



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

“EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO Y CONTENIDO DE
LÍPIDOS DE *Chlorella vulgaris* Y *Nannochloropsis oculata*
EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO”

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN
CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA:

Q.F.B. NATHALIE HERNÁNDEZ ARVIZU

DIRECTORA:

DRA. RUTH ELENA SORIA GUERRA



SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P., FEBRERO DE 2022

El programa de Maestría en Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, Registro 000519, en el Nivel CONSOLIDADO.

Número de registro de la beca otorgada por CONACyT: 1033456



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS



“EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO Y CONTENIDO DE
LÍPIDOS DE *Chlorella vulgaris* Y *Nannochloropsis oculata* EN DIFERENTES
MEDIOS DE CULTIVO”

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS
QUÍMICAS:

PRESENTA:

Q.F.B. NATHALIE HERNÁNDEZ ARVIZU

INTEGRANTES DEL JURADO:

PRESIDENTE:

DRA. RUTH ELENA SORIA GUERRA

SECRETARIO:

DR. ALEJANDRO ROCHA URIBE

VOCAL:

DR. OMAR GONZÁLEZ ORTEGA

Integrantes del Subcomité de Tesis:

Dra. Ruth Elena Soria Guerra: Directora de Tesis. Adscrita al Posgrado en Ciencias Químicas en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, S.L.P.

Dr. Alejandro Rocha Uribe: Comité Tutorial. Adscrito al Posgrado en Ciencias en Bioprocesos en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, S.L.P.

Dr. Omar González Ortega: Comité Tutorial Extendido. Adscrito al Posgrado de Ingeniería Química en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, S.L.P.



Evaluación del crecimiento y contenido de lípidos de *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis oculata* en diferentes medios de cultivo por Nathalie Hernández Arvizu se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

Agradecimientos

Mi primer agradecimiento es para la Dra. Ruth Elena Soria Guerra por haberme aceptado en su laboratorio y, haberme dado el apoyo y confianza para la realización de este trabajo. Durante estos dos años he aprendido muchas cosas, además de que he crecido profesionalmente, lo cual, me servirá en mis proyectos futuros.

Al Dr. Alejandro Rocha Uribe y al Dr. Omar González Ortega por su tiempo y dedicación al formar parte de mi comité tutorial y haberme permitido hacer uso de sus equipos de laboratorio.

Enseguida, me gustaría agradecer al Dr. Ismael Acosta Rodríguez por el apoyo y ayuda incondicional que siempre he recibido de su parte desde que estaba estudiando la Licenciatura. Gracias por haberme prestado material y reactivo de su laboratorio para la realización de esta tesis. Y, en conjunto con el Profesor Alejandro Salazar Navarro, mi maestro de Inmunología en la Licenciatura, por haberme ayudado a cumplir con los requisitos para entrar a este Posgrado.

Y, sin restar importancia, al Dr. José Luis Martínez Salgado por haberme permitido el acceso y uso de sus equipos y material en el Laboratorio de Docencia.

Todo esto no hubiera sido posible sin el apoyo económico que recibí de CONACYT, a través de la beca No. 1033456 que me fue otorgada. Muchas gracias. Asimismo, al Fondo Sectorial de Investigación para la Educación, CONACYT, CB-2017-2018, A1-S-8367, por el financiamiento para la realización de este proyecto.

Por último, agradezco enormemente a mi alma máter, la Universidad Autónoma de San Luis Potosí y la Facultad de Ciencias Químicas, que ha sido la institución que me ha formado profesionalmente desde la licenciatura.

Dedicatoria y agradecimientos personales

Dedico este trabajo a mi Mami y a mis bebés porque sin su apoyo y ayuda incondicional, no habría podido terminar este proyecto. Mil gracias mami, por haber estado al pie del cañón y haber recorrido este camino conmigo y, que, a pesar de todos los problemas que se nos presentaron, me seguiste motivando para no dejarme caer y seguir adelante.

A mis bebés que sólo con estar conmigo haciéndome compañía, todo el estrés y el cansancio se desvanecían y, pude agarrar nuevas fuerzas para continuar con mi trabajo.

A mis compañeros de laboratorio: Marcos por los conocimientos y habilidades que me enseñó, los cuales, fueron la base para la realización de este proyecto. A Sara, de Servicio Social, por su apoyo en el procesamiento de muestras, y, muy especialmente a Óscar, Citlalli y Juan que, sin temor a equivocarme, puedo decir que construimos una bonita amistad en el tiempo que pasamos juntos. Gracias por su ayuda y por todos los conocimientos, tips y habilidades que me han transmitido.

Resumen

La dependencia del ser humano por los combustibles fósiles, debido a su mayor disponibilidad, bajo costo y mejores resultados, ha hecho que se conviertan en los combustibles dominantes. Sin embargo, el uso indiscriminado de éstos ha provocado un rápido descenso de las reservas y la contaminación causada por la combustión ha alterado ecosistemas y la salud humana. Los biocombustibles, en particular el biodiesel, han surgido como una estrategia para promocionar el desarrollo de energías renovables, limpias y sustentables. Las microalgas oleaginosas son una de las materias primas más prometedoras, debido a su rápido crecimiento y alto contenido lipídico. La inanición o limitación de macronutrientes, es la estrategia más comúnmente utilizada para lograr la máxima productividad lipídica y de biomasa.

En este estudio, las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis oculata* fueron sometidas a deficiencia de nutrientes (fósforo y azufre) en tres medios de cultivo (Chu #10, MBB y BG-11) y se evaluó su crecimiento y contenido de lípidos. Se cuantificaron varios parámetros, entre los más destacados se encontraron la biomasa producida y los lípidos totales y neutros, así como otros bioproductos de interés comercial. Los resultados mostraron que la deficiencia de nutrientes promueve la acumulación de lípidos totales, principalmente en el medio Chu #10 para las dos microalgas. Con respecto a los lípidos neutros, el MBB con déficit de fósforo y azufre fue el que exhibió la mayor acumulación de los mismos en *C. vulgaris*, mientras que para *N. oculata*, sólo se observó un incremento significativo de éstos en el medio BG-11 con deficiencia de fósforo.

Palabras Claves: Biodiesel, Déficit de nutrientes, *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata*, Fósforo, Azufre, Lípidos Totales, Lípidos Neutros.

Abstract

The dependence of the human being on fossil fuels, due to their greater availability, lower cost and better results, has made them become the dominant fuels. However, the indiscriminate use of these has caused a rapid decline in reserves and the pollution caused by combustion has altered ecosystems and human health. Biofuels, in particular biodiesel, have emerged as a strategy to promote the development of renewable, clean and sustainable energies. Microalgae are one of the most promising raw materials, due to their rapid growth and high lipid content. Starvation or macronutrient limitation are the most commonly used strategy to achieve maximum lipid and biomass productivity.

In this study, microalgae *Chlorella vulgaris* and *Nannochloropsis oculata* were subjected to nutrient deficiency (phosphorus and sulfur) in three culture media (Chu #10, MBB and BG-11), and their growth and lipid content were evaluated. Several parameters were quantified, among the most outstanding were the biomass and the total and neutral lipids, as well as other bioproducts of commercial interest. The results showed that nutrient deficiency promotes the accumulation of total lipids, mainly in the Chu #10 medium for the two microalgae. With regard to neutral lipids, the MBB with phosphorus and sulfur deficiency was the one that exhibited the greatest accumulation of these in *C. vulgaris*, while for *N. oculata*, a significant increase was only observed in the BG- 11 with phosphorus deficiency.

Keywords: Biodiesel, Nutrient deficiency, *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata*, Phosphorus, Sulfur, Total Lipids, Neutral Lipids.

Índice General

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	Contexto.....	1
1.2.	Biocombustibles	2
1.3.	Biocombustibles de tercera generación	3
1.4.	Microorganismos utilizados en la producción de biodiesel.....	3
1.4.1.	Microalgas oleaginosas	4
1.4.1.1.	<i>Chlorella vulgaris</i>	5
1.4.1.2.	<i>Nannochloropsis oculata</i>	6
1.5.	Déficit de nutrientes.....	6
1.5.1.	Fósforo	7
1.5.2.	Azufre.....	8
2.	ANTECEDENTES.....	9
3.	JUSTIFICACIÓN.....	10
4.	HIPÓTESIS	11
5.	OBJETIVOS	11
5.1.	Objetivo general	11
5.2.	Objetivos específicos.....	11
6.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
6.1.	Microorganismos	11
6.2.	Medios de cultivo y sistemas de aireación.....	12
6.2.1.	Medios de cultivo.....	12
6.2.2.	Sistemas de aireación	12
6.3.	Propagación de las cepas y condiciones de cultivo	12
6.4.	Diseño experimental para evaluar el tratamiento con déficit de nutrientes.....	13
6.5.	Cinéticas de crecimiento	14
6.6.	Cuantificación de biomasa y velocidad de crecimiento	14
6.7.	Identificación cuantitativa de lípidos totales y neutros.....	15
6.7.1.	Cuantificación de lípidos totales	15
6.7.2.	Cuantificación de lípidos neutros.....	16
6.8.	Cuantificación de clorofila y carotenoides totales	17
6.9.	Análisis estadístico	18
8.	DISCUSIÓN.....	18
9.	CONCLUSIONES	27
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	30

Índice de Tablas

Tabla 1.	Contenido lipídico y productividad de diferentes especies de microalgas.....	5
Tabla 2.	Porcentaje de nutrientes en los diferentes medios de cultivo.	14
Tabla 3	Concentraciones para curva curva estándar de trioleína.....	17

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Contexto

La extracción y utilización de combustibles fósiles durante la Revolución Industrial marcó el inicio de un progreso tecnológico y económico sin precedentes, gracias a la fabricación de maquinaria industrial para el transporte de mercancía y pasajeros, la introducción de la máquina de vapor, el desarrollo del motor de combustión interna y la energía eléctrica, entre otros. Desde entonces, el ser humano ha dependido casi por completo de dichos combustibles debido a su disponibilidad, sumado al bajo costo y a los mejores resultados que presentaban, lo que los llevó a convertirse en los combustibles dominantes.

