Bezerra, D.S. Correia, V.C. de Souza, A.C. Brasileiro-vidal, D.A.V. Marques, A.L.F. Porto, *Chlorella vulgaris* mixotrophic growth enhanced biomass productivity and reduced toxicity from agro-industrial by-products, *Chemosphere* 204 (2018) 344-350.
- [9] A.P. Abreu, B. Fernandes, A.A. Vicente, J. Teixeira, G. Dragone, Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source, *Bioresource Technology* 118 (2012) 61-66.
- [10] J.M. Girard, R. Tremblay, N. Faucheux, M. Heitz, J.S. Deschenes, Phycoremediation of cheese whey permeate using directed commensalism between *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella protothecoides*, *Algal Research* 22 (2017) 122-126.
- [11] S. Salati, G. D'Imporzano, B. Menin, D. Veronesi, B. Scaglia, P. Abbruscato, P. Mariani, F. Adani, F. Mixotrophic cultivation of *Chlorella* for local protein production using agro-food by-products, *Bioresource Technology* 230 (2017) 82-89.
- [12] A. Bhatnagar, S. Chinnasamy, M. Singh, K.C. Das, Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters, *Applied Energy* 88 (2011) 3425-3431.
- [13] T. Heredia-Arroyo, W. Wei, R. Ruan, B. Hu, Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials, *Biomass and Bioenergy* 35 (2011) 2245-2253.
- [14] J. Dumpler, U. Kulozik. Heat-induced coagulation of concentrated skim milk heated by direct steam injection, *International Dairy Journal* 59 (2016) 62-71.
- [15] R.A. Hutagalung, A.E. Sukoco, D. Soedharma, L.M. Goreti, I. Andrian, B. Elshaddai, N. Mulyono, Isolation, Identification and Growth Optimization of Microalgae Derived from Soft Coral *Dendronephthya* sp, *APCBEE Procedia* 10 (2014) 305-310.
- [16] B. Reviere, *Biologia das algas*, Artmed, Porto Alegre, 2006.

- [17] M.M. Phukan, R.S. Chutia, B.K. Konwar, R. Kataki, Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock, *Applied Energy* 88 (2011) 3307-3312.
- [18] S.I.I.A. Hadi, H. Santana, P.P.M. Brunale, T.G. Gomes, M.D. Oliveira, A. Matthiensen, M.E.C. Oliveira, F.C.P. Silva, B.S.A.F. Brasil, DNA Barcoding Green Microalgae Isolated from Neotropical Inland Waters, *PLoS ONE* 11(2) (2016) 1-18.
- [19] T.G. Da Silva, C. Bock, C.L. Sant'Anna, I.L. Bagatini, S. Wodniok, A.A.H. Vieira, Selenatracheae (Sphaeropleales, Chlorophyceae): *rbcL*, 18S rDNA and ITS-2 secondary structure enlightens traditional taxonomy, with description of two new genera, *Messatrum gen. nov.* and *Curvastrum gen. nov.*, *Fottea, Olomouc* 17 (2017) 1-19.
- [20] R.V. Mello, F.S. Meccheri, I.L. Bagatini, E. Rodriguez-Filho, A.A.H. Vieira, MALDI-TOF MS based discrimination of coccoid Green microalgae (selenatracheae, Chlorophyta), *Algal Research* 28 (2017) 151-160.
- [21] R. Andersen, *Algal Culturing Techniques*, Elsevier Academic Press, Oxford, UK, 2005.
- [22] L. Rugnini, G. Costa, R. Congestri, S. Antonaroli, L. Sanità di Toppi, L. Bruno, Phosphorus and metal removal combined with lipid production by the green microalga *Desmodesmus sp.*: An integrated approach, *Plant Physiology and Biochemistry* 125 (2018) 45-51.
- [23] J. Purkayastha, A. Bora, H.K. Gogoi, L. Singh, Growth of high oil yield green alga *Chlorella ellipsoidea* in diverse autotrophic media, effects on its constituents, *Algal Research* 21(2017) 81-88.
- [24] B. George, I. Pancha, C. Desai, K. Chokshi, C. Paliwal, T. Ghosh, S. Mishra, Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus* – A potential strain for bio-fuel production, *Bioresource Technology* 171 (2014) 367-374.
- [25] K.C.D. Bayona, L.A. Garcés, Effect of different media on exopolysaccharide and biomass production by the green microalgae *Botryococcus braunii*, *J. App. Phycol* (2013) 1-9.
- [26] Y. Wen, Y. He, X. Ji, S. Li, L. Chen, Y. Zhou, M. Wang, M. B. Chen, Isolation of an indigenous *Chlorella vulgaris* from swine wastewater and characterization of its nutrient removal ability in undiluted sewage, *Bioresource Technology* 243 (2017) 247-253.
- [27] J.M. Burkholder, P.M. Glibert, H.M. Skelton, Mixotrophy, a major mode of nutrition for harmful algal species in eutrophic waters, *Harmful Algae* 8 (2008) 77-93.
- [28] R.P. Rocha, M. Machado, M; M.G.M.V. Vaz, C.C. Vinson, M. Leite, R. Richard, L.B.B. Mendes, W.L. Araujo, C. Caldana, M.A. Martins, T.C.R. Williams, A. Nunes-Nesi, Exploring the metabolic and physiological diversity of native microalgal strains (Chlorophyta) isolated from tropical freshwater reservoirs, *Algal Research* 28 (2017) 139-150.
- [29] T. Li, Y. Zheng, L. Yu, S. Chen, Mixotrophic cultivation of a *Chlorella sorokiniana* strain for enhanced biomass and lipid production, *Biomass and Energy* 66 (2014) 204-213
- [30] J.M. Girard, M.L. Roy, M.B. Hafsa, J. Gagnon, N. Faucheux, M. Heitz, R. Tremblay, J.S. Deschenes, Mixotrophic cultivation of green microalgae *Scenedesmus obliquos* on cheese whey permeate for biodiesel production, *Algal Research* 5 (2014) 241-248.