

Influencia de la concentración de dióxido de carbono en el crecimiento y composición de la biomasa de *Botryococcus braunii* y *Scenedesmus* sp

Lizbeth Castañeda Hernández

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras
Noviembre, 2020

ZAMORANO
CARRERA DE AMBIENTE Y DESARROLLO

Influencia de la concentración de dióxido de carbono en el crecimiento y composición de la biomasa de *Botryococcus braunii* y *Scenedesmus* sp

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniera en Ambiente y desarrollo en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Lizbeth Castañeda Hernández

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2020

Influencia de la concentración de dióxido de carbono en el crecimiento y composición de la biomasa de *Botryococcus braunii* y *Scenedesmus* sp

Lizbeth Castañeda Hernández

Resumen. Las emisiones de dióxido de carbono (CO₂) en la atmósfera continúan incrementando como resultado de las actividades antropogénicas, requiriendo de alternativas de mitigación para su reducción y captura. Entre estas opciones se plantea el uso de organismos que requieren CO₂ para sus procesos metabólicos, como las microalgas. El objetivo de este estudio fue investigar la influencia que tiene el suministro de CO₂ con las concentraciones de 0.03, 10 y 20% en el crecimiento, producción de proteínas, lípidos y carbohidratos de las microalgas *Botryococcus braunii* y *Scenedesmus* sp. cultivadas bajo condiciones controladas. Se encontró que el crecimiento celular de *Botryococcus braunii* disminuye con concentraciones altas de CO₂ reportando valores de 0.64 g/L con 0.03% CO₂, 0.26 g/L con 10% CO₂ y 0.41 g/L con 20% CO₂, en donde el contenido de nitrógeno con el suministro de 10% CO₂ inhibe el crecimiento. En el caso de *Scenedesmus* sp. se mostró un aumento en el crecimiento celular, al incrementar la concentración de CO₂ alcanzando valores mayores con 20% CO₂ y una concentración de biomasa de 1.95 g/L. La curva de crecimiento celular y el contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos se encuentran directamente relacionados para ambas especies, obteniendo las mayores concentraciones luego de 15 días en los tratamientos con mayor producción de biomasa. Finalmente, la eficiencia de remoción de CO₂ fue más alta para ambos cultivos al operar con 10% CO₂, logrando 6.78% para *Botryococcus braunii* y 6.60% para *Scenedesmus* sp.

Palabras clave: Carbohidratos, crecimiento celular, lípidos, microalga, proteínas, remoción de CO₂.

Abstract. Carbon dioxide (CO₂) emissions in the atmosphere are increasing constantly as a result of anthropological activities, requiring mitigation for its reduction and capture alternatives. Between these options raises the use of organisms that require CO₂ for its metabolic processes, like micro-algae. The main goal of this study was to investigate the influence of CO₂ supply in concentrations of 0.03, 10 and 20% in protein, lipids and carbohydrates production and growth of micro-algae *Botryococcus braunii* and *Scenedesmus* sp. growing them under controlled conditions. Cell growing of *Botryococcus braunii* decreases with high concentrations of CO₂ reporting data of 0.64 g/L with 0.03% CO₂, 0.26 g/L with 10% CO₂ and 0.41 g/L with 20% CO₂, where the nitrogen content with 10% CO₂ supply inhibits growth. In the case of *Scenedesmus* sp., there was a rise in the cell growth, increasing CO₂ concentrations, obtaining great values with 20% CO₂ and a biomass concentration of 1.95 g/L. The cell growth curve and the protein, lipid and carbohydrate content are directly related for both species, obtaining great concentrations after 15 days of treatment with higher biomass production. Finally, the remotion efficiency of CO₂ was higher for both experiments using 10% CO₂, getting 6.78% for *Botryococcus braunii* and 6.60% for *Scenedesmus* sp.

Key words: Carbohydrates, cell growth, CO₂ removal, lipids, microalgae, proteins.

ÍNDICE GENERAL

Portadilla	i
Página de Firmas	ii
Resumen	iii
Índice General	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. METODOLOGÍA	4
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	11
4. CONCLUSIONES.....	22
5. RECOMENDACIONES.....	23
6. LITERATURA CITADA	24
7. ANEXOS	28

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Diseño experimental.....	6
2. Remoción total de CO ₂ de <i>Botryococcus braunii</i> y <i>Scenedesmus</i> sp.....	14

Figuras	Página
1. Montaje de los cultivos con los diferentes porcentajes de CO ₂	5
2. Toma de muestra de gas en la salida de los sistemas.....	8
3. Análisis de lípidos, proteínas y carbohidratos.....	10
4. Crecimiento celular de <i>Botryococcus braunii</i> con diferentes concentraciones de CO ₂ ..	12
5. Crecimiento celular de <i>Scenedesmus</i> sp. con diferentes concentraciones de CO ₂	13
6. Producción de Carbohidratos de <i>B. braunii</i> con diferentes concentraciones de CO ₂	16
7. Producción de Lípidos de <i>B. braunii</i> con diferentes concentraciones de CO ₂	17
8. Producción de Proteínas de <i>B. braunii</i> con diferentes concentraciones de CO ₂	18
9. Producción de Carbohidratos de <i>Scenedesmus</i> sp. con diferentes concentraciones de CO ₂	19
10. Producción de Lípidos de <i>Scenedesmus</i> sp. con diferentes concentraciones de CO ₂	20
11. Producción de Proteínas de <i>Scenedesmus</i> sp. con diferentes concentraciones de CO ₂ ...	21

Anexos	Página
1. <i>Botryococcus braunii</i> vista al microscopio a 100x	28
2. <i>Scenedesmus</i> sp. vista al microscopio a 100x	28
3. Medio de crecimiento BG11	29

1. INTRODUCCIÓN

Las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) han incrementado en los últimos años, producto de actividades antropogénicas, como la quema de combustibles fósiles, procesos industriales, cambio y uso del suelo para la agricultura, incendios forestales, crecimiento poblacional, mayor demanda de bienes y servicios, y el uso de energía. Este conjunto de factores contribuye al impacto del cambio climático, alterando la temperatura promedio en una región específica lo que a su vez provoca una alteración del intercambio de materia y energía de las diferentes capas del planeta (Lizano, 2013).

En el contexto de esta problemática, se han planteado diversas medidas de mitigación, destacando entre estas el uso eficiente de energía, la implementación de energía renovable, el uso de biocombustibles para transporte, la mejora en la productividad de cosecha, el uso y cambio de suelos, y el fomento de proyectos enfocados en la captura y secuestro de carbono (Sánchez y Reyes, 2015). Por ello el desarrollo de métodos sostenibles y efectivos para la captura, secuestro y almacenamiento del CO₂ de las emisiones directas de las industrias representan una alternativa que contribuirá en el abordaje de esta problemática, además de una mitigación, se debe considerar una economía circular en donde se aproveche el CO₂ emitido por las industrias para la obtención de subproductos, otorgando así una buena aplicabilidad.

Se han desarrollado varios métodos para capturar CO₂, por ejemplo, métodos basados en procesos de adsorción y absorción mediante el uso de compuestos absorbentes como zeolita 13 o aminas (Cloete, Giuffrida, Romano y Zaabout, 2019; Jiang et al., 2019; López-Bautista y Flores-Tlacuahuac, 2020; Zhang et al., 2019). Otro método para capturar CO₂ es el uso de organismos vivos conocido como biocaptura, biosecuestro o biofijación (Jain, Urban, Balbach y Webb, 2012). Este consiste en el almacenamiento de carbono a través de árboles, plantas, y otro tipo de flora que realice fotosíntesis a través de sus vías metabólicas, contribuyendo a la reducción de la concentración presente en la atmósfera. También se han desarrollado otros métodos para la captura de CO₂, por ejemplo, a través de compuestos absorbentes derivados del amoníaco (López-Bautista y Flores-Tlacuahuac, 2020).

Las microalgas representan una alternativa para la captura de carbono y producción de biomasa debido a que estas son microorganismos unicelulares eucarióticos que realizan fotosíntesis y necesitan del CO₂ para realizar sus procesos metabólicos (Díaz y Restrepo, 2013). Estos microorganismos producen biomasa durante su ciclo celular, teniendo potencial en la obtención de subproductos. Además, se les puede extraer de sus pigmentos intercelulares, proteínas, polisacáridos y ácidos grasos (Martinez, 2009).

Se ha demostrado también que las microalgas capturan de 1.8 a 2 kg de CO₂ por cada kg de biomasa producida (Fulke, Kannan, Chakrabarti y Devi, 2014). Este mecanismo es de interés porque la biomasa generada se puede utilizar ampliamente en distintos rubros. La fijación de CO₂ a través de la fotosíntesis de las microalgas y la conversión de su biomasa producida en algún tipo de combustible o subproducto es considerado como un verdadero enfoque sostenible para la neutralización del CO₂ (López-Pacheco et al., 2019; Yang et al., 2016).

Las microalgas pueden ser utilizadas como una medida de mitigación para secuestrar el CO₂ directamente de las industrias, produciendo biomasa que a su vez puede tener un valor comercial. En un estudio para la obtención de valor de la biomasa a escala piloto realizado por Marella, López-Pacheco, Parra-Saldívar, Dixit y Tiwari (2020), demostraron que las microalgas poseen diversas capacidades que las hacen muy útiles para generar distintos subproductos y aplicaciones. Algunos de estos usos son biocombustibles, biofertilizantes y suplementos nutricionales, donde cada uso dependerá de la cantidad de macronutrientes que posea la biomasa microalgal.

En un documento publicado por Sandoval y Rubio (2017) se demostró que la capacidad de fijación de CO₂ por las microalgas es cuatro veces superior a las macroalgas y plantas superiores. Además, se reportó que las especies *Scenedesmus*, *Spirulina* y *Chlorella* toleran una mayor concentración de CO₂. Por otra parte, *Botryococcus braunii* es una microalga verde colonial de crecimiento lento, muy extendida en lagos, embalses y estanques de agua dulce y salobre, y es reconocida como uno de los potentes recursos renovables para la producción de carbohidratos. *Botryococcus braunii* se clasifica en razas A, B y L según el tipo de polisacárido sintetizados. Estos compuestos son prometedores como fuente de energía renovable, ya que se acumulan a niveles muy altos en las algas (26 - 86% en peso seco) y tienen un valor térmico en el rango de 30,000 – 42,000 kJ/kg (Calderón, Bayona y Garcés, 2018; Dayananda, Sarada, Rani, Shamala y Ravishankar, 2007).

Además de los hidrocarburos, *B. braunii* también es capaz de producir grandes cantidades de carbohidratos. Algunos de los monómeros que constituyen estos carbohidratos son galactosa, glucosa, fucosa, arabinosa y ramnosa. La aplicación de carbohidratos en la industria farmacéutica ha sido ampliamente estudiada, debido a los diversos agentes activos biológicos presentes. Por ejemplo, la fucosa tiene aplicaciones medicinales potenciales, propiedades anticancerígenas, y la galactosa puede usarse para la producción de bioetanol por fermentación (Dayananda et al., 2007; Gouveia et al., 2017). A pesar de estas ventajas, se cuenta con muy poca información sobre su potencial en la captura de CO₂ y el desempeño que se obtiene al estar sometida bajo diferentes concentraciones de CO₂, así como sobre la influencia que este gas proporciona en la composición de su biomasa.

