# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA SUR

**Área de Conocimiento de Ciencias del Mar y de la Tierra**

Departamento Académico de Ciencias Marinas y Costeras


# TESIS

# Variación del Contenido de Lípidos en Microalgas con Potencial Biotecnológico Sometidas a Diferentes Condiciones de Estrés

Que como requisito para obtener el grado de:

**Maestro en Ciencias Marinas y Costeras con Orientación en Acuacultura**


Presenta:

**Esteban Alberto Lucero Rouzaud**

Director:

Dr. Pablo Misael Arce Amezquita



La Paz, B.C.S., septiembre de 2018

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA SUR

**Área de Conocimiento de Ciencias del Mar y de la Tierra**

Departamento Académico de Ciencias Marinas y Costeras


# TESIS

# Variación del Contenido de Lípidos en Microalgas con Potencial Biotecnológico Sometidas a Diferentes Condiciones de Estrés

Que como requisito para obtener el grado de:

**Maestro en Ciencias Marinas y Costeras con Orientación en Acuacultura**


Presenta:

**Esteban Alberto Lucero Rouzaud**

Director:

Dr. Pablo Misael Arce Amezquita



La Paz, B.C.S., septiembre de 2018

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA SUR**
Área de Conocimiento de Ciencias del Mar y de la Tierra
Departamento Académico de Ciencias Marinas y Costeras
**POSGRADO EN CIENCIAS MARINAS Y COSTERAS**

CIMACO

Fecha: 25/05/18

**DR. ENRIQUE A. GÓMEZ GALLARDO UNZUETA**
**JEFE DEL DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIAS MARINAS Y COSTERAS**
**PRESENTE.**

Los abajo firmantes, Miembros del Comité Académico Asesor del trabajo de tesis completamente terminado, titulado:

Variación del contenido de lípidos en microalgas con potencial biotecnológico sometidas a diferentes condiciones de estrés

que presentó:

Esteban Alberto Lucero Rouzaud

Otorgamos nuestro voto **aprobatorio** y consideramos que dicho trabajo está listo para su **defensa,** a fin de obtener el **Grado de Maestro** en Ciencias Marinas y Costeras, con Orientación en Acuacultura.

Comité Académico Asesor:

| | | |
|---|---|---|
| Dr. Pablo Misael Arce Amezquita<br>Nombre del Director | | Firma |
| Dr. Marco Antonio Cadena Roa<br>Nombre del Asesor | | Firma |
| Dr. Alfredo Flores Irigollen<br>Nombre del Asesor | | Firma |

DEPTO. DE CIENCIAS MARINA Y COSTERAS

POSGRADO EN CIENCIAS MARINAS Y COSTERAS

c.c.p Expediente del alumno (CIMACO)

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA SUR
RECIBIDO
05 SEP 2018
DECIMAC
POSGRADO EN CIENCIAS MARINAS Y COSTERAS

## DEDICATORIA

La dedicatoria de éste trabajo, así como cualquier otro de mis logros es y será para mi madre: **Maria Consuelo Rouzaud Osuna**, mi ejemplo de vida, y mi padre: **Esteban Lucero Mendez**, así como a mi hermano, y a todos mis familiares, ellos son los que siempre han estado detrás de mi, impulsándome en los mejores y en mis peores momentos, mi familia es mi motor del día a día. Mi madre a muy temprana edad me enseñó a nunca rendirme, ella logró titularse con los tratamientos de quimioterapia en su ser, parece que fue ayer cuando la miraba hacer sus últimos trabajos, interrumpidos por los malestares del tratamiento, algunos de estos malestares que hasta el momento se manifiestan debido a la agresividad del tratamiento, que decidió tomar en aquellos tiempos, a lo cual le agradezco infinitamente, ya que muchos se rinden en el proceso. Durante mi estadía en el posgrado, otro de mis pilares (mi padre) sufrió de múltiples problemas que lo llevaron a tener insuficiencia renal crónica, fue un impacto muy fuerte para toda la familia, ya que al solamente contar con un hermano discapacitado, me sentí desvanecido ante la situación, la asimilación fue muy difícil, ya que tuve que enfrentar múltiples ocupaciones que no me dejaron dar mi 100% de empeño en mi estadía por el posgrado, pero saqué fuerza y voluntad de muchas formas, una de esas fue Dios, empecé a encontrar esa tranquilidad que tanto anhelaba, y esos pensamientos nocturnos que no me dejaban descansar, se fueron esfumando, algo complejo de explicar, pero cada quien busca la forma de sentirse bien, y yo la fuí encontrando. ¡Lo logre! Y me llena de dicha que pese a todas esas dificultades, mis queridos padres, ustedes puedan ver y presenciar ésto. No fue nada fácil por las situaciones comentadas anteriormente, el trasfondo es abismal, pero me llena de dicha, porque la satisfacción de poder culminar lo vale.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi director, el Dr. Pablo Misael Arce Amezquita, quien me aceptó y depositó toda su confianza en mí desde un inicio, sin duda alguna por el excelente trato siempre brindado, la disponibilidad de su tiempo, para aclarar cualquier duda e inquietud, por la facilidad de permitirme cualquier material, equipo e instrumentación del laboratorio sin objeción alguna, y por siempre estar al pendiente de mí. Además agradezco a mi asesor: el Dr. Marco Antonio Cadena Roa, por todo el apoyo financiero, siempre al pendiente de lo que necesitaba, por lo cual le agradezco infinitamente, así como su disponibilidad para aclarar dudas e inquietudes durante la realización del diseño y el proceso de experimentación, el excelente trato y disposición. Así mismo, agradezco a mi otro asesor, el Dr. Alfredo Flores Irigollen, el cual siempre tuvo la mejor disposición conmigo, siempre brindándome soporte, con la mejor accesibilidad al consultarlo, por su tiempo, preparándome para las presentaciones, y sin duda alguna el excelente trato. Estoy infinitamente agradecido con los tres, gracias por creer en mí y por el buen trato que siempre recibí, realmente no tengo ninguna queja, me dejaron solamente cosas positivas, y un ejemplo para continuar desempeñándome en la ciencia.

También quiero agradecer a a la Dra. Maurilia Rojas Contreras que facilitó equipo y material de laboratorio, de igual manera una excelente persona, que tuvo siempre la mejor disposición conmigo, al Dr. Juan Manuel Pacheco Vega, quien me brindó la mejor disposición y los mejores tratos en el tiempo que duró mi estancia en San Blas, Nayarit, México. A la IBQ. Mony Lauterio Garcia, por siempre estar al pendiente de mis avances, y consejos, gracias por todo. No se me puede olvidar Elizabeth Perez Bravo (Eli) quien me brindó toda la ayuda y disposición en el laboratorio de “La Unidad Pichilingue - UABCS”, por todas las atenciones y el conocimiento que me brindó en su momento., así mismo al técnico en acuacultura Oscar Valdez, quien me brindó soporte en los sistemas. A la Dra. Anidia Blanco Jarvio por facilitarme el laboratorio y espacio para guardar mis muestras. Gracias también al equipo de fibra de vidrio de la Unidad Pichilingue, que quien no me ayudo directamente, pero todo lo que aprendí en el taller con ellos, lo agradezco mucho, gracias a eso pude restaurar tanques que utilicé para mi experimento, y de nuevo gracias al “jefe” por la oportunidad de aprender ahí

con ellos. Al M.C. Francisco Jimenez Ordaz por ayudarme un día con extracciones, gracias de verdad, de igual manera al M.C. Saúl Hernandez Rubio facilitándome programas y soporte, a la M.C. Yesenia Cota Castro apoyándome con la documentación y consultas, a Jessica Paola Reinecke, gracias por muestrearme cuando estaba en estancias, a José Roberto Mendoza, gracias por auxiliarme aquel día a última hora con la fuga de los tanques, y además quiero agradecer a los que alguna vez llegaron a hacerme ameno el día en mi zona de trabajo: Diana Arias Romero, Dr. Carlos Rangel, Roberto Jauregui Paniagua, Favio Favoretto, Macario Savin A., Diego Cadena, M.C. Erika Torres Ochoa, Giovana Ruiz Cortéz y al Ing. Manuel de Jesús Valenzuela.

Agradezco infinitamente el apoyo de CONACyT, por la beca otorgoda, sin esta ayuda no se hubiera podido realizar el presente trabajo, ni hubiera podido seguir formándome, así mismo agradezco a mi querida institución: La Universidad Autónoma de Baja California Sur, a cada uno de mis profesores del departamento de ingeniería en pesquerías, y de CIMACO, gracias por todo el aprendizaje.

# ÍNDICE

## TABLA DE CONTENIDO


1. Introducción ..... 1
2. Antecedentes ..... 5
3. Objetivo general ..... 12
4. Objetivos específicos ..... 12
5. Metodología ..... 13
5.1 *Zona de experimentación* ..... 13
5.2 *Descripción de las cepas utilizadas* ..... 13
5.3 *Calidad del agua* ..... 13
*5.4 Medio de cultivo* ..... 14
*5.6 Escalado de la siembra* ..... 14
*5.7 Efecto de las estaciones sobre el contenido de lípidos totales* ..... 15
*5.8 Técnica de cosecha (concentración de biomasa algal)* ..... 16
5.9 *Almacenamiento post-cosecha* ..... 16
*5.10 Muestreo de las microalgas almacenadas en presencia de luz y ausencia de luz.* ..... 17
5.*11 Determinación de la viabilidad de microalgas almacenadas* ..... 17
*5.12 Evaluación microbiológica de bacterias en la biomasa algal almacenada en refrigeración* ..... 18
*5.13 Incorporación de una fuente de carbono a los cultivos* ..... 18
*5.14 Evaluación de cultivos con un fotoperíodo de corto tiempo* ..... 19
5.15 *Conteos celulares* ..... 19
*5.16 Análisis de las muestras* ..... 20
*5.18 Análisis estadísticos.* ..... 21
6. Resultados ..... 22
*6.1 Curva de calibración de absorbancias de lípidos* ..... 22
*6.2 Estandarización de colorantes para viabilidad celular* ..... 22
*6.3 Experimentación con la adición de bicarbonato de sodio fuente extra de carbono a los cultivos* ..... 23
*6.4 Experimentación con la adición de melaza como fuente de carbono a los cultivos* ..... 27
*6.5 Evaluación de fotoperíodo de corto tiempo* ..... 32

*6.6 Evaluación del efecto de las condiciones de las estaciones del año sobre los lípidos en las microalgas* ..... 36
*6.7 Determinación de la técnica de cosecha sobre el contenido lipídico en las microalgas* ..... 40
*6.8 Evaluación post-cosecha de almacenamiento de biomasa algal.* ..... 43
*6.8 Determinación de la Viabilidad y calidad de la biomasa algal almacenada.* ... 46
*6.9 Evaluación de estrés mecánico por aireación* ..... 50
7. Discusión ..... 53
*7.1 Experimentación con la adición de bicarbonato de sodio fuente extra de carbono a los cultivos* ..... 53
*7.2 Experimentación con la adición de melaza como fuente de carbono a los cultivos de las tres especies de microalgas* ..... 55
*7.3 Evaluación del efecto de las condiciones de las estaciones del año sobre los lípidos en las microalgas* ..... 57
*7.4 Evaluación de fotoperíodo de corto tiempo* ..... 60
*7.5 Evaluación post-cosecha de almacenamiento y la calidad de biomasa algal en refrigeración* ..... 63
*7.6 Estrés mecánico por aireación* ..... 68
*6.7 Efecto de la técnica de cosecha sobre la composición lipídica de la biomasa algal (uso de floculantes)* ..... 70
8. Conclusiones ..... 72
9. Bibliografía ..... 75

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig 1. Sistema de captación, tratado y abastecimiento de agua de mar para uso acuícola. ..... 14
Fig 2. Escalamiento de los cultivos en volúmenes progresivamente mayores (1000 mL – 19 L – 400 L). ..... 15
Fig 3. Sensores programados (hobos) para tomar lectura de intensidad lumínica y temperatura durante todos los días de cultivo. ..... 15
Fig 4. Triplicados de cultivos en laboratorio, donde se evaluaron dos tratamientos con la adición de bicarbonato de sodio para cada una de las especies de microalgas. ..... 19
Fig 5. Espectofotometro de fluorecencia, marca: Thermo Scientific, modelo: Genesys 10s UV-VIS. ..... 20
Fig 6. Curva de calibración para la determinación de lípidos totales mediante espectofometría. ..... 22

Fig 7. Efecto de la adición de bicarbonato de sodio sobre el crecimiento en las tres especies de microalgas: *Grammatophora sp.*, *Navicula sp*., y *Schizochytrium sp*. ..... 24
Fig 8. Efecto de la adición de bicarbonato de sodio como fuente de carbono en los porcentajes de lípidos totales de la microalga *Schizochytrium sp*. ..... 25
Fig 9. Efecto de la adición de bicarbonato de sodio como fuente de carbono en los porcentajes de lípidos totales de la microalga *Grammatophora sp*. ..... 26
Fig 10. Efecto de la adición de bicarbonato de sodio como fuente de carbono en los porcentajes de lipidos totales de la microalga *Navicula sp*. ..... 26
Fig 11. Diferencias en pigmentación de la biomasa para todas las especies con los experimentos adicionando bicarbonato de sodio. ..... 27
Fig 12. Crecimiento de la microalga *Schizochytrium sp*. con la adición de melaza como fuente de carbono ..... 28
Fig 13. Crecimiento de la microalga *Navicula sp*. con la adición de melaza como fuente de carbono. ..... 29
Fig 14. Crecimiento de la microalga *Grammatophora sp.* con la adición de melaza como fuente de carbono. ..... 29
Fig 15. Efecto de la adición de melaza sobre los porcentajes de lípidos totales de la microalga *Schizochytrium sp*. ..... 30
Fig 16. Efecto de la adición de melaza sobre los porcentajes de lípidos totales de la microalga *Grammatophora sp*. ..... 31
Fig 17. Efecto de la adición de melaza sobre los porcentajes de lípidos totales de la microalga *Navicula sp*. ..... 32
Fig 18. Crecimiento de la microalga *Schizochytrium sp*. control (solamente medio f/2) y con el tratamiento de un fotoperiodo de 2 h/Día, cultivadas en laboratorio en condiciones controladas, en volúmenes de 19 L. ..... 33
Fig 19. Crecimiento de la microalga *Grammatophora sp*. control (solamente medio f/2) y con el tratamiento de un fotoperíodo de 2 h/Día, cultivadas en laboratorio en condiciones controladas, en volúmenes de 19 L. ..... 33
Fig 20. Crecimiento de la microalga *Navicula sp*. control (solamente medio f/2) y con el tratamiento de un fotoperíodo de 2 h/Día, cultivadas en laboratorio en condiciones controladas, en volúmenes de 19 L. ..... 34
Fig 21. Efecto de un fotoperíodo de corto tiempo sobre los contenidos de lípidos totales de la microalga *Schizochytrium sp*. ..... 35
Fig 22. Efecto de un fotoperíodo de corto tiempo sobre los contenidos de lípidos totales en la microalga *Grammatophora sp*. ..... 35
Fig 23. Efecto de un fotoperíodo de corto tiempo sobre los contenidos de lípidos de la microalga *Navicula sp*. ..... 36
Fig 24. Crecimiento de las tres diferentes especies de microalgas cultivadas en el exterior en la temporada de invierno (inicios de enero 2018). ..... 37
Fig 25. Crecimiento de las tres diferentes especies de microalgas cultivadas en el exterior en la temporada de otoño (mediados de octubre 2017). ..... 37
Fig 26. Crecimiento de las tres diferentes especies cultivadas en el exterior en la temporada de verano (inicios de agosto 2017). ..... 38

Fig 27. Evaluación del efecto de las estaciones del año sobre el contenido total de lípidos de la microalga *Navicula sp*. ..... 38
Fig 28. Evaluación del efecto de las estaciones del año sobre el contenido total de lípidos de la microalga *Grammatophora sp*. ..... 39
Fig 29. Evaluación del efecto de las estaciones del año sobre el contenido total de lípidos de la microalga *Schizochytrium sp*. ..... 39
Fig 30. Efecto de floculantes químicos sobre los porcentajes de lípidos totales de la microalga *Grammatophora sp*. ..... 41
Fig 31. Efecto de floculantes químicos sobre los porcentajes de lípidos totales de la microalga *Navicula sp*. ..... 42
Fig 32. Efecto de los floculantes químicos sobre los porcentajes de lípidos totales de la microalga *Schizochytrium sp.* ..... 43
Fig 33. Efecto del tiempo de almacenamiento en ausencia y presencia de luz sobre la cantidad de lípidos totales en la microalga *Schizochytium sp*. ..... 44
Fig 34. Efecto del tiempo de almacenamiento en ausencia y presencia de luz sobre el contenido de lípidos totales en la microalga *Grammatophora sp*. ..... 45
Fig 35. Efecto del tiempo de almacenamiento en ausencia y presencia de luz sobre el contenido de lípidos totales en la microalga *Navicula sp*. ..... 45
Fig 36. Estado de las células algales de *Grammatophora sp*. al inicio del experimento en almacenamiento a 4 °C. ..... 46
Fig 37. Estado de las células algales de *Grammatophora sp.* al final del experimento en almacenamiento a 4 °C ..... 47
Fig 38. Estado de las células algales de *Navicula sp*. al inicio del experimento en almacenamiento a 4 °C. ..... 47
Fig 39. Estado de las células algales de *Navicula sp*. al final del experimento en almacenamiento a 4 °C ..... 48
Fig 40. Estado de las células algales de *Schizochytrium sp*. al inicio del experimento en almacenamiento a 4 °C. ..... 48
Fig 41. Estado de las células algales de *Schizochytrium sp*. al final del experimento en almacenamiento a 4 °C. ..... 49
Fig 42. Efecto de la aireación sobre la densidad celular de las especies de microlgas cultivadas ..... 51
Fig 43. Efecto de la aireación sobre los porcentajes de lípidos totales en la microalga *Schizochytrium sp*. ..... 51
Fig 44. Efecto de la aireación sobre los porcentajes de lípidos totales en la microalga *Grammatophora sp*. ..... 52
Fig 45. Efecto de la aireación sobre los porcentajes de lípidos totales en la microalga *Navicula sp*. ..... 52

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estandarización de colorantes para observar viabilidad celular. ..... 23
Tabla 2. Comparaciones múltiples del ANOVA aplicado a los porcentajes de lípidos de *Schizochytrium sp*. con los tratamientos de bicarbonato de sodio añadido. ..... 25

Tabla 3. Comparaciones múltiples del ANOVA de una vía aplicado a los porcentajes de lípidos de la *Schizochytrium sp*. con los tratamientos de la adición de melaza. ..... 31
Tabla 4. Valores de temperatura e intensidad lumínica registrados y recopilados mediante sensores en las diferentes estaciones. ..... 40
Tabla 5. Comparación de los tratamientos resultantes del ANOVA aplicado a los porcentajes de lípidos en la microalga *Grammatophora sp*. con el uso de floculantes químicos. ..... 41
Tabla 6. Comparación de los tratamientos resultantes del ANOVA aplicado a los porcentajes de lípidos de la microalga *Navicula sp.* con el uso de floculantes químicos. ..... 42
Tabla 7. UFC del cultivo de bacterias en el medio TSA, mediante la técnica de vaciado en placa de las muestras al inicio y final del experimento de biomasa algal almacenada en refrigeración. ..... 49

## RESUMEN

Las microalgas son de gran importancia debido a la cantidad y calidad de lípidos presentes en éstas, además que son muy eficientes en la producción de biomasa, en un corto periodo de tiempo, y con muy pocos requerimientos. Actualmente los lípidos en las microalgas juegan un papel importante directamente en la acuacultura como alimento vivo para las especies de interés comercial cultivadas, pero también como una fuente para obtener bioproductos con alto valor agregado, tales como: biocombustibles, fármacos; así mismo, con aporte para el sector en nutrición humana, todo esto debido a la calidad y las bondades nutricionales derivados de los lípidos presentes. En este trabajo se utilizaron 3 especies de microalgas que fueron aisladas en la bahía de La Paz B.C.S, México, las cuales han presentado resultados favorables en distintas evaluaciones acorde a sus propiedades nutricionales y a la capacidad que tienen, de poder cultivarse en el exterior, minimizando así los costos de producción de las mismas, al no estar en ambientes donde se gastan insumos para tener condiciones controladas para asegurar su producción. Se sabe que las microalgas pueden variar su cantidad y calidad de lípidos bajo diferentes condiciones de cultivo y factores de estrés, por lo que se evaluaron distintos factores de estrés, se probaron experimentos en condiciones controladas de laboratorio (modelo I) y experimentos en el exterior, en condiciones no controladas (modelo II y mixto). Se encontró que el experimento con mayor variación de los porcentajes de lípidos totales en forma ascendente, fue el de biomasa almacenada (4 °C) en ausencia de luz para las 3 especies de microalgas ($p < 0.05$), de las cuales la microalga *Schizochitrium sp.* logró un mayor porcentaje de aumento *(>13% respecto al control).* En el experimento con diferentes técnicas de cosecha (floculantes químicos), se encontró diferencias significativas ($p<0.05$) en el aumento de los porcentajes de lípidos para la microalga *Grammatophora sp*. cosechada con $FeSO_4$ (6%), y para *Navicula sp*. con ambos floculantes (2%), respecto al control (cosecha por simple gravedad)., en los dos experimentos con la adición de una fuente extra de carbono (bicarbonato de sodio y melaza), resultó favorecedor en el incremento de lípidos solo para la microalga *Schizochytrium sp.* ($p < 0.05$), y en el experimento con la adición de melaza; el tratamiento de 1.9 g/L de melaza añadida como fuente de carbono fue la que obtuvo mayor crecimiento celular en la microalga

*Schizochytrium sp.*, la cual logró una densidad celular de aproximadamente $2.6x10^5$ cel/mL, así como un incremento de lípidos respecto al control ($p < 0.05$). En la evaluación de los cultivos con un fotoperíodo de corto tiempo (2h/día), respecto al control (luz constante 24 h/día), la microalga *Schizcochytrium sp.* fue la que más variación de los contenidos de lípidos tuvo, favoreciendo la inducción de material lipídico en éste experimento. En la evaluación del efecto de las estaciones sobre los contenidos lipídicos se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de lípidos de los cultivos en el exterior para las tres especies de microalgas ($p<0.05$), resultando la estación de invierno la más favorecedora para la acumulación de material lipídico de las tres diferentes especies evaluadas. Cabe destacar que *Schizochytrium sp.* le favorece invierno en la productividad de biomasa, *Grammatophora sp*. y *Navicula sp*. tienen gran productividad de biomasa todo el año, pero en otoño obtienen la mayor productividad de biomasa, acorde a las condiciones locales.

