

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Metodología de alto rendimiento para evaluar contenido de lípidos y producción de biomasa en microalgas

Proyecto de investigación

David Marcus Salomón Pérez

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniero en Procesos Biotecnológicos

Quito, 22 de diciembre de 2015

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Metodología de alto rendimiento para evaluar contenido de lípidos y producción
de biomasa en microalgas**

David Marcus Salomón Pérez

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Andrés Torres, Ph. D.

Firma del profesor

Nombre del profesor, Título académico

Valeria Ochoa-Herrera, Ph. D.

Firma del profesor

Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: David Marcus Salomón Pérez

Código: 00104537

Cédula de Identidad: 0924668171

Lugar y fecha: Quito, 18 de diciembre de 2015

Agradecimientos

Agradezco a Andrés Torres por haberme guiado de manera excepcional en el desarrollo de este trabajo de titulación, por su paciencia y por sus buenos consejos. A Valeria Ochoa por el apoyo brindado, por sus enseñanzas a lo largo de la carrera y su buena predisposición a lo largo de este proyecto. A Renato León por permitirme trabajar en su laboratorio. A Antonio León por prestarme su lector de microplatos, que permitió el desarrollo de este proyecto. A mi madre por creer en mí hasta el final. A mis compañeros por el apoyo a lo largo de la carrera.

RESUMEN

En la última década se ha expandido la producción y demanda de biodiesel en todo el planeta. El biodiesel puede ser elaborado utilizando lípidos provenientes de microalgas, gracias a su alto rendimiento metabólico a nivel fotosintético. El objetivo de esta investigación es desarrollar y estandarizar una metodología de alto rendimiento para el análisis de microalgas con mayor capacidad de producción de biomasa y acumulación de lípidos. Al evaluar densidad óptica medida a 750nm y comparar con conteo celular realizado en una cámara de Neubauer se observó una relación lineal con un grado de correlación elevado. Las condiciones óptimas de marcaje de ácido palmítico con Nile Red obtenidas son 25% de sulfóxido de dimetilo, 10 min de incubación a 40°C. El marcaje de lípidos intracelulares de microalgas requirió incubar a 30°C y se observó que para diferentes concentraciones celulares se puede obtener valores de intensidad de fluorescencia iguales. La metodología estandarizada y optimizada nos permite medir la capacidad de acumular lípidos y producir biomasa en microalgas, a pesar que las longitudes de onda para análisis con Nile Red no fueron óptimas.

Palabras Clave: microalgas, lípidos, Nile Red, biodiesel.

ABSTRACT

In the last decade biodiesel production and its demand has expanded around the world. Biodiesel can be produced using lipids from microalgae, due to its high metabolic yield in a photosynthetic level. The objective of this research is to develop and standardize a methodology for high throughput analysis of microalgae with greater capacity for biomass production and lipid accumulation. Through evaluation of optical density measured at 750nm and compared to cell counts performed in a Neubauer chamber a linear tendency with a high degree of correlation was observed. Optimal conditions for staining palmitic acid with Nile Red were obtained at 25% dimethylsulfoxide and 10 min of incubation at 40 ° C. Staining intracellular lipid microalgae required incubation at 30 ° C and it was observed that at different cell concentration, equal values of fluorescence intensity were obtained. The standardized and streamlined methodology allows us to measure the ability to accumulate lipids and produce biomass in microalgae, although the wavelengths used for analysis with Nile Red were not optimal.

Keywords: microalgae, lipids , Nile Red , biodiesel.

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción.....	11
1.1 Cambio climático y consumo de combustibles fósiles.....	11
1.2 Técnicas en estudios de bioprospección.....	14
1.3 Objetivo general.....	17
1.4 Objetivos específicos.....	18
2. JUSTIFICACIÓN.....	19
3. AREA DE ESTUDIO.....	21
4. MATERIALES.....	22
4.1 Fase I. Desarrollo de un sistema de alto rendimiento para la determinación de concentración celular mediante espectrofotometría.....	22
4.2 Fase II - Desarrollo y optimización de una metodología de alto-rendimiento para evaluar la capacidad de acumulación de lípidos en microalgas.....	23
4.3 Fase III - Evaluación de la fiabilidad de metodología de alto-rendimiento optimizada para evaluar la capacidad de acumulación de lípidos en microalgas.....	23
5. METODOS.....	25
5.1 Fase I. Desarrollo de un sistema de alto rendimiento para la determinación de concentración celular mediante espectrofotometría.....	25
5.2 Fase II. Desarrollo y optimización de una metodología de alto-rendimiento para evaluar la capacidad de acumulación de lípidos en microalgas.....	26
5.2.1 Estandarización de marcaje de ácido palmítico.....	26

5.2.2 Estandarización de metodología para determinar concentración de lípidos por medición de fluorescencia mediante marcaje.....	27
5.3 Fase III. Evaluación de la fiabilidad de metodología de alto-rendimiento optimizada para evaluar la capacidad de acumulación de lípidos en microalgas.....	29
5.3.1 Cuantificación gravimétrica de lípidos totales de microalgas.....	29
6. Resultados.....	31
6.1 Fase I. Desarrollo de un sistema de alto rendimiento para la determinación de concentración celular mediante espectrofotometría.....	31
6.2 Fase II. Desarrollo y optimización de una metodología de alto-rendimiento para evaluar la capacidad de acumulación de lípidos en microalgas.....	31
6.3 Fase III. Evaluación de la fiabilidad de metodología de alto-rendimiento optimizada para evaluar la capacidad de acumulación de lípidos en microalgas.....	33
7. Discusión.....	35
7.1 Fase I. Desarrollo de un sistema de alto rendimiento para la determinación de concentración celular mediante espectrofotometría.....	36
7.2 Fase II: Desarrollo y estandarización de metodología de alto rendimiento para medir acumulación de lípidos en microalgas.....	37
7.3 Fase III: Validación de metodología de alto rendimiento para medir acumulación de lípidos.....	42
8. Conclusiones.....	44
9. Recomendaciones.....	45
10. Anexos.....	46
11. Referencias.....	51

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Promedios de R^2 y desviación estandar de los ensayos de marcaje realizados con diferentes concentraciones de DMSO, tiempo de incubación y temperatura de incubación en la estandarización de metodología para marcaje fluorescente de lípidos con Nile Red.....	46
Tabla 2. Promedios de R^2 y desviación estandar al variar la temperatura de incubación en el marcaje de lípidos intracelulares de microalgas con Nile Red.....	48
Tabla 3. Lipidos totales obtenidos por ensayos de extracción de lípidos y medición gravimétrica y su promedio.....	50

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Variación de la densidad óptica (aborsbancia) con respecto a la concentración celular de microalgas.....	46
Figura 2. Variación de la intensidad de la fluorescencia con respecto a la concentración de ácido palmítico para diferentes concentraciones de DMSO.....	47
Figura 3. Variación de la intensidad de la fluorescencia con respecto a la concentración de ácido palmítico para diferentes tiempos de incubación.....	47
Figura 4. Variación de la intensidad de la fluorescencia con respecto a la concentración de ácido palmítico para diferentes temperaturas de incubación.....	48
Figura 5. Variación de la intensidad de la fluorescencia con respecto a la concentración de celular de microalgas para diferentes temperaturas de incubación.....	49
Figura 6. Variación de la intensidad de la fluorescencia con respecto a la concentración de celular de microalgas incubadas a 30°C.....	49

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Producción de biodiesel a partir de microalgas

Los cambios climáticos que se han dado a nivel mundial son una clara evidencia de los efectos del calentamiento global, producidos en gran parte como consecuencia de las actividades antropogénicas. La gran cantidad de gases de efecto invernadero emitidos debido al consumo de combustibles fósiles han llevado a un replanteamiento de fuentes de energía alternativas que no afecten el medio ambiente y sean sostenibles a largo plazo. Actualmente la demanda energética mundial está cubierta por fuentes de energía convencionales tales como el carbón, petróleo y gas natural. Las reservas de los combustibles en base a petróleo son limitadas y se encuentran concentradas en ciertas zonas del planeta. Varios analistas estiman que si la tasa actual de consumo de petróleo se mantiene, las reservas de petróleo se verán agotadas en aproximadamente 50 años (Doan, et. Al., 2011). Esta proyección es poco realista ya que se han desarrollado nuevas tecnologías para acceder a recursos fósiles que antes se consideraban inaccesibles. Se estima un incremento en las reservas de petróleo de hasta 10.2 trillones de barriles de petróleo gracias a la recuperación mejorada de petróleo. En la recuperación mejorada de petróleo se utiliza polímeros y compuestos alcalinos que ayudan a la liberación petróleo fijado en formaciones rocosas, permitiendo su aprovechamiento (Jamali, 2013).

En la actualidad existen varias fuentes de energía renovable que están siendo estudiadas a nivel mundial. Los biocombustibles son atractivos porque son una fuente renovable de energía, constituyen una fuente de energía limpia y permiten una independencia energética. La independencia energética permite superar problemas de especulación de precios y conflictos geopolíticos por fuentes de energía (Abou Shanab, et. Al., 2011). Esto hace que las fuentes de energía renovable se vuelvan atractivas, ya que estas podrían permitir saciar la demanda

energética. Uno de los grandes retos que tienen que afrontar los biocombustibles es que deben ser técnicamente viables, económicamente competitivos, ambientalmente aceptables y de fácil acceso. El biodiesel es una de las fuentes de energía alternativas que puede usarse como fuente potencial de combustible renovable (Abou Shanab, et. Al., 2011).