De forma paralela, la especie *Scenedesmus* sp, ha sido explorada para su uso comercial. Los miembros de este género muestran características interesantes como una rápida tasa de crecimiento, alta biosíntesis de lípidos, resistencia a la contaminación microbiana y depredadores (Rocha et al., 2019). Dependiendo de las condiciones de crecimiento el contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos varían del 3 al 47%, del 2 al 30% y del 10 al 50% del peso de la biomasa seca. Esta especie ha ganado interés como fuente de varios metabolitos secundarios, particularmente carotenoides (α -caroteno, β -caroteno, luteína) que pueden fijar de manera eficiente el CO₂ al tiempo que muestran una alta tolerancia a los gases de combustión industriales (Idrissi, A. Mohamed, Mohammed y Lotfi, 2003; Msanne, Polle y Starkenburg, 2020).

A lo largo de las investigaciones, se ha evidenciado que las microalgas son los organismos fotosintéticos más adecuados para la remoción directa del CO₂, debido a que estas son capaces de adaptarse a altas condiciones de este gas, así como a ambientes extremos como temperatura alta, salinidad y pH (Barahoei, Hatamipour y Afsharzadeh, 2020). Sin embargo, su capacidad de captura se encuentra asociada a la concentración de CO₂ dosificada y la especie presente en el cultivo. Estos factores también tendrán influencia sobre la curva de crecimiento, la producción de biomasa y la composición de esta en términos de lípidos, proteínas y carbohidratos.

Conforme a lo descrito anteriormente y considerando la importancia de este tipo de microorganismos en la implementación de alternativas de mitigación fundamentales en la captura de carbono, y la obtención de subproductos para uso comercial, esta investigación centra su atención en la capacidad de remoción de CO₂ y producción de biomasa por parte de las microalgas *Botryococcus braunii* y *Scenedesmus* sp. Determinando la influencia de la concentración de CO₂ dosificada en el desempeño del cultivo y sus efectos en la producción y composición de la biomasa. Los resultados de esta investigación servirán como apertura para el desarrollo de aplicaciones que involucren el uso de estas especies en el desarrollo de tratamientos orientados en reducción de emisiones de CO₂ y producción de biomasa para la obtención de subproductos. En este contexto, se plantean los siguientes objetivos:

- Determinar la curva de crecimiento celular de *Scenedesmus* sp y *Botryococcus braunii* con un suministro de 0.03, 10 y 20% de CO₂.
- Evaluar la eficiencia de remoción de CO₂ por *Scenedesmus* sp y *Botryococcus braunii* con un suministro de 10 y 20% de CO₂.
- Determinar la composición de la biomasa microalgal, en términos de la concentración de proteínas, lípidos y carbohidratos por litro de cultivo, con suministro de 0.03, 10 y 20% de CO₂.

2. METODOLOGÍA

Sitio de estudio

El estudio se realizó con la colaboración del grupo de Biotecnología Sustentable Aplicada (SAB) perteneciente al centro de Biotecnología, Campus Monterrey del Instituto Tecnológico y de Estudios superiores de Monterrey, Nuevo León, México, ubicado a una altitud de 540 msnm. El experimento consistió en el cultivo de dos cepas de microalgas bajo condiciones controladas, a las cuales se les suministro diferentes concentraciones de CO₂ para identificar la especie con mayor capacidad de captura. Adicionalmente, se determinó el tratamiento que derivó en una mayor producción de biomasa.

Se seleccionaron ambas cepas principalmente por su diferencia morfológica, debido a que *Scenedesmus* sp. es una microalga que se agrupan de cuatro a seis individuos y posee flagelos que les permite moverse con facilidad. En cambio, *Botryococcus braunii* es de forma esférica y no posee flagelos ni alguna otra estructura que le permita mantenerse en movimiento, y debido al enfoque exploratorio del estudio, se generaron datos que mostraran la tendencia del suministro de CO₂ a distintas concentraciones sobre la producción de biomasa de ambas cepas.

Determinación de la curva de crecimiento celular

Las etapas requeridas para la obtención de la curva de crecimiento bajo las tres diferentes concentraciones de CO₂, iniciaron con el establecimiento de los cultivos, seguido del monitoreo diario de los cultivos bajo las diferentes concentraciones de CO₂ durante los 15 días del experimento. Se continuó con la conversión de la absorbancia obtenida diariamente a peso de la biomasa en g/L y finalizó con el cálculo de la tasa de crecimiento diario.

Establecimiento de cultivos. Para este estudio se utilizaron las especies *Botryococcus braunii* y *Scenedesmus* sp. Ambas cepas fueron adquiridas de UTEX, (UTEX, Austin, TX, EE.UU.). Para el cultivo de ambas microalgas se utilizó medio de crecimiento BG11, utilizando matraces Erlenmeyer de 4 L para el mantenimiento del cultivo. Se aplicó un flujo de aireación de 200 mL/L/min con bombas de aire marca OPTIMA de 4.5 watt, con un filtro de 0.2 µm a lo largo de todo el experimento. Además, se mantuvo un fotoperiodo de 12:12 con lámparas marca “hydro grow extreme” LED, a 80 µmol de fotones m²/s. Estas condiciones permanecieron constantes durante el experimento (Figura 1). Los cultivos de reserva se mantuvieron a 20 °C con las mismas condiciones mencionada anteriormente. Cuando el cultivo de reserva se encontraba con una densidad mayor a 1 g/L, se utilizó un volumen de 100 mL como inóculo para los reactores utilizados en el experimento. De esta forma, el inóculo inicial de *Botryococcus* y *Scenedesmus* tenía una absorbancia de uno a la longitud de onda de 750 nm.

Monitoreo de crecimiento celular. El experimento se realizó en frascos de cultivo de 1 L, con 900 mL de medio BG11 y 100 mL de las microalgas obtenidas del cultivo previamente mencionado. Se realizó la inoculación por separado y por triplicado para cada concentración de CO₂ aplicada. Las condiciones de flujo de gas e iluminación se mantuvieron al igual que en la etapa de establecimiento del cultivo (Figura 1).

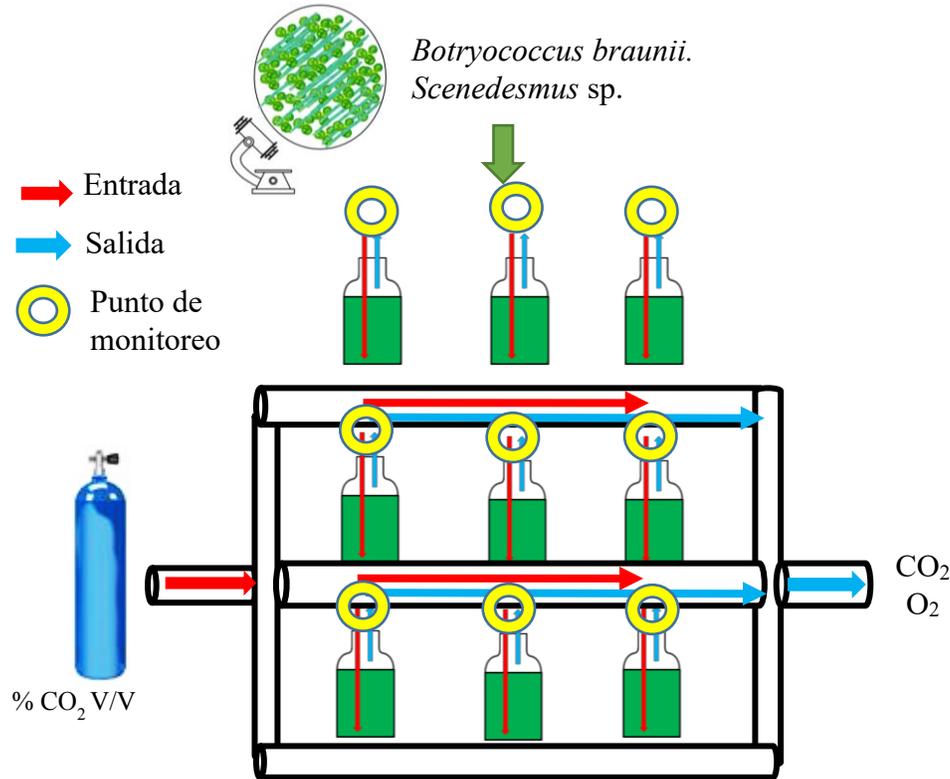


Figura 1. Montaje de los cultivos con los diferentes porcentajes de CO₂

Se realizó el montaje de dos tratamientos utilizando un flujo de gas de 0.2 vvm (volumen del aire por volumen de medio por minuto). Se utilizaron dos diferentes mezclas de gas compuesto de CO₂ al 10 y 20% mezclado con nitrógeno (N₂). Adicionalmente, se utilizó un tratamiento con un flujo de 0.03%, (la concentración de CO₂ presente en el aire), sin algún suministro adicional de CO₂. Este tratamiento, no se consideró para la evaluación de remoción de CO₂, debido a que, en el cromatógrafo de gases, esta muestra no era significativa. Se colocaron difusores de aire en la manguera de la entrada de gas, para su correcta distribución, el flujo de gas de ambos cultivos fue de 0.2 vvm. Los cultivos se mantuvieron durante 15 días realizando el monitoreo periódico de la variable concentración de biomasa en cada tratamiento.

Las concentraciones de biomasa de ambas microalgas fueron evaluadas cada 24 horas, muestreando 300 µL del cultivo para obtener su absorbancia a 750 nm con un espectrofotómetro (Fluorstar omega, 415-0470). Previamente, se realizó una curva estándar para relacionar la densidad óptica del inóculo con su masa seca. El experimento se realizó con el diseño experimental expresado en el cuadro 1. El cual fue dividido en tres bloques, con 3 tratamientos (0.03, 10 y 20% de CO₂), con tres repeticiones por porcentaje de CO₂ por cada microalga, logrando así 9 unidades experimentales (UE) por microalga, para un total de 18 UE en el experimento. Se corrió un experimento bajo las condiciones estándar mencionadas en un principio, pero sin el suministro de CO₂ para tener un punto de referencia de ambas microalgas.

Cuadro 1. Diseño experimental

Orden	Bloque	Microalgas	% v/v CO ₂
1	3	1	3
2	3	2	3
3	3	2	1
4	3	2	2
5	3	1	2
6	3	1	1
7	1	1	1
8	1	2	2
9	1	1	3
10	1	2	3
11	1	2	1
12	1	1	2
13	2	1	3
14	2	1	2
15	2	1	1
16	2	2	2
17	2	2	3
18	2	2	1

Microalga: 1 □ (*Botryococcus braunii*), 2 □ (*Scenedesmus* sp.)