**Palabras clave:** Microalgas, lípidos, ácidos grasos, estrés.

# 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la contaminación juega un papel crítico en el medio ambiente y en el planeta. Entre los contaminantes atmosféricos, el bióxido de carbono ($CO_2$) contribuye de manera significativa al efecto invernadero. El calentamiento global es atribuído principalmente a los niveles elevados de $CO_2$ en la atmósfera, por lo que ha llevado al desarrollo de estrategias de mitigación de $CO_2$, tales como la captura de $CO_2$ basada en reacciones químicas; sin embargo éstas son relativamente costosas y consumen energía, propiciando la necesidad de desarrollar alternativas eficientes, rentables y sustentables. La mitigación biológica de $CO_2$ es una estrategia alternativa en la fijación de $CO_2$ a través de la fotosíntesis que conduce a la producción de energía de biomasa. (Kondilia & Kaldellis, 2007; de Moraisand Costa, 2007). Las microalgas son mucho más eficientes que las plantas terrestres en la producción de biomasa bajo diversas condiciones en el medio ambiente, además son importantes para prevenir el aumento de la concentración atmosférica de $CO_2$. Estas convierten el $CO_2$ en energía de biomasa y al mismo tiempo reciclan el $CO_2$ (Demirbas, 2004). El acoplamiento del secuestro de $CO_2$ con los cultivos de algas reducen la huella de carbono y promueven un ambiente sustentable. La producción de microalgas está considerada como el bioenergético con valor más negativo en emisiones de gases invernaderos, por cada 100 toneladas producidas de biomasa algal se consumen 183 toneladas de $CO_2$ (183kg $CO_2$/MJ) (Christi, 2007; Guedes, 2011). Por tal razón es de suma importancia, la utilización, producción e investigación asociada a las microalgas, ya que poseen cualidades biotecnológicas, y bondades ecológicas, brindando así, un servicio al planeta.

Gran parte de la contaminación ambiental se debe principalmente a la dependencia de combustibles fósiles (Gao et al., 2014), por lo que otros biocombustibles tales como el biohidrógeno, bioetanol y biodiesel; sin duda alguna presentan alternativas sustentables, atrayendo la atención debido a sus propiedades ecológicas y renovables. El biodiesel que es producto derivado de las microalgas, ha abierto un nuevo camino, para el desarrollo y el aprovechamiento de bioenergía limpia (Halim et al., 2014). La utilización de las microalgas brinda una de las fuentes más prometedoras de biodiesel, ya que

éstas tienen más ventajas en comparación con otros productores de biodiesel (Brennan & Owende, 2010). Además, podrían cultivarse en diferentes áreas, en diferentes ambientes, inclusive en tierras no cultivables, evitando así la competencia con cultivos alimentarios (Miau & Wu, 2006). Entre las muchas ventajas que tienen las microalgas, se encuentra una rápida tasa de crecimiento y una alta productividad lipídica de las células algales, que son adecuadas para la producción de biodiesel. Aunque también existen desventajas considerables, el alto costo del biodiesel producido por las microalgas aún limita su aplicación, por lo que se sigue buscando la manera de reducirlo aún más, para poder cumplir con los requisitos de una producción industrial (Scott et al., 2010). En los últimos años se han realizado diferentes evaluaciones, usando aguas residuales en lugar de medio sintético (Le et al., 2016, Hemalatha & Mohan, 2016), para lograr la eliminación simultánea de nutrientes y la recuperación de energía a partir de sustratos inútiles y baratos.

Actualmente, el proceso de lodo activado (AS), es uno de los procesos más aplicados en el tratamiento biológico de varios tipos de aguas residuales. Sin embargo, las microalgas también pueden crecer bien en aguas residuales con abundantes nutrientes, contribuyendo además a la reducción de contaminantes y la sustentabilidad ambiental (Bashan-LE & Bashan-Y, 2010). Las microalgas tienen el potencial para eliminar de forma eficiente los nutrientes y sustancias orgánicas trabajando de manera heterotrófica / mixotrófica, además de sintetizar productos de alto valor agregado. El tratamiento de aguas residuales con microalgas está llamando cada vez más atención de los investigadores (Venkata et al., 2015). El carbono orgánico y los contaminantes en las aguas residuales podrían convertirse en componentes celulares como lípidos y carbohidratos, a través del metabolismo. Además, las microalgas pueden asimilar nitrógeno inorgánico (N) y fósforo (P) para el crecimiento celular, algo que está muy estudiado, como un método eficiente y económico para el tratamiento de aguas residuales y se ha utilizado ampliamente en el proceso de biorremediación (Bhatnagar et al., 2011, Devi, 2012).

Las microalgas son microorganismos que generalmente crecen suspendidas en agua, utilizando la fotosíntesis y muy pocos requerimientos (luz solar, agua, $CO_2$ y

nutrientes inorgánicos (N, P, K, etc.) para producir oxígeno ($O_2$) y biomasa rica en proteínas, lípidos, vitaminas, antioxidantes y otros nutrientes requeridos en la nutrición para humanos y animales. Además de la fotosíntesis, algunas microalgas pueden crecer heterotróficamente, por fermentación en la oscuridad, usando azúcares y otros sustratos orgánicos. Miles de especies de microalgas se describen en la literatura, pero solo una cantidad de géneros y especies se producen actualmente de manera comercial fotosintéticamente (Chen et al., 2015).

Hay un interés creciente en todo el mundo asociado a los bioproductos de microalgas establecidas, que se pueden extraer principalmente, derivado de los lípidos presentes en éstas, bioproductos con alto valor comercial. En la actualidad estos productos están dirijidos principalmente a cubrir las necesidades nutricionales en humanos, así como agentes colorantes, ácidos grasos omega-3 de cadenas largas, tales como el Ácido Docosahexaenoico y ácido eicosapentaenoico (DHA, EPA) y también productos a granel de bajo valor con extensa investigación y desarrollo en curso en todas las áreas de biotecnología. (Chen et al., 2015).

La importancia de las microalgas en el ambiente marino es elemental, son el eslavon primario de la cadena trófica alimenticia, por tal razón son indispensables en los laboratorios de acuacultura, principalmente para alimentar a la producción de especies de interés comercial, cultivadas en acuacultura (Benemann, 1992). Varias especies de microalgas marinas se utilizan como alimentos en la acuacultura. Las principales especies utilizadas son de los géneros: *Nannochloropsis*, *Pavlova, Isochrysis, Tetraselmis, Thalassiosira, Chaetoceros y Skeletonema*. Éstos son particularmente ricas en los nutrientes requeridos por las etapas larvales y juveniles de los peces, camarón peneido y otros crustáceos, moluscos, etc., los ácidos grasos omega-3 C20 y C22 de cadenas largas, como el ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) son de interés particular ya que son necesarios en la nutrición de peces. En algunos casos, las algas se utilizan para alimentar a los rotíferos y artemias, que luego se utilizan para alimentar a los animales de mayor tamaño (etapas juveniles) (Borowitzka, 1997; Hemaiswaryaetal, 2011). Las microalgas, en grandes cantidades, en particular la espirulina también se utiliza como fuente de pigmentos naturales

para el cultivo de langostinos, salmónidos, peces ornamentales y otros peces de alto valor (Priyadarshani & Rath 2012). El mayor desafío en las operaciones acuícolas es que los animales recién nacidos y eclosionados (criaderos y viveros), se deben alimentar de alimento vivo (microalgas). Las microalgas se producen in situ, según sea necesario, en unos pocos metros cúbicos de cultivo, y luego se alimentan directamente, sin recolección, a las larvas y peces juveniles, camarones, o bivalvos, requieren alimento vivo, necesariamente microalgas. Sin embargo, este ha sido un cuello de botella importante para las operaciones acuícolas en todo el mundo, ya que cultivar las algas cuando es necesario, en el momento adecuado y en cantidades suficientes, ha demostrado ser un desafío (Spolaore et al., 2006). Por lo tanto, producir algas a distancia y enviarlas a donde y cuando se requiera, es atractivo, pero se requiere que la muestra esté concentrada (por ejemplo, centrifugación a una pasta con alto contenido de sólidos) y que el almacenamiento de las células de algas sea a bajas temperaturas, típicamente con un crioprotector agregado, para usar cuando sea necesario.

Algunas empresas cultivan y usan biomasa de microalgas para alimentar rotíferos o larvas de peces marinos y crustáceos. Tal es el ejemplo de una exitosa empresa en china "Tianjin Ocean Pal Biotech Co.", la cual cultiva *Chlorella* con agua de mar en Hainan, para satisfacer sus necesidades en la cría de rotíferos que luego se utilizan para alimentar a las larvas de camarón. En el año 1999, la producción de microalgas para acuacultura llegó a 1000 ton (alrededor del 62% para moluscos, 21% para camarones y 16% para peces) (Hemaiswarya et al., 2011), aunque esta cifra probablemente sea una estimación alta. Las microalgas son una alternativa para reemplazar los alimentos utilizados en la acuacultura. Actualmente estos alimentos son producidos a partir de harina y aceites de pescado. El mercado de la alimentación acuícola es muy grande, varios millones de toneladas por año con costos de producción de pescado y harina de pescado cada vez son mayores, actualmente de más de 3000 ton-1 incluyendo la incertidumbre en el suministro de lo que se necesite. Esta situación presenta un gran mercado a corto plazo para la venta de microalgas a granel para ser utilizada como alimento en la acuacultura y para animales en general.

## 2. ANTECEDENTES

Las microalgas han sido utilizadas desde hace muchos años atrás, inicialmente por las bondades nutricionales de éstas. Se sabe que las microalgas cultivadas fotosintéticamente son fuentes de carbohidratos, proteínas, aceites y nutrientes esenciales como vitaminas, minerales, carotenoides, ácidos grasos (omega-3) de cadenas largas poliinsaturadas, y otros fitonutrientes. Por ejemplo, la microalga *Chlorella* contiene el denominado factor de crecimiento concentrado (CGF), que puede aislarse de ésta alga, por extracción de agua caliente y se vende comercialmente como un producto de promoción de la salud (Tang & Suter, 2011). Spirulina contiene la llamada "espirulina de calcio", un polisacárido sulfatado, y ficocianina, una proteína, ambas moléculas con efectos asociados a la promoción de la salud. La ficocianina también se usa como colorante alimenticio, recientemente permitido tanto en Europa como en EUA. La microalga *Dunaliella salina* y *Haematococcus pluvialis* son fuentes comerciales de antioxidantes, carotenoides, betacaroteno (también una pro-vitamina A) y astaxantina (Borowitzka, 2013a). Estos productos de interés comercial como los carotenoides presentes en las microalgas, se venden como extractos crudos, en forma de polvos, tabletas y aceites, estos últimos típicamente como cápsulas de gelatina blanda.

Las microalgas se pueden cultivar en agua dulce, salobre o agua de mar, con fertilizantes agrícolas como nutrientes y fuentes de carbono, ya sea como $CO_2$ burbujeando en los cultivos o adicionando bicarbonato, o incluso del aire. Tanto *Spirulina* como *Chlorella* son especies cultivadas en China, utilizando estanques de raceway mixtos con paletas. La producción comercial que utiliza la proteína del retinoblastoma (PBR) está actualmente limitada a la producción de *H. pluvialis* para la obtención del carotenoide astaxantina. *Chlorella* también se produce comercialmente en varios países, incluyendo China, por fotosíntesis ('autotrófico') y por vía de fermentación ('heterotrófico', en azúcares en la oscuridad en reactores esterilizados) (Shi et al., 1999; Ip y Chen 2005; Wang y Peng 2008; Han et al. 2013). La producción de *Chlorella* por los procesos de fermentación se ha expandido recientemente con dos grandes empresas estadounidenses y europeas; Solazyme, es una de las empresas en EE. UU. y Roquette, en Francia, que ofrecen sus productos para nutrición humana y a granel como ingredientes en

la comida. El dinoflagelado no fotosintético *Crypthecodinium cohnii*, una fuente de ácidos grasos de cadenas largas poliinsaturadas (LC-PUFA), como lo es el ácido docosahexaenoico (DHA) utilizado en las fórmulas de leche infantil, esta alga es producida por fermentación en la oscuridad utilizando azúcares (Jiang et al. 1999; Wynn et al., 2005).

La microalga *Dunaliella* se comercializó por primera vez en Australia e Israel en la década de 1980 (Ben Amotz et al., 1988, Borowitzka & Borowitzka 1990, Schlipalius 1991, Borowitzka 2013b). El β-caroteno es la principal fuente de provitamina A y se usa ampliamente como colorante alimentario, con un mercado global que se estima superará los 280 millones de dólares en 2015 (Ribeiro et al., 2011). Sin embargo, esto es para el betacaroteno sintético. BASF (una compañía química alemana) es el líder mundial indiscutible en la producción natural de betacaroteno de *Dunaliella salina*, con más de mil hectáreas de estanques de producción en dos plantas en Australia (adquirida como parte de su adquisición hace unos años de Cognis) (Borowitzka 2013b). BASF anunció la expansión con un sistema de producción, posiblemente aún mayor que se está estableciendo actualmente en Arabia Saudita, una empresa conjunta local “National Aquaculture Group”. La producción de *Dunaliella salina* para betacaroteno en China fue llevada a cabo por la empresa “Inner Mongolia Lantai Industrial Co.", (Mongolia Interior) y el Salt Research Institute, China National Salt Industry Corp (Tianjin) (Yin et al., 2013).

El hematococo *pluvialis* se comercializó para la astaxantina en Israel y los EE. UU. (Boussiba 2000; Lorenz & Cysewski 2000) y también se comenzó a utilizar en China (http://www.algachina.com; http://www.e-asta.cn; http: //www.astawefirst. com). La principal aplicación existente para la astaxantina, que se utiliza como aditivo en la alimentación del salmón de piscifactoría y como pigmento para la carne de pescado, con cerca de 200 toneladas de astaxantinas sintéticas con un valor de US $ 200 millones. Sin embargo, en cuanto al betacaroteno natural, actualmente es el único mercado para astaxantina natural provenientes de microalgas, para aplicaciones nutricionales humanas, principalmente debido a su alto precio de venta, hasta aproximadamente 10,000 kg-1, o casi 10 veces más alto que el precio actual de la astaxantina sintética utilizada en acuacultura.

Anteriormente se estaba aplicando mucho esfuerzo e investigación en la producción de biocombustibles, como el etanol a base de caña de azúcar y el maíz, asi como biodiesel a partir de aceite de soya, canola, girasol y aceite de palma. Sin embargo, la sustentabilidad de la producción de estos biocombustibles se ha visto fuertemente cuestionada, principalmente porque la gran demanda de ellos requiere la conversión del uso de bósques o áreas naturales en superficies agrícolas o incluso el uso de superficies actualmente utilizadas para producción de alimentos (Majer et al., 2009). Por lo que para lograr una sustentabilidad ambiental y económica, encaminadas a las tendencias a futuro, se requiere que el proceso de producción de biocombustibles no sólo sea renovable, sino que también contribuya de forma positiva con el medio ambiente, con el secuestro de $CO_2$ atmosférico (Schenk et al., 2008). Es donde las especies de microalgas oleaginosas, consideradas como fuente de biocombustibles, contribuyen de manera importante a la fijación de $CO_2$ atmosférico y que además puedan ser utilizadas para producir una amplia gama de biocombustibles, tales como el biodiesel, bioetanol, biometano y biohidrógeno, además de que producen metabolitos secundarios con aplicaciones en diferentes sectores: la industria farmacéutica, complementos nutricionales, acuacultura, cosmetología. (Rosenberg, et al., 2008; Schenk et al., 2008). Por lo que las microalgas de ser solamente microorganismos con bondades nutricionales han pasado a ser de sumo interés ya que han sido reconocidas como una fuente alternativa para la producción de energía renovable. Estos microorganismos pueden usarse para la producción de biodiesel y otros biocombustibles debido a su alta productividad de lípidos (Chisti, 2007). Sin embargo, existen algunas barreras en las diferentes fases del proceso de producción masiva. Uno de los "cuellos de botella" es la falta de un método efectivo para concentrar y cosechar toda la biomasa generada, porque las células son pequeñas y normalmente se diluyen en grandes volúmenes de agua (Uduman et al., 2010).

Actualmente, existen diferentes métodos de cosecha aplicados a las microalgas, tales métodos pueden ser: químicos, biológicos y eléctricos, o una combinación de dos o más de estos procesos (Barros et al., 2015). Los procesos mecánicos bien establecidos de deshidratación, como la filtración y la centrifugación, son energéticamente caros y requieren altos costos operativos (Uduman et al., 2010). Los procesos químicos (coagulación / floculación) son la principal opción para

concentrar grandes cantidades de biomasa a un costo relativamente bajo (Barros et al., 2015). Al agregar metales, bases y polímeros al medio de cultivo, las células se coagulan y forman flóculos que se separan fácilmente mediante sedimentación o flotación (Uduman et al., 2010).

Otra de las grandes limitaciones en el cultivo masivos de microalgas son los costos de producción, por lo que también se ha realizado investigación incorporando microalgas en aguas residuales. Además existe una amplia experiencia en el uso de microalgas para el tratamiento de aguas residuales, ya que son eficaces en la remoción de nutrientes, materia orgánica, metales pesados y de xenobióticos, entre otros (Hernández & Olguín, 2002; Olguín, 2003; Muñoz & Guieysse, 2006).