En la actualidad, el 79.7 % del consumo de energía del mundo proviene de los combustibles fósiles. Sin embargo, en México, esa cifra se incrementa hasta 90.4 % (Banco Mundial, 2015). Debido a lo anterior, existen dos grandes problemas que enfrenta el mundo en materia energética: la disminución de los combustibles fósiles y la contaminación causada por la quema de éstos. Desde la Revolución Industrial se comenzó a observar la presencia de gases emitidos durante los procesos productivos, y sólo hasta el siglo XX, los científicos y los políticos comenzaron a tomar en consideración las alteraciones generadas a los ecosistemas y a la población humana (Fernández- Linares et al., 2012).

El cambio climático, el aumento del precio del petróleo, el rápido descenso en las reservas de combustibles fósiles, la preocupación por la seguridad energética y la degradación de tierra y agua, han forzado a los gobiernos, científicos e investigadores, a encontrar fuentes de energía alternativa incluyendo la eólica, solar y los biocombustibles (Firoz et al., 2012). En la década de 1970, los biocombustibles cobraron nueva importancia debido a la crisis del mercado del petróleo, acaecida como consecuencia de los conflictos del Cercano Oriente, en especial la guerra entre Israel y los países árabes (Ramos et al., 2016).

La producción de biocombustibles surgió a finales del siglo pasado, como una estrategia para promocionar el desarrollo de energías renovables, limpias y sustentables, ante la crisis de producción de combustibles fósiles y sus efectos negativos a la atmósfera (Agüero-Rodríguez et al., 2015).

1.2. Biocombustibles

La producción de biocombustibles de fuentes renovables puede reducir la dependencia a los combustibles fósiles y asistir a mantener un ambiente sano y una sustentabilidad económica. Los biocombustibles son definidos como combustibles líquidos o gaseosos potencialmente renovables que pueden utilizarse para la generación de electricidad, calor y energéticos. Los biocombustibles como: bioetanol, butanol, biodiesel, hidrógeno y metano son sintetizados a partir de fuentes biológicas (Fernández- Linares et al., 2012).

Su clasificación depende del tipo de materia orgánica de la que provienen; de tal manera que tenemos biocombustibles de primera generación para designar a los que se producen a partir de aceites o azúcares comestibles provenientes de plantas como maíz, caña de azúcar, girasol o soya. Los biocombustibles de segunda generación se obtienen de materias primas no aprovechables para alimentación humana, como residuos forestales y agrícolas que tienen elevado contenido de celulosa y lignina. Finalmente, los biocombustibles de tercera generación provienen de organismos que pueden producir su propio alimento a partir de energía solar y CO₂, entre ellos, las algas. Los biocombustibles de cuarta generación se producen a partir de organismos y/o microorganismos genéticamente modificados para que capturen más dióxido de carbono del ambiente, o produzcan el biocombustible de manera directa, como el Algenol (Ramos et al., 2016).

Los problemas que enfrenta la industria de los biocombustibles, debido a las materias primas que utilizan, son complejos: los de primera generación no son sustentables por competir por alimento humano, suelos cultivables y representan cerca del 70 % del costo de producción de los biocombustibles; los de segunda generación requieren tecnologías sofisticadas y caras para el pretratamiento con enzimas especiales, haciéndolos no viables para la producción comercial; y los de cuarta generación, además del uso de tecnología altamente avanzada y personal capacitado que necesitan para su producción, también enfrentan los largos períodos de tiempo y capital requeridos. Por lo anterior, la presente investigación se ha dirigido hacia los biocombustibles de tercera generación.

1.3. Biocombustibles de tercera generación

De los biocombustibles de tercera generación, la producción de biodiesel es la única tecnología capaz de sustituir el consumo de combustibles derivados del petróleo (Christi et al., 2011), principalmente aquellos destinados para el sector del transporte. Se espera que para el 2060, éstos representen alrededor del 30% del consumo energético en el transporte. Este rol es particularmente importante en sectores difíciles de descarbonizar, como en el sector aéreo, marítimo y otros transportes de larga distancia (Bioenergy Annual Report, 2018).

El biodiesel es un biocombustible líquido derivado de aceites (triglicéridos, TAG) obtenidos a partir de biomasa renovable, usualmente compuesto de metil-ésteres de ácidos grasos de cadena larga. La composición química exacta depende de la fuente del aceite. Usualmente, es producido por transesterificación química, la cual es una reacción reversible entre los TAG y un alcohol (principalmente: metanol, etanol, propanol y butanol) para producir alquil-ésteres de ácidos grasos y glicerol como subproducto (Scott et al., 2010).

Entre las principales ventajas que presenta está el de ser una fuente de energía potencialmente renovable y biodegradable, durante su combustión produce menos emisiones nocivas de sulfuros, hidrocarburos aromáticos y partículas de hollín, posee propiedades lubricantes que reducen el desgaste de los motores, es un producto seguro para su transporte y manejo debido a su elevado punto de ebullición (150 °C) y baja volatilidad. Además, con el biodiesel se puede utilizar la infraestructura actual de almacenamiento y de distribución para el diésel de petróleo (Fernández- Linares et al., 2012).

1.4. Microorganismos utilizados en la producción de biodiesel

Una estrategia alternativa para la producción de biodiesel es el uso de una prometedora fuente de materia prima, los llamados microorganismos oleaginosos: microalgas, bacterias, levaduras y hongos. Algunas ventajas de éstos sobre las otras fuentes de materias primas son: no requieren terrenos cultivables para el crecimiento celular y, por lo mismo, no compiten por alimento humano; cortos períodos de cultivo; alta productividad lipídica, y su composición de ácidos grasos es similar a la de los aceites vegetales. Algunos pueden

acumular altas concentraciones de lípidos (>20 %) en sus células al metabolizar fuentes de carbono orgánico. Los componentes principales de los aceites producidos por los microorganismos oleaginosos presentan ácidos grasos de 16 o 18 carbonos, similares a los componentes de aceites vegetales como la soya y la canola (Cho et al., 2018).

1.4.1. Microalgas oleaginosas

Las microalgas son microorganismos procariotas o eucariotas fotosintéticos que pueden crecer rápidamente y vivir en condiciones duras, debido a su estructura unicelular o multicelular simple. Están presentes en todos los ecosistemas existentes en el planeta tierra. Su metabolismo puede ser autótrofo o heterótrofo (Mata et al., 2010).

Su mecanismo fotosintético es generalmente más eficiente que el de las plantas, al convertir más eficazmente la energía solar, gracias a su estructura celular simple. Además, al crecer en suspensiones acuosas, tienen mejor acceso a agua, CO₂, y a otros nutrientes. El contenido lipídico de varias microalgas en relación a su peso seco se muestra en la Tabla 1. Es claro que algunas de ellas pueden tener un contenido de lípidos de hasta el 80 % de su peso seco bajo ciertas condiciones (Firoz et al., 2012).

El uso de las microalgas no está limitado a la producción de biocombustibles, sino también se pueden obtener otros subproductos de alta calidad que presentan beneficios importantes para la salud humana, como ácidos grasos poliinsaturados, polisacáridos, pigmentos, minerales, vitaminas, enzimas y péptidos bioactivos. Igualmente, la biomasa se puede utilizar como una fuente de biofertilizante para aumentar el crecimiento de las plantas (Christi et al., 2011).

Tabla 1. Contenido lipídico y productividad de diferentes especies de microalgas.			
Cultivo	Especie de microalga	Contenido lipídico (% peso seco)	Productividad lipídica (mg L ⁻¹ d ⁻¹)
Agua dulce	<i>Botryococcus sp.</i>	25.0-75.0	-
	<i>Chlorella emersonii</i>	25.0-63.0	10.3-50.0
	<i>Chlorella vulgaris</i>	5.0-58.0	11.2-40.0
	<i>Chlorella sp.</i>	10.0-48.0	42.1
	<i>Chlorococcum sp.</i>	19.3	53.7
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	11.0-55.0	-
	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	1.9-18.4	35.1
	<i>Scenedesmus sp.</i>	19.6-21.1	40.8-53.9
Agua marina	<i>Dunaliella salina</i>	6.0-25.0	116.0
	<i>Dunaliella sp.</i>	17.5-67.0	33.5
	<i>Nannochloris sp.</i>	20.0-56.0	60.9-76.5
	<i>Nannochloropsis oculata</i>	23.0-30.0	84.0-142.0
	<i>Nannochloropsis sp.</i>	12.0-53.0	60.9-76.5
	<i>Neochloris oleoabundans</i>	29.0-65.0	90.0-134.0
	<i>Pavlova salina</i>	30.9	49.4
	<i>Spirulina platensis</i>	4.0-16.6	-

Modificado de Mata et al., 2010.

1.4.1.1. *Chlorella vulgaris*

C. vulgaris es un alga verde unicelular, eucariota de agua dulce con forma esférica y su tamaño varía de 2 a 10 µm de diámetro. Está reportada como una microalga de rápido crecimiento, ya que duplica su población aproximadamente en 6.5 h cuando se cultiva en fermentadores. Además, es capaz de crecer en diferentes tipos de medio y aguas de desecho, bajo condiciones extremas como altos pH y temperaturas, tolerar la presencia de compuestos tóxicos como los fenoles, y metales pesados.

Es un microorganismo muy versátil conocido por su acumulación lipídica, y porque su producción en masa a nivel industrial ya ha sido demostrada (Sakarika et al., 2016).

1.4.1.2. *Nannochloropsis oculata*

Es una microalga unicelular, con formas subesféricas o cilíndricas que van de los 2 a los 4 μm , con cloroplastos que van del color amarillo al verde. Este género de microalgas agrupa a las especies que contienen la mayor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), especialmente ácido eicosapentaenoico (EPA), de gran importancia en la nutrición de animales marinos. Catalogada como una de las microalgas capaces de producir altas concentraciones de lípidos, con contenidos que varían de 31 a 68 %. Adicionalmente, por su alto contenido de ácido palmítico (C16:0) y palmitoleico (C16:1n-7), es una muy buena fuente para producir biodiesel (Martínez-Macías et al., 2017).