% v/v CO₂: ¹ (0.03% v/v CO₂), ² (10% v/v CO₂), ³ (20% v/v CO₂)

Conversión de absorbancia a peso de la biomasa en g/L. Para determinar el crecimiento celular durante los 15 días, se realizó una curva de calibración cuando el cultivo llegó a una densidad óptica superior a uno con una absorbancia a 750 nm. Este cultivo se diluyó con agua destilada a 10 concentraciones. Después se realizó el filtrado de la disolución (10 mL) con filtros de microfibras de vidrio “Whatman” GF/C pesados con anterioridad. Posteriormente el filtro con la biomasa se secó a 100 °C por 2 horas. Finalmente, los filtros se enfriaron a una temperatura ambiente en un desecador de vacío y se pesaron gravimétricamente para obtener la curva estándar. Este procedimiento se realizó para cada una de las cepas, de este procedimiento se obtuvo la ecuación 1 para *Botryococcus* y la ecuación 2 para *Scenedesmus* sp expresadas a continuación:

$$g/L = 2.061(\text{Absorbancia } 750 \text{ nm}) - 0.6567 \quad [1]$$

$$g/L = 1.495(\text{Absorbancia } 750 \text{ nm}) - 0.0584 \quad [2]$$

Cálculo de la tasa de crecimiento de las microalgas *Botryococcus braunii* y *Scenedesmus* sp. aplicando 0.03, 10 y 20% de CO₂. Se obtuvo la tasa de crecimiento de los cultivos a través de los datos obtenidos diariamente para conocer el crecimiento celular. La tasa de crecimiento fue determinada utilizando la ecuación 3 (Astacondor, Mayta-Guatuco, Montoya-Terreros y Tarazona-Delgado, 2017).

$$\text{Tasa de crecimiento} = \frac{(\text{Ln}X_2 - \text{Ln}X_1)}{t_2 - t_1} \quad [3]$$

Dónde:

X1 = es el tamaño de la población al inicio (mg/L) de un intervalo de tiempo

X2 = tamaño de la población al final (mg/L) de un intervalo de tiempo

t2-t1 = intervalo de tiempo en días

A partir de los datos obtenidos, en el programa “Microsoft Excel”, se sustituyó la fórmula de la curva previamente establecida para cada cepa (Ecuación 1 y 2) con el promedio del triplicado de la absorbancia de cada tratamiento, para obtener los g/L de cada cepa de microalga a través del tiempo. Después se procedió a construir el gráfico de crecimiento celular durante los 15 días con los diferentes tratamientos para su análisis y comparación.

Evaluación de la eficiencia de remoción de CO₂

La cantidad de CO₂ removido fue determinado a través de la toma de muestras en bolsas de gas de fluoruro de polivinilo (PVF) “Tedlar” (Supelco) de la fase gaseosa de entrada y salida de cada sistema (Figura 2). Se determinó la concentración de CO₂ presente en las muestras utilizando un estándar de CO₂ (concentración conocida de CO₂) con un cromatógrafo 490 Micro GC, “Agilent Technologies” adaptado con detectores de conductividad térmica (TCD) y una columna CP-PoraPlot U (PPU) de 10 m. En el análisis, se utilizó helio como el gas portador, la temperatura del inyector fue de 110 °C y la temperatura de la columna fue de 80 °C. La eficiencia de eliminación de CO₂ se determinó utilizando la ecuación 4 (Guo, Duan, Sun, Han y Zhao, 2019; Seyedin et al., 2020):

$$\text{Eficiencia de remoción de CO}_2 \text{ (\%)} = \frac{C_{in} - C_{fn}}{C_{in}} \times 100 \quad [4]$$

Donde:

C_{in} es la concentración inicial.

C_{fn} es la concentración final.



Figura 2. Toma de muestra de gas en la salida de los sistemas.

Las muestras obtenidas en la entrada y la salida del sistema fueron analizadas en un cromatógrafo de gases. Se utilizó en un inicio un gas estándar que era la muestra en la entrada del sistema con cierto porcentaje de oxígeno (O_2), CO_2 y N_2 , en donde proporcionaba un pico, por cada uno. Simultáneamente, el mismo programa indicaba el tiempo y el área bajo la curva, por lo que, al inyectar las muestras de la salida de los sistemas, se comparó el área bajo la curva de la muestra estándar con la concentración conocida de CO_2 y la muestra que se obtuvo en la salida del sistema. Dependiendo de la variación de esa área bajo la curva, se obtuvo el porcentaje de remoción de CO_2 . Una vez obtenidos los datos previamente analizados con el cromatógrafo de gases, se construyó un cuadro con los resultados, para identificar la eficiencia de remoción de CO_2 de cada microalga bajo los dos porcentajes de CO_2 suministrados.

Determinación de la composición de la biomasa microalgal

La composición de la biomasa microalgal, se determinó a partir de tres métodos analíticos. Para la concentración de proteínas se utilizó el kit de “Lowry”, para obtener la producción de lípidos, se utilizó, el ensayo fosfo-vanilina y para determinar la producción de carbohidratos, se utilizó el método fenol-sulfúrico. Estos ensayos se realizaron cada 5 días para todos los cultivos establecidos bajo las distintas concentraciones de CO_2 de cada cepa.

Reactivos y equipo. Los reactivos utilizados para el análisis del medio de cultivo, lípidos y carbohidratos se adquirieron de “Sigma-Aldrich”. El kit de ensayo de proteínas “Lowry” se adquirió de “Thermo Fisher Scientific”. Las medidas espectrofotométricas se tomaron en un lector de microplacas de absorbancia BGM “Labtech” (Fluorstar omega, 415-0470).

Cosecha y caracterización de la biomasa. Para determinar la composición de la biomasa, se tomaron muestras de 15 mL de cultivo cada 5 días a partir de la inoculación de los cultivos de

Botryococcus braunii y *Scenedesmus* sp. Esto para obtener tres muestras en diferentes tiempos y así identificar cuándo se produjo la mayor cantidad de proteínas lípidos y carbohidratos. Estas muestras fueron almacenadas a una temperatura de 4 °C hasta que se completó el ciclo de 15 días para realizar el análisis necesario. Para la realización del ensayo de las proteínas, lípidos y carbohidratos las muestras de, ambas cepas fueron centrifugadas a una velocidad de 4,000 rpm, por 30 minutos a 10 °C. Después, se retiró el sobrenadante y la biomasa fue lavada en dos ocasiones para evitar el almacenamiento de nutrientes y finalmente se volvió a suspender en agua destilada.

Para determinar el contenido de proteínas totales se utilizó el kit de proteínas de Lowry modificado. En primer lugar, se añadió 1 mL de reactivo Modificado de “Lowry” a 200 µl de solución de la biomasa previamente lavada. En segundo lugar, el tubo se agitó con un “vortex” y después de 10 minutos, se añadieron 100 µl de reactivo 1X “Folin-Ciocalteu” y la mezcla se agitó de nuevo con el “vortex”. Después de incubar la muestra durante 30 minutos en la oscuridad, se midió la absorbancia de las muestras a 750 nm con un espectrofotómetro marca BGM “Labtech”. La concentración de proteína (mg/L) se obtuvo usando una curva de calibración, previamente establecida.

El contenido de lípidos obtenidos por ambas cepas de microalgas fue cuantificado a través del ensayo fosfo-vanilina descrito por Mishra et al. (2014). Este consiste en una reacción que produce una coloración rosa que puede ser medida con un espectrofotómetro a 530 nm. En este ensayo, la intensidad de coloración es directamente proporcional a la concentración de lípidos presentes (Gutierrez, Santa Cruz y Barrantes-Bustanza, 2002). Se añadieron 2 mL de ácido sulfúrico concentrado (98%) a 100 µl de las microalgas lavadas previamente. A continuación, esta muestra se incubó por 10 minutos a 100 °C, después se colocó por 5 minutos en un baño con hielo. Posteriormente, se añadieron 5 mL de reactivo fosfo-vanilina y se incubó la muestra por 15 minutos a 37 °C. Se midió la absorbancia a 530 nm en un lector de microplacas de absorbancia BGM Labtech, utilizando agua bidestilada como blanco. La concentración de lípidos (mg/L) se obtuvo usando una curva de calibración de aceite de canola que estaba previamente establecida.

Se determinó la cantidad de carbohidratos a través del método fenol-sulfúrico modificado (López-Legarda, Taramuel-Gallardo y Arboleda, 2017). Se tomaron 300 µL de la biomasa previamente lavada y se le añadió 1 mL de ácido sulfúrico concentrado (98 - 100%), se mezcló por 30 segundos. Posteriormente, se incubó por 2 minutos en un baño con hielo y, por último, se midió la absorbancia a 315 nm utilizando un lector de microplacas BGM “Labtech” y usando agua bidestilada como blanco. Para convertir la concentración de carbohidratos de biomasa a mg/L se utilizó una curva estándar de glucosa establecida previamente. El momento de los análisis de lípidos, proteínas y carbohidratos de ambas microalgas pueden observarse en la figura 3.



Figura 3. Análisis de lípidos, proteínas y carbohidratos.

Con los datos obtenidos de cada ensayo, se utilizó el programa “Microsoft Excel”, sustituyendo la fórmula de la curva previamente establecida para cada ensayo, con el promedio de la absorbancia de cada tratamiento para así obtener los mg/L de cada cepa de microalgas a través del tiempo. Finalmente se realizaron las gráficas para identificar la concentración de CO₂ suministrada que derivó en una mayor cantidad de lípidos, proteínas y carbohidratos para cada especie analizada.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de la curva de crecimiento celular

El crecimiento, de las especies seleccionadas para esta investigación conforme a las concentraciones de CO₂ se muestra en las figuras 4 y 5. En el caso de *Botryococcus braunii*, se observó una mayor producción a la concentración de CO₂ de 0.03%, es decir con aire del ambiente, alcanzando una tasa de crecimiento de 0.17 mg/L/día con 0.03% de CO₂, 0.06 mg/L/día con la inyección de 10% de CO₂ y 0.09 mg/L/día con 20% CO₂. El crecimiento obtenido a los 15 días del experimento de *Botryococcus braunii* en las distintas concentraciones de CO₂ fue de 0.64 g/L para 0.03% de CO₂, 0.26 g/L para 10% de CO₂ y 0.41 g/L para la concentración de 20% de CO₂. Se presume que en este periodo no se logra alcanzar la fase de crecimiento exponencial de esta cepa, por lo que, si se extiende el tiempo del experimento y se llega a las siguientes fases de crecimiento, posiblemente, los resultados serían diferentes.

Los resultados obtenidos concuerdan con el estudio realizado por Yoshimura, Okada y Honda (2013), donde una concentración óptima de CO₂ para el crecimiento de *Botryococcus braunii* debe ser menor a 5%. Esta especie cuenta con una tasa de crecimiento lenta en comparación con otras especies de microalgas debido a que su fase exponencial se alcanza aproximadamente en el día 14 de cultivo (Arévalo et al., 2018; Cabanelas, Marques, de Souza, Druzian y Nascimento, 2015; Gouveia et al., 2017). Por otra parte, en el estudio realizado por Jaimes y Kafarov (2015) se demostró que la concentración de CO₂ además de un mayor porcentaje de nitrógeno en el suministro de gas fue un factor que reprimía el crecimiento celular. Ge, Liu y Tian (2011) mostraron que el crecimiento de microalgas con una concentración de 20% CO₂ fue mayor que el crecimiento con 10% de CO₂. Esta diferencia por parte del otro experimento pudo ser ocasionada por el medio de cultivo utilizado y otras variables como la concentración de nitrógeno presente en el suministro de gas.