Existe además otra problemática, una limitación importante en este tipo de desarrollo (microalgas para producir bioproductos), ya que aunque muchas especies de microalgas son capaces de producir grandes cantidades de lípidos, con frecuencia las concentraciones elevadas de lípidos se logran cuando las microalgas son sometidas a condiciones de estrés impuestas por estímulos físicos y/o químicos (Hu et al., 2008), lo que casi siempre está asociado a condiciones de limitación de nutrientes y por lo tanto, a baja productividad de biomasa y de lípidos. Por lo que algunos de los mayores retos para obtener grandes cantidades de biomasa y de lípidos, consiste en la selección de las cepas de microalgas adecuadas, ya que se busca un máximo rendimiento de lípidos y de biomasa en conjunto, asi como establecer estrategias de cultivo para que se logre el máximo posible de productividad de biomasa y de lípidos, a pesar de las condiciones de estrés fisiológico (Loera-Quezada & Olguin, 2010), asi como minimizar costos de producción.

Las producciones de microalgas de manera heterótrofa y mixtrófica han cobrado gran importancia ya que se han obtenido buenos resultados en la inducción de material lipídico en distintas algas que pueden crecer bajo estas condiciones de estrés. En algunos casos, algunas células de microalgas pueden crecer heterotróficamente, como lo muestran informes recientes (Doebbe et al., 2007, Chen et al., 2006) Sin embargo, no todas las especies de microalgas son capaces de sobrevivir en condicones heterótrofas (Tuchman et al., 2006), por lo que este tipo de microalgas presentan una alternativa adicional de aprovechamiento.

Sin embargo, diversas condiciones de crecimiento tales como el suministro de carbono, la temperatura, la tasa de aireación, asi como la cantidad de nutrientes debe ajustarse para maximizar la producción de un componente específico, con la finalidad de aumentar la densidad celular, así como el contenido de lípidos, utilizando cultivos de microalgas en condiciones heterótrofas o condiciones mixotróficas, donde se usan carbonos orgánicos, como azúcares y ácidos orgánicos como fuentes de carbono. Bhatnagar et al., (2011) han estudiado el cultivo mixotrófico de tres diferentes especies de microalgas y concluyeron que el crecimiento mixotrófico de estas microalgas resultó en la producción de biomasa 3-10 veces más que la fototrofia. Heredia-Arroyo et al., (2011) han demostrado que la acumulación de lípidos se mejora durante el nitrógeno limitado o cultivos privadas de éste. El agotamiento de nitrógeno, junto con la disponibilidad de la fuente de carbono, cambia el flujo de carbono celular, de la síntesis de proteínas a la síntesis de lípidos (Sheehan et al., 1998). Además de esto, los lípidos neutros en forma de triacilgliceroles se vuelven predominantes componentes de lípidos en células agotadas de nitrógeno (Sheehan et al., 1998; Ho et al., 2012; Li et al. al., 2011). Sin embargo, la acumulación mejorada de lípidos es resultante en una biomasa con baja productividad y consecuentemente menor cantidad de lípidos en general (Klok et al., 2014). Para alcanzar altas tasas de crecimiento, así como un alto contenido de lípidos; se requiere de dos etapas, una que consiste en el cultivo bajo suficientes nutrientes, seguido de cultivos en condiciones de inanición de nitrógeno, que resulta en la aplicación más viable (Mujtaba et al., 2012). Varios investigadores han estudiado este proceso; sin embargo, se han centrado principalmente en el $CO_2$ como fuente de carbono (Sun et al., 2014; Breuer et al., 2012; Lucas Salas et al., 2013). Así mismo Abedini et al., (2014) han investigado el efecto de diversas fuentes orgánicas e inorgánicas en el cultivo de microalgas *Chlorella vulgaris* durante un proceso de dos etapas. Las fuentes de carbono estudiadas fueron dióxido de carbono y bicarbonato de sodio como fuentes inorgánicas, y acetato de sodio y melaza como fuentes orgánicas, donde encontraron que el bicarbonato de sodio resultaba beneficioso en el incremento de lípidos para esta especie, así como el crecimiento celular (generación de biomasa), seguida del acetato, el bióxido de carbono y la melaza, aunque consideran que para el incremento de lípidos y el costo de la melaza resulta una fuente de carbono viable para la utilización y producción de lípidos.

Sin embargo la mayoría de investigaciones llegan a las mismas conclusiones, donde se necesita más investigación, ya que los efectos no son los mismos de una especie a otra, existen grandes diferencias entre el metabolismo lipidico, y de como reaccionan a las diferentes condiciones, además de que se siguen buscando métodos sencillos y factibles en la inducción de material lipídico sin bajar los rendimientos de biomasa algal. Además de que se busca promover la innovación tecnológica para la transformación y modernización de la industria de microalgas, así como mejoras adicionales de procesos, y productos de valor agregado, y lo más importante, producción de menor costo (Chen et al., 2015).

En el presente escrito se trabajó con tres especies de microalgas que fueron aisladas en la Bahía de La Paz Baja California Sur, México, identificadas morfológicamente del género: *Grammatophora sp. Navicula sp., y Schizochytrium sp.* (Zumaya-Higuera, 2013).

*Grammatophora* es una diatomea bentónica unicelular color café, en forma rectangular, que presenta un rango de tamaño de 28 a 36 µm, es perteneciente al dominio de los eucariontes, Reino: Chromalveolata, Filo: Heterokontophyta, Clase Bacillariophyceae, Orden Striatellales, Familia Striatellaceae. La microalga del genero *Navicula* es una diatomea, la cual tiene forma de “barco”es ovalada, con un tamaño que va de los 32-103 µm, de color (amarillo/café), es perteneciente al dominio de los eucariontes, Superphylum: Heterokonta, Clase: Bacillariophyceae, Orden: Naviculales, Familia: Naviculaceae (https://www.eoas.ubc.ca/research/phytoplankton/diatoms/pennate/navicula/navicula_spp.html).

*Schizochytrium* es un microorganismo esférico unicelular con red ectoplasmica, esta puede presentarse en diversos estadios: como zoospora biflgeladas, aplanospora y células ameboides, con rango de tamaño de 10-20 µm, además la célula madura puede dividirse por fisión binaria, o formar diadas, tétradas y clusters. Cada célula de *Schizochytrium* puede desarrollar en su interior un esporangio que produce varias zoosporas (Hakim, 2012, Kamlangdee & Fan, 2003). *Schizochytrium* pertenece al grupo de los traustoquitridios que son microorganismos del ambiente marino, clasificados antiguamente dentro de los hongos por su naturaleza heterotrófica, pero con la utilización de las nuevas

técnicas de biología molecular, se demostró que son organismos relacionados con las algas heterokontas (Quilodrán, 2010).
Son del Dominio: Eucarionte, Reino: Chromista, Filo: Heterokonta, Clase: Thraustochytridae, Orden: Thraustochytriales, Familia: Thraustochytriaceae, Especie: *Schizochytrium sp*. (Source: Leipe et al., 1994).

Al ser microalgas autóctonas, presentan una buena opción para su cultivo, ya que son organismos adaptados a las condiciones de la entidad (locales), capaces de producir compuestos de gran interés biotecnológico con altas tasas de crecimiento (Hoys, 2012). Sin lugar a duda los lípidos presentes en las microalgas presentan gran importancia biotecnológica dirijida a una gran diversidad de sectores mencionados con anterioridad, por tal razón, se llevó a cabo esta evaluación, con la intención de tratar de aumentar los porcentajes de lípidos presentes en estas tres diferentes especies (*Grammatophora sp., Navicula sp., y Schizochytrium sp*.) cultivadas en el exterior (condiciones no controladas) así como en condiciones controladas (laboratorio), sometidas a estrés, bajo distintos tratamientos, de manera de tener un panorama exacto del tipo de compuestos de interés comercial y de los porcentajes de lípidos totales presentes bajo los diferentes tratamientos aplicados.

## 3. Objetivo General

Determinar la variación del contenido de lípidos en tres diferentes tipos de microalgas locales sometidas a diferentes condiciones de estrés.

## 4. Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de las estaciones sobre la biomasa algal y los porcentajes lipídicos de las microalgas: *Grammatophora sp., Navicula sp., y Schizochytrium sp.* cultivadas en el exterior.

2. Determinar el efecto del tiempo de almacenamiento en frío de biomasa algal en ausencia y presencia de luz, sobre el contenido total de lípidos en *las 3 especies.*

3. Determinar el efecto de la técnica de cosecha sobre el contenido total lipídico para cada especie.

4. Evaluar el efecto de la adición de dos fuentes extra de carbono en los cultivos ($NaHCO_3$ y melaza), sobre el contenido de lípidos totales en las tres diferentes especies.

5. Evaluar la variación del contenido de lípidos totales de las especies de microalgas en cultivos con un fotoperíodo de corto tiempo.

6. Evaluar la variación del contenido de lípidos totales en las tres especies de microalgas, mediante el efecto de estrés mecánico por aireación.

# 5. METODOLOGÍA

## 5.1 *Zona de experimentación*

El trabajo experimental se realizó en la unidad Pichilingue extensión de la Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS), Dirección: Carretera Pichilingue, km 17, La Paz B.C.S, México, CP: 99999.

## 5.2 *Descripción de las cepas utilizadas*

En el laboratorio de acuacultura de la Unidad Pichilingue además de las cepas tradicionales utilizadas en acuacultura, se tienen distintas cepas de origen local y de zonas aledañas. Para el desarrollo del presente trabajo, se utilizaron tres especies de microalgas marinas de origen local, consideradas por su identificación morfológica del género *Grammatophora sp.*, *Schyzochytrium sp., y Navicula sp*., éstas son mantenidas en el medio f/2 (Guillard, 1975).

## 5.3 *Calidad del agua*

Para cultivar las microalgas, se utilizó agua de mar proveniente del sistema abierto que abastece al laboratorio de la unidad Pichilingue, la cual primeramente es pasada por una serie de filtros de sedimentación por gravedad donde se queda la materia orgánica de mayor tamaño, después fue pasada por una serie de filtros rápidos de arena para partículas de 40, 20, y 5µm. Esta agua posteriormente fue irradiada con luz ultravioleta y pasada por una serie de filtros de algodón de 10,5 y 1 µm. Además se trabajó con distintos recipientes con diferentes volúmenes, para matraces con volúmenes de 250 mL hasta 1000 mL, a estos volúmenes se le dió un tratamiento adicional de esterilización a 120°C y a una presión de 15 kg cm-2 por un período de 15 minutos. Para volúmenes >10 L se utilizó el procedimiento de desinfección recomendado por “Preuder & Bolton (1978), el cual consiste en la adición de 1mL de hipoclorito de sodio (6%) por cada litro de agua de mar,

utilizando una concentración de 0.05 g mL -1 de tiosulfato de sodio por cada mililitro de cloro utilizado para su neutralización.

Fig 1. Sistema de captación, tratado y abastecimiento de agua de mar para uso acuícola.

### *5.4 Medio de cultivo*

Para el cultivo de estas microalgas se utilizó el medio f/2 (Guillard, 1975), para matraces agregando micro y macronutrientes, así como vitaminas, cada una por separado, y para volúmenes >10 L se utilizó la soluciones comerciales “A” y “B” de este mismo medio de cultivo.

### *5.6 Escalado de la siembra*

A partir del cepario del laboratorio de acuacultura experimental de la Unidad Pichilingue se obtuvieron las tres especies de microalgas, estas fueron escaladas a volúmenes progresivamente mayores, utilizando agua de mar filtrada hasta una micra, pasada por lámparas UV y enriquecida con el medio F/2 (Guillard, 1975). Se llevaron a matraces de 1000 mL y fueron mantenidos bajo condiciones controladas de cultivo (20°C, iluminación continua y aireación manual). El escalamiento se realizó cada cuatro días para que la densidad de biomasa algal aumentara, posteriormente se escaló a recipientes de 19 L

añadiendo más nutrientes esenciales para su crecimiento (proporción de nutrientes correspondiente al nuevo volumen). Después se escalaron a estanques cilíndricos de 1.80 m de altura con volúmenes de 400 L, estos volúmenes de 400 L fueron para experimentos en el exterior (Fig 2).

Fig 2. Escalamiento de los cultivos en volúmenes progresivamente mayores (1000 mL – 19 L – 400 L).

### *5.7 Efecto de las estaciones sobre el contenido de lípidos totales*

Se evaluaron las estaciones en las condiciones más contrastantes (verano – invierno) y la estación intermedia (otoño), descartando la evaluación de primavera. Para este experimento se llevó a cabo el registro de temperatura e intensidad lumínica cada hora durante todos los días de cultivo mediante sensores (Hobos) previamente calibrados en condiciones controladas, se registraron lecturas cada día (por triplicado) desde el inicio de la siembra de las microalgas, hasta la cosecha.

Cada evaluación se realizó por triplicado (3x), en tanques cilíndricos de 1.80 m de altura con capacidad de 400 L.

Fig 3. Sensores programados para tomar lectura de intensidad lumínica y temperatura cada 2 horas durante todos los días de cultivo.

### *5.8 Técnica de cosecha (concentración de biomasa algal)*

Se utilizaron dos tipos de floculantes químicos, estos floculantes son utilizados para agilizar las técnicas de cosecha de biomasa.

1. Floculación con hidróxido de sodio (NaOH)

2. Floculación con sulfato ferroso ($FeSO_4$)

La concentración por simple gravedad (control): A la hora de la cosecha primeramente se le retiró la aireación a los estanques y se dejó pasar un tiempo (aproximadamente 5-6 horas) con la finalidad de extraer la mayor cantidad de biomasa, una vez transcurrido este tiempo, la microalga se asentaba en gran porcentaje en el fondo de los tanques, permitiendo extraer el agua en la parte superficial (sobrenadante), de manera que se obtuvo biomasa algal concentrada fresca en el fondo de los estanques.

El procedimiento para ambos floculantes fue el mismo, al momento de la cosecha se le añadió el floculante al cultivo, la microalga se concentró en el fondo de los tanques, dejando extraer el agua de mar en la parte superior que no se necesitaba, extrayendo finalmente biomasa algal concentrada en un periodo de tiempo más reducido respecto al control. Finalmente se tomaba la muestra de biomasa para cada especie donde se aplicaron los floculantes, asi como el de su respectivo control.

Todas las evaluaciones se utilizaron por triplicado (3x), en tanques cilíndricos de 1.80 m de altura, con capacidad de 400 L.

### **5.9** ***Almacenamiento post-cosecha***

Se utilizaron recipientes de 5 L para introducir a refrigerar las muestras de la biomasa de las microalgas concentradas y cosechadas en otoño, se almacenaron de dos formas: recipientes transparentes donde estuvieran en contacto con la luz y recipientes donde no penetrara la luz, en un refrigerador con puertas de cristal visibles a 4°C.

### *5.10 Muestreo de las microalgas almacenadas en presencia de luz y ausencia de luz.*

Cada cinco días se tomó una muestra por triplicado de los tres diferentes tipos de microalgas almacenadas en refrigeración, durante un periodo de 18 días, se tomó la muestra en tubos falcon de 50 mL, posteriormente estos tubos se centrifugaron durante 15 minutos a 3600 RPM para concentrar la microalga aún más, y la pasta de biomasa homogénea resultante de la centrifugación se congeló -40°C, para finalmente liofilizarse y obtener las muestras para los análisis de determinación de lípidos totales y los perfiles de ácidos grasos.

### 5*.11 Determinación de la viabilidad de microalgas almacenadas*

Se tomaron muestras de la biomasa al inicio y final del tiempo de experimentación durante el periodo de almacenaje en refrigeración, se utilizaron dos colorantes para tinción de las microalgas en buen estado, por lo cual primero se estandarizó la metodología de tinción para las especies de microalgas utilizadas. Una vez que se estandarizaron con la cámara de Neubauer se observó y se obtuvo la calidad de las células viables durante los días de almacenamiento (viabilidad – potencial de reutilización).

La metodología es la misma para preparar ambos colorantes (Zetche & Meysman, 2012), primero se preparó una solución stock de trabajo con agua destilada y los colorantes.

**Preparación de la solución stock**

(0.01g/mL)

Una vez preparada la solución stock, se prepara la **solución de trabajo:**

(1 mL de biomasa algal / 10 microlitos de solución stock)

En este trabajo se utilizaron 2 mL de biomasa algal, por lo cual se agregaron 20 microlitros de la solución stock, así mismo se hicieron diluciones seriadas hasta $10^{-9}$, ya que la biomasa algal estaba muy concentrada, de manera que se facilitaran los conteos de viabilidad con la tinción en la cámara de Neubauer.

El tiempo de tinción después de agregar el colorante se estandarizó a las microalgas que se utilizaron en esta evaluación.

### *5.12 Evaluación microbiológica de bacterias en la biomasa algal almacenada en refrigeración*

Se realizaron cultivos de bacterias, con la técnica de vaciado de placa "*Basic practical Microbiology a Manual by society for general Microbiology (SGM), (2006)"*, utilizando el medio (TSA) con las muestras de biomasa algal tomadas del experimento bajo almacenamiento en refrigeración (4°C), para evaluar el contenido de colonias de bacterias (UFC/mL) presentes al inicio, y al final del experimento (cuantificación de numero de colonias).

### *5.13 Incorporación de una fuente de carbono a los cultivos*

Se probó la incorporación de dos fuentes de carbono a los cultivos de las tres especies utilizadas, y se utilizó como control solamente el cultivo con el medio f/2 de Guillard. Para el experimento de bicarbonato de sodio se llevó a cabo en el laboratorio (condiciones controladas de temperatura a 21 °C) y el experimento de la adición de melaza se llevó a cabo en el exterior (condiciones no controladas).

**Bicarbonato de sodio:** Se probó la adición de dos cantidades (tratamientos) de bicarbonato para cada especie; 1.5 g/L y 0.5 g/L.

**Melaza:** Se utilizaron dos tratamientos de melaza (1.9 g/L y 3.8 g/L) a los cultivos.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado (3x), en recipientes con un volumen de 19 L.

Fig 4. Triplicados de cultivos en laboratorio, donde se evaluaron dos tratamientos con la adición de bicarbonato de sodio para cada una de las especies de microalgas.

### *5.14 Evaluación de cultivos con un fotoperiodo de corto tiempo*

Este experimento se realizó en laboratorio, en condiciones controladas, temperatura constante de 21°C, y aireación constante.

Los cultivos de las tres especies se mantuvieron en ausencia de luz (cubiertos con plástico negro), y solamente se les permitía la luz durante 2 h/día.

Se utilizaron cultivos expuestos a la luz las 24 h/día, de inicio hasta el final de cada experimento, éste fue el control del experimento.

Los experimentos se realizaron por triplicado (3x) en recipientes con volumenes de 19 L

### 5.15 *Conteos celulares*

En cada experimento para cada cultivo se realizaron conteos por triplicado, todos los días, desde el inicio de la siembra de las microalgas, hasta el día final de su cosecha, utilizando la cámara de Neubauer, un contador manual y el microscopio

óptico compuesto, utilizando el objetivo de 10X, determinando la densidad celular y posteriormente obteniendo la cinética de crecimiento de las especies cultivadas. . La densidad celular se realizó con la siguiente formula:

(X / 8) * 10,000 = Cel /mL

**Donde:**

- **X:** Es el número total de células viables contadas en los 8 cuadrantes.
- **10, 000:** Es la Diezmilésima parte de la muestra.
- **8:** Es el número de cuadrantes que se contaron en la cámara de Neubauer.

### *5.16 Análisis de las muestras*

La extracción de lípidos se llevó a cabo por el medio de una mezcla de cloroformo, metanol (relación 2:1) y agua, siguiendo la técnica descrita por Blingh y Dyer (1959) Y modificada por Chiaverini (1972). Los lípidos totales se cuantificaron siguiendo la metodología descrita por Pande, et al., (1963), agregando dicromato de potasio al 2% y ácido sulfúrico. Se utilizó Tripalmitina (99%) como estándar para la realización de la curva de calibración.

Fig 5. Espectofotómetro de fluorescencia, Marca: Thermo Scientific, modelo: Genesys 10s UV-VIS.

### *5.18 Análisis estadísticos.*

Los resultados de los porcentajes de lipídicos totales de las microalgas bajo los distintos tratamientos se realizaron por triplicado; Antes de desarrollar el análisis estadístico, se probaron los datos experimentales para la normalidad y homocedasticidad. Las diferencias en el contenido de lípidos se determinaron con un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, y otros experimentos con la prueba T-Student. Para los casos en los ANOVAS donde se observaron diferencias significativas, se le aplicó un análisis post hoc Tukey HSD, todas las pruebas se realizaron con un $\alpha = 0.05$. Se trabajó con el software GraphPad Prism 8.0 para Windows (StatSoft, EE.UU.). Debido a la clasificación estadística de los diseños experimentales, se tomaron las siguientes consideraciones: para los experimentos en laboratorio se utilizó (Modelo I - Efectos fijos) y experimentos realizados en el exterior (Modelo II – Condiciones no controladas, y mixto).