El biodiesel de tercera generación se elabora a partir de lípidos provenientes de microalgas. Las microalgas son microorganismos fotosintéticos acuáticos que pueden transformar el dióxido de carbono en sustancias químicas que pueden ser procesadas en biocombustibles. Las algas pueden producir lípidos a partir de agua, dióxido de carbono y luz solar, los cuales son almacenados en forma de lípidos no polares como triacilglicéridos. Además las membranas celulares de las algas están compuestas por lípidos polares, fosfolípidos, glicolípidos y esteroides, los cuales a través de procesos de transesterificación pueden ser convertidos en biodiesel (Georgianna, et. Al. 2012). En relación a biocombustibles, la biomasa producida por las microalgas es considerada una de las fuentes de energía renovable más importante para el futuro de la humanidad. Aunque la producción de biodiesel a partir de algas afronta varios problemas técnicos que deben superarse, siguen siendo muy prometedoras por varias razones (Pereira, et. Al., 2011). Las algas poseen un mejor rendimiento fotosintético que las plantas, además que a diferencia de estas no necesitan de suelo cultivable para su crecimiento ni agua fresca, ya que existen diversas cepas de microalgas capaces de crecer en aguas residuales y agua salina (Georgianna, et. Al. 2012). Otra ventaja de las algas son sus ciclos cortos de vida, que permiten cosechar su biomasa de manera casi continua (Larkum, et. Al., 2012). El cultivo de algas no interfiere con la seguridad alimentaria y los combustibles derivados de estas producen menos emisiones y contaminantes que los combustibles fósiles derivados del petróleo (Mutanda, et. Al., 2011). El desarrollo de tecnología de producción de biodiesel a partir de microalgas tiene el potencial de mejorar el medio ambiente de una manera

Las microalgas son organismos unicelulares eucariotas fotosintéticos capaces de transformar la energía luminosa en energía química con una eficiencia cuatro veces superior a la de las plantas. Su importancia radica en su papel como productores primarios de la cadena trófica, que las constituyen en las primeras formadoras de materia orgánica. Por su tamaño reducido y variado (5–50 μm en promedio) son de fácil captura y digestión por multitud de organismos que se alimentan en forma directa del fitoplancton (Abalde, 2004).

Las condiciones óptimas de temperatura, intensidad luminosa, salinidad, nutrientes y pH para el cultivo de microalgas, varían ampliamente de una especie a otra, estos parámetros fisicoquímicos, han sido determinados en laboratorio y ayudan a comprender las condiciones óptimas para el desarrollo de las diferentes especies en cultivo. Actualmente a nivel comercial, los cultivos masivos de microalgasal exterior y los fotobiorreactores cobran mayor importancia para la producción de compuestos químicos de alta pureza, como: biocombustibles, biofertilizantes, intercambiadores iónicos y carotenos; así mismo, para el tratamiento de aguas residuales, obtención de compuestos terapéuticos y como alimento de consumo humano y animal (Contreras-Flores, et. Al., 2003).

Para el 2050 se estima que la población mundial pasará de 7 a 9 billones de personas, por lo que el consumo de alimentos, combustible y agua fresca aumentarán significativamente (Larkum, et. Al., 2012). Esta perspectiva sobre el futuro de la humanidad lleva a plantear un desarrollo económicamente viable de biocombustibles a partir de microalgas. La primera generación de microalgas ha sido utilizada para la producción de beta-caroteno y espirulina, así como otros suplementos médicos o alimenticios. A partir de esto se ha considerado una coproducción de estas sustancias junto a las necesarias para producir biodiesel y hacer más

rentable la elaboración de este último. Para lograr este objetivo aún hay mucho por hacer a nivel de ingeniería, biotecnología y modelos económicos (Larkum, et. Al., 2012).

1.2 Técnicas en estudios de bioprospección

Uno de los principales problemas de la producción de biodiesel se centra en obtener microalgas con un alto rendimiento en producción de ácidos grasos y que además crezcan de manera óptima. Las especies de algas con las que se ha trabajado en este ámbito son pocas. Se estima que existen alrededor de 350.000 especies de algas a nivel mundial, de las cuales solo se han usado 20 especies para estudios vinculados a combustibles renovables (Larkum, et. Al., 2012). Por lo tanto, la probabilidad de encontrar algas con un alto rendimiento tanto en producción de lípidos como en su crecimiento es relativamente alta. La bioprospección está definida según el Reglamento al Régimen Común Sobre Acceso a Recursos Genéticos como *“la búsqueda sistemática, clasificación e investigación para fines comerciales de nuevas fuentes de compuestos químicos, genes, proteínas, microorganismos y otros productos con valor económico actual o potencial, que se encuentran en la biodiversidad”* (2011). Este es un proceso que juega un papel fundamental para el uso y protección racional de la biodiversidad, en donde se busca identificar especies, variedades, genes, para la obtención de productos químicos, genéticos con usos actuales o potenciales para la humanidad (Melgarejo, 2003). Para la biotecnología la bioprospección representa un mar de probabilidades, donde en la naturaleza existen gran diversidad de seres vivos con propiedades diferentes que gracias a la bioprospección podrían ser utilizadas por la biotecnología para diseñar nuevos productos o procesos que beneficien directamente a la humanidad.

Otros autores son un poco más optimistas sobre la megadiversidad en especies de algas, donde llegan a estimar entre 1 y 10 millones de especies de algas, por lo que estudios de

bioprospección en esta área son recomendables. Para estos estudios un factor muy importante es el muestreo de las microalgas, la recolección de estas está influenciada directamente por factores ambientales, tanto bióticos como abióticos (Mutanda, et. Al., 2011). Las microalgas pueden ser encontradas en lagos, aguas saladas, agua fresca, estanques de maduración de agua residual, presas, ríos y agua marina. Los ecosistemas naturales tienen un valor muy alto como fuente de microalgas con una hiper producción de lípidos. En estudios realizados se ha encontrado gran variedad de algas con diferentes capacidades de producción de lípidos, las cuales pueden variar su producción según los cambios climáticos de la zona, por lo que se recomienda hacer estudios en diferentes épocas del año, como temporada lluviosa y seca, para tener un espectro más amplio de la capacidad óptima de producción de las algas. Se ha encontrado una especie que es capaz de producir lípidos hasta en un 75% de su peso seco, esta especie se llama *Botryococcusbraunii* (Mutanda, et. Al., 2011).

En el proceso de búsqueda de microalgas con una elevada producción de lípidos debe tomarse en cuenta algunos factores. Entre estos tenemos el muestreo que puede darse en una gran variedad de ecosistemas, el cultivo, el análisis de producción de lípidos y una caracterización molecular de las especies encontradas. Los medios de cultivos se encuentran estandarizados para las pocas especies de algas que han sido estudiadas por lo que el desarrollo de nuevos medios debe analizarse, para poder cultivar nuevas especies bajo condiciones controladas (Abou-Shanab, et. Al., 2011). La cantidad de lípidos producidos se determina mediante un proceso de extracción a partir de algas por medios químicos utilizando cloroformo, metanol, y cloruro de sodio al 5%. Este método requiere de la ruptura de la célula previa la extracción de los lípidos (Abou-Shanab, et. Al., 2011). Los lípidos extraídos suelen ser caracterizados por cromatografía de gases con

llama ionizante. Para luego realizar ensayos de producción de biodiesel y estimar el rendimiento en la producción a partir de los lípidos obtenidos.

Otra técnica utilizada para determinar la producción de lípidos en algas y el aislamiento de especies en consorcios de microalgas, es la citometría de flujo donde se aplica diferentes reactivos fluorescentes y a través de la medición y comparación de la fluorescencia emitida por la reacción de los reactivos con los pigmentos que las células poseen, se logra separar y estimar la producción de lípidos de cada especie analizada (Doan, et. Al., 2011). Uno de los reactivos utilizados es el Nile Red o 9-diethylamino-5-benzo[α]phenoxazinone, que tiene la capacidad de infiltrarse en la célula sin dañarla, emite una fluorescencia amarillenta cuando se la disuelve en lípido puro. La longitud de onda que se emite y a la que se mide son 480 y 575 nm, respectivamente (Doan, et. Al., 2011). Otro reactivo utilizado es el 4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene o BODIPY; este ha sido usado con diferentes longitudes de onda según el estudio y ha demostrado dar excelentes resultados al aplicar citometría de flujo. Una de las ventajas más importantes que ofrece esta técnica es la reducción de los tiempos de análisis, llegando a ser una técnica de alto rendimiento para analizar gran cantidad de colonias en un lapso de tiempo corto en relación a las técnicas tradicionales como la Bligh and Dyer, la única desventaja de utilizar esta técnica es el uso de equipos costosos (Pereira, et. Al., 2011).

Dentro de los estudios de bioprospección luego de encontrar alguna especie que tenga una alta producción de lípidos y sea un buen candidato para producción de biodiesel, es muy importante determinar cuál es la especie de alga con la que se está trabajando, para hacer futuros análisis y promover estudios en dicha especie. Para esto se realiza primero una identificación por caracteres morfológicos, tales como las dimensiones de las células, forma y cantidad de

cloroplastos, rasgos reproductivos, presencia de almidón, vacuolas y flagelo. Luego esta información se compara con análisis existentes, para determinar que especie podría ser. Posteriormente, se realizan análisis moleculares donde primero se requiere de la extracción de ADN, la cual puede realizarse por medio de diferentes protocolos, uno de estos es a través del QiagenDNeasy Plant Mini Kit (Zhou, et. Al., 2011). El ADN extraído es amplificado con primers específicos para subunidad larga del ribosoma o 18S rDNA. Luego de amplificar el material genético es secuenciado y la información obtenida se compara con la existente en el GenBank y se determina que especie es y de ser nueva será analizada a profundidad y registrada (Zhou, et. Al., 2011).

Otra forma de lograr obtener una cepa de microalgas óptima para la producción de biodiesel, se da gracias a la ingeniería genética, donde la ingeniería del metabolismo de algas tiene un rol importante en el mejoramiento del crecimiento y acumulación de biomasa. Con el uso de nuevas técnicas de secuenciamiento, el entendimiento sobre el genoma de las algas ha avanzado rápidamente, especialmente con genes involucrados en la respuesta metabólica. Análisis en abstención de nitrógeno en algas, llevan a una mayor acumulación de triglicéridos, lo que ha permitido encontrar varios genes vinculados a la repuesta metabólica y 86 factores transcripcionales vinculados a esta (Georgianna, et. Al., 2012).

1.3 Objetivo general

El objetivo principal de este proyecto es desarrollar y estandarizar una metodología de alto rendimiento para el análisis de microalgas con mayor capacidad de producción de biomasa y acumulación de lípidos. La metodología propuesta podrá ser utilizada en estudios de bioprospección de microalgas adecuadas para la producción de biocombustibles.

1.4 Objetivos específicos

1. Desarrollar una metodología de alto rendimiento para evaluar la capacidad de producción de biomasa de microalgas basada en análisis de densidad óptica.
2. Desarrollar una metodología de alto rendimiento para analizar el potencial de producción de lípidos en microalgas mediante un sistema de marcaje de lípidos con agentes fluorescentes y cuantificación espectrofotométrica.
3. Estandarizar y validar un flujo de trabajo eficiente, que combine las metodologías descritas anteriormente, para la biosprospección de microalgas con mayor potencial para la producción de biocombustibles.