1.5. Déficit de nutrientes

La composición de los ácidos grasos de las microalgas es importante, ya que éstos pueden tener efectos significativos en las características del biodiesel producido. Diferentes factores nutricionales y ambientales, condiciones de cultivo y fases de crecimiento pueden afectar la constitución de los lípidos (Mata et al., 2010).

Cuando las microalgas se someten a condiciones de estrés impuestas por estímulos ambientales químicos o físicos, solos o en combinación, ocurre la síntesis y acumulación de grandes cantidades de triacilglicéridos, acompañada por considerables alteraciones en la composición de los lípidos y ácidos grasos. Los principales estímulos químicos son la deficiencia de nutrientes: nitrógeno, fósforo, azufre y silicio (Loera-Quezada y Olguín, 2010). Los parámetros óptimos, así como los rangos de tolerancia son específicos para cada especie, los distintos factores pueden ser interdependientes y un parámetro que es óptimo para un conjunto especies, no necesariamente lo es para otro (Salazar-Pérez, 2012).

El déficit de nutrientes ha sido hasta ahora la estrategia más comúnmente empleada para dirigir el flujo metabólico a la biosíntesis de lípidos en las microalgas (Dorval-Courchesne et al., 2009). Se han reportado estudios, donde la deficiencia de nutrientes como hierro y fósforo induce la producción de mayor cantidad de lípidos y cesa el crecimiento celular; sin embargo, la limitación de

nitrógeno es el factor nutricional más documentado, debido a que no sólo promueve la producción de lípidos en microalgas, sino también su acumulación en forma de cuerpos lipídicos (Dorval-Courchesne et al., 2009).

En el año 2000, Illman et al. (citado en Dorval-Courchesne, 2009), observaron que *C. emersonii*, *C. minutissima*, *C. vulgaris*, y *C. pyrenoidosa* podían acumular lípidos hasta en un 63 %, 57 %, 40 %, y 23 % en base a sus pesos secos, respectivamente, en medio de cultivo con bajas concentraciones de nitrógeno. La limitación de fosfato también fue causa del incremento en la acumulación de lípidos de *Monodus subterraneus* (Khozin-Goldberg and Cohen, 2006 (citado en Dorval-Courchesne, 2009)). Con una disminución de la disponibilidad de fosfato de 175 a 52.5, 17.5 y 0 μM (K_2HPO_4), el contenido de lípidos totales de las células con déficit nutricional aumentó, principalmente debido al drástico crecimiento en los niveles de TAG.

Igualmente, la deficiencia de hierro ha sido reportada como estimulante para incrementar la acumulación de lípidos en *C. vulgaris*, la cual fue de hasta 56.6 % de lípidos en peso seco de biomasa (Liu et al., 2008).

Empero, una gran desventaja de la estrategia de flujo metabólico inducido es que la limitación de nutrientes o el estrés fisiológico requerido para la acumulación de lípidos en la célula, está asociado con la reducción del proceso de división celular y la baja velocidad de crecimiento. Las productividades lipídicas elevadas y los altos contenidos de biomasa son mutuamente excluyentes. Una estrategia sugerida es el cultivo en dos etapas: la primera etapa, enfocada al crecimiento celular empleando medios de cultivo con concentraciones suficientes de macronutrientes; y la segunda, direccionada a la acumulación de lípidos, mediante el uso de otro medio de cultivo con limitación de nutrientes u otro estrés fisiológico (Dorval-Courchesne et al., 2009).

1.5.1. Fósforo

El fósforo juega un papel importante en la mayoría de los procesos celulares, especialmente los que están implicados en la generación y transformación de energía metabólica, por lo que es indispensable para el crecimiento y reproducción de las microalgas (Stewart, 1974).

Este debe ser asimilado casi exclusivamente en forma de fosfatos y es la concentración de este compuesto la que determina la tasa de crecimiento algal. La máxima biomasa algal que puede ser soportada por la cantidad total de fósforo presente depende de la cantidad de ortofosfatos que llega a estar disponible para las células en crecimiento (Sze, 1998, Brönmark & Hansson, 2005 (citados en González-González, 2010)).

La limitación del crecimiento algal se produce debido a una limitación de la síntesis de ácidos nucleicos, la cual puede darse a nivel de la replicación del genoma o al nivel de la síntesis de RNA. Esta limitación puede afectar la conversión de energía fotosintética reduciendo la tasa de síntesis de proteínas en el aparato fotosintético, resultando en un efecto negativo en el proceso de fotosíntesis. Por otra parte, al presentarse altas tasas de crecimiento aumenta la demanda de RNA y particularmente de RNA ribosomal, por lo tanto, la deficiencia de P deriva en menores tasas de crecimiento. La inhabilidad de producir ácidos nucleicos limita la división celular generando un incremento en el volumen celular (Barsanti & Gualtieri, 2006; Hessen et al., 2002 (citados en González-González, 2010)).

Una respuesta más inmediata a la limitación de fósforo se observa en la tasa de síntesis y regeneración de sustratos en el ciclo de Calvin-Benson, reduciendo así la tasa de utilización de luz para fijación de carbono. Las células pueden sufrir también un decremento en los fosfolípidos de membrana (Barsanti & Gualtieri, 2006 (citado en González-González, 2010)).

1.5.2. Azufre

El azufre es un elemento esencial para todas las formas de vida. En los seres vivos, los aminoácidos cisteína y metionina contienen azufre, al igual que todos los polipéptidos, proteínas y enzimas que contienen estos aminoácidos. Los compuestos orgánicos del azufre se encuentran localizados en diversas moléculas y constituyentes celulares, como por ejemplo en la membrana sulfolípídica, formando parte de las paredes celulares, en vitaminas y cofactores tales como tiamina, biotina y coenzima A.

También se conoce que la estructura terciaria y cuaternaria de muchas proteínas es resultado de la presencia de puentes disulfuro (-S-S-) formados por la oxidación de grupos SH de la cisteína (Cys). Además, el azufre se encuentra íntimamente relacionado con los procesos redox de la célula, y en particular, en la fotosíntesis, puesto que los átomos de azufre se encuentran localizados en componentes de la cadena de transferencia electrónica, como el clúster Fe-S del fotosistema o en la proteína de Rieske (componente del complejo del citocromo bc1) y en portadores del poder reductor generados por la transferencia de electrones fotosintética (ferredoxina) (Mera-Sanmartín, 2016).

Los organismos fotosintéticos sintetizan una amplia variedad de compuestos de azufre usando sulfato como fuente de azufre primaria. Generalmente, el azufre es incorporado por los organismos autótrofos en forma de sulfatos, los cuales son reducidos a sulfuro que finalmente es transferido a los aminoácidos azufrados cisteína y metionina, siendo un proceso bien conocido en células algales (Shibagaki and Grossman, 2008 (citado en Mera-Sanmartín, 2016)).

Tanto el *fósforo* como el *azufre* son considerados macronutrientes, es decir, nutrientes que requieren las microalgas en grandes cantidades para su crecimiento y desarrollo, ya que, estos son componentes fundamentales de macromoléculas y tienen un papel clave en la estructura celular.

2. ANTECEDENTES

Uno de los mayores retos en el desarrollo de procesos para la producción de biodiesel con microalgas consiste en establecer estrategias de cultivo adecuadas que permitan lograr la máxima productividad de lípidos y de biomasa.

La estrategia más comúnmente usada para lograr lo anterior es el diseño de cultivos con inanición o limitación de macronutrientes. Principalmente, la variación de macronutrientes como: nitrógeno, fósforo, azufre y hierro, llevarán a una alteración de la composición macromolecular en las células algales. La inanición de nitrógeno y fósforo han sido de los factores que mayormente afectan

la acumulación y la composición de lípidos en cultivos de *C. vulgaris* (Wong et al., 2017).

Una moderada reducción en biomasa y producción de almidón es causada por la limitación de sulfuro en *C. vulgaris* (Brányiková et al., 2010), sugiriendo que la disminución de este nutriente podría ser un procedimiento efectivo y económico para producir almidón y lípidos en microalgas. En el 2018, Sabzi et al., establecieron que la limitación de hierro en medios de cultivo de *N. oculata* (de 10 a 20 veces menos), son las más efectivas para mejorar la acumulación de ácidos grasos.

No obstante, no se han reportado datos en la literatura donde se analicen, en el mismo experimento, los efectos que la limitación separada o combinada de nutrientes (P y S) tienen en la productividad de lípidos y biomasa en la microalga *C. vulgaris*, y los estudios donde se ha evaluado la deficiencia de azufre, son muy escasos. Mientras que para *N. oculata*, no hay reportes sobre la limitación o inanición de azufre y fósforo, así como su combinación en diferentes medios de cultivo.

Por lo tanto, este estudio sería el primero en evaluar los efectos de estos dos macronutrientes en diferentes medios de cultivo en estas dos microalgas, las cuales son de gran importancia para la producción de biocombustibles debido al gran rendimiento lipídico que han probado acumular cuando son sometidas a deficiencia de nitrógeno o fósforo.

3. JUSTIFICACIÓN

El consumo desmedido y la dependencia total que se tiene de los combustibles fósiles, así como los efectos dañinos que presentan los gases de efecto invernadero en el planeta, producto de la combustión de éstos, harán que tarde o temprano las reservas se agoten y el daño a la tierra será irreversible. Por ende, es indispensable y urgente crear procesos amigables con el ambiente y que contribuyan a la sustentabilidad para la obtención de energía. Una de esas estrategias es la producción de biocombustibles, los cuales pueden obtenerse de diferentes materias primas, una de las que más ha atraído la atención en los

últimos años es el uso de microalgas debido a su fácil crecimiento y alto contenido de lípidos que pueden ser útiles para la producción de biodiesel.

4. HIPÓTESIS

La deficiencia de fósforo y/o azufre en diferentes medios de cultivo inducen la acumulación de lípidos en las microalgas *C. vulgaris* y *N. oculata*, principalmente lípidos neutros, los cuales son la materia prima para la producción de biodiesel; así como de otros componentes de interés comercial.