# 6. RESULTADOS

## *6.1 Curva de calibración de absorbancias de lípidos*

Se logró determinar la curva de calibración para la lectura de absorbancias de los lípidos totales utilizando como estándar: Tripalmitina (99%), obteniendo los siguientes valores de la ecuación: pendiente= 0.23, intercepto=0.0366, y un coeficiente de correlación de 0.991 (Fig 6).

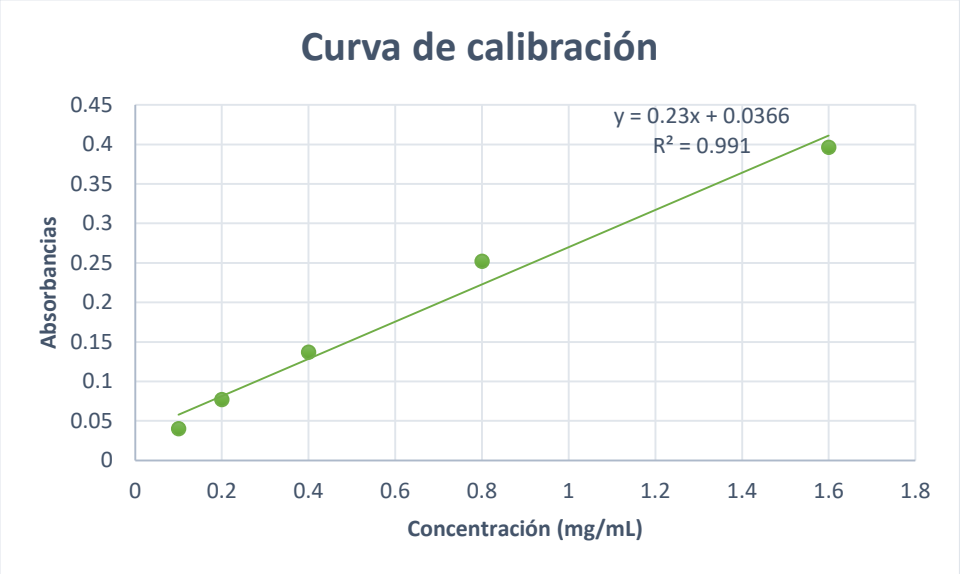


Fig 6. Curva de calibración para la determinación de lípidos totales mediante espectofometría.

## *6.2 Estandarización de colorantes para viabilidad celular*

Se tuvieron que estandarizar los tiempos de tinción de las células, ya que la metodología seguida no contemplaba tiempos, era tinción directa al agregar los colorantes y agitar las muestras, como lo indicaba la metodología seguida de Zetche & Meysman (2012) para microalgas diatomeas, sin embargo se encontró que después de agregar estos colorantes se tiene que esperar de 30-40 minutos para una buena tinción celular, y a partir de los 15 min se pudo observar una tinción parcial (tabla 1).

Para la microalga *Schizochytrium sp.,* no funcionó ninguno de los colorantes probados, tampoco se encontró alguna metodología para este tipo de especie, por lo que se evaluó el estado de estas células con simple observación en el

microscopio con el objetivo de 40X, lo cual resultó sin contratiempos por las características morfológicas de esta célula, la estructura, el tamaño y el color.

Tabla 1. Estandarización de colorantes para observar viabilidad celular.

| **Especie** | **Colorantes (0.1 %)** | **Prueba de Tinción** | **Metodología (**Zetche & Meysman, 2012) | **Tiempo de Tinción absoluta particular encontrada** |
|---|---|---|---|---|
| *Grammatophora sp* | Azul de tripano | | 2 horas | |
| | Rojo Neutro | | | |
| | Azul de metileno | ✓ | Al instante | 30 min |
| *Schizochytrium sp* | Azul de tripano | (Ninguna) Observación al microscopio | | |
| | Rojo Neutro | | | |
| | Azul de metileno | | | |
| *Navicula sp* | Azul de tripano | | | |
| | Rojo Neutro | ✓ | Al instante | 40 min |
| | Azul de metileno | ✓ | Al instante | 30 min |

### *6.3 Experimentación con la adición de bicarbonato de sodio fuente extra de carbono a los cultivos*

El control de la microalga *Navicula sp.* fue la que obtuvo mayor densidad celular durante los días de cultivo, logrando una densidad de aproximadamente $3.0x10^5$ cel/mL, ligeramente más baja la densidad de esta misma especie con el tratamiento de la adición de 0.5 g/L de bicarbonato de sodio como fuente de carbono, logrando aproximadamente $2.9x10^5$ cel/mL, así mismo en el control de la microalga *Grammatophora sp.* fue la que mayor concentración celular logró con aproximadamente 2.5 $x10^5$ cel/mL respecto a los tratamientos con 0.5 y 1.5 g/L de

bicarbonato añadido, pero para la microalga *Schizochytrium sp.* el control resultó con una densidad más baja comparada con los dos tratamientos de la adición de 0.5 y 1.5 g/L de bicarbonato de sodio para esta misma especie, obteniendo aproximadamente $1.5x10^5$ cel/mL (Fig 7).

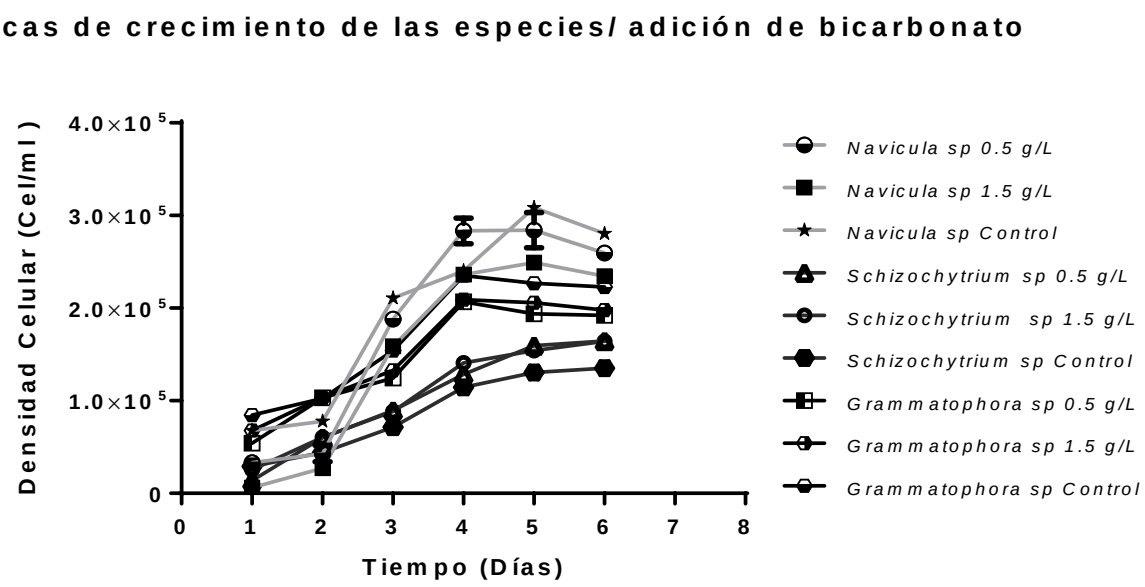


Fig 7. Efecto de la adición de bicarbonato de sodio sobre el crecimiento en las tres especies de microalgas: *Grammatophora sp., Navicula Sp., y Schizochytrium sp.*

El ANOVA de una vía aplicado a la microalga *Schizochytrium sp*. nos indicó que existen diferencias significativas ($p< 0.05$) respecto al control con las dos cantidades de bicarbonato de sodio añadido a los cultivos (Tabla 2), resultando diferencias positivas en la inducción de material lipídico, hay un ligero incremento de los porcentajes de lípidos totales en esta especie, de aproximadamente 2% (Fig 8 ).

Para las microalga *Grammatophora sp.* también se realizó un ANOVA de una vía resultando que sí se encontraron diferencias significativas ($p<0.05$), sin embargo estas diferencias son negativas respecto al control (decremento de lípidos), se puede observar claramente que conforme más cantidad de bicarbonato se aplicó en los tratamiento, hay un descenso de los contenidos de lípidos totales (Fig 9), de igual manera la microalga *Navicula sp.* (Fig 10) muestra el mismo patrón de

comportamiento con la adición de bicarbonato de sodio como fuente de carbono en los cultivos.

También se observó en este experimento, que con la adición de bicarbonato de sodio la biomasa final colectada en las tres especies de microalgas, mostraba un notable cambio en la pigmentación de ésta, a medida que aumentaba la cantidad de bicarbonato añadido, la biomasa resultante era de una pigmentación más clara respecto al control (Fig 11).

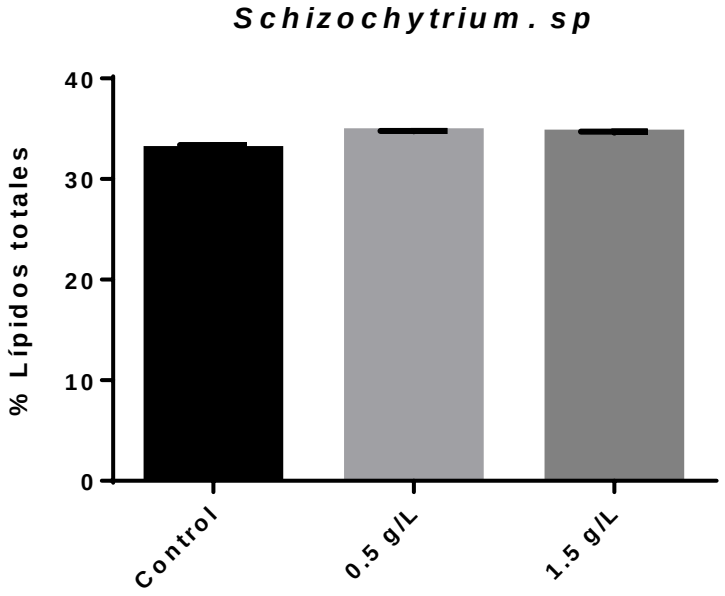


Fig 8. Efecto de la adición de bicarbonato de sodio como fuente de carbono en los porcentajes de lípidos totales de la microalga *Schizochytrium sp.*

Tabla 2. Comparaciones múltiples del ANOVA aplicado a los porcentajes de lípidos de *Schizochytrium sp*. con los tratamientos de bicarbonato de sodio añadido.

| **Tukey's multiple comparisons test** | **Mean Diff.** | **95% CI of diff.** | **Significant?** |
|---|---|---|---|
| Control vs. 0.5 g/L | -1.758 | -2.335 to -1.180 | Yes |
| Control vs. 1.5 g/L | -1.630 | -2.208 to -1.053 | Yes |
| 0.5 g/L vs. 1.5 g/L | 0.1274 | -0.4501 to 0.7050 | No |

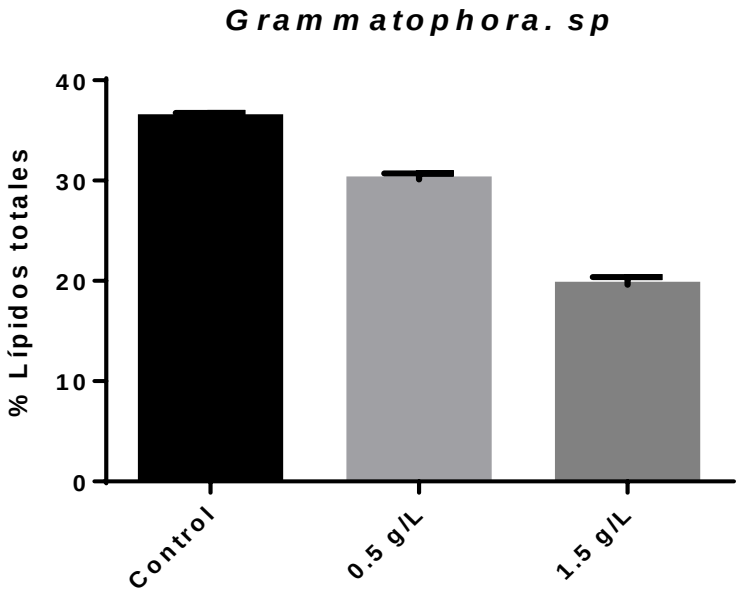


Fig 9. Efecto de la adición de bicarbonato de sodio como fuente de carbono en los porcentajes de lípidos totales de la microalga *Grammatophora sp.*

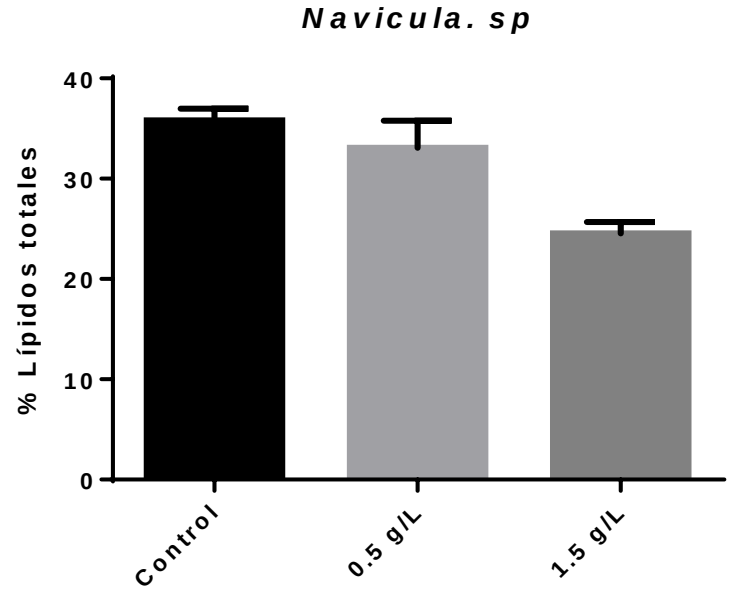


Fig 10. Efecto de la adición de bicarbonato de sodio como fuente de carbono en los porcentajes de lipidos totales de la microalga *Navicula sp.*

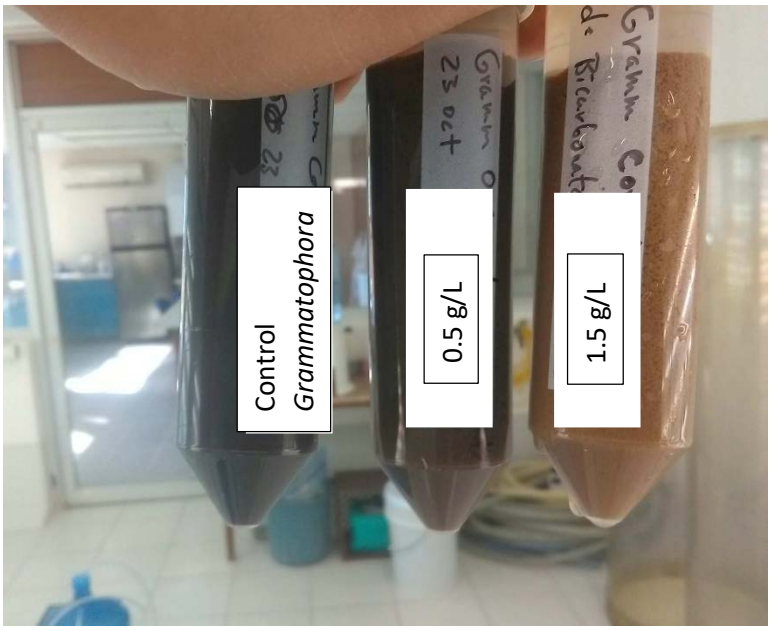


Fig 11. Diferencias en pigmentación de la biomasa para todas las especies con los experimentos adicionando bicarbonato de sodio.

### *6.4 Experimentación con la adición de melaza como fuente de carbono a los cultivos*

El tratamiento con la adición de 1.9 g/L de melaza fue el que obtuvo mayor crecimiento celular para la microalga *Schizochytrium sp.*, la cual logró una densidad celular de aproximadamente $2.6x10^5$ cel/mL, seguida del tratamiento con la cantidad de 3.9 g/L de melaza añadida, con una densidad aproximada de $2.5x10^5$ cel/mL, la densidad celular del control (solamente el medio f/2) de *Schizochytrium sp.* fue la más baja, con lo cual obtuvimos que la adición de melaza a los cultivos de esta especie, beneficia el crecimiento celular, permitiendo obtener más cantidad de biomasa (cel/mL) en los cultivos (Fig 12).

No existieron diferencias en las densidades celulares de la microalga *Navicula sp.* con los dos diferentes tratamientos (1.9 y 3.9 g/L) de adición de melaza como fuente de carbono a los cultivos (Fig 13), en promedio la densidad celular fué de aproximadamente ($3.2x10^5$ cel/mL), así mismo no se encontraron diferencias en las densidades celulares con los tratamientos aplicados en la microalga

*Grammatophora sp.* (Fig 14), obteniendo al final del cultivo en promedio $3.0x10^5$ cel/mL.

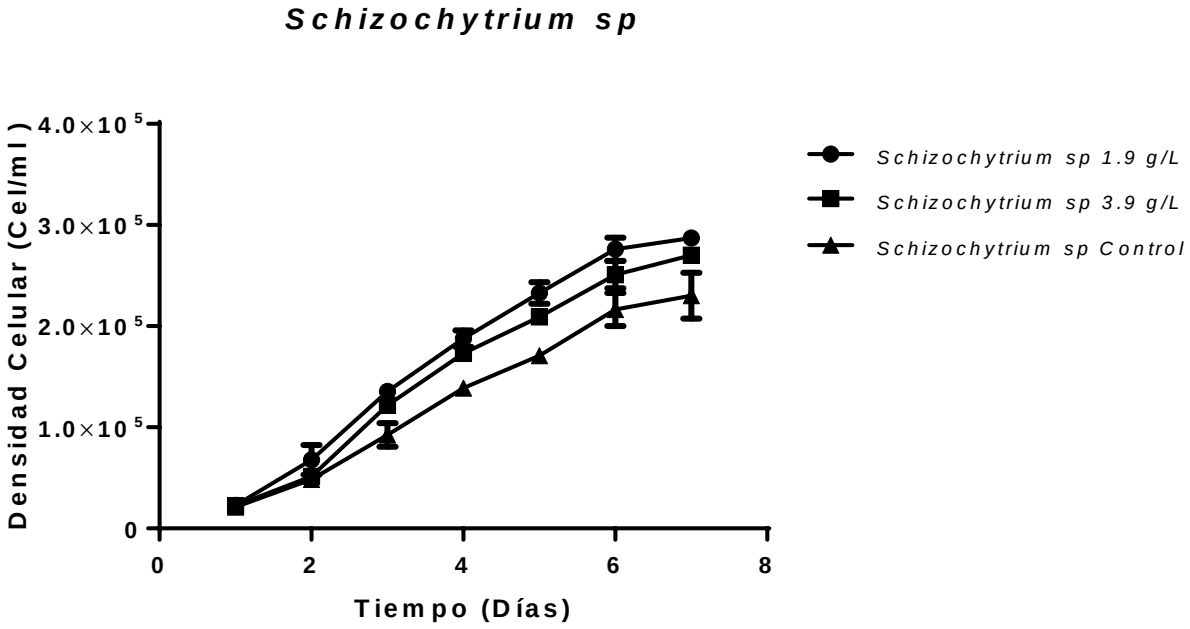


Fig 12. Crecimiento de la microalga *Schizochytrium sp*. con la adición de melaza como fuente de carbono

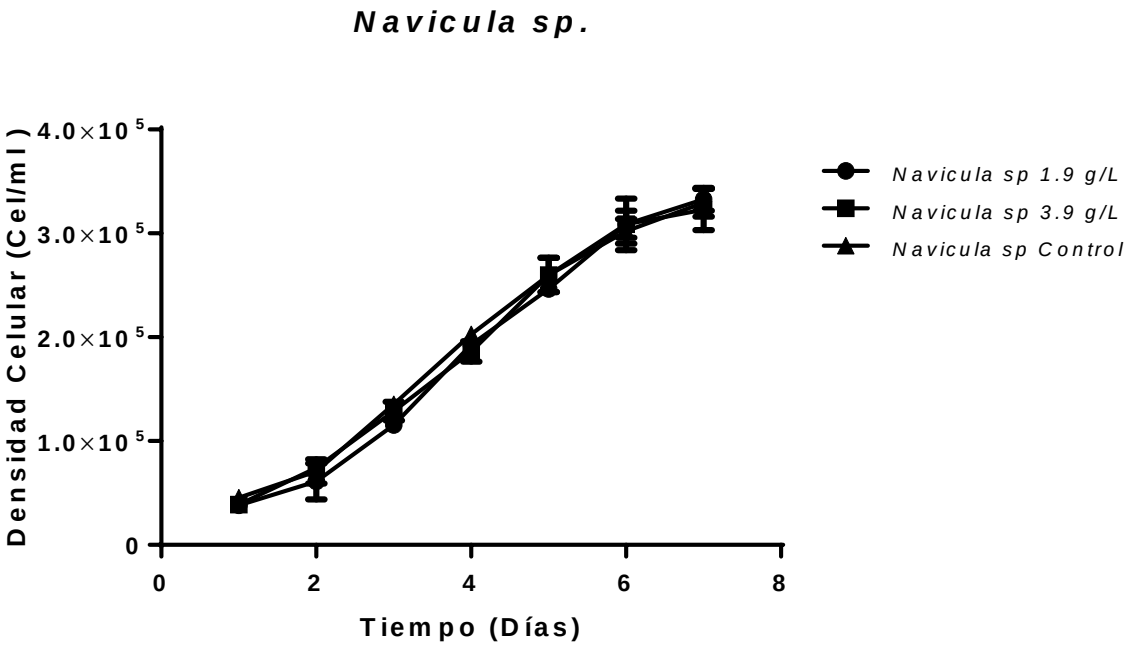


Fig 13. Crecimiento de la microalga *Navicula sp*. con la adición de melaza como fuente de carbono.