2 JUSTIFICACION

El consumo de combustibles fósiles es una de las principales fuentes de contaminación atmosférica del planeta. Las emisiones de dióxido y monóxido de carbono están aumentando continuamente dando como resultado el calentamiento global del cual se siente ya serios cambios climáticos en todo el planeta. Estos cambios climáticos alteran el equilibrio de todos los ecosistemas existentes. Para contrarrestar la contaminación se considera la producción y comercialización de biocombustibles, siendo estos una fuente de energía alternativa renovable. El biodiesel a partir de lípidos de microalgas es una fuente de energía alternativa con un gran potencial ya que este puede servir de combustible a vehículos que utilizan diésel de petróleo sin necesitar de adecuaciones.

Uno de los retos más grandes en la producción de biodiesel es encontrar una especie de microalga que tenga un alto rendimiento en acumulación de lípidos y producción de biomasa. La acumulación de lípidos en microalgas se da principalmente bajo condiciones de estrés y las condiciones de estrés son contraproducentes a la producción de biomasa. El Ecuador es un país megadiverso, donde la probabilidad de encontrar una especie de microalga que satisfaga los requisitos buscados es relativamente alta. Por lo tanto, se considera oportuno desarrollar una metodología que permita evaluar de manera rápida y sistemática diferentes especies de microalgas para en el futuro realizar estudios de bioprospección en los diferentes ecosistemas.

Algunas de las técnicas empleadas para estudios de bioprospección requieren de equipos costosos como citómetros de flujo o requieren de mucho tiempo como la técnica de Bligh and Dyer. En el Ecuador se necesita desarrollar herramientas que permitan y faciliten hacer estudios de bioprospección. Debido a esto se propone desarrollar y estandarizar una metodología de alto rendimiento para el análisis de microalgas con mayor capacidad de producción de biomasa y

acumulación de lípidos, que puede servir para encontrar una especie de microalga que permita producir biosiesel a gran escala siendo económicamente rentable.

3 AREA DE ESTUDIO

Este proyecto de investigación fue desarrollado en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental y en el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad San Francisco de Quito. En el Laboratorio de Ingeniería Ambiental (LIA – USFQ) se realizó los conteos microscópicos en cámara de Neubauer, las mediciones de espectrofotometría, la preparación de soluciones para marcaje de ácido palmítico y microalgas. En el Laboratorio de Fitopatología se realizó el marcaje de ácido palmítico y de microalgas, además de medición de fluorescencia con el lector de microplatos.

4 MATERIALES

4.1 Fase I. Desarrollo de un sistema de alto rendimiento para la determinación de concentración celular mediante espectrofotometría

- Material biológico: Una cepa de *Chlorella sp.* se obtuvo a partir de una muestra del fotobiorreactor (PBR) que se encuentra en LIA-USFQ. Las microalgas se cultivaron en un fotobiorreactor (PBR) tubular de 10L con aireación constante de 3Lmin^{-1} . El fotobiorreactor se alimentó de luz en fotoperiodos de 12h con lámparas fluorescentes OSRAM de 20W. El medio de cultivo estaba compuesto por NaNO_3 (0.25 g L^{-1}), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{ H}_2\text{O}$ (0.025 g L^{-1}), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{ H}_2\text{O}$ (0.075 g L^{-1}), K_2HPO_4 (0.075 g L^{-1}), KH_2PO_4 (0.175 g L^{-1}), NaCl (0.025 g L^{-1}), Proteose Peptone (1 g L^{-1}) and NaHCO_3 (0.1 g L^{-1}).
- Agua destilada
- Lugol
- Cubetas de cuarzo
- Vasos de precipitación de 50 y 100mL
- Tubos eppendorf de 1.5mL
- Cámara de Neubauer
- Pipeta de vidrio de 10 y 20mL
- Propipeta
- Cámara de Neubauer
- Micropipetas de 100 y 1000 μL (Labnet, Biopette)
- Espectrofotómetro (Thermo Scientific, Spectronic)
- Microscopio óptico (Leica)

4.2 Fase II - Desarrollo y optimización de una metodología de alto-rendimiento para evaluar la capacidad de acumulación de lípidos en microalgas

- Material biológico
- Sulfoxido de dimetilo
- Ácido palmítico
- Agua destilada
- Nile Red
- Microplatos de 96 posillos
- Balones de 100mL
- Tubos falcon de 15mL
- Pipeta de vidrio de 10 y 20mL
- Propipeta
- Micropipetas de 10, 100 y 1000 μ L (Labnet, Biopette)
- Centrifugadora (MRC)
- Lector de microplatos (SEAC, Sirio Sreader)

4.3 Fase III - Evaluación de la fiabilidad de metodología de alto-rendimiento optimizada para evaluar la capacidad de acumulación de lípidos en microalgas

- Material biológico
- Cloroformo
- Metanol
- Cloruro de Sodio
- Tubos falcon de 15mL

- Pipeta de vidrio de 10 y 20mL
- Propipeta
- Balones de 100mL
- Horno
- Centrifuga (MRC)
- Balanza (Mettler Toledo)

5 METODOS

Como se estableció inicialmente el objetivo principal de esta investigación fue el de diseñar, desarrollar y optimizar una metodología de alto rendimiento para la rápida prospección de microalgas con mayor capacidad de producción de biomasa y acumulación de lípidos. El proyecto fue dividido en 3 fases experimentales, estas se describen en detalle a continuación.

5.1 Fase I. Desarrollo de un sistema de alto rendimiento para la determinación de concentración celular mediante espectrofotometría

La primera fase de este proyecto conllevó el desarrollo de una metodología rápida para analizar la capacidad productiva de biomasa en microalgas. La metodología propuesta se basó en el desarrollo de una curva de calibración que describe la relación entre la concentración celular de una muestra algal y su densidad óptica. Esta relación matemática permitiría evaluar la tasa de crecimiento de un cultivo de microalgas mediante mediciones rápidas por espectrofotometría.

A partir de una muestra homogeneizada de *Chlorella sp.*, se preparó (por duplicado) diluciones de 20 mL de solución de microalgas bajo los siguientes factores de dilución: 0.1, 0.25, 0.5 y 0.75. La concentración celular de cada dilución seriada se determinó por conteo celular usando una cámara de Neubaer. Para realizar el conteo celular, se diluyó 40 μL de muestra de microalgas en 160 μL de solución de Lugol (concentración) con la finalidad de inmovilizar las células en la cámara de Neubaer. Se depositó 10 μL de la mezcla de microalgas con Lugol en cada extremo de la cámara de Neubaer y se realizó el conteo celular usando un microscopio compuesto (Leica CME) con un aumento de 40X. La densidad celular se calculó utilizando la Ecuación 1:

$$\text{Concentración (células/mL)} = \frac{\text{Total Células Contadas} \times 10.000}{\text{Número de Cuadrados}} \quad 26$$

(Celeromics, 2015)

Paralelamente, la densidad óptica de cada dilución seriada fue evaluada mediante espectrofotometría. Se colocó 7 mL de cada dilución en cubetas de cuarzo de 10 mL, y se midió su absorbancia a 750nm usando un espectrofotómetro (Thermo Scientific, Spectronic). La longitud de onda analizada corresponde a la longitud de onda de la Clorofila A, abundante en microalgas del género *Chlorella* (Abou-Shanab, et. Al., 2011).

La toma de muestra, producción de diluciones, conteo celular y medición de absorbancia se repitió en cinco ocasiones distintas. Los datos obtenidos se utilizaron para establecer una curva de calibración que describe la relación matemática entre densidad óptica y concentración celular.

5.2 Fase II. Desarrollo y optimización de una metodología de alto-rendimiento para evaluar la capacidad de acumulación de lípidos en microalgas

El objetivo de esta fase experimental fue desarrollar y estandarizar una metodología de alto-rendimiento para la rápida evaluación de la concentración de lípidos intracelulares en microalgas. Esta metodología se basó en el marcaje *in-vivo* de lípidos intracelulares con agentes fluorescentes tales como Nile Red y su cuantificación indirecta a través de la medición de la fluorescencia emitida.

5.2.1 Estandarización de marcaje de ácido palmítico

El marcaje *in-vivo* de lípidos *intracelulares* con agentes fluorescentes permite la determinación de su concentración de forma indirecta, siempre y cuando se establezca *a priori* la relación cuantitativa entre concentración de ácidos grasos con marcaje fluorescente y emisión de fluorescencia. En la mayoría de especies de microalgas estudiadas para la producción de biodiesel, el ácido graso de mayor concentración es el ácido palmítico. Por consiguiente, este

último fue empleado para determinar la relación entre la concentración de lípidos en las microalgas y la fluorescencia emitida.

El protocolo consiste en preparar soluciones de ácido palmítico en concentraciones de 0.1, 0.3, 0.5, 1 y 3 $\mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$. Estas soluciones fueron preparadas en una mezcla base del agente fluorescente “Nile Red” (usado para el marcaje de lípidos) y el solvente orgánico Sulfóxido de Dimetilo (DMSO). Tras un período de incubación determinado, 6 réplicas de 300 μL de cada solución de ácido palmítico fueron depositadas en un microplato translucido de 96 pocillos. Adicionalmente, en el microplato, 6 pocillos se llenaron con 300 μL de agua destilada (*control negativo*) y 6 pocillos se llenaron con la solución base de Nile Red/DMSO (*blanco*). Subsecuentemente, la emisión de fluorescencia de las muestras depositadas fue evaluada usando un lector de microplatos programado a una longitud de onda de excitación de 492 nm y una longitud de onda de medición de 520 nm.

El proceso de marcaje de ácido palmítico con Nile Red fue optimizado mediante una serie de ensayos donde se evaluó 3 distintas variables: tiempo de incubación de marcaje de lípidos con Nile Red, temperatura de incubación de proceso de marcaje y concentración de DMSO. Los tiempos de incubación, temperaturas de incubación y concentraciones de DMSO analizadas fueron 10, 30 y 60 min; 30, 40 y 50°C; y 15, 20 y 25%, respectivamente. En todos los ensayos, la concentración de Nile Red en la solución base fue 1 $\mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

5.2.2 Estandarización de metodología para determinar concentración de lípidos por medición de fluorescencia mediante marcaje

En esta fase experimental se estandarizó una metodología para medir *in-vivo* la concentración de lípidos de manera indirecta, al marcar los lípidos *intracelulares* con un agente fluorescente

(Nile Red). Al medir la fluorescencia emitida por el agente que reacciona con los lípidos, se utilizó la relación entre concentración de ácido palmítico y la fluorescencia emitida para determinar la concentración de lípidos intracelulares. En el marcaje de lípidos de microalgas se aplicaron inicialmente las condiciones óptimas determinadas en para el marcaje de ácido palmítico. Estas condiciones fueron DMSO al 25%, 10 min a 40°C de incubación.