En otro estudio realizado por Ge, Liu y Tian. (2011) demostraron que el crecimiento de la microalga *Botryococcus braunii* 765 con 20% CO₂ fue mayor que con una concentración de 10% CO₂. De igual manera, los resultados del estudio concuerdan con los obtenidos con la cepa *Botryococcus braunii* AC755 y *Botryococcus braunii* CCALA777 por Gouveia et al. (2017), donde muestra una concentración de 0.9 g/L y 1.2 g/L, respectivamente con una concentración de 2.5% de CO₂ a los 15 días de cultivo. El crecimiento celular de estos resultados concuerda con el de este estudio, debido a que el mayor crecimiento fue observado en el día 15. Además, Yoo, Jun, Lee, Ahn y Oh. (2010) muestran un bajo rendimiento en la producción de biomasa al cultivar *Botryococcus braunii* por 14 días con una concentración de 10% CO₂, debido al bajo periodo de adaptación al medio de cultivo de *Botryococcus* por lo que muestra una tasa de crecimiento menor. A pesar de su bajo período de adaptación, esta microalga posee grandes cualidades para la producción de biomasa, debido a que algunas cepas han logrado crecer hasta 37 g/L (Wan et al., 2019). En la figura 4 se puede observar el crecimiento celular de la microalga *Botryococcus braunii* obtenido en este experimento, con los diferentes suministros de CO₂.

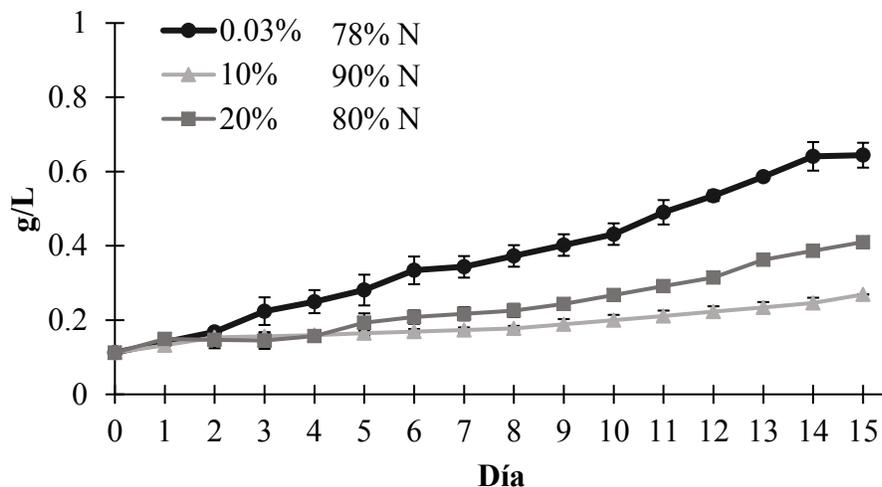


Figura 4. Crecimiento celular de *Botryococcus braunii* con diferentes concentraciones de CO₂

De los resultados obtenidos por los estudios previamente mencionados, se demuestra que la especie *Botryococcus braunii* en los primeros 5 días, se observa un bajo crecimiento celular con los suministros de 10 y 20% CO₂, por lo que se infiere que posee una baja tasa de crecimiento celular afectando en su producción de biomasa. Sin embargo, obtuvo una mayor producción de biomasa en el día 15, por lo que, si el experimento se extendiera a más días, posiblemente se obtendría una mayor producción de biomasa. Además de esto, su crecimiento puede ser inhibido al incrementar el suministro de CO₂. Esto es congruente con el comportamiento observado a través de la curva, en donde se observa que a un mayor suministro de CO₂, el crecimiento y producción de biomasa, se ve afectado.

En cuanto a la microalga *Scenedesmus* sp, los resultados muestran el incremento en la producción de biomasa en concordancia con el aumento en la concentración de CO₂, ya que en el día 15 se obtuvo mayor producción de biomasa (1.95 g/L) al inyectar la concentración de 20% CO₂, seguido de 0.95 g/L para la concentración de 10%, terminando con 0.72 g/L para la concentración de 0.03% de CO₂. Esto se respalda con el estudio realizado por Tang, Han, Li, Miao y Zhong (2011), en donde concluyeron que al cultivar *Scenedesmus obliquus* SJTU-3 se obtendría un mayor crecimiento a medida que la concentración de CO₂ aumentaba del 0,03 al 10%. Sin embargo, al exponer esa cepa a concentraciones de 20 - 50% de CO₂, la producción de biomasa disminuyó. Es de gran importancia destacar que en este estudio se reportó una mayor producción de biomasa (1.95 g/L) con concentraciones menores a 20% de CO₂.

Al demostrar esta capacidad de crecimiento, se demuestra que la microalga *Scenedesmus* sp. tolera altas concentraciones de CO₂ (Figura 5), por lo que puede tener una aplicación potencial para la reducción industrial de CO₂, debido a que la mayoría de las emisiones industriales reportan una concentración de 10 a 20% para este compuesto. En este experimento se logró una tasa de crecimiento de *Scenedesmus* sp. de 0.12 mg/L/día con 0.03 % de CO₂, 0.11 mg/L/día con la inyección de 10% de CO₂ y 0.19 mg/L/día con 20% de CO₂.

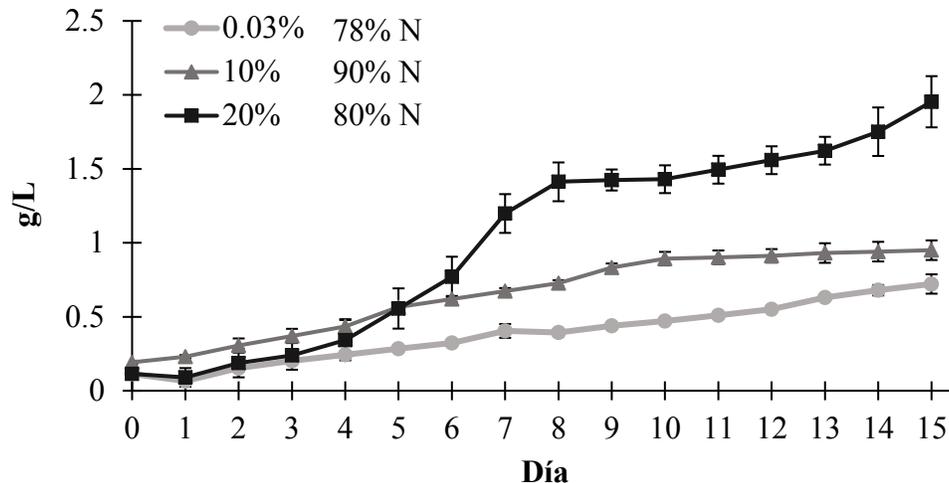


Figura 5. Crecimiento celular de *Scenedesmus* sp. con diferentes concentraciones de CO₂

A partir de los resultados obtenidos, se determinó que la microalga *Scenedesmus* sp es la especie que presenta un mayor crecimiento al incrementar la concentración de CO₂ suministrado. Por otra parte, la microalga *Botryococcus braunii*, mostró un menor crecimiento mientras aumentaba el porcentaje de suministro de CO₂. Esto no indica que esta cepa, no pueda crecer en altas concentraciones de CO₂, si no que debido a que su tasa de crecimiento es más lenta, el tiempo de adaptación a estas condiciones se extiende por un mayor período de tiempo y no puede asimilar la misma cantidad de CO₂. Posiblemente, al incrementar el periodo de análisis, los resultados serían diferentes. Por el momento, la mejor alternativa de producción de biomasa bajo las distintas concentraciones de CO₂ es *Scenedesmus* sp. por su alta tasa de crecimiento y su rápida adaptación bajo estas condiciones.

Evaluación de la eficiencia de remoción de CO₂

La dependencia de las especies en la eficiencia de la eliminación o captura de CO₂ puede deberse a las condiciones fisiológicas de las microalgas, como el potencial de crecimiento celular y la capacidad del metabolismo del CO₂ (Chiu et al., 2008). Además, la eficiencia de la eliminación o captura de CO₂ en un sistema de cultivo cerrado depende de las especies de microalgas, la concentración de CO₂, el diseño del fotobiorreactor y las condiciones de funcionamiento (Razzak, Hossain, Lucky, Bassi y De Lasa, 2013). Hay poca comprensión de las respuestas y los mecanismos de una especie de microalgas tolerantes a estas condiciones.

No existe un análisis completo de los mecanismos de aclimatación molecular a la alta concentración de CO₂ para una especie de microalgas tolerantes. Sin embargo, Guo, Yang y Tang. (2017) demostraron que algunas microalgas, cuando se exponen a concentraciones elevadas de CO₂, producen metabolitos. Estos podrían servir como tampón potencial para compensar la acidificación del ambiente citosólico provocada por el aporte de CO₂, mejorando así el crecimiento de las microalgas.

Adicionalmente, la fisiología celular de las microalgas se ajusta a las altas concentraciones de CO₂ mediante la producción de metabolitos involucrados en el metabolismo del carbono, de los

aminoácidos y de los lípidos, así como metabolismo de cofactores y vitaminas, metabolismo energético, transportadores, biosíntesis de aminoácidos tRNA, y biosíntesis de otros metabolitos secundarios (Guo et al., 2017).

En el cuadro 2 se muestra la eficiencia de remoción de CO₂ en los cultivos de las microalgas *Botryococcus braunii* y *Scenedesmus* sp. con las concentraciones de 10 y 20% de CO₂. Estos valores mostrados son un promedio del triplicado de cada concentración. Ambas microalgas demostraron una disminución en la eficiencia de remoción de CO₂ cuando el suministro de 10% CO₂ aumentó a 20% CO₂. Este mismo comportamiento se ha visto en otras investigaciones, en donde, al incrementar la concentración de CO₂ en el medio de cultivo, se reduce la captura de CO₂ de las microalgas (Jaimes y Kafarov, 2015). Esta disminución pudo ocurrir debido al estrés al que son sometidas las microalgas con el aumento de la concentración de CO₂.

Cuadro 2. Porcentaje de remoción total de CO₂ de *Botryococcus braunii* y *Scenedesmus* sp.