5. OBJETIVOS

5.1. General

Estudiar el efecto de diferentes medios de cultivo bajo estrés fisiológico de nutrientes (fósforo y azufre), en el crecimiento y el contenido de lípidos en las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis oculata*.

5.2. Específicos

- a) Comparar el efecto de 3 medios de cultivo (Chu #10, Bold basal y BG-11) bajo estrés fisiológico de nutrientes (fósforo y azufre) sobre la densidad celular de *C. vulgaris* y *N. oculata*.
- b) Cuantificar la biomasa producida y determinar la velocidad específica de crecimiento para cada microalga.
- c) Evaluar el contenido de clorofila y carotenoides totales.
- d) Cuantificar la cantidad de lípidos totales y neutros producidos en los diferentes medios de cultivo.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Microorganismos

Las microalgas *Chlorella vulgaris* OW-01 y *Nannochloropsis oculata* CCAP 849/7 fueron obtenidas del cepario del laboratorio de Biotecnología Molecular de Células Vegetales.

6.2. Medios de cultivo y sistemas de aireación

6.2.1 Medios de cultivo

- **Medio Basal Bold (MBB).** NaNO_3 2.94 mM; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 mM; NaCl 0.43 mM; K_2HPO_4 0.43 mM; KH_2PO_4 1.29 mM; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.17 mM; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.307 μM ; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 7.28 μM ; MoO_3 4.93 μM ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 6.29 μM ; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.68 μM ; H_3BO_3 18.50 mM; EDTA 17.10 mM; KOH 55.30 mM; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.179 mM; H_2SO_4 conc. 1 mL (CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa)).
- **Medio Chu #10.** $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 2.44×10^{-4} M; K_2HPO_4 2.87×10^{-5} M; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.01×10^{-4} M; Na_2CO_3 1.89×10^{-4} M; Na_2SiO_3 2.05×10^{-4} M; FeCl_3 4.93×10^{-6} M (Andersen et al. Appendix A—Recipes for Freshwater and Seawater Media).
- **Medio BG-11.** NaNO_3 17.6 mM; K_2HPO_4 0.23 mM; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 Mm; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.24 mM; ácido cítrico $\cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.031 mM; citrato de amonio férrico 0.021 mM; $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0027 mM; Na_2CO_3 0.19 mM; H_3BO_3 46 mM; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 9 mM; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.77 mM; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.6 mM; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.3 mM; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.17 mM (UTEX (Culture Collection of Algae at The University of Texas at Austin)).

6.2.2 Sistemas de aireación

El suministro de carbono, en forma de CO_2 , se realizó mediante un sistema de aireación (inyección de aire atmosférico), el cual fue diseñado a base de mangueras de PVC flexible y transparente de 2 mm de radio, conectadas a una bomba de aire de 2.2 L/min; el flujo de aire en los experimentos se controló mediante válvulas reguladoras de flujo de $\frac{1}{4}$ de pulgada.

6.3 Propagación de las cepas y condiciones de cultivo

Las microalgas se precultivaron en 100 mL de MBB, manteniéndose a una temperatura de 25 °C con agitación continua y fotoperiodos de 16 h luz/8 h de oscuridad, hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0.3. La lectura se registró mediante el espectrómetro GloMax®-Multi Microplate Reader (Promega Corporation, Madison, WI, USA) a una longitud de onda de 750 nm.

Una vez alcanzada la DO deseada se recuperó la biomasa por centrifugación y cada microalga se inoculó en matraces de 125 mL conteniendo cada uno 100 mL de MBB, Chu #10 y BG-11, experimento que se escaló hasta 1 L con la finalidad de obtener biomasa suficiente para los ensayos siguientes.

Posteriormente, se inocularon las dos microalgas en los tres medios de cultivo con distintas concentraciones de fósforo y azufre de acuerdo a lo establecido en la Tabla 2. Todos los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 25 °C con un fotoperíodo de 16 h luz/8 h oscuridad y aireación constante para suministrar CO₂ como fuente de carbono y mantener homogéneo el sistema. Se analizaron tres réplicas biológicas.

Como controles se incluyeron cultivos que crecieron sin someterse a ningún tipo de estrés e igualmente, se analizaron tres réplicas biológicas.

6.4 Diseño experimental para evaluar el tratamiento con déficit de nutrientes

Se utilizaron dos diferentes concentraciones de los macronutrientes fósforo y azufre y en combinación para las dos especies de microalgas en los tres diferentes medios de cultivos como se muestra en la Tabla 2.

Al tratarse de un estudio exploratorio, se decidió reducir las concentraciones de estos dos macronutrientes al 50%, con el fin de descubrir si se presentaba algún efecto en la producción lipídica y de biomasa de las dos microalgas, ya que, hasta la fecha, no hay reportes donde se estudie la deficiencia de P y S en MBB, Chu #10 y BG-11 para *C. vulgaris* y *N. oculata*. Como experimentos control, se incluyeron cultivos que crecieron sin someterse a algún tipo de estrés.

Soluciones Stock con déficit de P y S según el medio de cultivo:

- Medio Bold Basal
 - K₂HPO₄. Se pesó 1.5 g de la sal y se disolvió en 400 mL de agua destilada. Se almacenó en un recipiente de plástico a temperatura ambiente.
 - KH₂PO₄. Se pesó 3.5 g de la sal y se disolvió en 400 mL de agua destilada. Se almacenó en un recipiente de plástico a temperatura ambiente.

- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Se pesó 1.5 g de la sal y se disolvió en 400 mL de agua destilada. Se almacenó en un recipiente de plástico a temperatura ambiente.
- Medio Chu #10
 - K_2HPO_4 . Se pesó 2.5 g de la sal y se disolvió en 1 L de agua destilada. Se almacenó en un recipiente de plástico a temperatura ambiente.
 - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Se pesó 12.5 g de la sal y se disolvió en 1 L de agua destilada. Se almacenó en un recipiente de plástico a temperatura ambiente.
- Medio BG-11
 - K_2HPO_4 . Se pesó 1 g de la sal y se disolvió en 500 mL de agua destilada. Posteriormente, se vació en un recipiente de plástico a temperatura ambiente.
 - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Se pesó 1.875 g de la sal y se disolvió en 500 mL de agua destilada. Se vació en un recipiente de plástico manteniéndose a temperatura ambiente.

Tabla 2. Porcentaje de nutrientes (fósforo y azufre) en los diferentes medios de cultivo con respecto a los experimentos control. Compuestos de fósforo: Chu #10 (K_2HPO_4); MBB (K_2HPO_4 y KH_2PO_4); BG-11 (K_2HPO_4). Compuestos de azufre: para los tres medios es $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. P (fósforo), S (azufre) y P/S (fósforo/azufre).

Medio de cultivo	Deficiencia de P	Deficiencia de S	Combinación P/S	Control
CHU #10	50%	50%	50%	100%
MBB	50%	50%	50%	100%
BG-11	50%	50%	50%	100%

6.5 Cinéticas de crecimiento

Cada 48 h, se tomaron tres muestras de 1 mL de cada cultivo para construir una cinética de crecimiento por espectrofotometría hasta llegar a la fase estacionaria. De estas muestras obtenidas se registró la densidad óptica para monitorear el crecimiento algal y realizar el conteo celular; el resto de las muestras se utilizaron para el análisis de lípidos neutros, carotenoides y clorofila a.

Una vez que los cultivos alcanzaron la fase estacionaria, la biomasa se recuperó mediante centrifugación a 4500 rpm por 20 min, los sobrenadantes se descartaron y la biomasa resultante de cada cultivo se secó a 70 °C en una estufa de secado, registrándose al final el peso seco.

6.6 Cuantificación de biomasa y velocidad de crecimiento

Para el conteo celular, se utilizó la cámara de Neubauer de 0.1 mm de profundidad con reglilla de Neubauer. La velocidad de crecimiento en fase exponencial fue calculada según Wood et al. (2005), de la siguiente manera:

$$\text{Tasa de crecimiento de la población (r)} = \text{Ln} (N_t / N_o) / \Delta t,$$

En donde: N_o = tamaño de la población al inicio de un intervalo de tiempo, N_t = tamaño de la población al final de un intervalo de tiempo y Δt = intervalo de tiempo ($t_t - t_o$) en días.

6.7 Identificación cuantitativa de lípidos totales y neutros

6.7.1 Cuantificación de Lípidos totales

Para la cuantificación de lípidos totales se utilizaron las muestras de biomasa recuperadas al final de las cinéticas de crecimiento y se procesaron como se describe a continuación: se recuperó la biomasa de todos los experimentos en tubos Falcon, los cuales se centrifugaron y se decantaron para eliminar todo el medio de cultivo remanente, después se dejaron secar por 1 día a 70 °C dentro de una estufa de secado y se registraron los pesos. Enseguida, se añadió 0.0002 g de antioxidante a cada tubo y el contenido se molió por separado en un mortero para conseguir un tamaño de partícula más pequeño. Posteriormente, a todos los tubos se les agregó 10 mL de metanol absoluto para extraer la clorofila de las muestras y se metieron a una estufa de secado durante 1 h a 70 °C. Se prosiguió a centrifugar a 4600 rpm durante 10 min para remover el sobrenadante con la clorofila y se volvieron a añadir 10 mL de metanol. Este proceso se repitió hasta que el sobrenadante (metanol) mostró una coloración verde débil. Después se agregaron 5 mL de agua destilada y se homogenizaron

con ayuda de un vórtex. A continuación, se sonicaron las muestras a una amplitud de 60 % por 5 s y se dejaron reposar por otros 5 segundos en hielo, esto se repitió 4 veces. Inmediatamente, se añadieron 10 mL de una mezcla de cloroformo-metanol (2:1, v:v), se homogenizaron nuevamente en un vórtex y se dejaron reposar por 24 h a -20 °C. Al finalizar ese tiempo, se centrifugaron a 4500 rpm por 20 min, mientras esto se realizaba, se pesó un tubo nuevo para cada muestra para transferir el sobrenadante (fase orgánica). Se añadieron 5 mL de NaCl 0.9 % (w/w) para crear un sistema bifásico, del cual se recuperó la fase inferior que contenía los lípidos totales extraídos, en este paso se volvió a centrifugar para facilitar la decantación de la fase superior. Por último, para la eliminación del solvente, se incubaron las muestras a 70 °C dentro de una estufa de secado, hasta la evaporación completa y se registraron los pesos obtenidos.