Para evaluar la sensibilidad de la metodología planteada se evaluó varias concentraciones celulares, 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 y 10^7 células de microalgas mL^{-1} . Una muestra de solución de algas con medio de cultivo fue centrifugada a 6000 rpm por 10min en tubos falcon de 15 mL y se vertió el sobrenadante, a continuación se depositó el DMSO puro en los tubos y se aforó con agua destilada para obtener una solución de microalgas en 25% de DMSO. La absorbancia fue medida y se realizó un conteo celular en cámara de Neubauer. Una vez que se determinó la densidad óptica y la concentración celular se procedió a realizar diluciones seriales.

Los ensayos de marcaje de lípidos en microalgas se realizaron aplicando sulfoxido de dimetilo al 25%. El DMSO es responsable de transportar el agente fluorescente (Nile red) al interior de las células sin dañarlas. La concentración de Nile red aplicada en el proceso de marcaje fue de $1\mu\text{g}\text{mL}^{-1}$ y el tiempo de incubación fue de 10 min (Chen, et. Al., 2011) (Rumin, et. Al., 2015) (Held & Raymond, 2011).

Las diluciones fueron marcadas con Nile red e incubadas por 10 min y se realizó varios ensayos con diferentes temperaturas de incubación. Se evaluó 2 temperaturas de incubación más, 30 y 50°C, realizando análisis por triplicado para cada temperatura. Posterior a la incubación se colocó las diluciones en un microplato con 2 réplicas biológicas y 3 réplicas técnicas, usando

como blanco solución de DMSO con Nile red, agua como control negativo y estándares de ácido palmítico en las concentraciones evaluadas previamente. En todos los ensayos se aplicó estándares de ácido palmítico en las mismas concentraciones que se utilizaron en el marcaje de este con Nile Red. Los microplatos fueron introducidos en el lector de microplatos (SEAC, Sirio Sreader), el cual se programó a 492 nm de excitación y 520 nm para medición.

Los resultados obtenidos de estos ensayos se diagramaron para determinar el grado de correlación y la desviación estándar. A partir de los análisis con ácido palmítico se generó una curva de calibración donde se puede determinar matemáticamente la concentración de lípidos de las algas.

5.3 Fase III. Evaluación de la fiabilidad de metodología de alto-rendimiento optimizada para evaluar la capacidad de acumulación de lípidos en microalgas

En esta fase se comparó la precisión en la medición de lípidos *intracelulares* entre la metodología de alto-rendimiento optimizada en esta investigación y el protocolo gravimétrico clásico para la determinación de lípidos en microalgas.

5.3.1 Cuantificación gravimétrica de lípidos totales de microalgas

Dos contramuestras independientes de microalgas de 15 mL fueron tomadas del fotobiorreactor (PBR) del Laboratorio de Ingeniería Ambiental de la Universidad San Francisco de Quito. Estas muestras fueron centrifugadas por 10 min a 3000 rpm, obteniendo así precipitados compactos. Subsecuentemente, los precipitados formados fueron disueltos en una solución de cloroformo/metanol (2:1 v/v) y se incubaron por 10 min bajo agitación constante. Posteriormente, esta mezcla se centrifugó a 3000 rpm por 10 min y se recolectó el sobrenadante el cual contiene los lípidos diluidos. El sobrenadante con los lípidos se mezcló con la solución

cloroformo/methanol y fue centrifugado nuevamente. Después de centrifugar se recolectó nuevamente el sobrenadante y se añadió una solución de cloruro de sodio al 0.9 % en una relación de 1:5 v/v. Este extracto se agitó vigorosamente por 1 min y se dejó reposar durante 15 min para que se dé una separación de fases que consistió en tomar el sobrenadante, correspondiente a la fase superior utilizando una micropipeta, ya que en esta fase se encontraban focalizados los lípidos. La fase de cloroformo fue recolectada y secada en un horno a 80°C. Posteriormente se cuantificó la presencia de lípidos por diferencial gravimétrico (Doan, et. Al., 2011).

A través de la relación entre concentración de microalgas y fluorescencia y la correlación entre ácido palmítico y fluorescencia, se determinó la concentración de lípidos intracelular en microalgas. La concentración de lípidos calculada se comparó con la concentración de lípidos totales de las microalgas y se determinó el nivel de precisión de la metodología de evaluación de lípidos previamente diseñada.

6 RESULTADOS

6.1 Fase I. Desarrollo de un sistema de alto rendimiento para la determinación de concentración celular mediante espectrofotometría

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que existe una relación lineal y proporcional entre la concentración celular de microalgas y su densidad óptica medida a una longitud de onda de 750 nm (Figura 1). El grado de correlación ($R^2 = 0,94$) entre las dos variables analizadas fue fuerte y altamente reproducible ($CV = 0.6\%$). Esta relación se puede describir a través de la siguiente ecuación:

$$\text{Ecuación 1: } CC = 2 \times 10^7 A - 2.5 \times 10^5$$

donde CC corresponde a la concentración celular de una muestra de microalgas y A representa la absorbancia medida a 750 nm para esa misma muestra. Mediante la relación establecida se pueden realizar mediciones rápidas de la concentración celular de una muestra de microalgas en base a su absorbancia.

6.2 Fase II. Desarrollo y optimización de una metodología de alto-rendimiento para evaluar la capacidad de acumulación de lípidos en microalgas

La Tabla 1 presenta los promedios de R^2 y desviación estandar de los ensayos de marcaje realizados con diferentes concentraciones de DMSO, tiempo de incubación y temperatura de incubación en la estandarización de metodología para marcaje fluorescente de lípidos con Nile Red. Los resultados demuestran que la mejor relación concentración-ácido-palmitico/fluorescencia ($R^2 = 0.98$; $CV = 0.6\%$) se obtiene al realizar el marcaje de lípidos usando una solución de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ Nile Red diluido en DMSO al 25%, y con un tiempo de

incubación de 10 min a 40°C. Cabe destacar, no obstante, que existió un amplio grado de variabilidad en el nivel global de fluorescencia emitida entre réplicas para cada ensayo. En otras palabras, aunque existe consistentemente un alto grado de correlación entre concentración-ácido-palmitico/fluorescencia bajo condiciones ideales, existe variabilidad en el nivel de fluorescencia emitida cada vez que se repite el procedimiento (Figura 2). Adicionalmente, se observó que la sensibilidad de la metodología en un rango de concentración de ácido palmitico sobre los $3\mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$ es baja y su reproducibilidad también es baja (Figuras 2, 3 y 4).

Las condiciones óptimas para el marcaje y cuantificación de ácido palmitico con el agente fluorescente Nile Red fueron empleadas en la cuantificación *in-vivo* de lípidos intracelulares de microalgas. La Figura 5 demuestra que a una temperatura de incubación de 40°C durante el proceso de marcaje, la relación concentración-celular/fluorescencia ($R^2=0.029$) fue negativa disminuyendo de manera no-lineal a medida que aumenta la concentración celular y encontrándose valores negativos para la intensidad de la fluorescencia. Al aumentar la concentración celular, debería incrementar la intensidad de la fluorescencia porque la cantidad de lípidos intracelulares marcados es mayor. Este hallazgo llevo a que se probaran diferentes temperaturas de incubación. A una temperatura de incubación de 50°C se pudo observar una tendencia positiva, aunque con un débil grado de correlación ($R^2=0.46$) y linealidad. Alternativamente, al usar una temperatura de incubación de 30°C se encontró una relación positiva y relativamente proporcional entre concentración-celular de microalgas marcadas con Nile Red y fluorescencia ($R^2=0.83$).

En los ensayos de marcaje de lípidos intracelular en microalgas, realizados a diferentes temperaturas de incubación se obtuvo resultados que se diagramaron por separado según su temperatura y se calculó promedios de grado correlación con su respectiva desviación estándar

como se observa en la Tabla 2. En la figura 5 se observa que la temperatura óptima de incubación en la tinción de microalgas es de 30°C con una relación definida por la ecuación $IF = 0,0014CC - 0.0047$, donde IF corresponde a intensidad de fluorescencia y CC a concentración celular de microalgas.

Al determinar las condiciones óptimas de marcaje de microalgas se realizó ensayos con tres replicas. En la Figura 6 se observa la relación entre concentración celular e intensidad de fluorescencia para uno de los ensayos de marcaje de lípidos intracelular en microalgas en condiciones óptimas de marcaje. Para este ensayo se encontró que a una concentración celular de 10^5 y 10^6 células, la intensidad de fluorescencia es la misma, esto puede indicar que la sensibilidad de la metodología en este rango de concentración es baja. Otra razón para explicar este hallazgo es que el marcaje de los lípidos intracelulares no se haya efectuado a un 100%.

6.3 Fase III. Evaluación de la fiabilidad de metodología de alto-rendimiento optimizada para evaluar la capacidad de acumulación de lípidos en microalgas

La concentración de lípidos intracelulares se calculó utilizando la relación 10^6 células mL^{-1} = 0.7g biomasa mL^{-1} (Hinojosa, 2015) y las siguientes 4 ecuaciones.

Ecuación 2. Relación entre concentración celular e intensidad de fluorescencia.

$$IF = 0.0014CC - 0.0047$$

Ecuación 3. Relación entre concentración de ácido palmítico y fluorescencia a una temperatura de incubación de 30°C

$$IF = 0.0007AC + 0.0013$$

Ecuación 4. Relación entre concentración de ácido palmítico y fluorescencia a una temperatura de incubación de 40°C

$$IF = 0.0082AC - 0.0006$$

Ecuación 5. Porcentaje de lípidos en relación a la biomasa

$$\% \text{ Lípidos} = \frac{CA}{Biomasa} \times 100$$

Para estas ecuaciones IF corresponde a intensidad de fluorescencia, CC a concentración celular y CA a concentración de ácido palmítico.

En la medición gravimétrica de lípidos totales se determinó que la concentración de lípidos promedio fue de 25.4% (SD = 2,72) y al calcular la concentración de lípidos en las algas por medio de la curva de ácido palmítico a 30°C y la curva de marcaje de algas a 40°C se obtuvo que la concentración de algas fue de 136.7 y 14.26% respectivamente. Al comparar los valores obtenidos por gravimetría y por marcaje de fluorescencia se encuentra un porcentaje de error de 43.8% usando la curva obtenida en 40°C.