Microalgas				
Días	<i>Botryococcus braunii</i>		<i>Scenedesmus</i> sp	
	10% CO ₂	20% CO ₂	10% CO ₂	20% CO ₂
5	3.09 ± 2.00	20.70 ± 0.21	5.49 ± 2.12	1.36 ± 0.58
10	1.43 ± 1.08	7.88 ± 2.85	3.65 ± 1.11	5.06 ± 0.53
15	6.78 ± 3.58	3.73 ± 0.74	6.60 ± 3.49	3.82 ± 1.71

De acuerdo con los datos obtenidos en la investigación, el tratamiento de la cepa *Botryococcus braunii* con inyección de CO₂ al 10% muestra que en el día 15 se alcanza una mayor eficiencia de remoción total de CO₂ con un valor de 6.78%. En cambio, con la concentración de 20% CO₂ la mayor eficiencia de remoción se observó en el día 5, con 20.70%. Sin embargo, este valor disminuye hasta 3.73% en el día 15. Esta reducción de acuerdo a Song et al. (2019) puede deberse a la baja solubilidad de CO₂ en el medio de cultivo. Se determinó que con una menor solubilidad de CO₂, las microalgas tendrán menor fijación de CO₂ (Chiu et al., 2009), debido a la capacidad de tolerancia al CO₂ de la cepa de microalga con la que se esté trabajando, y, sobre todo, a su tasa de crecimiento y adaptabilidad. Al contar con una tasa de crecimiento alta, la remoción de CO₂ será mucho más eficiente en comparación con una microalga con una tasa de crecimiento baja, ya que esta no tiene la capacidad de adaptarse a estas condiciones, estresándose y afectando su crecimiento y producción de biomasa.

En el estudio realizado por de Morais y Costa (2007) se obtuvieron eficiencias de remoción entre 4.39 y 8.63% con una concentración de 12% CO₂ después de 20 días de cultivo. Estos datos son similares a los encontrados en este estudio con respecto al suministro de 10% CO₂ por lo que se demuestra que a una alta concentración de CO₂, la microalga reduce su crecimiento y afecta su remoción.

De acuerdo con los datos obtenidos, la remoción de *B. braunii* no concuerda con la curva de crecimiento, ya que se reporta una mayor producción de biomasa al suministrar aire con 0.03% de CO₂. Sin embargo, se observó una mayor remoción con el suministro de 20% CO₂ en el día 5,

alcanzando una remoción del 20% del gas suministrado, valor que disminuyó en días posteriores. Esta situación puede deberse a las fluctuaciones que se tienen en el tiempo, además de la capacidad de adaptabilidad que posee la microalga. A esta especie, no se le había aplicado un suministro de CO₂ tan alto, por lo que se infiere, que, si esta cepa es sometida a varios ciclos de cultivo con el mismo suministro continuo, la capacidad de remoción podría mejorar. Esto dado que mientras más tiempo *Botryococcus* se encuentre expuesta al gas, puede producir más las enzimas necesarias para captar el CO₂ de manera eficiente.

En cuanto a *Scenedesmus*, los datos obtenidos de la remoción tampoco son congruentes con la curva de crecimiento, ya que se registró la mayor remoción, correspondiente al 6.60% del gas suministrado, al suplir una concentración de 10% CO₂ en el día 15. Estos resultados son opuestos a los obtenidos al operar a una concentración de 20% del CO₂ tal y como se muestra en el cuadro 2. Por ello se determinó que, en esta cepa, no se obtuvo una dilución correcta del CO₂ en el medio de cultivo, debido al gran crecimiento que este poseía y esto puede ser la causa de estos cambios. Además, una sobresaturación del gas, por lo que la cepa no pudo remover de forma eficiente el CO₂ con esta concentración. De lo anterior se estima que el crecimiento celular de *Scenedesmus* sp. se encuentra directamente relacionado con la remoción de CO₂ cuando este es suministrado en bajas cantidades. Al dosificar una cantidad de CO₂ excesiva, disminuye la remoción de CO₂ debido a que en el día 15 se obtuvieron 0.95 g/L para 10% de CO₂ y 1.95 g/L para la concentración de 20% CO₂.

Los estudios realizados por Guo et al. (2019) concuerdan con estos estudios, debido a que el mismo comportamiento ha sido observado cuando se ha aumentado la concentración de CO₂. En ellos la eficiencia de remoción por parte de las microalgas, se reduce y aumenta el porcentaje de biomasa. No existe un análisis exhaustivo de los mecanismos de aclimatación molecular a altas concentraciones de CO₂ para una especie de microalgas tolerante. Sin embargo, esto puede deberse a que ocurre una saturación de CO₂ y este no se encuentra disponible para las microalgas.

La especie *Botryococcus braunii* presentó una mayor eficiencia en la captura de CO₂ con el suministro de 20% en el día 5, obteniendo una remoción de (20.70%). Por otra parte, *Scenedesmus* sp., presentó una mayor eficiencia de remoción con el suministro de 10% en el día 15, obteniendo una remoción de (6.60%). Por ello se estipula, que, como ambas cepas no pasaron por un período de adaptabilidad, la capacidad de remoción de CO₂ se vio afectada.

Si ambas microalgas hubieran sido sometidas a más de dos ciclos de cultivo con los mismos suministros, la capacidad de remoción mejoraría, debido a que la capacidad de remoción mejora a través del tiempo, una vez estas se encuentren adaptadas. Dado que esta investigación es un estudio exploratorio para verificar la influencia que tiene el CO₂ con ambas cepas, por costos, no se pudo realizar previamente la adaptación de estas cepas bajo esos suministros de CO₂ y por la misma razón solo se realizaron tres lecturas por triplicado.

Evaluación de la composición de la biomasa cosechada en los tratamientos aplicados

La biomasa cosechada se presenta de mayor, a menor en cuanto a la producción de macronutrientes obtenidos por cada especie. Para esto, se muestra inicialmente la producción de *B. braunii*, finalizando con la producción de *Scenedesmus* sp. durante los 15 días de cultivo.

Carbohidratos totales en la solución del cultivo de *B. braunii*. Esta especie produjo una mayor concentración de carbohidratos con la concentración de 0.03% de CO₂. Este contenido total de carbohidratos luego de 15 días fue de 366, 100 y 150 mg/L para las concentraciones de 0.03, 10 y 20% CO₂ respectivamente.

Los resultados de este estudio en cuanto a la producción de carbohidratos totales concuerdan con los datos obtenidos por Dayananda et al. (2007) en donde se logró un crecimiento de *Botryococcus braunii* con luz y agitación continua, alcanzando la producción de 300 a 700 mg/L de carbohidratos en la biomasa final, con un suministro de 0.03% CO₂. Esta producción se encuentra directamente relacionada con el crecimiento celular, pero no con la remoción de CO₂. Esto se debe a que esta cepa, cuenta con un tiempo de adaptación muy largo, por lo que mientras se aumenta el suministro de CO₂, la producción de carbohidratos se ve afectada por el estrés al que se encuentra sometida la cepa por la sobresaturación de CO₂. Esto es interesante, porque en otros estudios realizados (Abdel-Hamid, Abdel-Aal y Abdel-Mogib, 2019; Gouveia et al., 2017; Ruangsomboon, Prachom y Sornchai, 2017; Yildiz-Ozturk y Yesil-Celiktas, 2017), se obtuvo una mayor concentración de carbohidratos de la microalga *B. braunii* con un suministro de 20% CO₂ que con un suministro de 10% de CO₂. A continuación, en la figura 6 se puede observar la producción de carbohidratos de la microalga *Botryococcus braunii* obtenida en este experimento, con los diferentes suministros de CO₂.

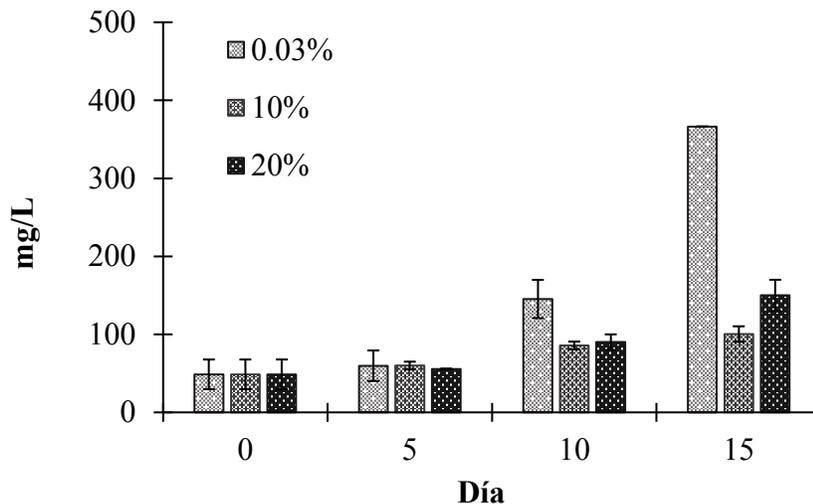


Figura 6. Producción de carbohidratos de *B. braunii* con diferentes concentraciones de CO₂

Contenido total de lípidos en la solución del cultivo de *B. braunii*. Todas las unidades experimentales alcanzaron la mayor producción de lípidos en el día 15 en donde se registró la mayor concentración de lípidos con un menor suministro de CO₂, valor que es congruente con los resultados de crecimiento celular y la producción de carbohidratos. De acuerdo al hallazgo, si la microalga, se mantiene con una aireación de 0.03% CO₂ (el aire presente en el ambiente), produce más cantidad de lípidos. Esto, dado que, con ese porcentaje, es capaz de absorber el CO₂ presente sin imponer una inhibición severa sobre su crecimiento celular y producción de lípidos (Figura 7).

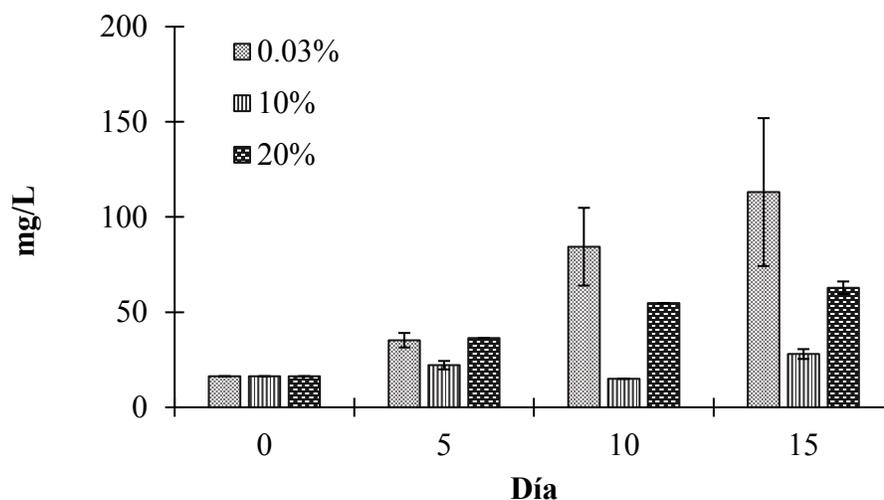


Figura 7. Producción de lípidos de *B. braunii* con diferentes concentraciones de CO₂

Contenido total de proteínas en la solución del cultivo de *B. braunii*. En el caso de la producción total de proteína generada por esta especie, su concentración mejoró cuando esta microalga fue alimentada con 0.03% de CO₂. El contenido de proteína en la biomasa de *B. braunii* al día 15 de incubación fue de 84, 60 y 69 mg/L a una concentración de alimento de 0.03, 10 y 20% de CO₂, respectivamente. En esta investigación se demostró que la biomasa obtenida al ser cultivada con 0.03% de CO₂ contiene mayor concentración de proteínas, además en esta misma concentración de CO₂ se obtuvo un mayor crecimiento celular y producción de lípidos y carbohidratos, por lo que se tiene una relación directa del crecimiento celular y la producción de micronutrientes en la biomasa.