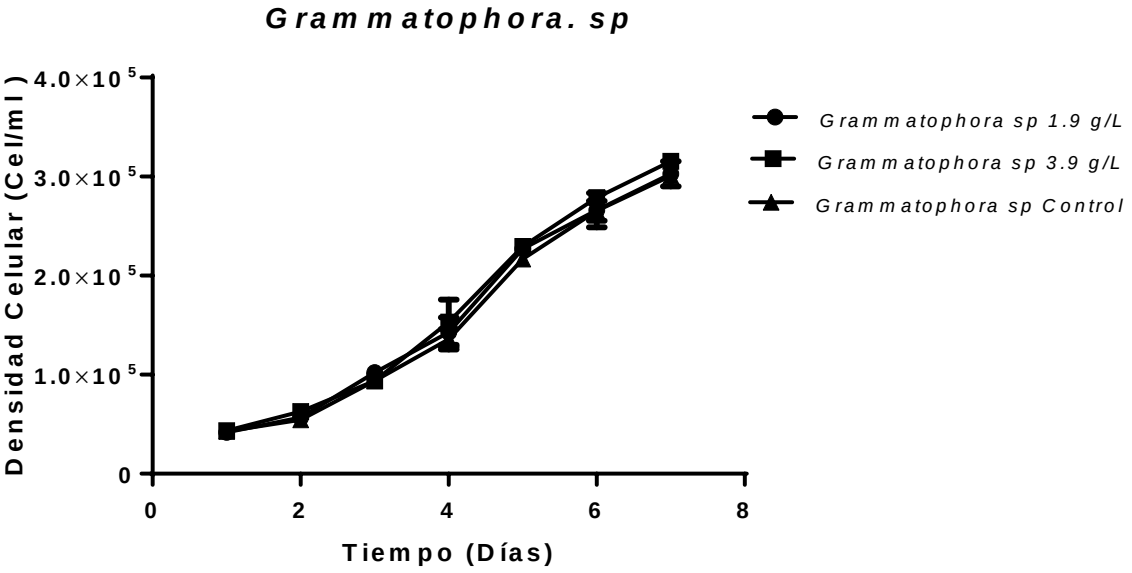


Fig 14. Crecimiento de la microalga *Grammatophora sp*. con la adición de melaza como fuente de carbono.

Se realizó un ANOVA de una vía para cada una de las tres especies de microalgas, con los dos tratamientos de la adición de melaza como fuente de carbono a los cultivos que se realizaron durante la temporada de invierno, obteniendo que solamente hubieron diferencias significativas en los porcentajes de lípidos totales para la microalga *Shizochytrium sp.* ($p<0.05$)(Fig 15), diferencias positivas (incremento de lípidos) respecto al control, como se muestra en la Tabla de comparaciones múltiples (Tabla 3).

Para la microalga *Grammatophora sp.* no hubo diferencias significativas ($p>0.05$) (Fig 16 ), al igual que para la microalga *Navicula sp*., es decir, la adición de melaza a estas dos especies no las beneficia en nada, ni en crecimiento ( Fig 17 - Fig 13 y 14), ni en la acumulación de material lipídico.

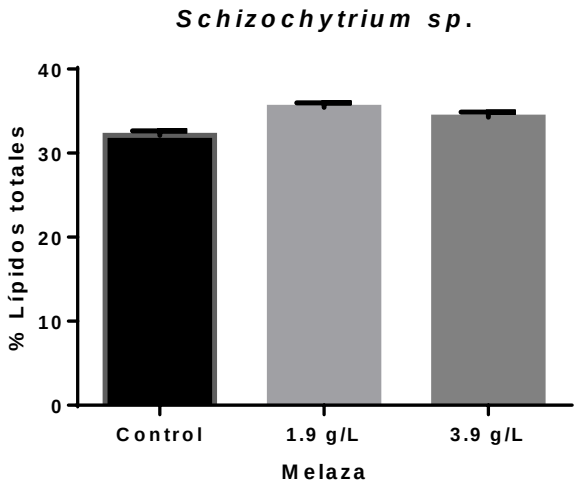


Fig 15. Efecto de la adición de melaza sobre los porcentajes de lípidos totales de la microalga *Schizochytrium sp.*

Tabla 3. Comparaciones múltiples del ANOVA de una vía aplicado a los porcentajes de lípidos de la *Schizochytrium sp*. con los tratamientos de la adición de melaza.

| Tukey's multiple comparisons test | Mean Diff. | 95% CI of diff. | Significant? |
|---|---|---|---|
| Control vs. 1.9 gr/L | -3.344 | -4.783 to -1.905 | Yes |
| Control vs. 3.9 gr/L | -2.173 | -3.612 to -0.7341 | Yes |
| 1.9 gr/L vs. 3.9 gr/L | 1.171 | -0.2677 to 2.610 | No |

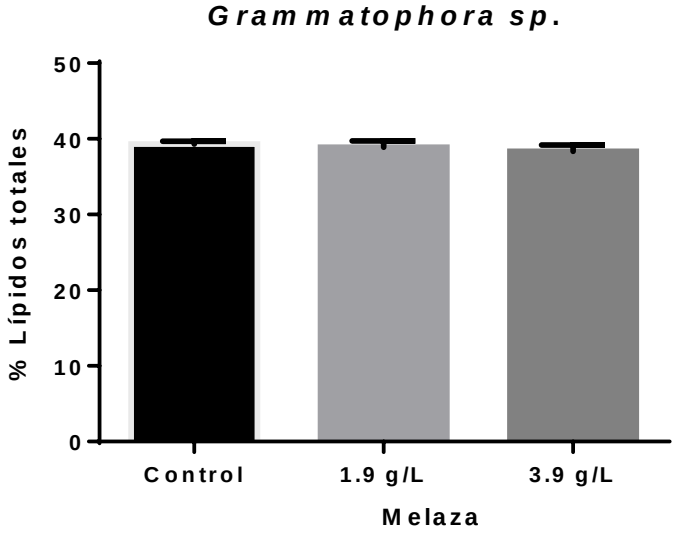


Fig 16. Efecto de la adición de melaza sobre los porcentajes de lípidos totales de la microalga *Grammatophora sp*.

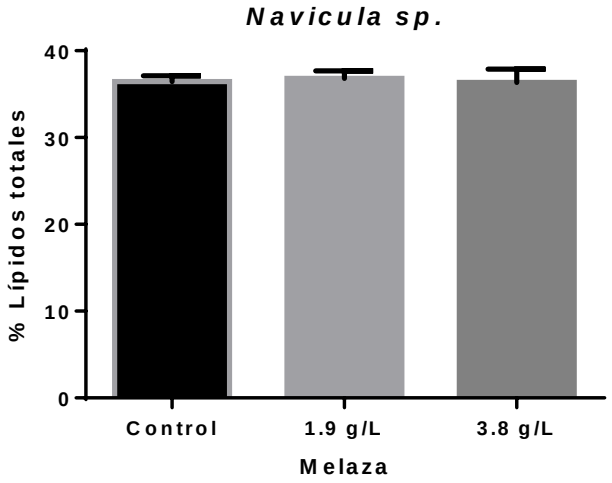


Fig 17. Efecto de la adición de melaza sobre los porcentajes de lípidos totales de la microalga *Navicula sp*.

### *6.5 Evaluación de Fotoperíodo de corto tiempo*

En este experimento, se realizó en el laboratorio, en condiciones controladas de 21 °C, iluminación y aireación constante, se aplicó un solo tratamiento, permitiendo un fotoperíodo de sólamente 2 h/día. Se puede apreciar en las distintas cinéticas de crecimiento, la densidad con este tratamiento quedó por debajo de las densidades celulares de los controles en las tres diferentes especies, sin embargo algo destacable es que la microalga *Schizochytrium sp.* fue la que tiene una diferencia de densidades mucho menor al control (Fig 18), respecto a las otras dos microalgas *Grammatophora sp* (Fig 19) y *Navicula sp.* (Fig 20). La microalga *Schizochytrium sp.* puede incrementar más densidad celular (biomasa) sometida a este tipo de condiciones (Fig 18).

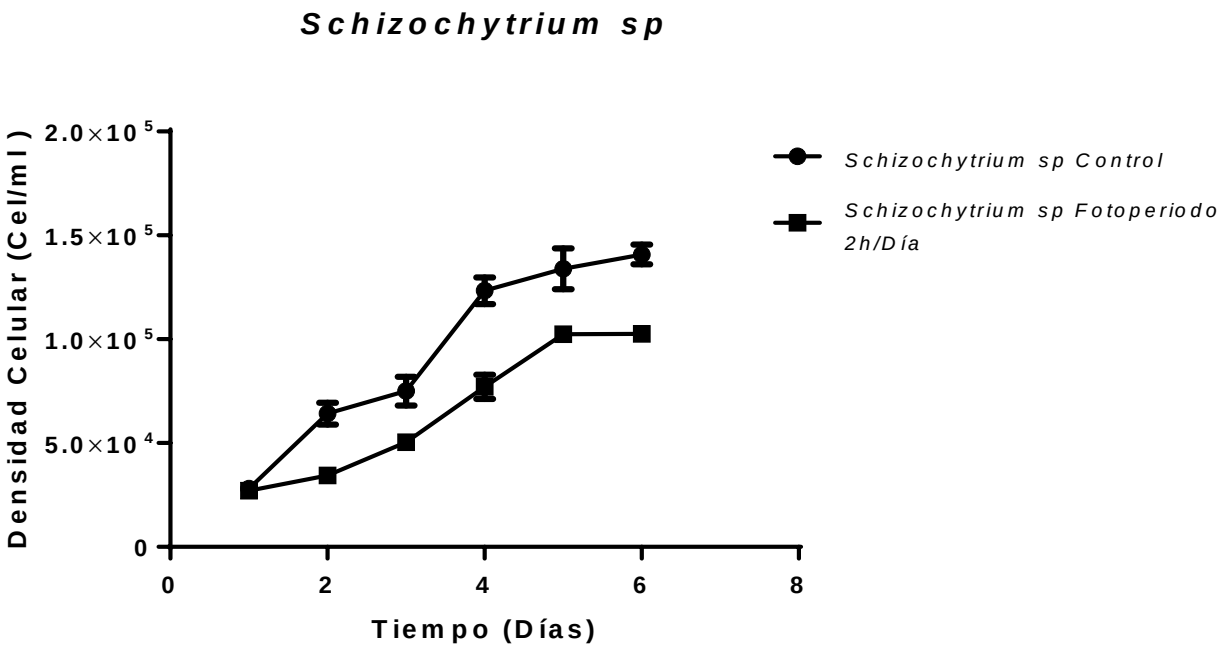


Fig 18. Crecimiento de la microalga *Schizochytrium sp*. control (solamente medio f/2) y con el tratamiento de un fotoperíodo de 2 h/Día, cultivadas en laboratorio en condiciones controladas, en volúmenes de 19 L.

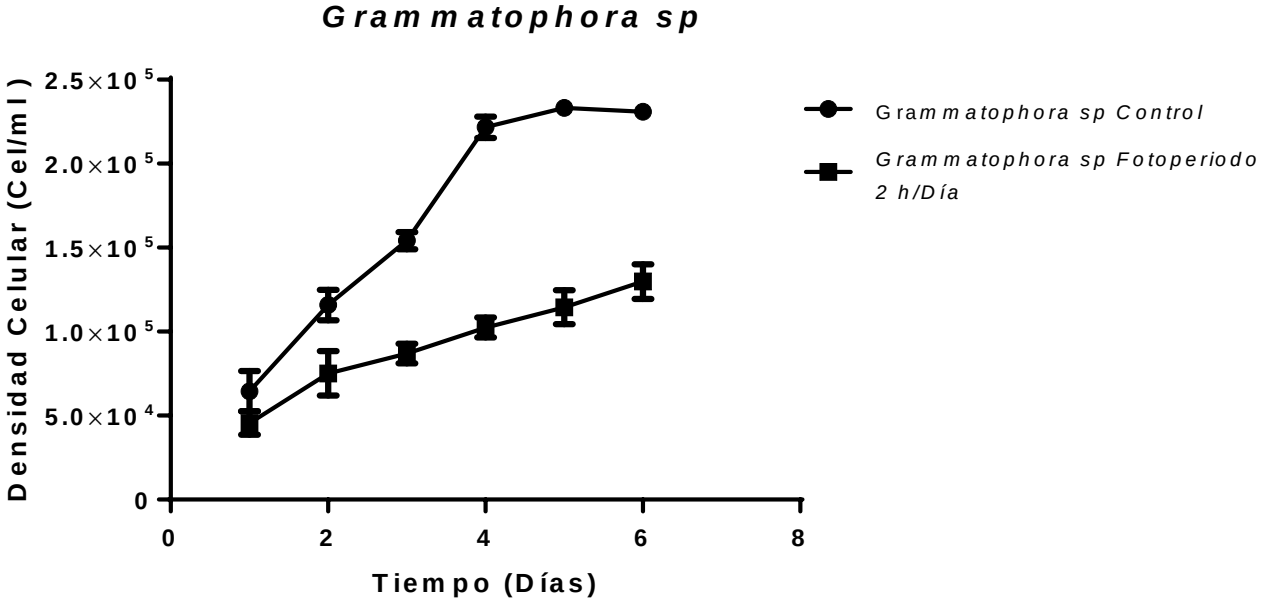


Fig 19. Crecimiento de la microalga *Grammatophora sp*. control (solamente medio f/2) y con el tratamiento de un fotoperíodo de 2 h/Día, cultivadas en laboratorio en condiciones controladas, en volúmenes de 19 L.

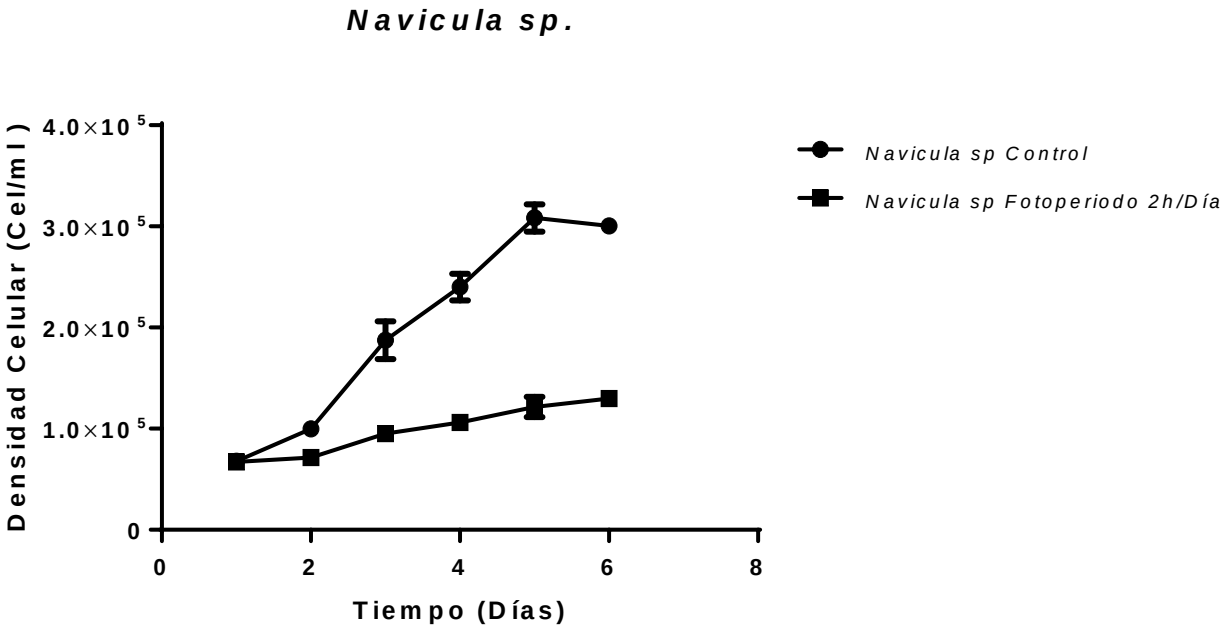


Fig 20. Crecimiento de la microalga *Navicula sp.* control (solamente medio f/2) y con el tratamiento de un fotoperíodo de 2 h/Día, cultivadas en laboratorio en condiciones controladas, en volúmenes de 19 L.

Se realizó una prueba T- Student para encontrar diferencias significativas entre los porcentajes de lípidos totales del control (cultivo con luz constante) vs el tratamiento con un fotoperíodo de corto tiempo (2h/día), obteniendo que para las tres especies de microalgas se encontraron diferencias significativas ($p<0.05$), pero de estas tres especies solo la microalga *Schizochytrium sp.* mostró un incremento de los porcentajes de lípidos totales respecto al control (Fig 21), las diferencias estadísticas encontradas para la microalga *Grammatophora sp.* (Fig 22) *y Navicula sp.* (Fig 23) resultaron diferencias negativas en los porcentajes de lípidos totales, es decir, un decremento muy notorio.