7 Discusión

La producción de biodiesel a partir de lípidos derivados de microalgas se ha convertido en una de las principales áreas de estudio para la investigación biotecnológica a nivel mundial. Esto se debe a que el biodiesel derivado de microalgas tiene el potencial de proveer energía renovable sin afectar la producción de comida o cultivos vinculados a esta, además que puede utilizarse en vehículos que funcionan con diésel de petróleo sin necesidad de hacer adecuaciones en los motores (Doan, et. Al., 2011). Uno de los principales problemas que afronta el desarrollo de tecnología para la elaboración de biodiesel a partir de microalgas, es el aislamiento rápido de cepas de microalgas que tengan un alto contenido intrínseco de lípidos y un elevado rendimiento de biomasa (Doan, et. Al., 2011). En la actualidad se ha encontrado especies de microalgas como *Nannochloropsis sp.*, la cual tiene un contenido de lípidos igual al 39.5% de su peso seco y un rendimiento de biomasa de 0.29g L^{-1} , donde su tasa de crecimiento es de 0.42 d^{-1} , esta especie tiene un alto nivel de concentración de lípidos y una capacidad de acumular biomasa relativamente baja. Otra especie estudiada es *Achnanthes sp.*, que también posee una alta capacidad para acumular lípidos pero posee una tasa de producción de biomasa baja (Doan, et. Al., 2011). Encontrar una o varias especies que tengan una elevada capacidad de acumulación de lípidos y un alto rendimiento de biomasa permitiría mejorar de manera significativa los procesos de producción de biodiesel derivado de microalgas. La cantidad de microalgas estudiadas para elaboración de biodiesel es muy pequeña en relación a la diversidad de especies existentes. Por lo tanto el empleo de metodologías estandarizadas que permitan realizar estudios de prospección de microalgas es posible encontrar una especie de microalga que cumpla con las condiciones deseadas (Rumin, et. Al., 2015).

Para la realización de prospección de microalgas, se estandarizó una metodología donde se puede medir la concentración celular de un cultivo de microalgas por espectrofotometría y la concentración de lípidos intracelulares por marcaje de fluorescencia con Nile Red. El potencial de esta metodología se basa en el siguiente flujo de trabajo. En prospección se tomaron muestras de agua con microalgas. Estas muestras se cultivaron bajo condiciones estándar, donde se aisló unidades formadoras de colonia para obtener cepas puras. El crecimiento de estas cepas se promovió por condiciones estándar y se evaluó la tasa de crecimiento de cada cepa por espectrofotometría para un tiempo determinado, seccionado en ciclos donde se realizaron mediciones periódicas. De esta manera se determinó la capacidad de producir biomasa entre las cepas aisladas. Para medir lípidos se tomó una cantidad de microalgas y se determinó su concentración por medición de densidad óptica. Se realizaron diluciones para obtener una concentración celular igual entre las cepas a ser evaluadas y se procedió con el marcaje fluorescente para medir indirectamente la concentración de lípidos y determinar si alguna de las cepas evaluadas es de nuestro interés.

7.1 Fase I. Desarrollo de un sistema de alto rendimiento para la determinación de concentración celular mediante espectrofotometría

Existe una amplia variedad de estudios donde se relaciona la densidad óptica – medida como absorbancia a través de espectrofotometría- con la concentración celular en cultivos de microalgas. En estos estudios, las longitudes de onda más utilizadas son 680 y 750nm, que corresponden a la longitud de onda de la Clorofila B y A presente en microalgas fotosintéticas, respectivamente (Abou-Shanab, et. Al., 2011). Teóricamente, debido a que existe una relación directamente proporcional entre la cantidad de clorofila y su absorbancia a longitudes de onda específicas, se espera que la concentración de clorofila en una muestra de

algas sea proporcional a la concentración celular de este mismo cultivo (Abou-Shanab, et. Al., 2011). Los resultados de este estudio han demostrado la presencia de una fuerte relación lineal entre la densidad óptica de un cultivo de algas y su concentración celular ($R^2 = 0.94$). El nivel de correlación para la linealidad determinada es relativamente alto, pero no es óptimo desde una perspectiva estadística. Para que esta linealidad tenga una relevancia estadística significativa, su valor de correlación debe ser mayor igual a 0.95, por lo que debe considerarse aumentar el número de réplicas en este ensayo, para alcanzar el nivel de significancia deseado.

Se ha encontrado que la variación de Clorofila entre especies de microalgas es relativamente pequeña cuando se las cultiva de manera simultánea bajo condiciones idénticas (Ramos, et. Al., 2002). Por lo tanto sería posible aplicar la metodología diseñada, evaluando las especies de microalgas estudiadas en la producción de biodiesel derivado de microalgas. A partir de la evaluación de las especies es posible generar una curva estándar donde se aplique la relación *absorbancia/concentración celular* a especies de microalgas desconocidas.

7.2 Fase II: Desarrollo y estandarización de metodología de alto rendimiento para medir acumulación de lípidos en microalgas

En primera instancia se buscó determinar si era posible marcar con fluorescencia ácidos grasos (unidades básicas de los lípidos), para lo cual se evaluó diferentes condiciones de marcaje y se determinó cuáles eran más apropiadas para el marcaje. Al evaluar diferentes concentraciones de DMSO, tiempos y temperaturas de incubación se encontró que las condiciones óptimas de marcaje para ácido palmítico con Nile Red son 25% DMSO, 10 minutos de incubación a 40°C. En los ensayos de marcaje con Nile Red se excitó el agente

fluorescente a 492nm y se midió a 520nm. En la gamma de ensayos realizados se encontró que para la concentración más alta de ácido palmítico evaluada, la variación en la intensidad de la fluorescencia medida era mucho mayor a la esperada, lo que se repitió de manera constante durante los ensayos de marcaje de ácido palmítico. Esta variación puede deberse a la sensibilidad de la técnica aplicada, donde a concentraciones iguales o mayores a 3 μg de ácido palmítico por μL de solución de DMSO el reactivo fluorescente emite picos de fluorescencia más pronunciados, lo que puede atribuirse a las longitudes de onda utilizadas, donde el error de cuantificación es mayor. El error de cuantificación es mayor ya que el rango de fluorescencia de Nile Red es muy bajo a las longitudes de onda empleados, siendo más sensible a variaciones (Kimura, et. Al., 2004). Se recomienda revisar la metodología utilizada con las longitudes de onda óptimas estudiadas para Nile Red. Nile Red tiene un rango óptimo de fluorescencia el cual es de 530 a 570 nm para su excitación y 630 a 670 nm para medición, este rango puede variar según el solvente orgánico que se utilice. El rango presentado corresponde a la aplicación de DMSO como solvente (Kimura, et. Al., 2004).

Para los ensayos donde se evaluó las condiciones de marcaje de ácido palmítico, se observó que al disminuir la concentración de DMSO, la correlación lineal entre intensidad de fluorescencia y la concentración de ácido palmítico, decrecía de manera drástica. Esto también se observó al aumentar el tiempo de incubación. Para la temperatura de incubación se encontró 40°C, como la más apropiada, donde al disminuir o aumentar la concentración, el grado de correlación disminuía significativamente. Los resultados obtenidos para las condiciones óptimas de marcaje de ácido palmítico, concuerdan con las de otros estudios realizados, donde se probaron una gama de concentraciones de DMSO, tiempos y temperaturas de incubación, para marcar ácidos grasos extraídos de algas y trioleína (Chen, et. Al., 2011). En el estudio de Chen et. Al., que consistió en el desarrollo de una metodología

de alto rendimiento para medir de manera cuantificable lípidos neutrales en microalgas se observó que la concentración de DMSO óptima de marcaje fue de 25% (2009). Además se determinó que al incubar en tiempos de 5, 10, 20, 30, 60 y 100min, el rendimiento de la tinción con Nile Red era el mismo. En el estudio de Chen et. Al., la temperatura óptima de incubación fue de 40°C (2009).

Los cambios en el grado de correlación al variar las condiciones de incubación pueden deberse a la propiedad hidrofóbica del ácido palmítico. Al disminuir la concentración de solvente orgánico, variar el tiempo y temperatura de incubación es probable que la solubilidad del ácido palmítico sea menor, ocasionando que disminuya la cantidad de ácido palmítico disuelto, haciendo que el marcaje sea menos eficiente. Las longitudes de onda óptimas para medir lípidos intracelulares en microalgas están lejos de las utilizadas. A las longitudes de onda de excitación y medición que se usó la sensibilidad del Nile Red es baja, así como la intensidad de fluorescencia emitida por lo que cualquier variación en el proceso de marcaje puede ocasionar una variación fuerte en los datos (Chen, et. Al., 2011). En un estudio de Chen et. Al., sobre cuantificación de lípidos neutrales por metodología de Nile Red asistida con microondas, se encontró que la intensidad de fluorescencia emitida para longitudes de onda menores a 550nm era menor a 20 y a medida que disminuye el tamaño de la longitud de onda la intensidad de la fluorescencia disminuye hasta un rango donde se vuelve susceptible a interferencia por pigmentos celulares contenidos en las microalgas (2011).

Las condiciones óptimas de marcaje de ácido palmítico fueron extrapoladas para el marcaje de lípidos intracelulares en microalgas, y se obtuvo resultados muy diferentes de lo

esperado, donde la relación intensidad de fluorescencia y concentración celular fue no lineal y con una tendencia clara a valores negativos. Por lo tanto las condiciones estándar establecidas con el ácido palmítico no son aplicables para tinción con Nile Red en microalgas. Este hecho se debe a varias razones, primero el ingreso del Nile Red al interior de las células está determinado por el solvente orgánico y la pared celular que dificulta su paso, segundo al marcar ácido palmítico el agente fluorescente no debe atravesar ninguna barrera, tercero el rango de longitud de onda al que se excita y mide está en el extremo inferior dentro de la capacidad para ser medido (Rumin, et. Al., 2015).