Estos resultados en cuanto a producción de proteína con una baja concentración de CO₂ se asemejan a los que obtuvieron Dayananda et al. (2007). En su investigación, se cultivó *Botryococcus braunii* con una agitación continua y una concentración de 0.03% CO₂ obteniendo en sus diferentes unidades experimentales de 60 a 160 mg/L de proteína en la biomasa generada. Esto demostró que, con una concentración de 0.03% de CO₂, se obtiene una mejora en el contenido de proteína en el día 15. Esta producción se dio debido a las condiciones del medio de cultivo, la fisiología de la microalga, la resistencia a condiciones de estrés, la iluminación continua, pero particularmente porque esta cepa tiene una mejor tasa de crecimiento con el aire presente en el ambiente. En la figura 8, se puede observar la producción de proteínas de la microalga *Botryococcus braunii* obtenida en este experimento, con los diferentes suministros de CO₂.

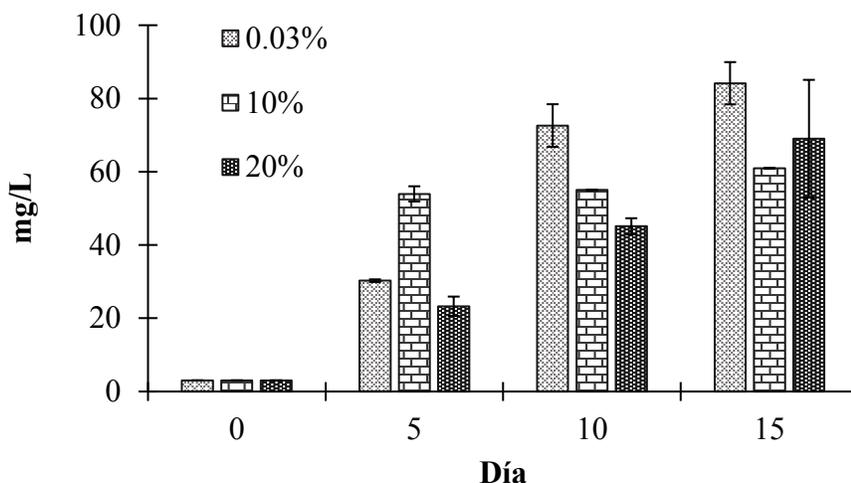


Figura 8. Producción de proteínas de *B. braunii* con diferentes concentraciones de CO₂

Con los datos obtenidos, se puede identificar que existe una relación directa entre el crecimiento celular y la producción de proteínas, debido a que ambas fueron mayores con el suministro de 0.03% CO₂. Sin embargo, estas, no se encuentran relacionadas con la remoción de CO₂, debido a que obtuvo una mayor remoción con el suministro de 20% CO₂. Esto se debe a que un mayor suministro de CO₂ inhibe el crecimiento de esta cepa, afectando en su producción. Se obtuvo una mayor remoción en el día 5 con el suministro de 20%, porque este, en un inicio se encontraba disponible para las microalgas, y después ocurrió una sobre dosificación que afectó en la remoción, crecimiento y producción de proteínas.

Carbohidratos totales en la solución del cultivo de *Scenedesmus* sp. En cuanto al contenido de carbohidratos por parte de los cultivos de esta especie se obtuvo una mayor producción de estos con 20% CO₂ por lo que se encuentra directamente relacionado con el crecimiento celular. El contenido total de carbohidratos de *Scenedesmus* fue de 220, 259 y 444 mg/L para la concentración de 0.03, 10 y 20% CO₂ respectivamente. Esto se debe a que el incremento del CO₂, estimula el crecimiento celular, y la producción de carbohidratos para esta especie debido a que esta cepa tiene un gran potencial de adaptabilidad y crecimiento bajo estas condiciones. A continuación, en la figura 9, se puede observar la producción de carbohidratos de la microalga *Scenedesmus* sp obtenida en este experimento, con los diferentes suministros de CO₂.

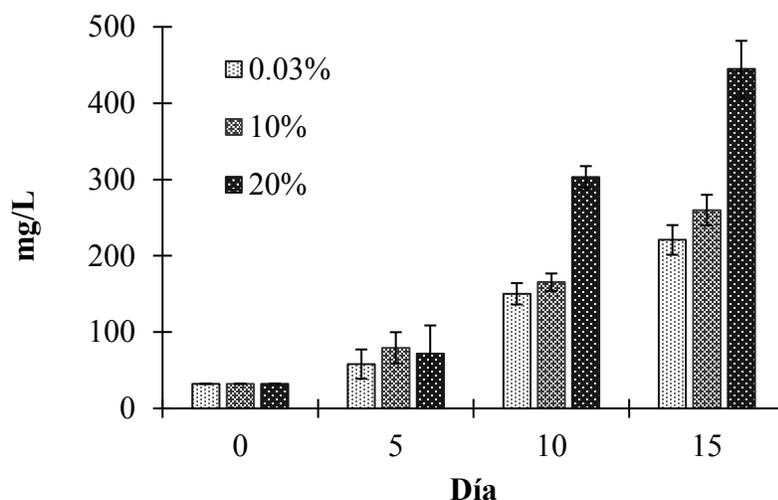


Figura 9. Producción de carbohidratos de *Scenedesmus sp.* con diferentes concentraciones de CO₂

A partir de los resultados obtenidos, se identificó que ambas microalgas poseen gran potencial para la producción de carbohidratos, siempre y cuando se mantengan bajo las condiciones de luz (80 μmol fotones) en el caso de ambas microalgas. También se debe tener un suministro de 200 ml/min, en el caso de *Scenedesmus sp* con 20% CO₂, y para el caso de *Botryococcus braunii* con el mismo suministro, pero con el aire presente en el ambiente (0.03%).

Contenido total de lípidos en la solución del cultivo de *Scenedesmus sp.* En cuanto al contenido de lípidos, los cultivos de esta especie, se obtuvo una concentración de lípidos baja en el triplicado donde se suministró CO₂ al 10% (22.43 - 90.85 mg/L). Además, la concentración máxima de lípidos se obtuvo en los experimentos con 20% de CO₂, alcanzando una concentración máxima de 350.55 mg/L al día 15, lo que indica que la producción de lípidos se encuentra relacionada directamente con el crecimiento celular y la producción de carbohidratos con el mismo suministro de CO₂.

En un estudio realizado por Tang et al. (2011), obtuvieron que la mayor producción de lípidos por la microalga *Scenedesmus obliquus*, bajo seis concentraciones de CO₂, ocurrió con 50% de CO₂, obteniendo 24.4 mg/L. Esto a diferencia de las demás concentraciones, que generaron 15.15 mg/L con 0.03% de CO₂, 16.45 mg/L con 5% de CO₂, 19.25 mg/L con 10% de CO₂, 19.85 mg/L con 20% de CO₂, 19.90 mg/L con 30% de CO₂, y, finalmente con la mayor producción de 24.4 mg/L, con 50% de CO₂. Esto demuestra que el crecimiento celular, y la producción de lípidos, se encuentran directamente relacionados, además de que *Scenedesmus* presenta un mayor crecimiento con el suministro de 20% CO₂.

De manera similar a *B. braunii*, la producción de lípidos en *Scenedesmus sp.* se ve afectada por la concentración de nitrógeno en el medio, es decir, los medios de cultivo con falta de nitrógeno mejoran la producción de lípidos (Ho, Chen y Chang, 2012). Por ello mientras en el medio de cultivo exista un suministro de nitrógeno disponible para las microalgas, el suministro de CO₂ no

se verá afectado en su producción. *Scenedesmus* sp. presenta diferentes valores en la producción de lípidos, dependiendo de las concentraciones de CO₂ que se le fue suministrado (Figura 10).

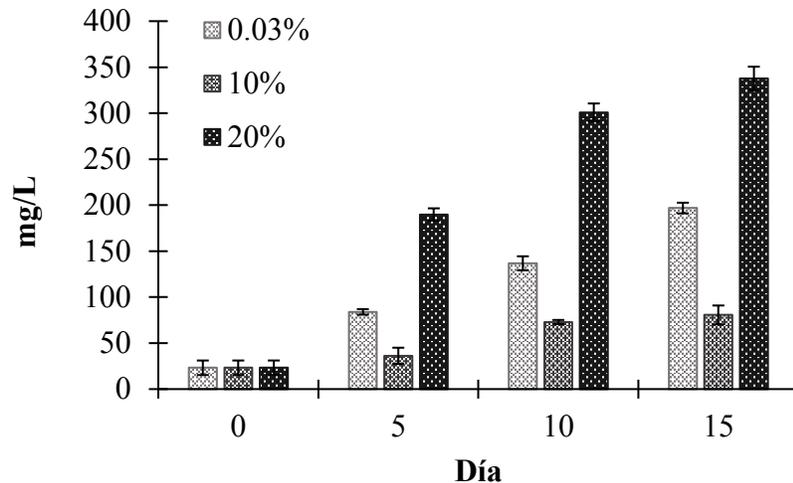


Figura 10. Producción de lípidos de *Scenedesmus* sp. con diferentes concentraciones de CO₂

Tanto *Botryococcus braunii* como *Scenedesmus* sp han reportado un excelente potencial para la producción de lípidos, con la diferencia de que la primera tiene una producción más alta con el CO₂ presente en el ambiente (0.03%) y la segunda presenta una mayor producción con el suministro de 20% CO₂. La producción de lípidos para ambas especies se encuentra directamente relacionada con el crecimiento celular, por lo que, a mayor crecimiento, mayor producción de lípidos se obtendrá. Por otra parte, esta variable no se encuentra relacionada con su potencial de remoción de CO₂, debido a las características de la especie.

Contenido total de proteínas en la solución del cultivo de *Scenedesmus* sp. En el caso del total de proteínas por parte de esta especie, se demuestra un mejor rendimiento y producción con 20% CO₂. El contenido de proteínas en la en el día 15 fue de 84, 150 y 259 mg/L a una concentración de suministro de 0.03, 10 y 20% de CO₂, respectivamente. Estos datos de mayor producción de proteínas entre los días 10 y 19 son similares a los obtenidos por Kim, Choi, W. Lee y Lee. (2013) donde demostraron que se obtiene una mayor producción total de proteínas entre los días 10 y 19 de incubación, alcanzando entre 221.4 a 254.2 mg/L de proteína, respectivamente.