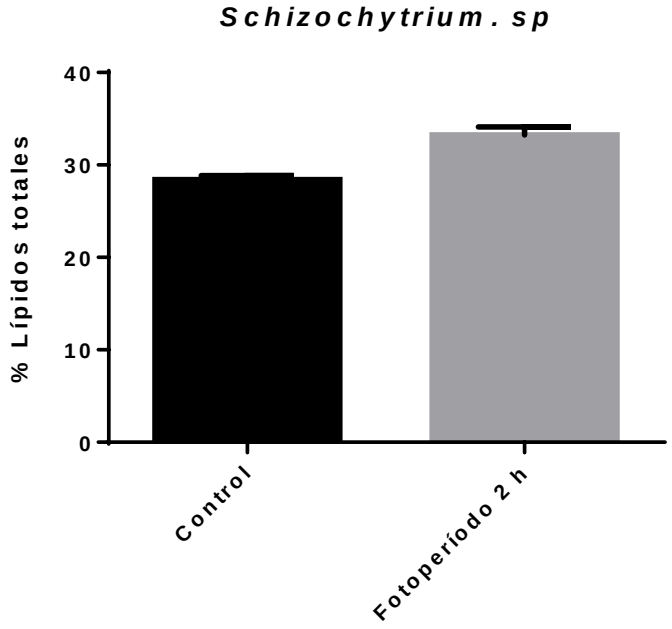


Fig 21. Efecto de un fotoperíodo de corto tiempo sobre los contenidos de lípidos totales de la microalga *Schizochytrium sp.*

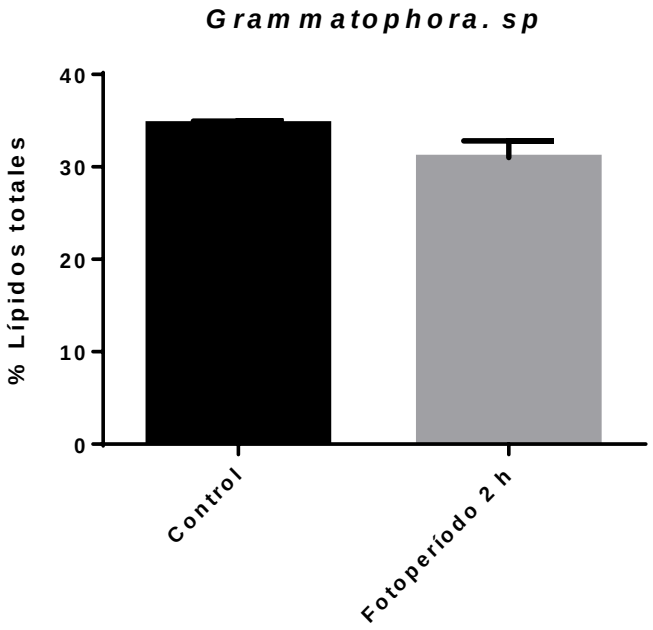


Fig 22. Efecto de un fotoperíodo de corto tiempo sobre los contenidos de lípidos totales en la microalga *Grammatophora sp*.

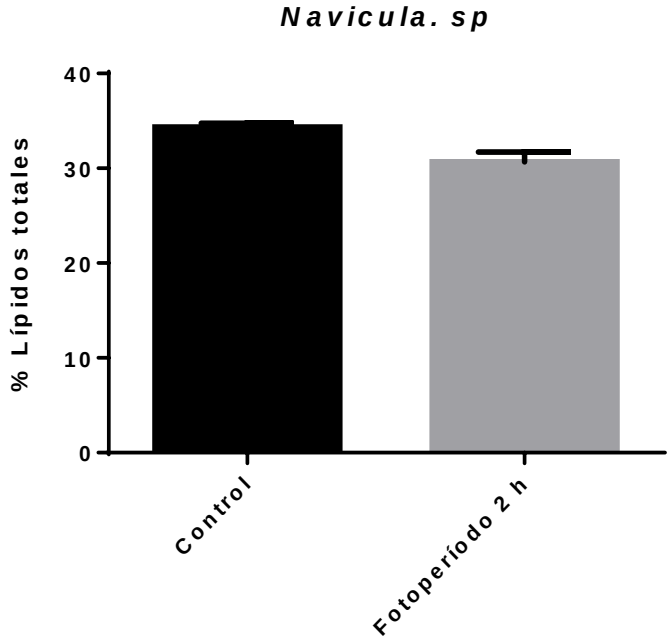


Fig 23. Efecto de un fotoperíodo de corto tiempo sobre los contenidos de lípidos de la microalga *Navicula sp*.

### *6.6 Evaluación del efecto de las condiciones de las estaciones del año sobre los lípidos en las microalgas*

La microalga *Schizochytrium sp.* mostró un mayor crecimiento en invierno (le favorecen las bajas temperaturas, y la alta intensidad lumínica) (Tabla 4), mientras que *Grammatophora sp.* no muestra gran variabilidad de densidad celular en la estación de otoño e invierno. La mayor densidad celular para *Navicula sp.* fue en otoño en tan solo cinco días (Fig 25), en la evaluación de invierno alcanzó, una densidad celular similar pero con dos días más de cultivo (Fig 24). Cabe destacar que fué la única microalga, la cual sobrevivió a las condiciones que fue sometida en verano, se muestra en la (Fig 25) que en el último día hay un descenso de la densidad celular, esta fue asociada al pico extremo de temperatura, el valor máximo de temperatura (Tabla 4) que fue en ese último día de evaluación del cultivo (Fig 25), sin embargo resultó una especie extremadamente resistente a las condiciones más extremas. Además hay un efecto contundente de las estaciones del año sobre el contenido de lípidos totales

en las tres especies, siendo la estación de invierno la más favorecedora en la inducción de material lipidico en todas las especies (Fig 27,28 y 29).

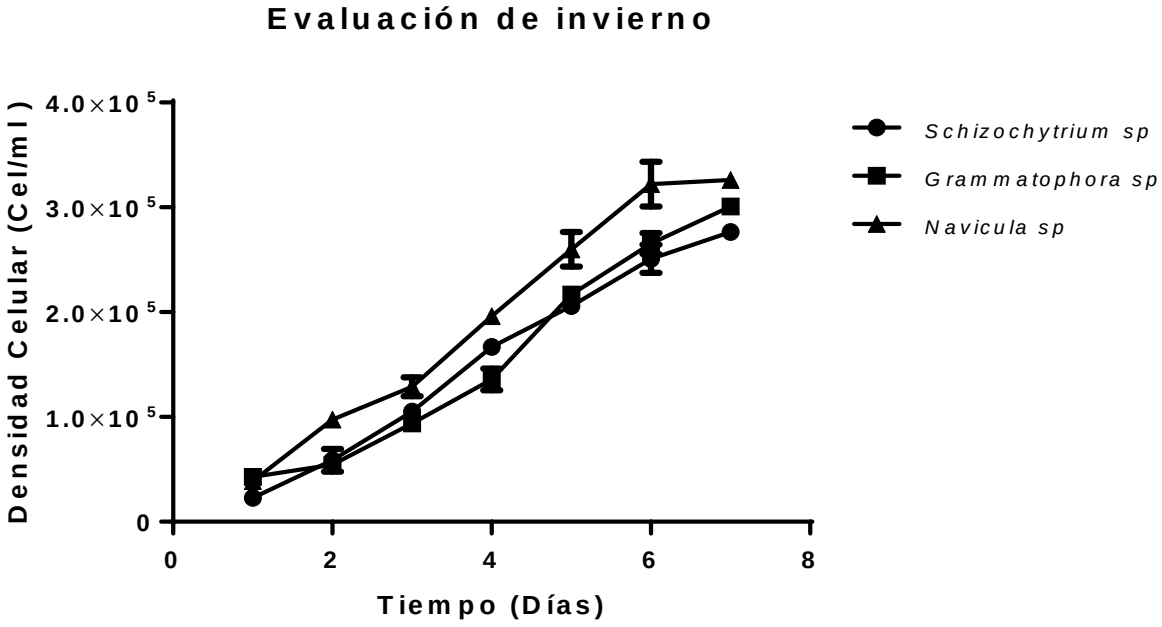


Fig 24. Crecimiento de las tres diferentes especies de microalgas cultivadas en el exterior en la temporada de invierno (inicios de enero 2018).

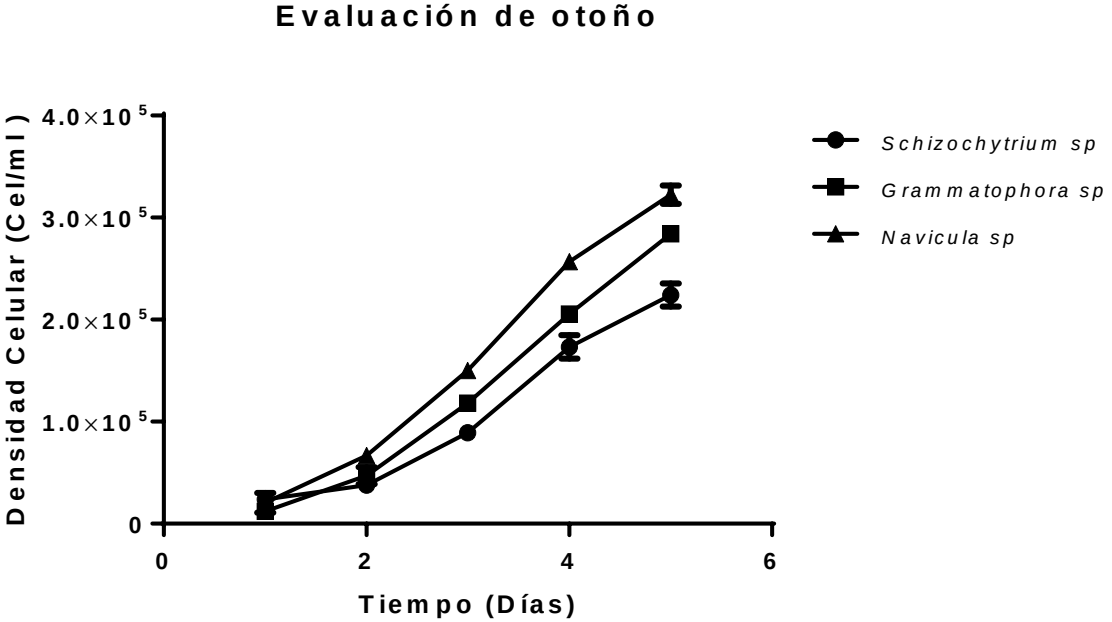


Fig 25. Crecimiento de las tres diferentes especies de microalgas cultivadas en el exterior en la temporada de otoño (mediados de octubre 2017).

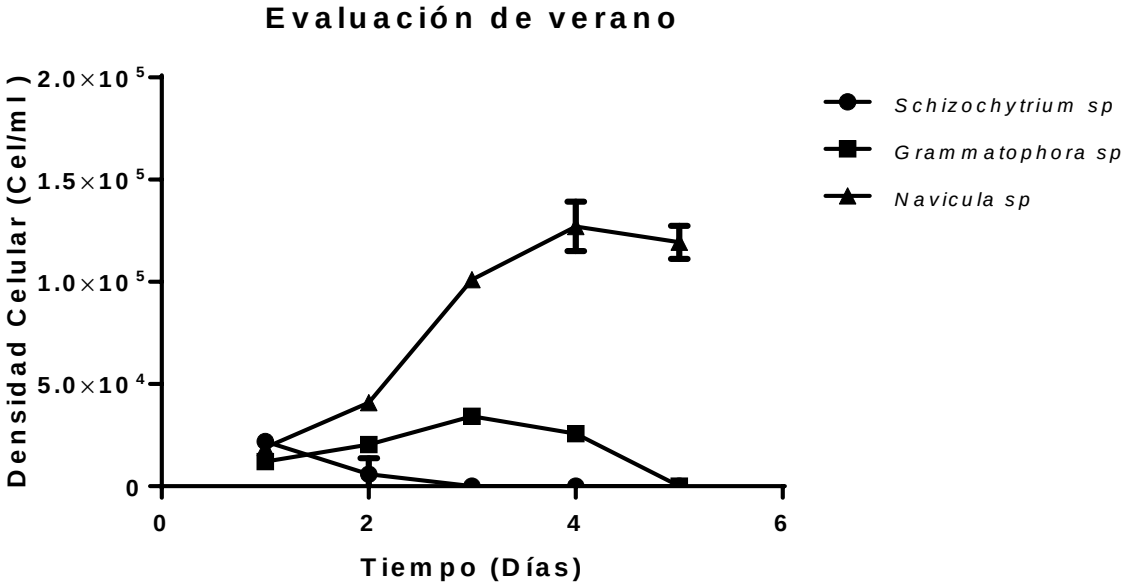


Fig 26. Crecimiento de las tres diferentes especies cultivadas en el exterior en la temporada de verano (inicios de agosto 2017).

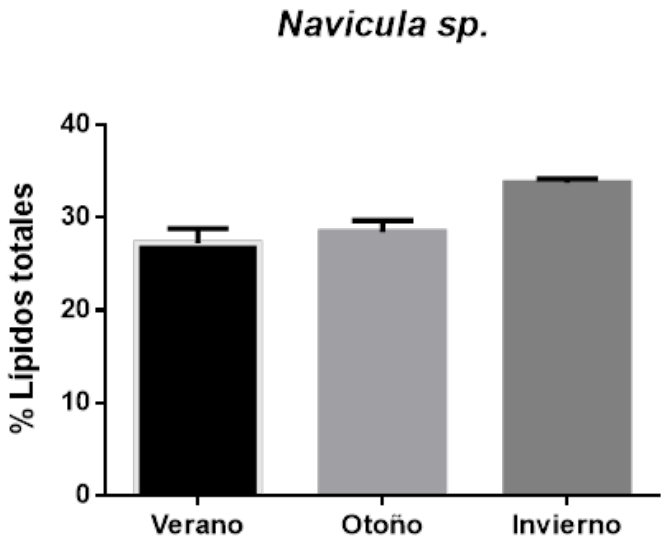


Fig 27. Evaluación del efecto de las estaciones del año sobre el contenido total de lípidos de la microalga *Navicula sp.*

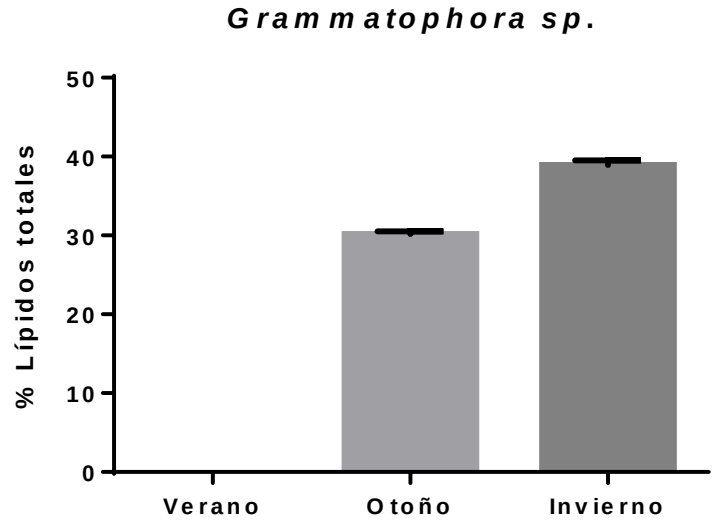


Fig 28. Evaluación del efecto de las estaciones del año sobre el contenido total de lípidos de la microalga *Grammatophora sp.*

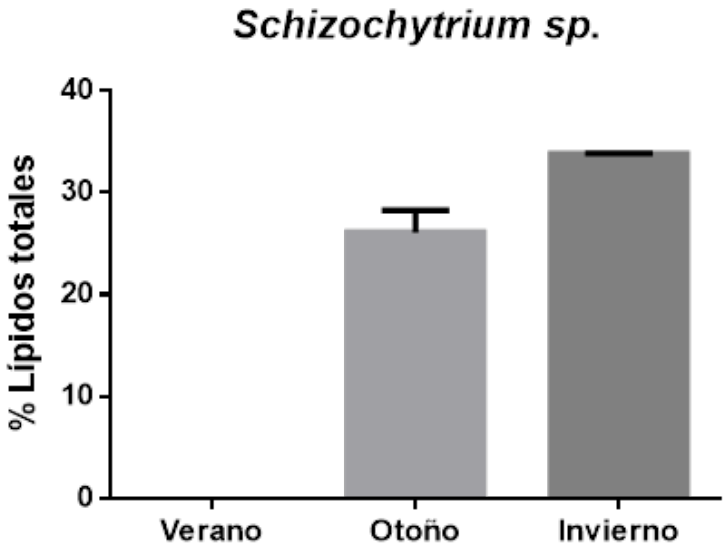


Fig 29. Evaluación del efecto de las estaciones del año sobre el contenido total de lípidos de la microalga *Schizochytrium sp.*

Tabla 4. Valores de temperatura e intensidad luminica registrados y recopilados mediante sensores en las diferentes estaciones.

| **Estaciones** | **Temp. $\bar{x}$ (°C)** | **Mín / Máx (°C)** | **$\bar{x}$ de Intensidad Lumínica (Luxes)** |
|---|---|---|---|
| Verano | 37.9 | 31 / 48 | 45,346.11 |
| Otoño | 32.04 | 29 / 35.2 | 31,175.68 |
| Invierno | 25.78 | 15 / 33.4 | 39,540.31 |

### *6.7 Determinación de la técnica de cosecha sobre el contenido lipídico en las microalgas*

Se puede apreciar en la (Fig 30) que para la microalga *Grammatophora sp.* existieron diferencias significativas ($p<0.05$) con el uso del floculante químico sulfato ferroso ($FeSO_4$) respecto al control (Tabla 5), el incremento aquí fue de 9%, el ANOVA de una vía aplicado a la microalga *Navicula sp.* (Fig 31) también muestra resultados significativas ($p<0.05$), un ligero incremento de los porcentajes de lípidos con ambos tratamiento, tanto con el floculante hidróxido de sodio (NaOH), como con el sulfato ferroso (FeSO4), respecto al control (Tabla 6).

En la microalga *Schizochytrium sp.* no se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) en los porcentajes de lípidos totales presentes en ésta con los dos floculantes químicos utilizados (Fig 32).

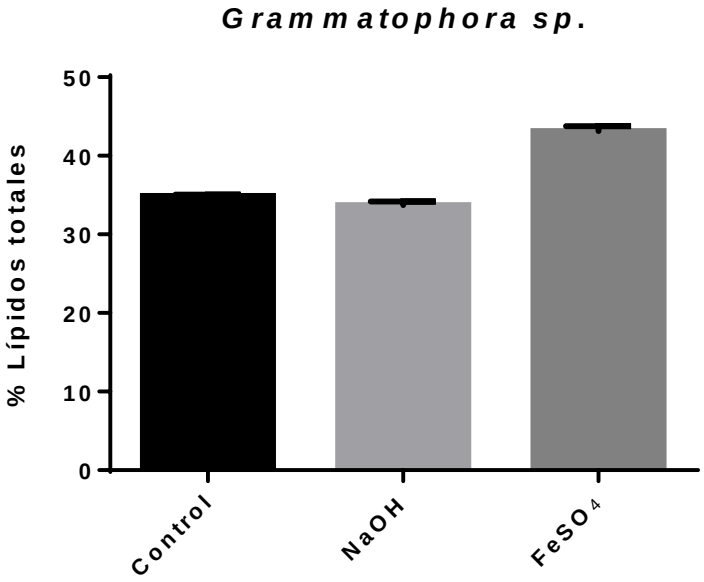


Fig 30. Efecto de floculantes químicos sobre los porcentajes de lípidos totales de la microalga *Grammatophora sp*.