6.7.2 Cuantificación de Lípidos neutros

Para el análisis del contenido de lípidos neutros, se utilizaron las muestras obtenidas durante las cinéticas de crecimiento y se siguió el procedimiento descrito por Bertozzini et al. (2011), el cual consistió en centrifugar las muestras durante 20 minutos a 6000 rpm a temperatura ambiente; el pellet se disolvió en 1 mL de medio Bold Basal para eliminar las impurezas presentes durante el crecimiento celular. De cada una de las muestras se tomaron 200 µL, que se depositaron en los pozos de una placa de fondo oscuro, se añadió el colorante rojo nilo disuelto en isopropanol a cada uno de los pozos, a una concentración de 0.25 µg/mL, y se incubaron por 5 minutos a una temperatura de 30-50 °C para su posterior medición.

Las mediciones se realizaron en el módulo de fluorescencia del equipo GloMax®-Multi Microplate Reader (Promega Corporation, Madison, WI, USA) utilizando el filtro óptico Verde (525 nm de Excitación y 580–640 nm de Emisión).

Consecutivamente, se realizaron tres mediciones de fluorescencia: la primera fue de la placa de fondo oscuro vacía (sin muestra), la segunda fue de la placa con muestra y la tercera después de agregar el rojo nilo. La diferencia de esas tres lecturas dio como resultado la fluorescencia emitida por los lípidos neutros presentes en cada una de las muestras.

Finalizando con el uso de una curva estándar de trioleína, se interpoló el resultado de fluorescencia obtenida para conocer la concentración de lípidos neutros en los distintos puntos de la cinética de crecimiento.

A partir de esas lecturas, se eligió el día en el que se mostró la mayor concentración de lípidos neutros en la cinética, el cual se presentó durante la fase estacionaria.

Las soluciones stock se prepararon conforme a lo descrito en la Tabla 3.

Tabla 3. Concentraciones para curva estándar de trioleína.			
Concentración (mg/L)	Medio Bold Basal (μL)	Isopropanol (μL)	Trioleína (μL)
0	180	20	0
3	180	19.4	0.6
5	180	19	1
8	180	18.4	1.6
10	180	18	2
20	180	16	4

6.8 Cuantificación de clorofila y carotenoides totales

Para el análisis del contenido de carotenoides y clorofila *a* y *b*, se utilizaron las muestras obtenidas durante la cinética de crecimiento siguiéndose el procedimiento descrito por M.T.A. Danaé Samara Sánchez Sandoval (Tesis de Doctorado), el cual consistió en centrifugar las muestras durante 5 minutos a 10000 rpm a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y se añadió 1 mL de agua destilada, se resuspendió la pastilla de biomasa y se prosiguió a centrifugar a 10000 rpm por 5 min. Posteriormente, se descartó el sobrenadante, se añadió 1.5 mL de metanol y se mezcló en el Agitador Vórtex-Genie II Mixer SI-0236 (Scientific Industries) a 3200 rpm durante 5 minutos. Enseguida, se incubaron los tubos con las muestras durante 10 minutos a una temperatura de 60 °C, después se refrigeraron durante 24 horas, pasado ese tiempo se centrifugaron por 5 minutos a 10000 rpm, se recuperó el sobrenadante y se

determinaron en el espectrofotómetro las absorbancias de los carotenoides y los dos tipos de clorofila.

Finalmente, se utilizaron las siguientes ecuaciones para determinar la concentración de clorofila *a* (C_a), clorofila *b* (C_b) y carotenoides totales (C_{x+c}):

$$C_a = 16.72 A_{665.2} - 9.16 A_{652.4}$$

$$C_b = 34.09 A_{652.4} - 15.28 A_{665.2}$$

$$C_{a+b} = 1.44 A_{665.2} + 24.93 A_{652.4}$$

$$C_{x+c} = (1000A_{470} - 1.63C_a - 104.96 C_b) / 221$$

Las concentraciones de pigmento obtenidas al insertar los valores de absorbancia medidos se reportan en microgramos por mililitro de solución de extracto vegetal (Lichtenthaler, 1987).

6.9 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA $p < 0.05$), utilizando la prueba de Dunnett en el Software SigmaPlot 14.0 para detectar diferencias estadísticamente significativas entre los contenidos de lípidos, productividad lipídica, lípidos neutros, clorofila *a* y carotenoides en las dos microalgas con los tres tratamientos de deficiencia de nutrientes respecto a los controles de las tres réplicas biológicas que se realizaron de cada experimento. Además de, un análisis de comparaciones múltiples con la *t* de Student $p < 0.05$, haciendo uso del Software JMP Pro 16.

8. DISCUSIÓN

Para lograr una sustentabilidad económica y ambiental se requiere que el proceso de producción de biocombustibles no sólo sea renovable, sino que también contribuya al secuestro de CO_2 atmosférico. Las microalgas oleaginosas, consideradas como fuente de biocombustibles de tercera generación, contribuyen de manera importante a la fijación de dióxido de carbono y pueden ser utilizadas para producir una amplia gama de biocombustibles, tales como el biodiesel, bioetanol, biometano y biohidrógeno, además de que

producen metabolitos secundarios con aplicación en la industria farmacéutica, para complementos nutricionales, acuicultura, cosmetología, etc. (Loera-Quezada et al., 2010).

Muchas especies de microalgas son capaces de producir grandes cantidades de lípidos; con frecuencia, concentraciones altas de éstos se obtienen cuando las algas son sometidas a condiciones de estrés impuestas por estímulos físicos y/o químicos, lo que generalmente está asociado a condiciones de limitación de nutrientes y, por lo tanto, a baja productividad de biomasa (Hu et al., 2008).

Hay muchos factores que influyen el crecimiento algal: a) factores abióticos como la luz (calidad y cantidad), temperatura, concentración de nutrientes, O₂, CO₂, pH, salinidad y químicos tóxicos; b) factores bióticos como patógenos (bacterias, hongos, virus) y la competencia con otras algas; y c) factores operacionales por ejemplo mezclado y frecuencia de cosecha, entre otros (Mata et al., 2010).

Algunos de los parámetros clave que afectan la factibilidad económica de la producción de biodiesel a partir de microalgas son: la productividad de la biomasa microalgal, el contenido celular de lípidos y, sobre todo, la productividad de lípidos (especialmente los triacilglicéridos). Este último parámetro determina el costo del proceso de cultivo, mientras que la concentración de la biomasa en el cultivo y el contenido celular de los lípidos, afectan significativamente el costo de los procesos de extracción y transformación.

Por lo tanto, un proceso ideal debería permitir la producción de lípidos a la más alta productividad celular, con el contenido más alto posible en las células (Li et al., 2008).

Xiadong et al. (2011) reportaron que en medio BG-11, la microalga *C. vulgaris* creció moderadamente (1.2×10^6 cel/mL a los 6 días), valores que se contraponen con los resultados de este trabajo, ya que el crecimiento ideal de *C. vulgaris* para la mayor estimulación en la producción de biomasa fue el medio BG-11:control (5.86×10^7 cel/mL al final de la cinética); el tratamiento con fósforo al 50% no afectó el crecimiento celular, mientras que, la limitación de azufre y en combinación fósforo y azufre, disminuyeron de manera significativa el crecimiento.

Por otro lado, tanto en el medio Bold Basal y en el Chu #10 se observaron niveles significativamente más bajos de biomasa en el control y todos los tratamientos comparados con el BG-11; pero entre ellos, el medio BB fue significativamente más alto que el Chu #10. En 2016, López-Sulla logró mejores resultados en el medio Bold Basal que en Chu #10, cuyas cinéticas evidenciaron un bajo perfil de crecimiento, teniendo un periodo de latencia al sexto día de cultivo, probablemente por la disminución de algunos de los nutrientes. Esta diferencia también pudo deberse, posiblemente, a la composición del medio BB, el cual contiene todos los macro y micronutrientes necesarios para el buen crecimiento de las microalgas, mientras que el medio Chu #10 solamente contiene los elementos mínimos requeridos.

Es importante resaltar que en medio BB y en Chu #10, los tratamientos S 50% y combinación PS 50% para el primer medio y P 50% y S 50% para el segundo, demostraron tener un aumento significativo de la concentración celular con respecto al control, situación que se opone a lo descrito en la literatura, donde la deficiencia de nutrientes promueve una baja en el crecimiento celular, sin embargo, esto se puede atribuir probablemente a que la concentración de estos macronutrientes en los medios no fue lo suficientemente baja para provocar un estrés en la microalga. Por lo tanto, más estudios son necesarios para encontrar las concentraciones ideales de cada macronutriente en estos microorganismos para favorecer el máximo crecimiento celular y acumulación de lípidos.

En cuanto a *N. oculata*, tanto el medio Bold Basal como el BG-11 arrojaron los mejores resultados para el crecimiento celular al no haber diferencia significativa entre ellos, por lo tanto, la decisión para elegir cualquiera de los dos se basaría en el costo y modo preparación del medio, siendo el medio BB más económico al no requerir solución de vitaminas y ser de más fácil preparación que el medio BG-11, al no necesitar ajuste de pH. Esto concuerda con Bajwa et al., en 2017, quienes encontraron que el medio BG-11 fue el mejor medio en lo que se refiere al rendimiento de biomasa, seguido del medio Bold Basal. En el medio Chu #10, por el contrario, fue donde se observó el crecimiento más bajo de esta microalga, apenas alcanzando 1.77×10^7 cel/mL al final de la cinética.

En las dos microalgas, fue en el medio Chu #10 donde se alcanzaron más rápido las fases estacionarias (8-12 d), en comparación con los otros dos medios que ocuparon el doble o hasta el triple de tiempo en terminar sus cinéticas. Esta diferencia podría ser de utilidad para maximizar los procesos en la producción de biodiesel, puesto que el dinero y el tiempo son los factores más importantes a tomar en cuenta para determinar si un proceso es viable o no.