Debido a estas circunstancias se probó otras temperaturas de incubación para el marcaje intracelular de lípidos de microalgas y se observó que la temperatura de incubación con mejores resultados fue a 30°C, donde se obtuvo un $R^2 = 0.83$ el cual es un grado de correlación alto pero no óptimo para hacer inferencias sobre la concentración de lípidos en microalgas. A pesar de no ser óptimo puede utilizarse para determinar la concentración de lípidos intracelular de manera indirecta en combinación con la relación encontrada entre ácido palmítico y fluorescencia. Existe una gran diferencia entre la metodología de marcaje de ácido palmítico y marcaje de lípidos intracelulares de microalgas, ya que en una el mayor grado de correlación se obtuvo a 40°C de incubación y en la otra a 30°C, respectivamente. Por lo tanto la compatibilidad entre estas metodologías no es óptima, sin embargo cumplen de manera intrínseca con el principio básico de la metodología planteada, donde se relaciona concentración celular con intensidad de fluorescencia y lípidos.

En varios estudios se menciona que la temperatura de incubación no tiene una influencia fuerte en el momento del marcaje de lípidos intracelular en microalgas (Chen, et. Al., 2009). Mientras que en otros estudios se ha encontrado que la interacción entre la especie de microalga, solvente orgánico, agente fluorescente y longitud de onda usada en la medición

pueden llevar a que la temperatura de incubación si altere de manera significativa los resultados a generar (Rumin, et. Al., 2015). Para este estudio se encontró que a temperaturas de incubación de 40 y 50°C no fue posible determinar una relación cuantitativa entre la concentración de algas y la intensidad de la fluorescencia emitida, lo que puede deberse principalmente a las longitudes de onda de excitación y medición utilizadas.

En la Figura 6 se observa que entre una concentración celular de 10^5 y 10^6 no se puede evaluar la diferencia en la concentración de lípidos intracelulares, donde se obtienen una intensidad de fluorescencia igual en los 2 puntos a pesar de que se comprueba por densidad óptica que la concentración celular varía. Esto plantea que la capacidad de la metodología para determinar concentración de lípidos no se aplica en ese rango celular bajo las condiciones de marcaje y medición de fluorescencia aplicados. Estos resultados de forma sinusoidal que se aprecia en la figura 6 se ha encontrado en otros estudios, por lo que se considera que a partir de una concentración de 10^5 células mL^{-1} no es recomendable medir lípidos con marcaje por Nile red sin importar la longitud de onda que se aplique (Chen, et. Al., 2009). En un estudio de Chen et. Al., sobre cuantificación de lípidos neutrales aplicando Nile Red, encontraron una curva sinusoidal al graficar la relación entre intensidad de fluorescencia y concentración celular a en un rango de concentración celular de 10^3 a 10^4 células de microalgas (2009). Este hallazgo ha sido explicado en otros estudios a través de complicaciones en el marcaje de microalgas con Nile red. Uno de los principales problemas que afronta el marcaje es que el agente fluorescente penetre la pared celular de las microalgas, donde para algunos estudios usando DMSO como solvente orgánico se ha observado que solo un 25% de la población de microalgas expuesta a la tinción, fue realmente marcado con el Nile Red (Rumin, et. Al., 2015). Otras complicaciones que afronta el marcaje con Nile Red es la fotoestabilidad de las soluciones donde en poco tiempo se ven degradadas

por contacto con luz proveniente del ambiente. La longitud de onda a la que opera es similar a la de la clorofila en las microalgas lo que genera interferencia en las lecturas (Rumin, et. Al., 2015). Se ha logrado desarrollar nuevos agentes fluorescentes con una sensibilidad y afinidad mayor hacia los lípidos intracelulares, uno de estos es BODIPY, el cual ha demostrado un gran potencial y rápidamente ha reemplazado al Nile Red para estudios de prospección de microalgas. Su especificidad y sensibilidad se deben a su estructura molecular y las longitudes de onda bajo las que trabaja, que son de 505 nm de excitación y 515 nm de medición (Rumin, et. Al., 2015).

7.3 Fase III: Validación de metodología de alto rendimiento para medir acumulación de lípidos

La concentración de lípidos promedio obtenida por metodología gravimétrica es de 25.4%, la cual es menor al rango promedio sugerido en otros estudios, donde esta es de un 28 a 32% para *Chlorella sp.* Esta variación puede deberse al estadio en el que se encontraban las algas al momento del muestreo (Mutanda, et. Al., 2011). Para calcular la concentración de lípidos intracelular se usó la curva de ácido palmítico a 40y 30°C. Se utilizó las 2 curvas, ya que el mejor nivel de correlación para ácido palmítico se obtuvo a 40°C mientras que para el marcaje de algas fue de 30°C. El valor de lípidos obtenido fue de 14.26% al aplicar la relación entre ácido palmítico y fluorescencia a 40°C, mientras que al utilizar la relación matemática encontrada a 30°C la concentración de lípido calculada fue igual a 136.7 %. La concentración de lípidos obtenida a 30°C es incorrecta y demuestra que no es aplicable para determinar la concentración de lípidos en microalgas. En el caso del porcentaje obtenido a 40°C este es bajo siendo un poco más de la mitad del obtenido graviméricamente. Esto puede deberse a que la sensibilidad de la metodología diseñada es baja. Otro factor a considerar es que la concentración de lípidos

intracelular sea menor a la concentración de lípidos totales, es que una gran cantidad de lípidos se encuentra formando la membrana celular de las microalgas (Rumin, et. Al., 2015).

La comparación entre lípidos totales medidos graviméricamente y la concentración de lípidos calculada por medición indirecta de fluorescencia, nos permite determinar que la metodología sirve y nos permite diferenciar la concentración de lípidos en microalgas que es uno de los principales objetivos de este trabajo de investigación. El rango de sensibilidad en su capacidad de medición no es óptimo pero puede mejorarse.

8 Conclusiones

- La metodología estandarizada y optimizada nos permite medir la capacidad de acumular lípidos y producir biomasa en microalgas.
- Las longitudes de onda para excitación y medición del agente fluorescente utilizado Nile Red no son las óptimas.
- La aplicación de ácido palmítico para estandarizar condiciones de marcaje y usar como curva de calibración para determinar concentración de lípidos no es óptima. Por lo que debe evaluarse que lípido o grupo de lípidos deben utilizarse para estandarizar la metodología.
- Las condiciones óptimas de marcaje de ácido palmítico con Nile Red son, 25% de DMSO y 10 min de incubación a 40°C, para 492nm de excitación y 520nm de medición.
- Las condiciones óptimas de marcaje para lípidos intracelulares en microalgas con Nile red son 25% de DMSO y 10 min de incubación a 30°C, cuando se excita el Nile red a 492nm y mide a 520nm.
- La relación entre absorbancia y concentración celular permite ahorrar tiempo al no ser necesario conteo en cámara de Neubauer.
- La aplicación de la relación absorbancia y concentración celular es medir de manera rápida la capacidad de producir biomasa.
- El rango de error de la metodología estandarizada es alto y debe mejorarse.
- La metodología diseñada debe aplicarse para soluciones de microalgas en concentraciones de 10^4 a 10^5 células mL^{-1} .

9 Recomendaciones

- Se recomienda trabajar con Nile red a una longitud de onda de excitación de 530nm y medición de 630nm.
- En vez de utilizar ácido palmítico para la estandarización de condiciones de marcaje con Nile red, se debería utilizar lípidos extraídos del interior de las microalgas.
- Debido a la variabilidad en la concentración de clorofila entre especies de microalgas se debería aplicar la metodología diseñada y obtener una curva universal a partir de las microalgas estudiadas, para medir concentración celular a partir de la absorbancia.
- Para mejorar el grado de correlación de la curva que relaciona absorbancia y concentración celular, deberían hacerse un mayor número de réplicas.
- En el marcaje de lípidos intracelulares de microalgas a 30°C, deben hacerse más ensayos donde se pruebe variaciones de concentración pequeñas dentro de un mismo orden de magnitud para determinar su sensibilidad.

10 Anexos

Figura 1. Variación de la densidad óptica (aborsbancia) con respecto a la concentración celular de microalgas.

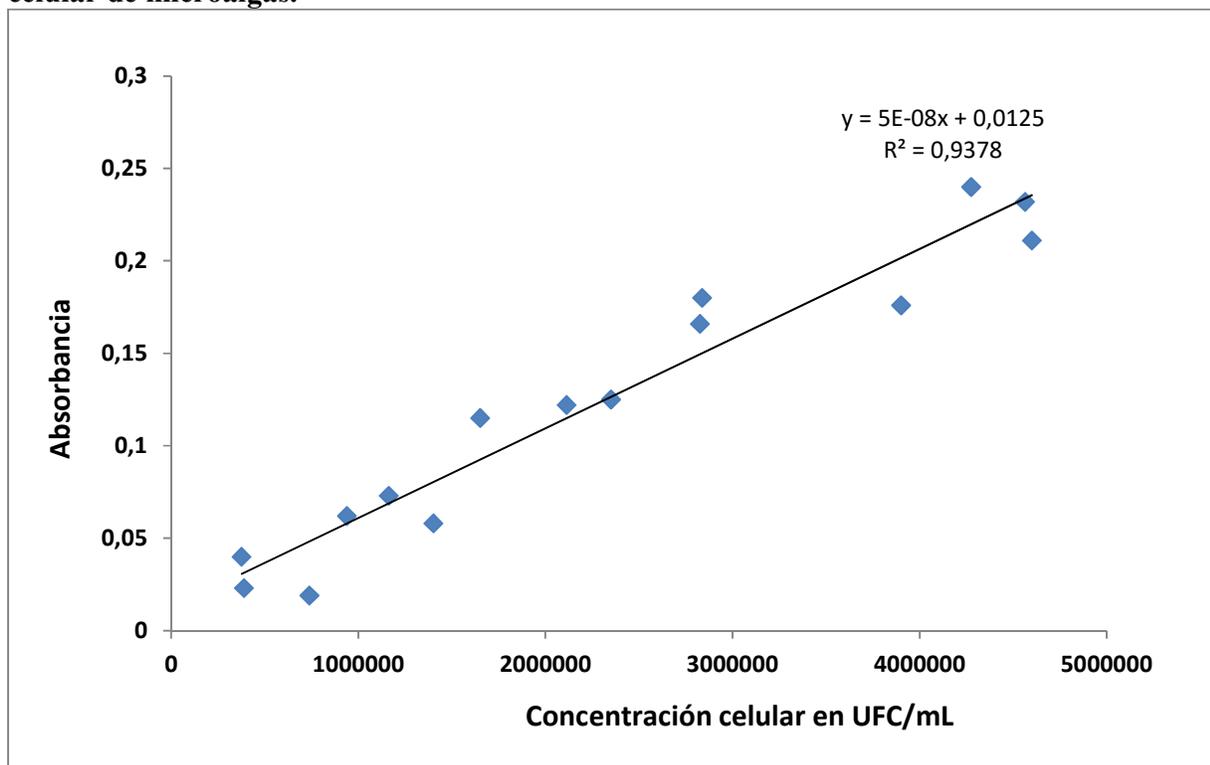


Tabla 1. Promedios de R^2 y desviación estandar de los ensayos de marcaje realizados con diferentes concentraciones de DMSO, tiempo de incubación y temperatura de incubación en la estandarización de metodología para marcaje fluorescente de lípidos con Nile Red.