Tabla 5. Comparación de los tratamientos resultantes del ANOVA aplicado a los porcentajes de lípidos en la microalga *Grammatophora sp*. con el uso de floculantes químicos.

| **Tukey's multiple comparisons test** | **Mean Diff.** | **95% CI of diff.** | **Significant?** |
|---|---|---|---|
| **Control vs. NaOH** | 1.166 | 0.02496 to 2.307 | Yes |
| **Control vs. $FeSO_4$** | -8.224 | -9.365 to -7.083 | Yes |
| **NaOH vs. $FeSO_4$** | -9.390 | -10.53 to -8.249 | Yes |

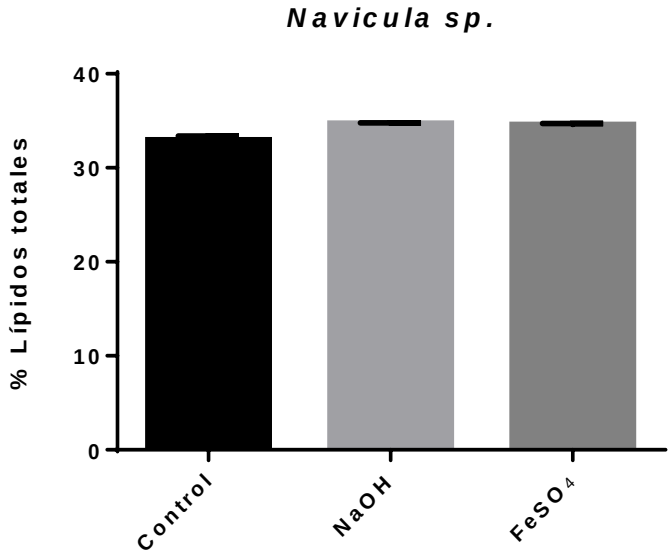


Fig 31. Efecto de floculantes químicos sobre los porcentajes de lípidos totales de la microalga *Navicula sp.*

Tabla 6. Comparación de los tratamientos resultantes del ANOVA aplicado a los porcentajes de lípidos de la microalga *Navicula sp*. con el uso de floculantes químicos.

| **Tukey's multiple comparisons test** | **Mean Diff.** | **95% CI of diff.** | **Significant?** |
|---|---|---|---|
| **Control vs. NaOH** | -1.758 | -2.335 to -1.180 | Yes |
| **Control vs. $FeSO_4$** | -1.630 | -2.208 to -1.053 | Yes |
| **NaOH vs. $FeSO_4$** | 0.1274 | -0.4501 to 0.7050 | No |

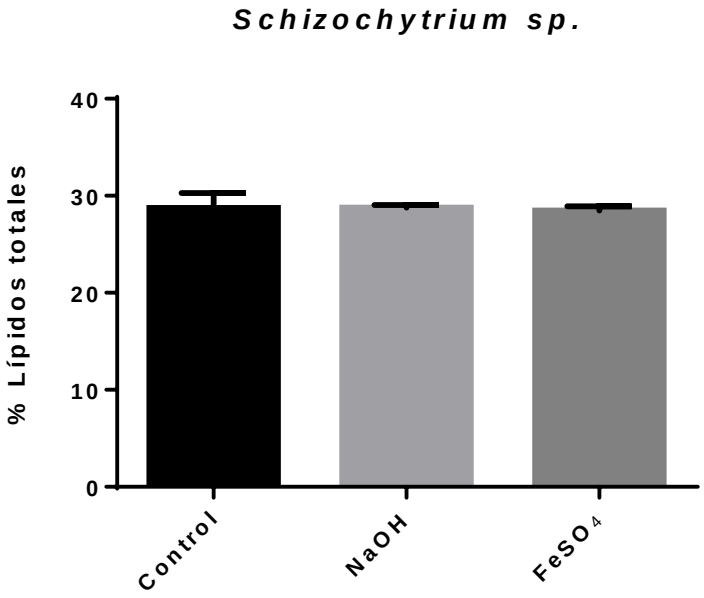


Fig 32. Efecto de los floculantes químicos sobre los porcentajes de lípidos totales de la microalga *Schizochytrium sp*.

### *6.8 Evaluación post-cosecha de almacenamiento de biomasa algal.*

Los modelos lineales cuadráticos de segundo orden ($Y= B0 + B1X + B2X^2$) nos muestran la tendencia clara de los porcentajes de lípidos totales en las microalgas a medida que transcurren los días de almacenamiento, con los dos tratamientos aplicados a todas las especies (almacenamiento en ausencia y presencia de luz), el más favorecedor en la inducción de material lipídico resultó el tratamiento en ausencia de luz. No se incluyeron los valores de $R^2$ ya que no nos interesa evaluar el modelo, ya que éste solamente se utilizó para describir los efectos de los tratamientos sobre el contenido total de lípidos en las especies de microalgas, conforme pasaban los días de almacenamiento. La microalga *Schizochytrium sp.* muestra un considerable incremento de los porcentajes de lípidos totales (13%) al final del experimento ( día 17) (Fig 33), el segundo mayor porcentaje de lípidos obtenidos, culminando el periodo de almacenamiento, con el tratamiento en ausencia de luz fue para la microalga *Navicula sp* (9%) (Fig 35), y

*Grammatophora sp.* al día 17 logró un incremento del (7%) de lípidos totales con el tratamiento en ausencia de luz (Fig 34).

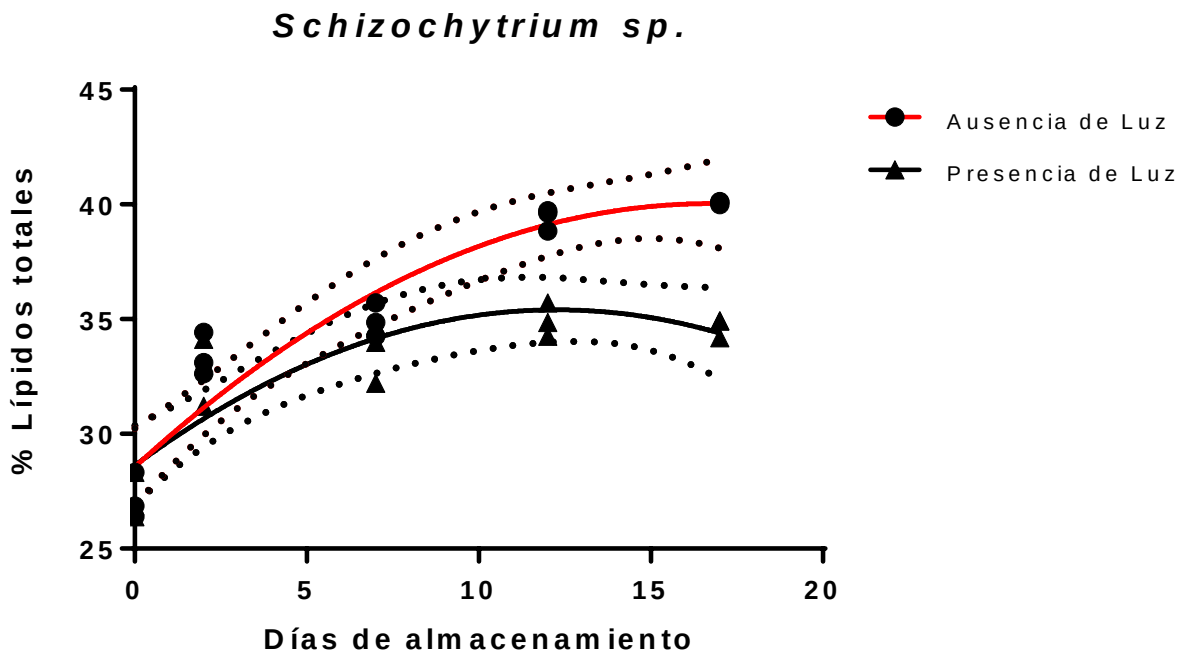


Fig 33. Efecto del tiempo de almacenamiento en ausencia y presencia de luz sobre la cantidad de lípidos totales en la microalga *Schizochytium sp.*

.

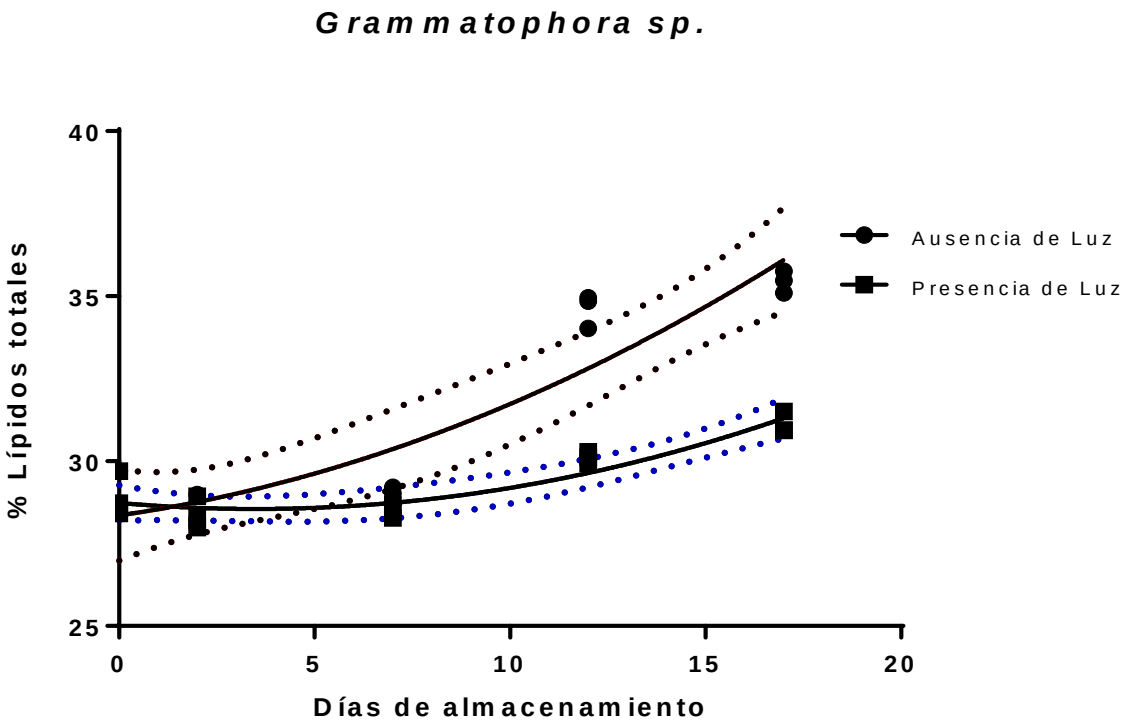


Fig 34. Efecto del tiempo de almacenamiento en ausencia y presencia de luz sobre el contenido de lípidos totales en la microalga *Grammatophora sp*.

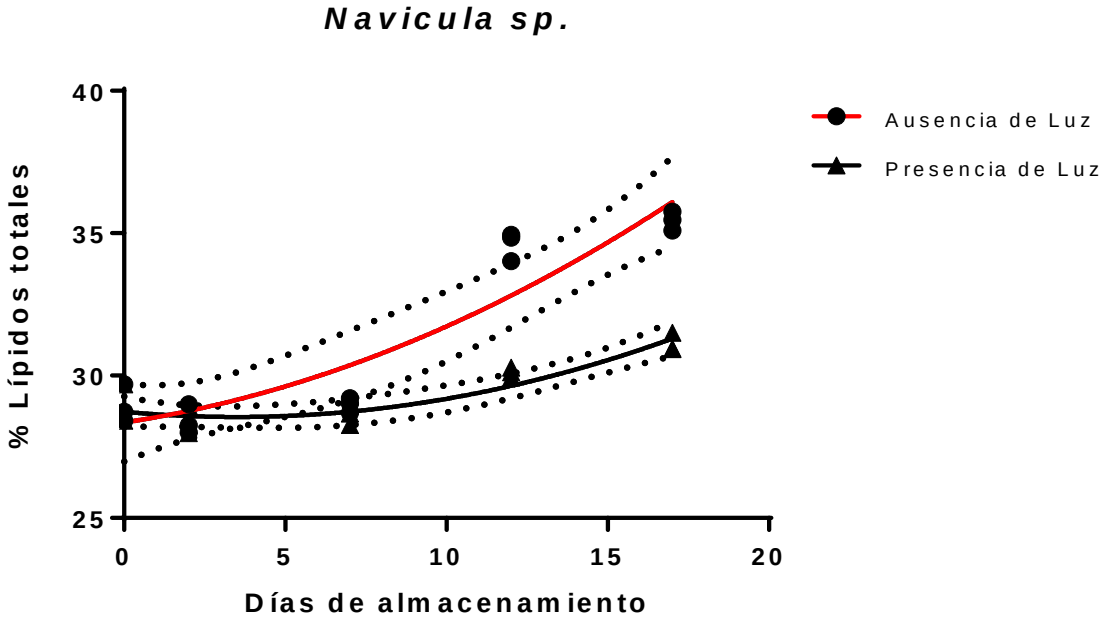


Fig 35. Efecto del tiempo de almacenamiento en ausencia y presencia de luz sobre el contenido de lípidos totales en la microalga *Navicula sp.*

### *6.8 Determinación de la Viabilidad y calidad de la biomasa algal almacenada.*

El experimento post-cosecha de almacenamiento de biomasa algal se llevó a cabo con la biomasa obtenida de cultivos en el exterior en tanques de 400 L que se realizaron en la estación de otoño (Fig 28), este experimento de almacenamiento en refrigeración fue de 17 días, en el cual se tomaron muestras en el día 1 (ingreso a refrigerarse) y del día final (día número 17 de almacenamiento), en el cual se encontró que la microalga *Schizochytrium sp.* al final del experimento tenía más porcentaje de células muertas, con un 19% (Fig 41), seguido de la microalga *Navicula sp.* con un 13% de células muertas al día 17 (Fig 39) , y en menor porcentaje *Grammatophora sp.* con un 11% de células muertas (Fig 37), y en cuanto a la calidad de la biomasa almacenada se encontró una gran cantidad de números de colonias de bacterias (UFC), en las muestras que se realizaron en placas con el medio TSA (Tabla 7); sin embargo la contaminación es muy propensa, esta biomasa era proveniente de cultivos en el exterior (época de otoño) donde no controlamos nada de las condiciones externas. En la (Tabla 7) se puede observar que del día inicial al ultimo día de almacenamiento (día 17), la cantidad de bacterias (UFC/mL) disminuyó en las microalgas *Grammatophora sp.* y *Navicula sp.*, mientras que en *Schizochytrium sp.,* la cantidad de bacterias aumentó.

Fig 36. Estado de las células algales de *Grammatophora sp*. al inicio del experimento en almacenamiento (4 °C).

Fig 37. Estado de las células algales de *Grammatophora sp*. al final del experimento en almacenamiento ( 4 °C).

Fig 38. Estado de las células algales de *Navicula sp*. al inicio del experimento en almacenamiento ( 4 °C).

Fig 39. Estado de las células algales de *Navicula sp*. al final del experimento en almacenamiento (4 °C).

Fig 40. Estado de las células algales de *Schizochytrium sp*. al inicio del experimento en almacenamiento (4 °C).

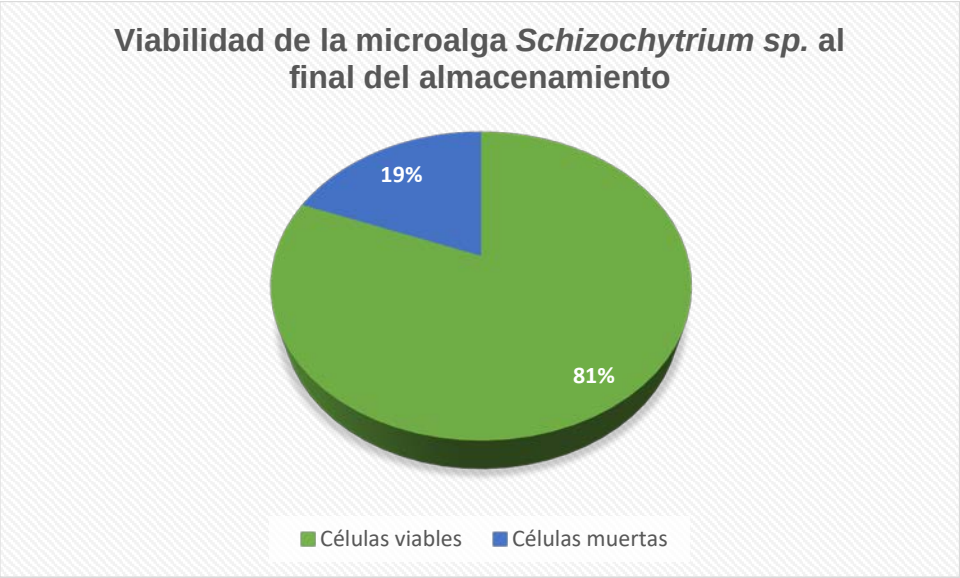


Fig 41. Estado de las células algales de *Schizochytrium sp*. al final del experimento en almacenamiento (4 °C).

Tabla 7. UFC del cultivo de bacterias en el medio TSA, mediante la técnica de vaciado en placa de las muestras al inicio y final del experimento de biomasa algal almacenada en refrigeración.

| **Microalga** | **Número de UFC/mL al inicio** | | | **Número de UFC/mL al final** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **$10^{-5}$** | **$10^{-6}$** | **$10^{-7}$** | **$10^{-5}$** | **$10^{-6}$** | **$10^{-7}$** |
| ***Grammatophora sp.*** | **>300** | >300 | 203 | >300 | 237 | 25 |
| ***Navicula sp.*** | **>300** | >300 | 283 | >300 | 252 | 29 |
| ***Schizochytrium sp.*** | **280** | 124 | 11 | >300 | 283 | 33 |

### *6.9 Evaluación de estrés mecánico por aireación*

Esta evaluación no estaba contemplada en los objetivos iniciales, sin embargo se sabe que una de las grandes problemáticas en los cultivos al exterior a mediana y gran escala es sin duda la aireación, el buen suministro de oxigenación y la capacidad de homogenización de las células algales por toda la columna de agua para un mejor aprovechamiento de dichas células. En los ultimos años se ha comenzado a evaluar el estrés que se puede generar (estrés mecánico por aireación), y ese es el interés de esta evaluación, de tal manera, se realizó una evaluación comparando la aireación tradicional suministrada por un blower de 2 hp, con líneas de manguera terminales de ¼" al fondo de cada cilindro, comparando con bombas de burbuja segmentada de 700L/h, de 12 Watts. El experimento demostró que con la bombas de 700 L/h en los cultivos hubo un incremento en la densidad celular para las tres especies de microalgas (Fig 42), ya que esta bomba permite recircular todas las células por la columna de agua sin permitir que las microalgas se adhieran tanto al fondo y a las paredes de los cilindros, evitando que las capas de biomasa dejen sin luz a las células de más abajo, además las pruebas estadísticas (T- Student) nos mostraron que hay diferencias significativas ($p<0.05$) con el tipo de aireación, un ligero incremento de los porcentajes de lípidos totales en las tres especies de microalgas, de las cuales: *Grammatophora sp.* fue la que tuvo un mayor incremento de los porcentajes de lípidos (3%) con bomba de aireación (Fig 44).