Además de los factores antes mencionados que afectan el contenido y composición de los lípidos, se encuentran también la fase de crecimiento y la edad del cultivo observándose un mayor contenido de lípidos en la fase estacionaria con respecto a la fase logarítmica (Spolaore et al., 2006; Hu et al., 2008).

Con respecto a la fase de crecimiento, Bigogno et al. (2002) reportaron que en la microalga verde *Parietochloris incisa* se observó un alto contenido de triacilgliceroles de 43% en la fase logarítmica y hasta un 77% en la fase estacionaria del total de los lípidos sintetizados por esta microalga. Por lo anterior, se decidió que la cosecha de la biomasa sería al inicio de la fase estacionaria para así asegurar la mayor acumulación de lípidos en las dos microalgas.

Muchas especies de microalgas pueden inducir la acumulación de grandes cantidades de lípidos, lo cual contribuye a un mayor rendimiento lipídico. El contenido de lípidos varía entre 1 a 70%, pero bajo ciertas condiciones de cultivo algunas especies pueden alcanzar hasta el 90% de peso seco (Spolaore et al., 2006; Chisti, 2007). Específicamente, para *C. vulgaris* el contenido lipídico es de 5-58% por peso seco y su productividad varía de 11.2 a 40.0 mg/L·d, mientras para *N. oculata* es de 23-30% por peso seco con una productividad lipídica de 84.0-142.0 mg/L·d (Mata et al., 2010).

En este estudio, se logró obtener un mayor contenido de lípidos a lo reportado hasta ahora, siendo el medio Chu #10 el que estimuló la mayor acumulación lipídica en las dos microalgas. *C. vulgaris* acumuló hasta un 85 y 74.1% con deficiencia de fósforo y azufre por separado, respectivamente; en tanto que, *N. oculata* alcanzó un máximo de 62.3% de lípidos en el control. El tratamiento PS

50% fue el único que inhibió el contenido de lípidos significativamente con respecto al control (46.8%). Esto pudo deberse a que probablemente el estímulo de la limitación de estos dos macronutrientes fue demasiado para las células, tomando en cuenta que el medio Chu #10 no es un medio de cultivo enriquecido.

En 2015, Wong et al., obtuvieron en medio Bold Basal con limitación de fósforo en la microalga *C. vulgaris* un contenido lipídico de 15.7% con una alta productividad de 147 mg/L.d. Comparando con nuestros resultados, se obtuvo un contenido similar de 18.8%. Sin embargo, el tratamiento de S 50% probó tener mejores rendimientos de 57.8%. Por otra parte, la deficiencia de fósforo al 50% y en combinación disminuyeron el contenido lipídico de manera significativa en *C. vulgaris*, mientras en el medio BG-11 no hubo diferencia entre el control y los tratamientos.

N. oculata exhibió mejores resultados con el tratamiento S 50% en medio Bold Basal y el P 50% en BG-11, al obtener un aumento significativo en la producción de lípidos (38.3% y 50.3%).

López-Sulla (2016) describió que el género *Chlorella* presenta la mayor acumulación de lípidos en el medio Chu #10 ($13.99 \pm 0.08\%$), aproximadamente el doble de lo reportado en MBB y BG-11 (7.39 ± 0.08 y $7.12 \pm 0.08\%$), al igual que lo observado en estos resultados.

Estos datos son muy reveladores porque hasta la fecha no se han reportado rendimientos lipídicos tan altos en estas microalgas con medio Chu #10, principalmente *N. oculata*, quien superó notablemente lo descrito hasta ahora al duplicar su contenido de lípidos. Además de que no hay estudios sobre el efecto de la limitación de azufre en *N. oculata*, por lo que este trabajo puede ser útil como referencia para posteriores proyectos al mostrar una correlación positiva entre la deficiencia de azufre y el contenido de lípidos.

Desafortunadamente, la desventaja del medio Chu #10 es su baja productividad de biomasa comparado con el MBB y BG-11, por lo que su contenido lipídico podría no ser tan relevante. Sin embargo, una solución podría ser lo sugerido por Suali et al. (2012), quienes lograron un incremento en la producción de biomasa y lípidos hasta de 10 veces, mediante el cultivo en dos etapas. En la primera se obtiene el aumento en la tasa de producción celular

acrecentando el número de células, y en la segunda se maximiza el contenido de lípidos al ser prioritario el enriquecimiento de cada célula con lípidos en lugar de aumentar el número de células. Este principio está basado en la naturaleza microalgal que responde activamente al exceso o deficiencia de nutrientes como el nitrógeno, fósforo, azufre y hierro, entre otros, incluyendo las condiciones del cultivo.

Prosiguiendo con la productividad lipídica, *C. vulgaris* en el medio Chu #10 y el MBB, con el tratamiento de fósforo al 50%, aumentaron su productividad lipídica de manera significativa con respecto al control (53.6 y 54.8 mg/L·d respectivamente); con BG-11 no se apreció ninguna diferencia significativa en ninguno de los tratamientos.

En *N. oculata* como se esperaba, hubo una disminución de la productividad en el medio Chu #10 con el tratamiento S 50% y PS 50%, en el primero porque aun cuando produjo el mismo contenido de lípidos que el tratamiento P 50%, hay que tomar en cuenta que la cinética de S 50% se alargó 4 días más que la de P 50%, factor que influye directamente en la productividad y, con respecto a PS 50%, el contenido de lípidos fue el más bajo registrado en ese medio. El medio BG-11, a la inversa, presentó una mayor productividad en todos los tratamientos con respecto a su control, debido a que P 50% tuvo un mayor porcentaje de lípidos y S 50% y PS 50% alcanzaron la fase estacionaria en menor tiempo comparadas con el control.

De la composición de los lípidos totales, sólo los lípidos neutros son los adecuados para la producción de biodiesel.

El MBB y el BG-11 fueron los medios que mostraron un efecto positivo en la concentración de lípidos neutros en *C. vulgaris*. El MBB fue en el que se presentaron las concentraciones más altas de lípidos neutros en los tres tratamientos con deficiencia de nutrientes, con un pico máximo de 9.4 mg/mL con S 50%. En tanto BG-11 sólo exhibió un incremento de este producto en el cultivo P 50% y PS 50%, siendo 7.8 mg/mL la concentración más alta obtenida con déficit de fósforo. El tratamiento con azufre provocó una baja significativa en la concentración (2.25 mg/mL). Inesperadamente, en el medio Chu #10, los tres

tratamientos estimularon un decremento en el contenido de lípidos neutros con respecto al control, donde la concentración más baja fue de 2.6 mg/mL con P 50%.

A diferencia de la microalga anterior, en *N. oculata* fue con el medio Chu #10 donde se encontraron los valores más altos de lípidos neutros (6.8 mg/mL con S 50%), pese a esto, el tratamiento PS 50% ocasionó una disminución significativa de éstos. Lo mismo sucedió con el MBB, donde en los tres tratamientos se observó un decremento significativo del contenido de lípidos neutros, al obtener una concentración mínima de 2.8 mg/mL con P 50%. No así con el medio BG-11, el cual fue el único medio en el que se estimuló de manera significativa el aumento en la concentración de lípidos neutros con el tratamiento de fósforo al 50% (5.1 mg/mL).

Dependiendo de la especie de microalga varios compuestos químicos de alto valor pueden ser extraídos tales como pigmentos, antioxidantes, β -carotenos, polisacáridos, vitaminas, ácidos grasos, etc., los cuales son ampliamente utilizados en diferentes sectores de la industria (farmacia, cosmetología, nutracéuticos y suplementos alimenticios (Barrow et al., 2008).

El objetivo principal de este estudio era evaluar el crecimiento y el contenido lipídico de estas dos microalgas con deficiencia de nutrientes, no obstante, se quiso estudiar el efecto de esta limitación de nutrientes sobre el contenido de la clorofila *a* y los carotenoides, al ser productos de alto valor comercial.

En las dos microalgas se observó el mismo fenómeno tanto con la clorofila *a* como con los carotenoides, donde la máxima concentración de ambos productos se dio en el medio BG-11, seguido del MBB y, por último, el medio Chu #10. A pesar de esto, igualmente en las dos cepas, en el medio BG-11 no hubo diferencia significativa en la concentración de estos pigmentos entre los tratamientos con déficit de nutrientes y los controles; se alcanzaron picos máximos de clorofila *a* de 20 $\mu\text{g/mL}$ y de carotenoides de 8.6 $\mu\text{g/mL}$ para *C. vulgaris* y de 22.8 $\mu\text{g/mL}$ y 8.5 $\mu\text{g/mL}$ para clorofila *a* y carotenoides, respectivamente, en *N. oculata*. Pese a no ser concentraciones tan altas, en un cultivo a una escala más grande y teniendo en cuenta los altos rendimientos de biomasa en el medio BG-11; éstas podrían llegar a ser representativas.

Posteriormente, con el MBB, sí se presentó una mayor concentración estadísticamente significativa con el tratamiento de P 50% en *C. vulgaris* para los dos pigmentos, siendo de 14.6 $\mu\text{g/mL}$ para clorofila *a* y de 5.9 $\mu\text{g/mL}$ para carotenoides. Wong et al. (2015) reportaron, en *C. vulgaris* en MBB con limitación de fósforo, una concentración de clorofila *a* de 4.439 mg/mL. Los carotenoides totales, por otro lado, fueron más altos con una concentración de 14 $\mu\text{g/mL}$.

Esto no se observó para *N. oculata*, cuyas concentraciones de los dos compuestos, si bien fueron las segundas más altas, no mostraron diferencia significativa entre las muestras, con un contenido promedio de clorofila *a* de entre 15-20 $\mu\text{g/mL}$ y de 7 $\mu\text{g/mL}$ para carotenoides.