Concentración	promedio	SD
R ² DMSO 25%	0,98546667	0,016951
R ² DMSO 20%	0,7874	0,146475
R ² DMSO 15%	0,8224	0,186596
Tiempo de incubación	promedio	SD
R ² tiempo 10min	0,98546667	0,016951
R ² tiempo 30min	0,60506667	0,376622
R ² tiempo 60min	0,47926667	0,333948
Temperatura de incubación	promedio	SD
R ² 30 grados	0,607467	0,073179
R ² 40 grados	0,929767	0,091105
R ² 50 grados	0,5955	0,290412

Figura 2. Variación de la intensidad de la fluorescencia con respecto a la concentración de ácido palmítico para diferentes concentraciones de DMSO.

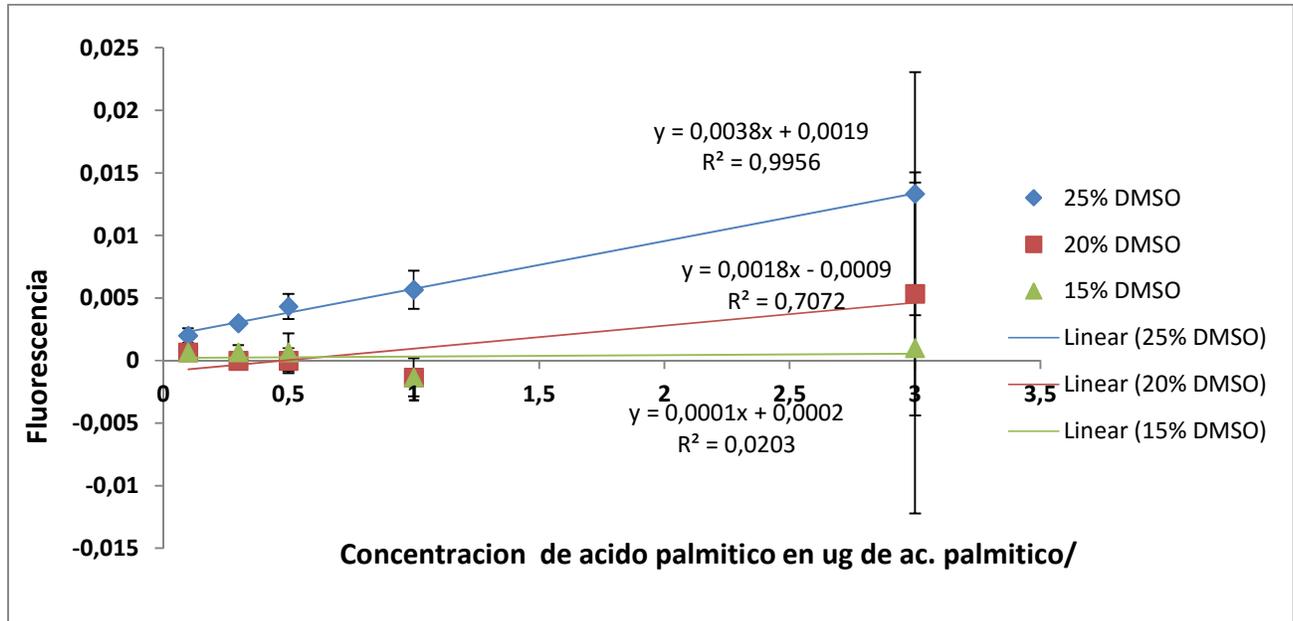


Figura 3. Variación de la intensidad de la fluorescencia con respecto a la concentración de ácido palmítico para diferentes tiempos de incubación.

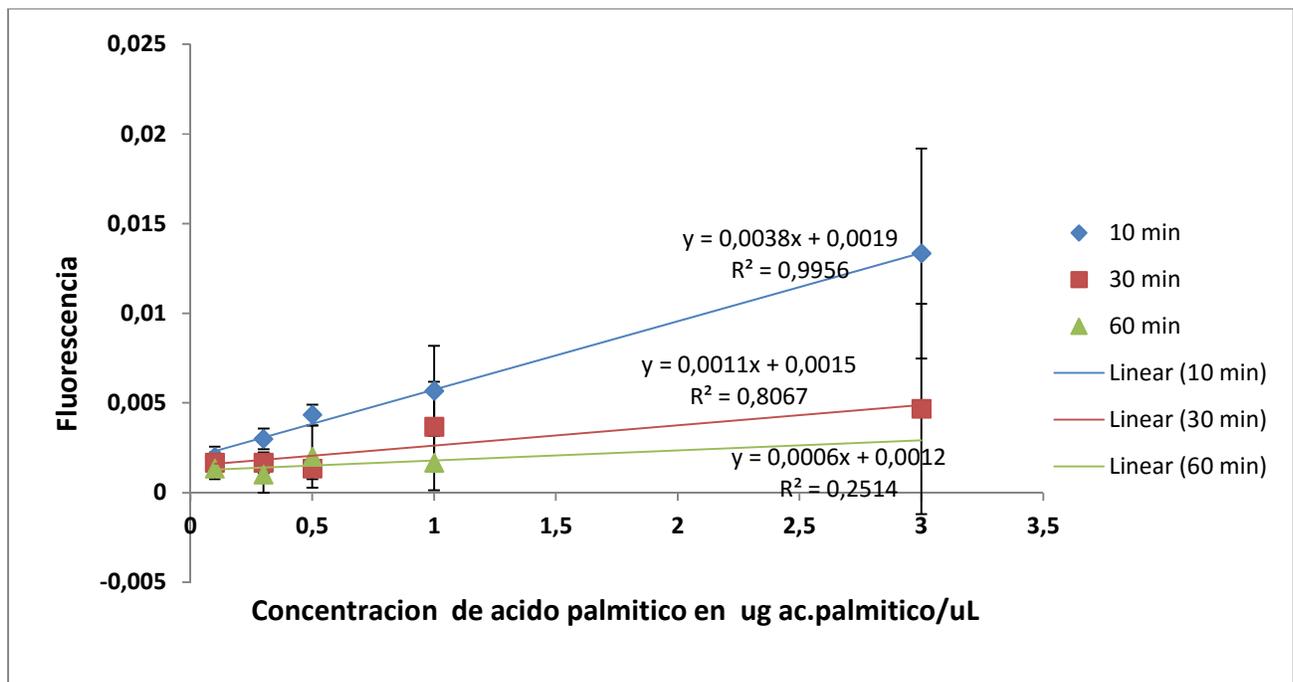


Figura 4. Variación de la intensidad de la fluorescencia con respecto a la concentración de ácido palmítico para diferentes temperaturas de incubación.

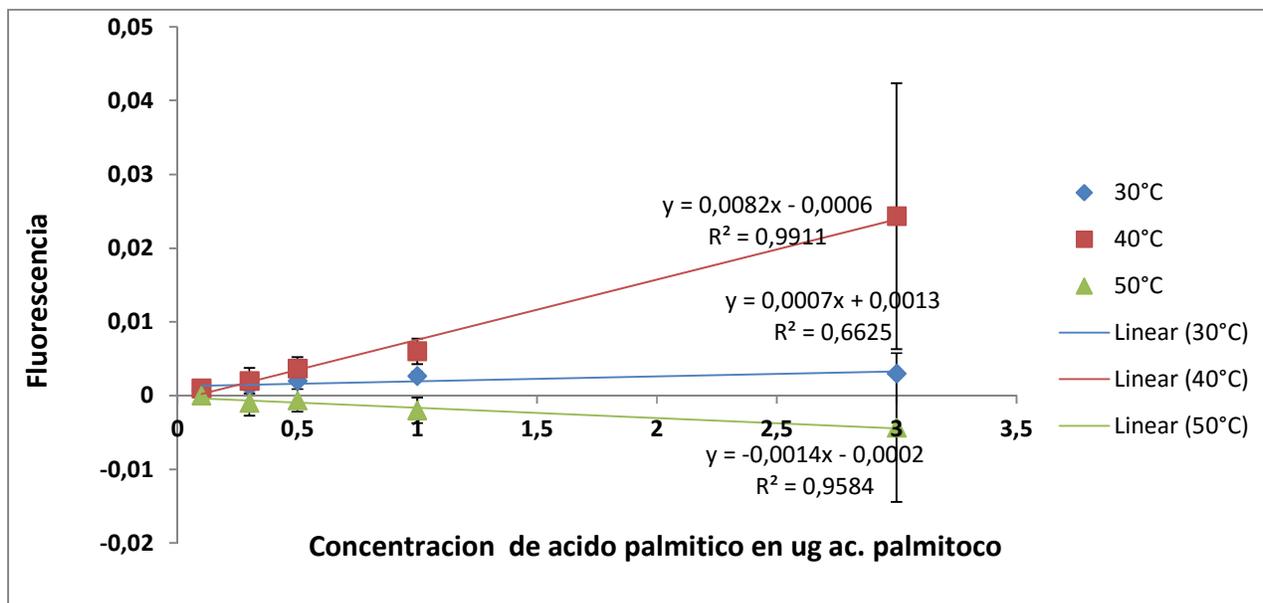


Tabla 2. Promedios de R^2 y desviación estandar al variar la temperatura de incubación en el marcaje de lípidos intracelulares de microalgas con Nile Red.

	promedio	SD
R^2 30 grados	0,821733333	0,01185341
R^2 40 grados	0,458266667	0,03964774
R^2 50 grados	0,0135	0,02338269

Figura 5. Variación de la intensidad de la fluorescencia con respecto a la concentración de celular de microalgas para diferentes temperaturas de incubación.