Este aumento en la producción de proteína se encuentra directamente relacionado con el crecimiento celular, producción de lípidos y carbohidratos, debido a que la fuente de carbono tanto para el crecimiento y producción es proporcionado a través del CO₂ que se encuentra disuelto en el cultivo. En comparación con este estudio, los resultados obtenidos son más bajos en la producción total de proteína, sin embargo, lo anterior puede deberse a que la tasa de entrada de CO₂ utilizada en este estudio fue de 10 a 20 veces mayor. Por ello, estos resultados indican que *Scenedesmus* aun siendo una cepa que tolera el CO₂, puede verse afectada en cuanto a producción con desmesuradas concentraciones de CO₂. En la figura 11 se puede observar la producción de proteínas de la microalga *Scenedesmus* sp obtenida en este experimento, con los diferentes suministros de CO₂.

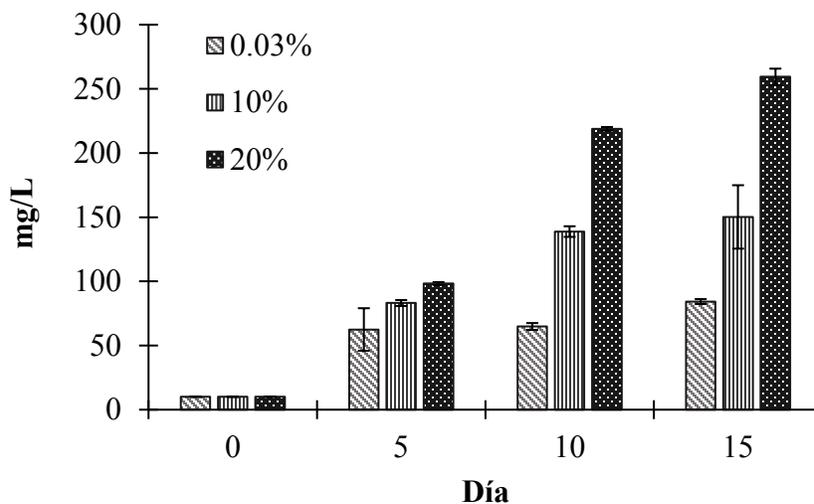


Figura 11. Producción de proteínas de *Scenedesmus* sp. con diferentes concentraciones de CO₂

Con los datos obtenidos se confirmó que la producción de proteínas depende de la cepa de microalga, su fisiología y las condiciones del medio de cultivo. Por los datos obtenidos, la microalga *Scenedesmus* sp es la mejor alternativa para la producción de proteína cultivada con un suministro de 10 y 20% CO₂. Se puede identificar que existe una relación directa entre el crecimiento celular y la producción de proteínas, lípidos y carbohidratos debido a que se obtuvieron mayores producciones de macronutrientes y crecimiento celular con el suministro de 20% CO₂, sin embargo, estas, no se encuentran relacionadas con la remoción de CO₂. Debido a una dosificación en exceso, el CO₂ no fue aprovechado por la microalga resultando en una baja remoción al compararlo con el suministro de 10% CO₂.

Para ambas cepas, la curva de crecimiento celular, producción de lípidos, proteínas y carbohidratos, se encuentran directamente relacionadas, debido a que las muestras fueron analizadas en solución, estos valores pueden ser diferentes, cuando los resultados se vean asociados con la biomasa seca. Por otra parte, no se encontró relación entre remoción de CO₂ y el crecimiento celular o producción de biomasa, debido principalmente a que el suministro de CO₂ fue muy alto y este no pudo ser asimilada por ambas microalgas, dando como resultado una sobresaturación.

4. CONCLUSIONES

- La influencia en el incremento de la concentración de CO₂ inyectado se encuentra asociado a la especie de microalga utilizada, obteniendo una tasa de crecimiento de *Scenedesmus* sp de 0.19 mg/L/día con el suministro de 20% CO₂, y una tasa de crecimiento de *Botryococcus braunii* de 0.12 mg/L/día con el suministro de 0.03% de CO₂.
- Ambas cepas poseen una relación directa entre el crecimiento celular y la producción de componentes como lípidos, proteínas y carbohidratos, pero su desempeño varía en función de la concentración de CO₂ suministrada. En el caso de *Botryococcus braunii* se obtuvo una mayor producción de componentes y crecimiento celular con el suministro de 0.03% de CO₂ y *Scenedesmus* con el suministro de 20% CO₂.
- En este experimento no se encontró una relación directa entre el crecimiento celular y la remoción de CO₂ debido a que *Botryococcus braunii* obtuvo un mayor crecimiento con el suministro de 0.03% CO₂ y una mayor remoción con el suministro de 20%. Por otra parte, *Scenedesmus* sp. obtuvo un mayor crecimiento con el suministro de 20% CO₂ y una mayor remoción con el suministro de 10% CO₂.

5. RECOMENDACIONES

- Prolongar el experimento más de 15 días, para obtener datos más exactos acerca de la producción de proteínas, lípidos y carbohidratos de las diferentes cepas con las dos diferentes concentraciones de CO₂ (10 y 20%).
- Hacer el uso de las microalgas *Scenedesmus* sp. y *Botryococcus braunii* para la captura de CO₂, debido a que se adaptan a concentraciones muy diferentes y se les puede dar un uso adecuado bajo las distintas condiciones y concentraciones de CO₂.
- Replicar este tipo de estudios comparando más de dos microalgas con diferentes suministros de CO₂, para determinar la capacidad de biocaptura y la productividad de proteínas, lípidos y carbohidratos, con el fin de encontrar la mejor y así afrontar problemas ambientales con respecto a las emisiones de CO₂.
- Realizar análisis más específicos que podrían explicar a más profundidad el proceso de remoción de CO₂ de las microalgas en sus diferentes etapas de crecimiento y explicar los comportamientos biológicos de la relación crecimiento y remoción de CO₂.
- Realizar investigaciones adicionales que respalden el uso de las microalgas *Botryococcus braunii* y *Scenedesmus* sp. para contrarrestar las emisiones de concentraciones altas de CO₂.

6. LITERATURA CITADA

- Abdel-Hamid, M. I., Abdel-Aal, E. I. y Abdel-Mogib, M. (2019). Isolation and characterization of new *Botryococcus braunii* (Trebouxiophyceae) isolates. *Renewable Energy*, 141, 782–790. doi: org/10.1016/j.renene.2019.04.048
- Arévalo-Gallegos, A., Garcia-Pérez, J. S., Carrillo-Nieves, D., Ramírez-Mendoza, R. A., Iqbal, H. M. y Parra-Saldívar, R. (2018). *Botryococcus braunii* as a bioreactor for the production of nanoparticles with antimicrobial potentialities. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 5591–5604. doi: org/10.2147/IJN.S174205
- Astacondor, M., Mayta-Huatuco, E., Montoya-Terrerros, H. y Tarazona-Delgado, R. (2017). Crecimiento Poblacional y Productividad de la Microalga Nativa *Chlorella peruviana* bajo Diferentes Salinidades. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 28(4), 976-986. doi: org/10.15381/rivep.v28i4.13004
- Barahoei, M., Hatamipour, M. S. y Afsharzadeh, S. (2020). Captura de CO₂ por *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor de columna de burbujas; Efecto del tamaño de la burbuja sobre la eliminación de CO₂ y la tasa de crecimiento. *Journal of CO₂ Utilization*, 37, 9–19.
- Cabanelas, I. T. D., Marques, S. S. I., de Souza, CO., Druzian, J. I. y Nascimento, I. A. (2015). *Botryococcus*, what to do with it? Effect of nutrient concentration on biorefinery potential. *Algal Research*, 11, 43–49. doi: org/10.1016/j.algal.2015.05.009
- Calderón, N. D., Bayona, K. C. y Garcés, L. (2018). Immobilization of the green microalga *Botryococcus braunii* in polyester wadding: Effect on biomass, fatty acids, and exopolysaccharide production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14, 80-70
- Chiu, S. Y., Kao, C. Y., Chen, C. H., Kuan, T. C., Ong, S. C. y Lin, C. S. (2008). Reducción de CO₂ mediante cultivo de alta densidad de *Chlorella* sp. en un fotobiorreactor semicontinuo. *Bioresource Technology*, 99(9), 3389–3396.
- Chiu, S. Y., Kao, C. Y., Tsai, M. T., Ong, S. C., Chen, C. H. y Lin, C. S. (2009). Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. *Bioresource Technology*, 100(2), 833–838. doi: org/10.1016/j.biortech. 2008.06.061
- Cloete, S., Giuffrida, A., Romano, M. y Zaabout, A. (2019). The swing adsorption reactor cluster for post-combustion CO₂ capture from cement plants. *Journal of Cleaner Production*, 223, 692–703. doi: https: org/10.1016/j.jclepro.2019.03.109
- Dayananda, C., Sarada, R., Rani, M., Shamala, T. y Ravishankar, G. (2007). Autotrophic cultivation of *Botryococcus braunii* for the production of hydrocarbons and exopolysaccharides in various media. *Biomass and Bioenergy*, 31(1), 87–93. doi: org/10. 1016/j.biombioe.2006. 05.001
- De Moraes, M. G. y Costa, J. A. V. (2007). Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology*, 129(3), 439–445. doi: org/10.1016/j.jbiotec.2007.01.009
- Díaz, A. P. y Restrepo, R. (2013). Empleo de las microalgas en la fijación del CO₂ presente en los gases de chimenea de equipos industriales de combustión en Colombia. *ITECKNE*, 8(1).

doi: org/10.15332/iteckne.v8i1.258.