En último lugar se tiene al medio Chu #10 por haber sido el medio con las concentraciones más bajas de estos pigmentos, estos resultados se esperaban, ya que a simple vista los cultivos con medio Chu #10 independientemente del tratamiento y la microalga presentaban una coloración verde opaca, en comparación con los otros dos medios que estaban coloridos de un verde intenso. Las concentraciones de clorofila *a* en *C. vulgaris* apenas llegaron a 6.8 $\mu\text{g/mL}$ con P 50%; valor que aumentó hasta 10.8 $\mu\text{g/mL}$ con PS 50% en *N. oculata*. Para los carotenoides, igualmente, se observó lo descrito en el párrafo anterior, *C. vulgaris* con los valores más bajos de carotenoides de 3 $\mu\text{g/mL}$ con S 50% y 4.7 $\mu\text{g/mL}$ con PS 50% en *N. oculata*.

En 2016, Lucero & Siavichay demostraron que el enriquecimiento del medio con fósforo influye en la producción de carotenoides. De manera análoga, Goiris et al. (2015) reportaron que el crecimiento es mayor en cultivos saturados de nutrientes, que influyen en el aumento de compuestos carotenoides y, por ende, en mayor actividad antioxidante. Partiendo de esto, se puede deducir que las concentraciones de estos pigmentos no fueron relevantes. Sin embargo, esto no fue así.

Algo que no se realizó en estos experimentos fue una extracción especial para los pigmentos, debido a que, al no ser el objetivo principal del proyecto, se decidió utilizar un solo solvente (metanol) para reducir los costos y tiempos de experimentación. Hay que considerar que los rendimientos de estos dos pigmentos pudieron ser mayores a los que se hubieran obtenido, habiendo

realizado una extracción por ultrasonido y maceración con cuatro solventes, evaluando la influencia de su polaridad en la extracción, al demostrarse que la combinación de estas técnicas incrementa y acelera la extracción y reduce la toxicidad del solvente (Armenta et al., 2006; Singh et al., 2015).

Por último, un factor importante a resaltar y que no se pudo estandarizar durante todos los experimentos fue el ciclo luz/oscuridad (LD). Generalmente, este ciclo puede ser de 14:10 o 12:12, con un máximo de 16:08. Pero, durante la etapa de experimentación, no se pudo lograr la oscuridad total del cuarto de cultivo por razones inherentes al laboratorio, por lo que aun siendo menor la intensidad de luz durante la noche, estuvo presente todo el tiempo, lo cual, pudo ocasionar algún efecto no deseado en los metabolitos producidos por las dos cepas de microalgas ya que tanto la asimilación de nutrientes como el crecimiento celular pueden variar en función de la luz, el pH y la temperatura. Por la noche en la oscuridad, no se realiza la fotosíntesis, por lo que las microalgas consumen energía almacenada para la respiración y, dependiendo de la temperatura y otras condiciones, hasta el 25% de la biomasa producida durante el día se puede perder de nuevo en la noche (Chisti, 2007). No obstante, muchas especies no crecen bien bajo iluminación constante, a pesar de que el cultivo de microalgas normalmente se desarrolla de esta forma, por lo tanto, se utiliza un ciclo luz/oscuridad (LD).

Varios estudios han determinado que la luz influye notablemente en la composición química en general, en el contenido de pigmentos y en la actividad fotosintética. Por lo regular, una intensidad luminosa baja induce la formación de lípidos polares (fosfolípidos y glucolípidos), los cuales están funcional y estructuralmente asociados a las membranas celulares (Hu et al., 2008). En contraste, las altas intensidades luminosas influyen en la disminución del contenido total de lípidos polares con el concomitante incremento de la cantidad de lípidos de almacenamiento, principalmente triglicéridos (Olguín et al., 2001; Khotimchenko y Yakovleva, 2005; Solovchenko et al., 2008).

Las dos microalgas estudiadas en este trabajo parecen ser una buena opción para la producción de lípidos neutros que pudieran transformarse en biodiesel. Sin embargo, la selección de las especies o cepas más adecuadas para la

manufactura de este biocombustible debe tener en cuenta varios factores y ser considerados simultáneamente, como por ejemplo la capacidad de las microalgas para desarrollarse utilizando los nutrientes disponibles o bajo condiciones ambientales específicas.

Es crucial entender cómo elegir las especies correctas de microalgas, es decir, se debe crear una fórmula fotobiológica óptima para cada especie y construir una unidad de cultivo rentable que pueda entregar con precisión esa fórmula a cada célula algal individual, sin importar el tamaño de la instalación o su ubicación geográfica (Mata et al., 2010).

Con base a todos los resultados anteriores, todavía no se puede explicar por qué razón, las microalgas actúan de cierta manera ante el estímulo de deficiencia de nutrientes y considerando que las respuestas varían de acuerdo a las condiciones de cultivo, la composición del medio de cultivo y la especie de microalga sobre diferentes aspectos en la fisiología del microorganismo: su nutrición, multiplicación y la producción de metabolitos primarios y secundarios (Leonardos et al., 2000). Es necesario un estudio genómico para elucidar qué vías metabólicas se activan o se inhiben como efecto de la limitación de nutrientes y así entender el comportamiento de estos microorganismos en ausencia o déficit de nutrientes.

9. CONCLUSIONES

Cinéticas de crecimiento

- *C. vulgaris* presenta una proliferación celular mayor en los tres medios de cultivo, logrando entre $3-6 \times 10^7$ células/mL, en comparación con *N. oculata* que sólo alcanza entre $1-3 \times 10^7$ células/mL.
- Las dos microalgas llegan a fase estacionaria entre 2 a 3 veces más rápido en medio Chu #10 (aprox. 8-12 días) que con medio Bold Basal y BG-11, donde las cinéticas se pueden extender hasta los 24 días.
- Para obtener la mayor productividad de biomasa, el medio de cultivo idóneo para *C. vulgaris*, es el BG-11 con o sin deficiencia de fósforo al 50%. En tanto que, *N. oculata* muestra mejores resultados en el MBB y BG-11 con o sin deficiencia de nutrientes.

Lípidos totales

- En el medio Chu #10, la deficiencia de fósforo y azufre al 50% provoca en *C. vulgaris* un aumento significativo en el contenido de lípidos totales (85 y 74.1%, respectivamente) con respecto al experimento control.
- En el medio Bold basal, *C. vulgaris*, con el tratamiento con fósforo al 50% y la combinación de fósforo y azufre al 50% se inhibió significativamente el contenido de lípidos, siendo de 18.8% y 45.2 % respectivamente.
- *N. oculata* mostró los contenidos lipídicos más altos en el medio Chu #10; sin embargo, con respecto al control (62.3%), en ninguno de los tratamientos se exhibió un crecimiento significativo de los mismos, por el contrario, en el cultivo PS 50%, se reportó una reducción significativa de éstos (46.8%).
- *N. oculata* en el medio Bold Basal con el tratamiento de azufre al 50%, mostró un aumento significativo de los lípidos totales.
- En BG-11, por su parte, también se pudo apreciar un incremento significativo con el tratamiento de fósforo (50.3%) con respecto al control (30.4%).

Productividad lipídica

- *C. vulgaris* presentó la productividad lipídica más alta con el tratamiento de fósforo tanto en el medio Chu #10 (53.6 mg/L·d) como en el MBB (54.8 mg/L·d).
- En el medio Bold basal, el tratamiento con azufre al 50%, causó una depleción significativa de la productividad en *C. vulgaris* llegando sólo hasta los 31.8 mg/L·d.
- *N. oculata* en medio Chu #10, exhibió una disminución significativa de la productividad en los cultivos S 50% y PS 50% (39.8 y 39.7 mg/L·d, respectivamente).
- En el medio BG-11, en los tres tratamientos se obtuvieron productividades significativas más altas con respecto al control.

Lípidos neutros

- La deficiencia de los macronutrientes fósforo y azufre por separado o en combinación, inhiben, en medio Chu #10, la concentración de lípidos neutros en *C. vulgaris*.
- En el medio Bold basal se promueve la acumulación de lípidos neutros en *C. vulgaris* en los tres tratamientos, mientras que, para BG-11, se observa un comportamiento similar, salvo que, con la deficiencia de azufre se inhibe significativamente la concentración de lípidos neutros, siendo de 2.25 mg/mL.
- *N. oculata* presenta los valores de lípidos neutros más elevados en el medio Chu #10 en comparación con los otros dos medios, alcanzando valores de casi 7 mg/mL; sin embargo, el déficit de fósforo y azufre en combinación disminuye significativamente esta concentración.
- En el medio Bold basal, con los tres tratamientos disminuyó significativamente el contenido de lípidos neutros en *N. oculata*, siendo el valor más bajo registrado de 2.8 mg/mL con el tratamiento PS 50%.
- El medio BG-11 es el único en el que se percibió un incremento significativo en la concentración de lípidos neutros con la deficiencia de fósforo (5.1 mg/mL).

Clorofila a

- La mayor concentración de clorofila a se presentó en el medio BG-11, seguido del MBB y, por último, en el Chu #10 en las dos microalgas. No obstante, para la microalga *C. vulgaris*, solamente la deficiencia de fósforo en el medio MBB permitió una mayor acumulación del pigmento, en tanto que para *N. oculata*, esto se presentó en el medio Chu #10 con deficiencia de fósforo y en combinación.

Carotenoides

- De manera similar que, con la clorofila, se apreció un mayor contenido de carotenoides en orden decreciente en el medio BG-11, MBB y Chu #10, con un máximo de aproximadamente 8 µg/mL para las dos microalgas.
- En el medio Chu #10, *C. vulgaris* obtuvo concentraciones de carotenoides estadísticamente significativas en comparación con el control en los tres

tratamientos. Lo mismo se observó en el medio Bold basal, pero sólo con la deficiencia fósforo.

- Por último, para *N. oculata*, el tratamiento de fósforo y azufre en combinación en el medio Chu #10, fue el único en lograr un efecto positivo en la acumulación de carotenoides. Tanto en el MBB como en BG-11 no hubo ninguna diferencia significativa entre los tratamientos y los controles.