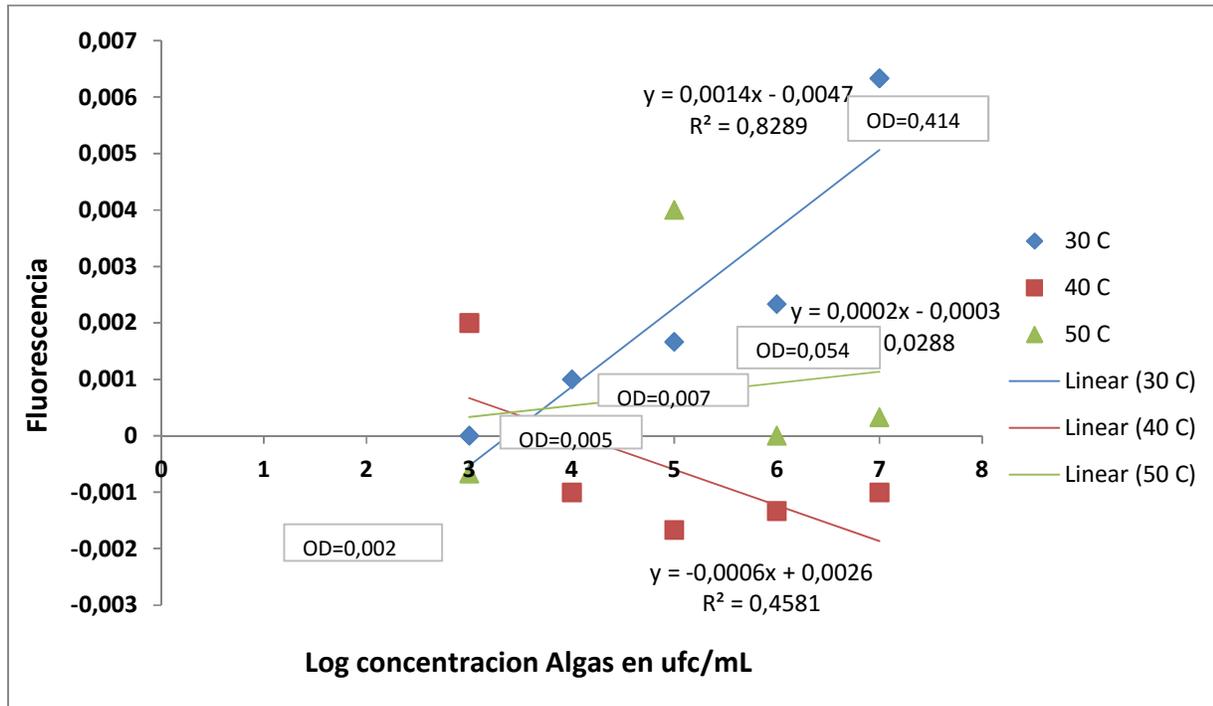


Figura 6. Variación de la intensidad de la fluorescencia con respecto a la concentración de celular de microalgas incubadas a 30°C.

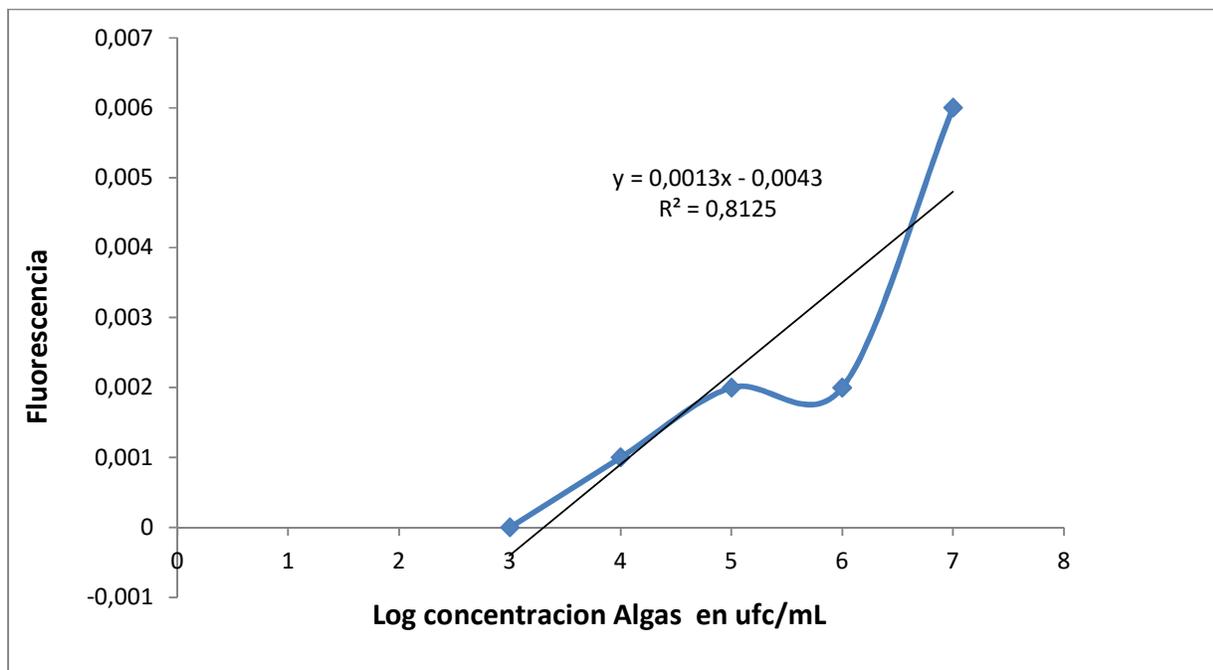


Tabla 3. Lípidos totales obtenidos por ensayos de extracción de lípidos y medición gravimétrica y su promedio.

Prueba	Contenido de lípido [%]
1	22.3
2	26.5
3	27.4
Promedio	25.4
Desviación estándar	2,722

Referencias

- Abalde, J. (1995). *Microalgas: Cultivo y Aplicaciones*. Universidad de Coruña. Edición 1^{ra}. España.
- Abou-Shanab, R., Matter, I., Kim, S., Oh, Y., Choi, J. & Jeon, B. (2011). Characterization and identification of lipid-producing microalgae species isolated from a freshwater lake. Elsevier. Doi: 10.1016/j.biombioe.2011.04.021.
- Abou-Shanab, R., Hwang, J., Cho, Y., Min, B. & Jeon, B. (2011). Characterization of microalgal species isolated from fresh water bodies as a potential source for biodiesel production. Elsevier. Doi: 10.1016/j.apenergy.2011.01.060.
- Bertozzini, E., Galluzzi, L., Penna, A., Magnani, M. (2011). Application of the standard addition method for the absolute quantification of neutral lipids in microalgae using Nile red. *Journal of Microbiological Methods*.
- CAN. (2011). Decisión 391- Regimen Común sobre Acceso a los Recursos Genéticos. *Colección de Leyes Electrónicamente Accesible*, 1-20.
- Celeromics. (2015). Formula de la cámara de Neubauer. Consultado el 5 de octubre del 2015 en: <http://www.celeromics.com/es/resources/Technical%20Notes/neubauer-chamber-cell-concentration/formula-camara-neubauer-concentracion.php#>
- Chen, W., Sommerfeld, M. & Hu, Q. (2011). Microwave-assisted Nile red method for in vivo quantification of neutral lipids in microalgae. *Bioresource Technology*. Doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.076.
- Chen, W., Zhang, Chengwu, Song, L., Sommerfeld, M. & Hu, Q. (2009). A high throughput Nile Red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *Journal of Microbiological Methods*. Doi: 10.1016/j.mimet.2009.01.001.
- Contreras-Flores, C., Peña-Castro, J., Flores-Cotera, L. & Cañizares-Villanueva, R. (2003). Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia*. Caracas.
- Doan, T., Sivaloganathan, B. & Obbard, J. (2011). Screening of marine microalgae for biodiesel feedstock. Elsevier. Doi: 10.1016/j.biombioe.2011.02.021.
- Georgianna, D. & Mayfield, S. (2012). Exploiting diversity and synthetic biology for the production of algal biofuels. *Nature*. Doi: 10.1038/nature11479.
- Held, P. & Razmond, K. (2011). Determination of Algal Cell Lipids Using Nile Red - Using Microplates to Monitor Neutral Lipids in *Chlorella Vulgaris* consultado el 10 de octubre del 2015 en: <http://www.biotek.com/resources/articles/nile-red-dye-algal.html>

- Jamali, H. (2013). New drilling technologies could give us so much oil, the climate won't stand a chance. Consultado el 10 de noviembre del 2015 en: <http://qz.com/117504/new-drilling-technologies-could-give-us-so-much-oil-the-climate-wont-stand-a-chance/>
- Kimura, K., Yamaoka, M. & Kamisaka, Y. (2004). Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile red fluorescence. *Journal of Microbiological Methods*. Doi: 10.1016/j.mimet.2003.10.018.
- Laboratorio de Ingeniería Ambiental, (2015). Protocolo de medición de biomasa. Universidad San Francisco de Quito.
- Larkum, A., Ross, I., Kruse, O., & Hankamer, B. (2012). Selection and engineering of microalgae for bioenergy and biofuel production. Elsevier. Doi: 10.1016/j.tibtech.2011.11.003.
- Melgarejo, L. (2003). BIOPROSPECCIÓN: Bioprospección: Plan nacional y aproximación al estado actual en Colombia. Melgarejo. *Acta Biológica Colombiana*, Vol. 8 No. 2. Obtenido de <http://www.virtual.unal.edu.co/revistas/actabiol/PDF's/V8N2/Art7V8N2.pdf>
- Mutanda, T., Ramesh, D., Karthikeyan, S., Kumari, S., Anandraj, A. & Bux, F. (2011). Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. Elsevier. Doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.077.
- Pereira, H., Barreira, L., Mozes, A., Florindo, C., Polo, C., Duarte, C., Custódio, L. & Varela, J. (2011). Microplate-based high throughput screening procedure for the isolation of lipid rich marine microalgae. *Biotechnology for Biofuels*. 4:61. Portugal.
- Ramos, P & Márquez, M. (2002). Avances en calidad ambiental. Universidad de Salamanca. Editorial Aquilafuente. España.
- Rumin, J., Bonnefond, H., Saint-Jean, B., Rouxel, C., Sciandra, A., Bernard, O., Cadoret, J. & Bougaran, G. (2015). The use of fluorescent Nile Red and Bodipy for lipid measurement in microalgae. *Biotechnology fuels*. Doi: 10.1186/s13068-015-0220-4.
- Torrentera, L. (1989). La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura una diagnosis. Consultado el 24 de marzo de 2015 en: <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab473s/AB473S00.htm#TOC>