- Fulke, A., Kannan, K., Chakrabarti, T. y Devi, S. (2014). CO₂ Sequestration by Microalgae: Advances and Perspectives.
- Ge, Y., Liu, J. y Tian, G. (2011). Growth characteristics of *Botryococcus braunii* 765 under high CO₂ concentration in photobioreactor. *Bioresource Technology*, 102(1), 130–134. doi: org/10.1016/j.biortech.2010.06.051
- Gouveia, J. D., Ruiz, J., van den Broek, L. A., Hesselink, T., Peters, S., Kleinegris, D. M. y Wijffels, R. H. (2017). *Botryococcus braunii* strains compared for biomass productivity, hydrocarbon and carbohydrate content. *Journal of Biotechnology*, 248, 7786. doi: org/10.1016/j.jbiotec.2017.03.008
- Guo, C., Duan, D., Sun, Y., Han, Y. y Zhao, S. (2019). Enhancing *Scenedesmus obliquus* biofilm growth and CO₂ fixation in a gas-permeable membrane photobioreactor integrated with additional rough surface. *Algal Research*, 43, 101620. doi:org/10.1016/j.algal.2019.101620
- Guo, Y., Yang, F. y Tang, X. (2017). An Overview of Protein Secretion in Yeast and Animal Cells. En: Jiang, L. (Edits.) Plant Protein Secretion (pp. 1-17). Humana Press, New York, NY. doi: org/10.1007/978-1-4939-7262-3_1
- Guo, Y., Yuan, Z., Xu, J., Wang, Z., Yuan, T., Zhou, W. y Liu, S. (2017). Metabolic acclimation mechanism in microalgae developed for CO₂ capture from industrial flue gas. *Algal Research*, 26(2), 225–233. doi: org/10.1016/j.algal.2017.07.029
- Gutierrez, A., Santa Cruz, C. y Barrantes-Bustinza, I. (2002). Bioquímica: Determinación de lípidos totales.
- Ho, S. H., Chen, C. Y. y Chang, J. S. (2012). Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource Technology*, 113, 244–252. doi: org/10.1016/j.biortech.2011.11.133
- Idrissi, E., Mohamed, B., Mohammed, A. M. y Lotfi, A. (2003). Growth performance and biochemical composition of nineteen microalgae collected from different Moroccan reservoirs. *Mediterranean Marine Science*, 4, 57–66
- Jain, R., Urban, L., Balbach, H. y Webb, M. (2012). Contemporary Issues in Environmental Assessment. In Handbook of Environmental Engineering Assessment (361–447). Elsevier. doi: org/10.1016/b978-0-12-388444-2.00013-0
- Jaimés, N. y Kafarov, V. (2015). Desarrollo preliminar de una metodología de suministro de CO₂ a cultivos de *Botryococcus Braunii* para la producción de biocombustibles. *Revista ION*, 28 (2), 33–50. doi: org/10.18273/revion.v28n2-2015003
- Jiang, N., Shen, Y., Liu, B., Zhang, D., Tang, Z., Li, G. y Fu, B. (2019). CO₂ capture from dry flue gas by means of VPSA, TSA and TVSA. *Journal of CO₂ Utilization*. doi: org/10.1016/j.jcou.2019.09.012
- Kim, G., Choi, W., Lee, C. y Lee, K. (2013). Enhancement of dissolved inorganic carbon and carbon fixation by green alga *Scenedesmus* sp. in the presence of alkanolamine CO₂ absorbents. *Biochemical Engineering Journal*, 78, 18–23. doi:org/10.1016/j.bej.2013.02.

- Lizano B. (2013). Calentamiento global: "La máxima expresión de la civilización petrolífera".
Revista Del CESLA. *International Latin American Studies Review*, (16), 35–68.
- López-Bautista, L. A. y Flores-Tlacuahuac, A. (2020). Optimization of the amines-CO₂ capture process by a nonequilibrium rate-based modeling approach. *AIChE Journal*, 66(6), e 16978 doi: org/10.1002/aic.16978
- López-Legarda, X., Taramuel-Gallardo, A. y Arboleda, C. (2017). Comparison of methods using sulfuric acid for determination of total sugars. *Revista Cubana Quím*, 29(2), 180–198.
- López-Pacheco, I. Y., Carrillo-Nieves, D., Salinas-Salazar, C., Silva-Nuñez, A., Arévalo-Gallegos, A., Barceló, D. y Parra-Saldívar, R. (2019). Combination of Nejayote and Swine Wastewater as a Medium for *Arthrospira maxima* and *Chlorella vulgaris* Production and Wastewater Treatment. *Science of the Total Environment* 676, 356-367.
- Martínez, G. L. (2009). Eliminación de CO₂ con microalgas autóctonas (Doctoral dissertation, Universidad de León).
- Marella, T. K., López-Pacheco, I. Y., Parra-Saldívar, R., Dixit, S. y Tiwari, A. (2020). Wealth from waste: Diatoms as tools for phycorremediation of wastewater and for obtaining value from the biomass. *Science of the Total Environment* 724.
- Mishra, S. K., Suh, W. I., Farooq, W., Moon, M., Shrivastav, A., Park, M. S. y Yang, J. (2014). Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresource Technology*, 155, 330–333. doi: org/10.1016/j.biortech.2013.12.077
- Msanne, J., Polle, J. y Starkenburg, S. (2020). An assessment of heterotrophy and mixotrophy in *Scenedesmus* and its utilization in wastewater treatment. *Algal Research*, 48, 101911. doi: org/10.1016/j.algal.2020.101911
- Razzak, S. A., Hossain, M. M., Lucky, R. A., Bassi, A. S. y De Lasa, H. (2013). Integrated CO₂ capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing - A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 622–653. doi:org/10.1016/j.rser.2013.05.063
- Rocha, D. N., Martins, M. A., Soares, J., Vaz, M. G., de Oliveira Leite, M., Covell, L. y Mendes, L. B. (2019). Combination of trace elements and salt stress in different cultivation modes improves the lipid productivity of *Scenedesmus* spp. *Bioresource Technology*, 289, 121644. doi: org/10.1016/j.biortech.2019.121644
- Ruangsomboon, S., Prachom, N. y Sornchai, P. (2017). Enhanced growth and hydrocarbon production of *Botryococcus braunii* KMITL 2 by optimum carbon dioxide concentration and concentration-dependent effects on its biochemical composition and biodiesel properties. *Bioresource Technology*, 244, 1358–1366. doi: org/10.1016/j.biortech.2017.06.042
- Sánchez, L. y Reyes, O. (2015). Medidas de adaptación y mitigación frente al cambio climático en América Latina y el Caribe: Una revisión general.
- Sandoval, H. J. y Rubio, F. D. (2017). Uso potencial de microalgas para mitigar los efectos de las emisiones de dióxido de carbono. *Revista de investigación*, 10(2), 153–164.

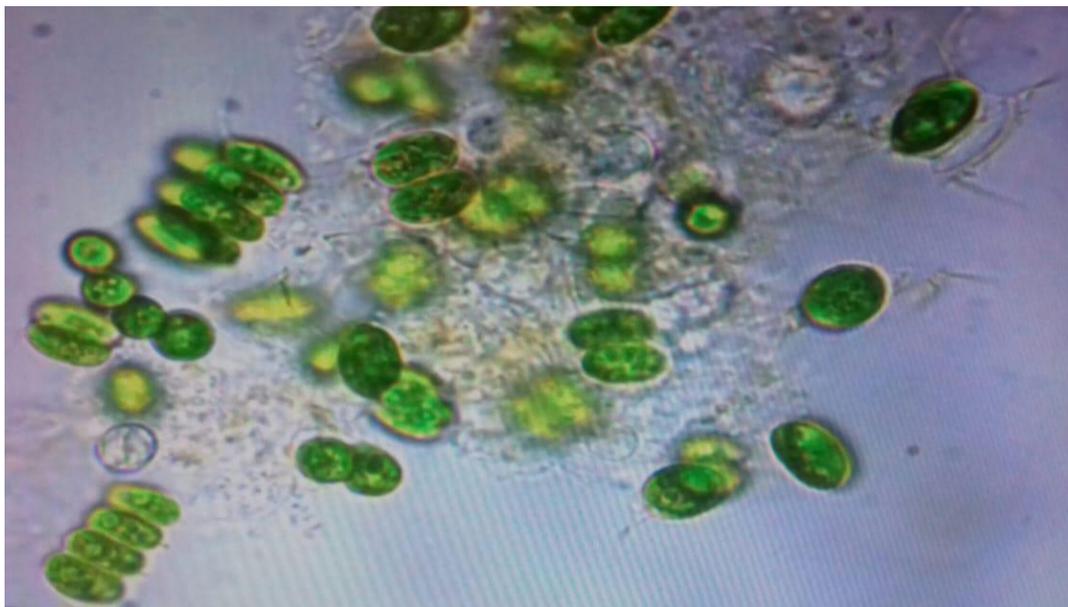
- Sayedin, F., Kermanshahi-pour, A., He, Q. S., Tibbetts, S. M., Lalonde, C. G. y Brar, S. K. (2020). Microalgae cultivation in thin stillage anaerobic digestate for nutrient recovery and bioproduct production. *Algal Research*, 47, 101867. doi: org/10.1016/j.algal.2020.101867
- Song, C., Xie, M., Qiu, Y., Liu, Q., Sun, L., Wang, K. y Kansha, Y. (2019). Integration of CO₂ absorption with biological transformation via using rich ammonia solution as a nutrient source for microalgae cultivation. *Energy*, 179, 618–627. doi: org/10.1016/j.energy.2019.05.039
- Tang, D., Han, W., Li, P., Miao, X. y Zhong, J. (2011). CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. *Bioresource Technology*, 102(3), 3071–3076. doi: org/10.1016/j.biortech.2010.10.047
- Wan, M., Zhang, Z., Wang, R., Bai, W., Huang, J., Wang, W. y Li, Y. (2019). High-yield cultivation of *Botryococcus braunii* for biomass and hydrocarbons. *Biomass and Bioenergy*, 131, 105399. doi: org/10.1016/j.biombioe.2019.105399
- Yang, I. S., Salama, E. S., Kim, J. O., Govindwar, S. P., Kurade, M. B., Lee, M. y Jeon, B. H. (2016). Cultivation and Harvesting of Microalgae in Photobioreactor for Biodiesel Production and Simultaneous Nutrient Removal. *Energy Conversion and Management* 117:54–62
- Yildiz-Ozturk, E. y Yesil-Celiktas, O. (2017). Supercritical CO₂ extraction of hydrocarbons from *Botryococcus braunii* as a promising bioresource. *The Journal of Supercritical Fluids*, 130, 261–266. doi: org/10.1016/j.supflu.2017.06.019
- Yoshimura, T., Okada, S. y Honda, M. (2013). Culture of the hydrocarbon producing microalga *Botryococcus braunii* strain Showa: Optimal CO₂, salinity, temperature, and irradiance conditions. *Bioresource Technology*, 133, 232–239. doi:org/10.1016/j.biortech.2013.01.095
- Yoo, C., Jun, S. Y., Lee, J. Y., Ahn, C. Y. y Oh, H. M. (2010). Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. *Bioresource Technology*, 101, S71–S74. doi: org/10.1016/j.biortech.2009.03.030
- Zhang, X., Huang, Y., Yang, J., Gao, H., Huang, Y., Luo, X. y Tontiwachwuthikul, P. (2019). Amine-based CO₂ capture aided by acid-basic bifunctional catalyst: Advancement of amine regeneration using metal modified MCM-41. *Chemical Engineering Journal*, 123077. doi: org/10.1016/j.cej.2019.123077

7. ANEXOS

Anexo 1. *Botryococcus braunii* vista al microscopio a 100x



Anexo 2. *Scenedesmus* sp. vista al microscopio a 100x



Anexo 3. Medio de crecimiento BG11

Componente	Cantidad
NaNO ₃	1.5 g/L
K ₂ HPO ₄	40 mg/L
CaCl ₂ • 2 H ₂ O	36 mg/L
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	75 mg/L
Ácido Cítrico	6 mg/L
C ₆ H ₈ FeNO ₇	6 mg/L
Na ₂ EDTA • 2 H ₂ O	1 mg/L
Na ₂ CO ₃	20 mg/L
H ₃ BO ₃	2.86 mg/L
MnCl ₂ • 4 H ₂ O	1.81 mg/L
ZnSO ₄ • 7 H ₂ O	0.22 mg/L
Na ₂ MoO ₄ • 2H ₂ O	0.39 mg/L
CuSO ₄ • 5 H ₂ O	0.079 mg/L
Co(NO ₃) ₂ • 6 H ₂ O	0.04 mg/L

Fuente: UTEX, Austin, TX, USA, 2020