10. REFERENCIAS

1. Agüero-Rodríguez, J., Tepetla-Montes, J. & Torres-Beristáin, B. (2015). Producción de biocombustibles a partir de la caña en Veracruz, México: perspectivas y riesgos socio-ambientales. *CienciaUAT*, 9 (2), 74-84. Recuperado de <http://www.scielo.org.mx/pdf/cuat/v9n2/2007-7858-cuat-9-02-00074.pdf>
2. Andersen, R. A., Berges, J.A., Harrison, P.J. & Watanabe, M.M. (2005). Appendix A — recipes for freshwater and seawater media. *Essentials of Medical Geology*, 429-438. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/302934940_Appendix_A_recipes_for_freshwater_and_seawater_media
3. Arredondo-Vega, B. O., & Voltolina, D. (2007). Concentración recuento celular y tasa de crecimiento. *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*, 21-29.
4. Bajwa, K., Bishnoi, N.R., Kirrolia, A., Sharma, J. & Gupta, S. (2017). Comparison of various growth media composition for physio-biochemical parameter of biodiesel producing microalgal species (*Chlorococum aquaticum*, *Scenedesmus obliquus*, *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella pyrenoidosa*). *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, 2 (6), 27-31.
5. Barrow, C. & Shahidi, F. (2007). *Marine nutraceuticals and functional foods*. doi: <https://doi.org/10.1201/9781420015812>
6. 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*, 87 (1), 17–23. doi: 10.1016/j.mimet.2011.06.018
7. Bigogno, C., Khozin-Goldberg, I., Boussiaba, S., Vonshaka, A., & Cohen Z. (2002). Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid. *Phytochemistry*, 60(5), 497-503.
8. Brányiková, I., Maršálková, B., Doucha, J., Brányik, T., Bišová, K., Zachleder, V. & Vítová, M. (2010). Microalgae-novel highly efficient starch producers. *Biotechnology and Bioengineering*, 108 (4). doi:10.1002/bit.23016
9. Bold's Basal Medium (BB). (s/f). En *CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa)*. Recuperado de <https://www.ccap.ac.uk/media/documents/BB.pdf>
10. Cho, H. U. & Park, J. M. (2018). Biodiesel production by various oleaginous microorganisms from organic wastes. *Bioresource Technology*, 256, 502-508. doi: 10.1016/j.biortech.2018.02.010
11. Christi, Y. & Benebo, O. (2019). Chapter 1: Process Engineering Biofuel Production, Chapter 2: A renewable Source of Hydrocarbons and High Value Co-Products from Algal Biomass. *Advances in Biofeedstocks and Biofuels Liquid Biofuel Production*. Beverly, MA, USA: Wiley.
12. Converti, A., Casazza, A. A., Ortiz, E. Y., Perego, P., & Del Borghi, M. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48 (6), 1146–1151.
13. Dorval-Courchesne, N. M., Parisien, A., Wang, B. & Lan, C. Q. (2009). Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. *Journal of Biotechnology*, 141 (1-2), 31-41. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.02.018>
14. Extracción húmeda. (s/a). Recuperado de <http://www.originoil.com/technology/single-step-extraction.html>

15. Fernández-Linares, L., Montiel-Montoya, J., Millán-Oropeza, A. & Badillo-Corona, J. (2012). Producción de biocombustibles a partir de microalgas. *Ra Ximhai*, 8 (3), 101-115. Recuperado de <http://uaim.edu.mx/webraximhai/Ej-25barticulosPDF/10%20FERNANDEZ-LINARES.pdf>
16. Firoz, A., Abhijit, D., Roesfiansjah, R., Saleh, M., Hazim, M. & Abdul, B. (2012). Biofuel from algae-Is it a viable alternative? *Procedia Engineering*, 49, 221-227. doi: 10.1016/j.proeng.2012.10.131
17. González-González, L. M. (2010). Influencia de la deficiencia de nitrógeno y fósforo en las interacciones competitivas entre *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*. [Tesis de maestría]. Universidad Nacional de Colombia. Recuperado de <https://core.ac.uk/download/pdf/11055207.pdf>
18. Grupo Banco Mundial. (s.f.). Recuperado de https://datos.bancomundial.org/indicador/EG.USE.COMM.FO.ZS?end=2015&most_recent_year_desc=true&start=1960&view=chart
19. Guillard, R.L. & Ryther, J.H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervaceae* (Cleve). *Gran. Can. J. Microbiol.* 8, 229-239.
20. Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert & Darzins, A.I (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstock for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J*, 54(4), 621-639.
21. IEA Bioenergy Annual Report (2018). Recuperado de <https://www.ieabioenergy.com/wp-content/uploads/2019/04/IEA-Bioenergy-Annual-Report-2018.pdf>
22. Kang, W., Ji, Z. & Wang, J. (2009). Composition of the essential oil of *Adiantum flabellulatum*, *Chemistry of natural compounds*, 45, 575-577.
23. Khotimchenko, S.V. & Yakovleva, I.M. (2005). Lipid composition of the red alga *Tichocarpus crinitus* exposed to different levels of photon irradiance. *Phytochemistry*, 66(1), 73-79.
24. Leonardos L. & Lucas I. (2000). The nutritional value of algae grown under different culture conditions for *Mytilus edulis* L. larvae. *Aquaculture*, 182, 301-315.
25. Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C.Q. & Dobois-Calero, N. (2008). Biofuels from microalgae. *Biotechnol Prog*, 24(4), 815-820.
26. Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148 (C), 350-382. doi: 10.1016/0076-6879(87)48036-1
27. Liu, Z. Y., Wang, G. C. & Zhou, B. C. (2008). Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 99 (11), 4717-4722. doi: 10.1016/j.biortech.2007.09.073
28. Loera-Quezada, M. M. & Olguín, E. J. (2010). Las microalgas oleaginosas como Fuente de biodiesel: retos y oportunidades. *Revista Latinoamericana Biotecnológica Ambiental Algal*, 1 (1), 91-116.
29. López-Sulla, L.K. (2016). Efecto de tres medios de cultivo en el perfil de ácidos grasos de tres especies de microalgas oleaginosas amazónicas. [Tesis de Licenciatura]. Universidad Científica del Perú. Recuperado de <http://repositorio.ucp.edu.pe/bitstream/handle/UCP/319/LOPEZ-1-Trabajo-Efecto.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
30. Martínez-Macias, M. R., Sánchez-Duarte, R., Meza-Escalante, E., Ulloa-Mercado, R. & Saldivar-Cabral, J. (2017). Síntesis de lípidos de la microalga *Nannochloropsis oculata* para su uso potencial en la producción de biodiesel. *Int. Contam. Ambie.*, 33, 85-91. doi: 10.20937/RICA.2017.33.esp02.08
31. Mata., T. M., Martins, A. A. & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 217-232. doi: 10.1016/j.rser.2009.07.020
32. Mera-Sanmartín, R. (2016). El sulfato como nutriente esencial en la protección contra los efectos citotóxicos del cadmio en la microalga dulceacuícola *Chlamydomonas moewusii* Gerloff. [Tesis de doctorado]. Universidade da Coruña, España. Recuperado de Mera_Roi_TD_2016.pdf
33. Olguín, E.J., Galicia, S., Angulo-Guerrero, O. & Hernández, E. (2001). The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (Arthrospira) grown on digested pig waste. *Bioresource Technol*, 77(1), 19-24.
34. Ramos, F., Díaz, M. & Villar, M. (2016). Biocombustibles. Universidad Nacional del Sur-Conicet, 25 (147), 69-73. Recuperado de

- https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/25791/CONICET_Digital_Nro.cf291889-a370-4b7a-915b-4de3e1058c97_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y
35. Richmond, A. (2004). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Iowa: Blackwell Science Ltd. doi:10.1002/9780470995280
 36. Sabzi, S., Shamsaie-Mehrgan, M., Rajabi-Islami, H. & Hosseini-Shekarabi, S. P. (2018). Changes in biochemical composition and fatty acid accumulation of *Nannochloropsis oculata* in response to different iron concentrations. *Biofuels*. doi: 10.1080/17597269.2018.1489672
 37. Sakarika, M. & Kornaros, M. (2016). Effect of pH on growth and lipid accumulation kinetics of the microalga *Chlorella vulgaris* grown heterotrophically under sulfur limitation. *Bioresource Technology*, 219, 694-701. doi: 10.1016/j.biortech.2016.08.033
 38. Salazar-Pérez, L. E. (2012). Evaluación de métodos de extracción de aceite de microalgas para producción de biodiesel. [Tesis de licenciatura]. Universidad de Piura, Perú. Recuperado de https://pirhua.udep.edu.pe/bitstream/handle/11042/1490/ING_508.pdf
 39. Scott, S. A., Davey, M. P., Dennis, J. S., Horst, I., Howe, C. J., Lea-Smith, D. J & Smith, A. G. (2010). Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Current Opinion in Biotechnology*, 21 (3), 277-286. doi: 10.1016/j.copbio.2010.03.005
 40. Solovchenko, A.E., Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Cohen, Z. & Merzlyak, M.N. (2008). Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*. *J Appl Phycol*, 20 (3), 245-251.
 41. Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng*, 101 (2), 87-96.
 42. Stewart, W.D.P. (1974). *Algal physiology and biochemistry*. Oxford: Blackwell Scientific Publications Ltd.
 43. Suali, E. & Sarbatly, R. (2012). Conversion of microalgae to biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16, 4316.
 44. UTEX (Culture Collection of Algae at The University of Texas at Austin). (s/f). En *The University of Texas at Austin College of Natural Sciences*. Recuperado de <https://utex.org/products/bg-11-medium>
 45. Williams, J.A. (2002). Keys to Bioreactor selection. *CEP Magazine*, 34-41.
 46. Wong, Y., Ho, Y. & Ho, K. (2017). Maximization of cell growth and lipid production of freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by enrichment technique for biodiesel production. *Environ Sci Pollut Res*, 24, 9089-9101. doi: 10.1007/s11356-016-7792-9
 47. Wood, A., Everroad, R. & Wingard, L. (2005). Measuring growth rates in microalgal cultures. En Andersen R (ed). *Algal culturing techniques* (269-286). USA: Elsevier, Academic Press.
 48. Xiadong, D., Xiaowen, F. & Yajun, L. (2011). The effects of nutritional restriction on neutral lipid accumulation in *Chlamydomonas* and *Chlorella*. *African Journal of Microbiology Research*, 5 (3), 260-270.