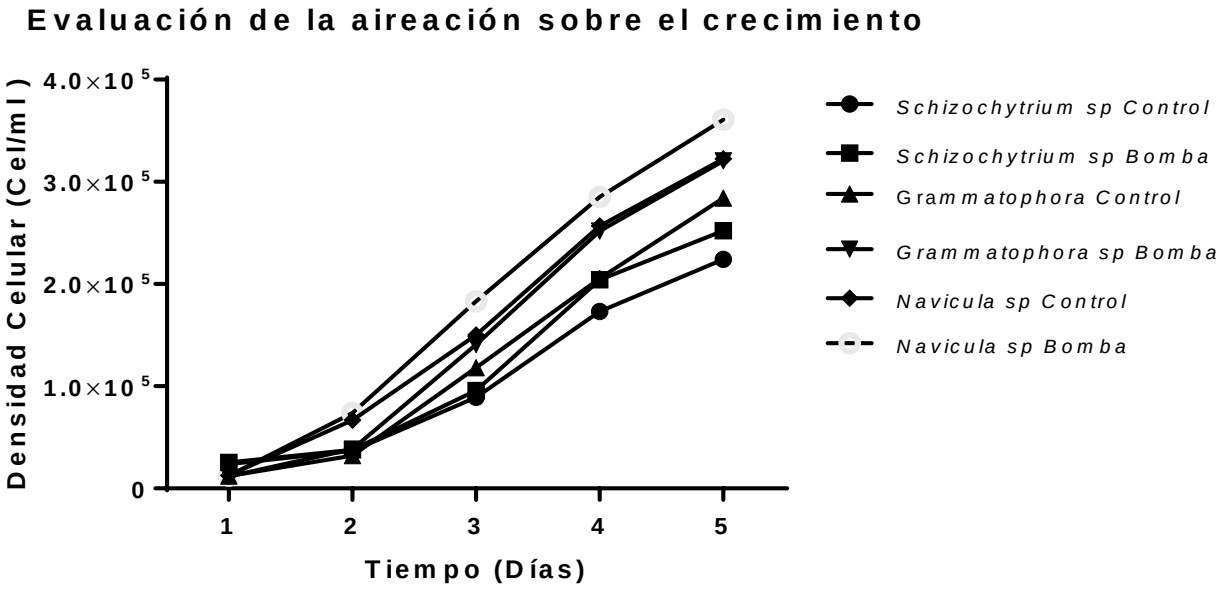


Fig 42. Efecto de la aireación sobre la densidad celular de las especies de microlgas cultivadas

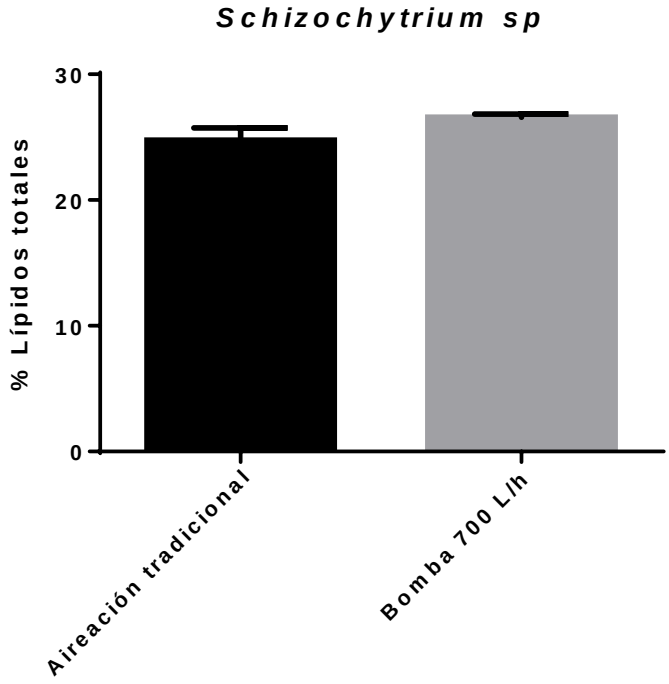


Fig 43. Efecto de la aireación sobre los porcentajes de lípidos totales en la microalga *Schizochytrium sp.*

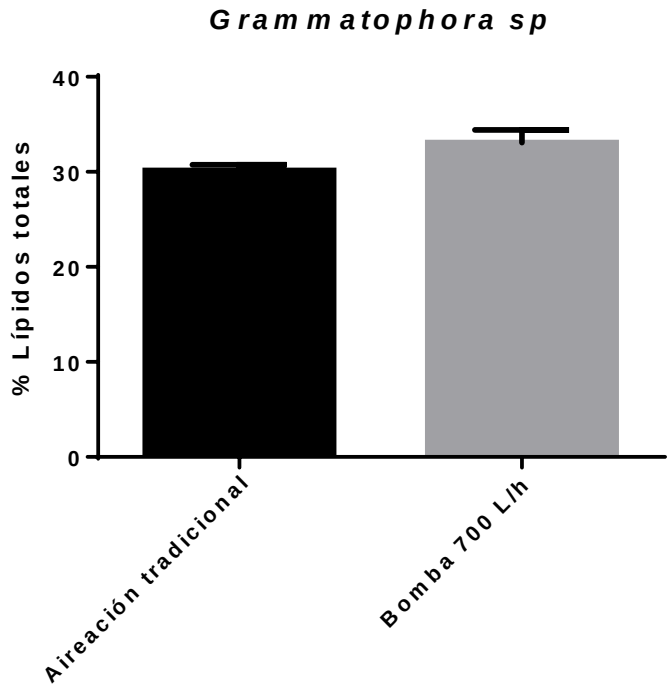


Fig 44. Efecto de la aireación sobre los porcentajes de lípidos totales en la microalga *Grammatophora sp.*

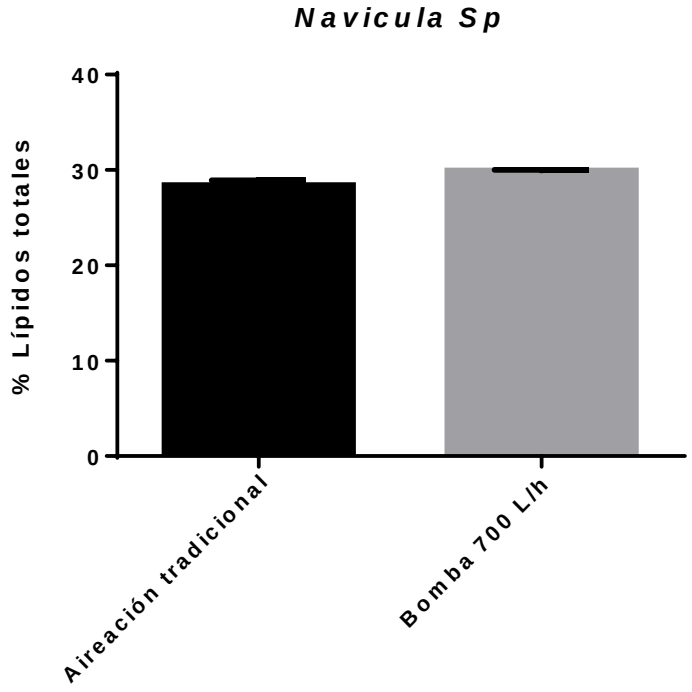


Fig 45. Efecto de la aireación sobre los porcentajes de lípidos totales en la microalga *Navicula sp.*

# 7. DISCUSIÓN

## *7.1 Experimentación con la adición de bicarbonato de sodio fuente extra de carbono a los cultivos*

Se probaron dos tratamientos con las tres especies de microalgas, adicionando bicarbonato de sodio como fuente carbono inorgánico, las cantidades fueron de 0.5 g/L y 1.5 g/L, se obtuvo que solo existieron diferencias significativas en crecimiento, y en aumento de las cantidades de lípidos totales (%) para la microalga *Schizochytrium sp.*, en *Navicula sp.* y *Grammatophora sp.* no existieron diferencias en cuanto a crecimiento, sin embargo, en las cantidades de lípidos si se encontraron. Estas diferencias en lípidos fueron en valores negativos respecto al control, en estas especies hubo un decremento de los porcentajes de lípidos totales, ésta disminución fue gradual, existiendo un descenso proporcional de lípidos con forme a la cantidad añadida de bicarbonato de sodio.

En el trabajo de El-Sheekh, (2012) se evaluó la adición de 3 cantidades de bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$), 0.5, 1.0 y 2.0 g/ L, encontrando que la cantidad de 2.0 g/L incrementó el crecimiento y la cantidad de lípidos de *Scenedesmus obliquus*, las cantidades de 0.5 y 1.0 g/L tuvieron un efecto negativo respecto al control, así como un efecto negativo en la productividad de ácidos grasos en esta especie de microalga, estos últimos resultados muy similares a los obtenidos en nuestra evaluación con las microalgas *Grammatophora sp.* y *Navicula sp.*. En la evaluación de este trabajo se utilizaron las cantidades de 0.5 y 1.5 g/ L de Bicarbonato de sodio, lo cual nos hace pensar que sería interesante evaluar más cantidades de bicarbonato de sodio para ver si podría existir un efecto positivo.

Caso contrario, en el estudio en *Chlorella vulgaris* donde se evaluaron distintas cantidades de bicarbonato de sodio añadidas a los cultivos de esta alga verde, donde se encontró que la cantidad de 1.0 g/L (en los cultivos de ésta alga) se obtuvo un mejor crecimiento respecto al control, así como un incremento de lípidos (Kayuri Mokashi, 2016).

Este mecanismo desencadenante puede mejorar potencialmente el uso comercial de algas como recurso de biocombustibles; sin embargo, se necesita más

experimentación para comprender mejor las respuestas metabólicas de estos organismos a la adición de bicarbonato para optimizar la producción de biocombustibles (Gardner et al., 2012).

En esta evaluación se utilizaron tres diferentes especies, las cuales poseen cualidades y características distintas, cada una reaccionando de distinta forma. Otro factor a considerar en esta evaluación es el pH en los cultivos que realizamos, donde los pH´s se incrementaron, pasando a ser un poco alcalinos con la adición de bicarbonato.
El pH puede afectar el crecimiento de algas, así como el suministro de carbono, normalmente el pH fluctúa durante el día y la noche en cultivos cerrados, ya que la absorción y el consumo de $HCO_3$ / $CO_2$ durante el día conducen a una alcalinización del medio, mientras que el pH disminuye durante la noche debido a la producción de $CO_2$ a través de la respiración. Estudios previos han detallado que el pH alcalino puede causar acumulación de TAG (Gardner et al., 2011; Guckert y Cooksey, 1990), aunque la influencia del pH en los lípidos se discute polémicamente, así como el efecto en diferentes especies de microalgas, de las cuales hay más informacion en algas diatomeas.

Recomendaría realizar un perfil de lípidos en este tratamiento, ya que aunque los tratamientos con la adición de bicarbonato de sodio solo se vió reflejada en el aumento de biomasa y de lípidos en una microalga (*Schizochutrium sp*) sería interesante conocer más a detalle el comportamiento de las otras especies.

### *7.2 Experimentación con la adición de melaza como fuente de carbono a los cultivos de las tres especies de microalgas*

De las tres especies cultivadas y evaluadas con la adición de melaza a los cultivos como fuente de carbono, se obtuvo que la microalga *Schizochytrium sp.* tuvo un incremento en las densidades celulares respecto al control, con la influencia de las dos cantidades de melaza probadas con 1.9 g/L y 3.9 g/L.

El incremento se debe a que a diferencia de las otras dos especies: *Grammatophora sp.* y *Navicula sp.* pertenecientes a las diatomáceas, la microalga *Schizochytrium sp.* tiene la capacidad de cambiar su metabolismo de autótrofo a heterótrofo "mixotrófica" (Quilodrán, 2010), esta puede aprovechar y tomar la energía de sustancias orgánicas simples sin requerir de la luz para su crecimiento, en este caso la melaza le sirvió de fuente de energía, a diferencia de las otras dos microalgas fotoautótrofas.

El incremento de la densidad celular para la microalga *Schizochytrium sp.* en cultivos de interacción mixtrófica con la adición de melaza como fuente de carbono, con la cantidad de $2g/m^3$ de agua, ya se había reportado *por Hernández-Castro (2014).*

En este experimento se obtuvo un mejor crecimiento en *Schizochytrium* sp. con las cantidades de melaza añadida, además también se obtuvo un incremento en los porcentajes de lípidos totales con ambas cantidades (1.9 g/L y 3.9 g/L de melaza), y de estas dos cantidades, la adición de 1.9 g/L de melaza resultó la más favorecedora en la inducción de lípidos.

Hay un grado de saturación en el cual ya no se puede sintetizar o aprovechar la melaza, Ma et al., (2017) evaluó las cantidades de 500, 800,1000 y 1500 mg/L de melaza añadida en la microalga mutante *Scenedesmus sp. Z- 4*., resultando la cantidad de 800 mg/L la más favorecedora en el incremento de lípidos, seguida de 1000 mg/L.

Ratanaporn Lessing et al., (2011) obtuvieron resultados similares en el incremento de biomasa y de ácidos grasos en el crecimiento heterótrofo de la microalga C*hrolella sp*. usando melaza como sustrato de carbono, aunque con un medio adicionado con una mayor cantidad de melaza( 30g/ L).

Las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus* en condiciones mixotróficas y heterotróficas usando melaza como fuente de carbono, en ambas condiciones de crecimiento, la tasa de crecimiento, los contenidos de carbohidratos y proteínas aumentaron por la elevación de las concentraciones de melaza. Las fracciones de pigmento y el contenido de lípidos incrementaron en respuesta al aumento de las concentraciones de melaza en condiciones mixotróficas para ambas algas, mientras que disminuyeron en condiciones heterotróficas (Mostafa et al., 2014).

Se han probado diferentes fuentes de carbono en los cultivos de microalgas heterótrofas: como el acetato de sodio, glucosa y almidón en cultivos mixtróficos, de éstos, principalmente la adición de glucosa ha logrado mayor incremento de lípidos en la especie de microalga *P. tricomutum* (Haiying et al., 2012). En la actualidad se siguen buscando fuentes de carbono que favorezcan la inducción de lípidos en cultivos mixtos, con microorganismos heterótrofos. El mecanismo para la inducción de lípidos es el mismo en microalgas, bacterias y algunas levaduras, por lo cual no solamente, las microalgas son microorganismos de interés biotecnológico, tal es el caso de *Cryptococcus laurentii* en la cual se optimizó la producción de lípidos con la incorporación de suero de queso combinada con melaza (Rodrigo Fernandez et al., 2012).

Las microalgas y organismos que pueden funcionar de manera autótrofa, heterótrofa y mixtrófica, en la actualidad presentan un gran interés biotecnológico, de los cuales, creo que la tendencia de investigación apunta a los organismos heterótrofos y mixtróficos que puedan coexistir con un beneficio mutuo, favoreciendo un fin biotecnológico.

### *7.3 Evaluación del efecto de las condiciones de las estaciones del año sobre los lípidos en las microalgas*

Se evaluó el efecto de las estaciones del año (vereno-otoño-invierno) particulares en la ciudad de La Paz, Baja California Sur, México, sobre el contenido de lípidos totales en las especies: *Grammatophora sp., Navicula sp. y Schizochytrium sp*.,estas se cultivaron en el exterior, en tanques cilíndricos de 1.80 m de altura con capacidad de 400 L, ubicados estratégicamente donde éstas pudieran aprovechar la mayor cantidad de luz durante todo el día. La evaluación resultante nos confirmó que efectivamente hay un efecto de las diferentes condiciones características de cada estación sobre la variable de respuesta evaluada (% de lípidos totales), así como en el crecimiento de estas especies (generación de biomasa). El crecimiento de microalgas y la composición bioquímica están reguladas por condiciones ambientales (Guiheneuf et al., 2008; Pal et al., 2011; Mokashi, 2016).

Se ha visto que el contenido de lípidos de la microalga *Scenedesmus* abunda en el aumento de la intensidad luminosa aumentada de 3000 a 6000 Luxes (Mandotra et al., 2016). Otro estudio indicó que *Botryococcus sp*. había mostrado el mayor porcentaje de lípidos (35.9%) a 6000 lux ( Yeesang and Cheirsilp, 2011).

Sin embargo, Sun et al., 2014 sugirieron que el mayor porcentaje de lípidos (33.0%) de microalgas *N. oleoabundans* HK-129 se logró a 14800 lux de intensidad. Por lo tanto, diferentes especies de microalgas tienen el mayor contenido de lípidos a intensidades de luz variables, ya que indican diferentes eficiencias en la utilización de la luz.

Por otro lado el crecimiento, el valor óptimo de la temperatura donde se obtiene la mayor producción de biomasa varía de una especie a otra (Sibi et al., 2016). Después del punto de compensación, la microalga experimenta el crecimiento ascendente a medida que aumenta la intensidad de la luz, y la máxima eficiencia fotosintética ocurre cuando llega al punto de saturación de la luz. Por lo tanto, el efecto positivo de la intensidad luminosa aumenta en las funciones de acumulación de lípidos solamente hasta un punto (Vitova et al., 2015) Una intensidad de luz extremadamente alta provocará la fotoinhibición, dañará los fotosistemas de microalgas, y por lo tanto, reducirá la acumulación de lípidos,

siendo este el efecto logrado en nuestra evaluación con la microalga *Navicula sp.* cultivada en verano, y a pesar de ser la única microalga resistente a las condiciones ambientales extremas en esta época, no logró una densidad alta en el cultivo, así como una cantidad de lípidos un poco más bajas a la reportada por Pacheco-Vega en 2015, en la cual cultivo la misma especie en el exterior; sin embargo, en éste trabajo no especifica temperaturas, ni la época en la que se cultivó, el valor reportado por este autor coincide con el de la evaluación que realizamos en esta especie en la época de Otoño.

*Grammatophora sp.* logró sobrevivir tres días en las condiciones de verano, mientras que *Schizochytrium sp.* no sobrevivió más de un día, sin embargo esto no significa que estas especies no se puedan cultivar en Verano, también se probaron tanques de volúmenes de 2500 L , en donde estas especies crecieron muy bien bajo las mismas condiciones, inclusive se probó una evaluación con los mismos tanques cilíndricos de 400 L cubriéndolos con malla sombra, bloqueando así un porcentaje de la luz solar, evitando de esta manera que se elevara la temperatura y las microalgas se mantuvieran sin problemas de muerte, solamente se recomienda utilizar volúmenes más grandes, ya que en un volumen de 400 L o inferior, se eleva la temperatura mucho más. Existe una única evaluación con estas mismas especies de microalgas utilizadas en el presente trabajo, donde se evaluaron en condiciones controladas de laboratorio, Donde De los Santos-Noyola en 2016, probó el crecimiento óptimo utilizando las temperaturas de: 22, 26, 30 y 34 °C, encontrando que la temperatura óptima para la microalga *Grammatophora sp.* fue de 34 ºC con una densidad de 1.7 x $10^6$ cel/mL, la microalga *Navicula sp.* fue de 34°C con una densidad de 1.9 x $10^6$ cel/mL y para la microalga *Schizochytrium sp.* fue una temperatura de 30°C con una densidad de 1.4 x $10^6$ cel/mL, lo cual quiere decir que *Navicula sp.* y *Grammatophora sp.* crecen muy bien a altas temperaturas, y *Schizochytrium sp.* es menos resistente, al igual que tiene una menos productividad de biomasa comparada a las otras dos especies analizadas, resultados similares se encontraron de igual manera en esta evaluación. Sin embargo, se encontró que en esta evaluación, las temperaturas no tan cálidas le favorecieron a la acumulación de material lipídico a estas especies.

La producción algal aumenta proporcionalmente con la temperatura hasta alcanzar la temperatura óptima de cada especie. Por encima de esta, aumenta la respiración y la fotorrespiración reduce la productividad global. La temperatura óptima varía entre las especies, pero en general está entre 28° y 35 °C (Park et al., 2011).

La microalga *C. vulgaris* tuvo una acumularon máxima de lípidos a 25°C, mientras que la disminución de la temperatura dio como resultado una disminución obvia en el contenido de lípidos (Converti et al., 2009). La temperatura de 20 ° C resultó ser la temperatura óptima para las microalgas *Scenedesmus sp.* para producir lípidos (Xin et al., 2011). La concentración lipídica de microalgas *N. oculata* varió de 18 a 40% en peso seco, cuando la temperatura varió de 20 a 27.5 °C (Converti et al. 2009) sugirió que a medida que la temperatura aumentaba de 20 a 25 °C, el contenido de lípidos de *N. oculata* aumentaba simultáneamente de 7.9 a 14.9%. En otro estudio, se encontró que la temperatura óptima de *C*. *minutissima* era de 20 °C, donde la productividad de lípidos era la más alta (Cao et al., 2014)

El aumento de la temperatura a un nivel óptimo causa el aumento del contenido total de lípidos. Sin embargo, no significa que todos los tipos de lípidos experimenten el aumento. En el artículo de Wei et al, 2015 estudiaron los efectos de la temperatura sobre las propiedades lipídicas de las microalgas *Tetraselmis subcordiformis* y *Nannochloropsis oculata* y encontraron que el aumento de la temperatura provocó una disminución de los lípidos neutros y ácidos grasos poliinsaturados, pero un aumento de los ácidos grasos saturados y monoinsaturados. Del mismo modo, James et al., 2013 investigaron la modulación de la temperatura de los perfiles de ácidos grasos de las microalgas *Chlamydomonas reinhardti* y sugirieron que un cambio a temperaturas inferiores a 25 ºC podría disminuir la cantidad total de ácidos grasos saturados pero aumentaría el contenido de ácidos grasos insaturados.

### *7.4 Evaluación de Fotoperíodo de corto tiempo*

En el entorno natural, toda la vida está expuesta a un ciclo diario de fluctuaciones de luz y oscuridad, lo que conocemos como oscilación estacional, como resultado de la rotación del planeta. Las células eucariotas y procariotas han evolucionado para responder a los cambios rítmicos en las condiciones ambientales y sincronizar sus procesos celulares al momento más apropiado del día (Dixon et al., 2014; Duanmu et al., 2014). La investigación sobre la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* muestra que una amplia gama de procesos biológicos que incluyen división celular, fototaxis, quimiotaxis, adhesión celular y metabolismo del nitrógeno pueden ser regulados por el reloj natural y las condiciones ambientales (Matsuo e Ishiura, 2011). Además de la regulación de los procesos biológicos, tanto el rendimiento como la composición de la biomasa de algas dependen de las condiciones ambientales de luz.

En esta evaluación se encontró grandes diferencias en la producción de biomasa algal, de las tres especies evaluadas, las diatomáceas: *Grammatophora sp.* y *Navicula sp.*, presentaron mucho menos rendimiento de biomasa respecto al control, siendo la microalga *Schizochytrium sp.* la que pudo generar mas biomasa en promedio respecto al control comparándola con las dos diatomáceas, así como un incremento en los porcentajes de lípidos totales presentes en ésta, esto debido a que los fotoperiodos de corto tiempo (2 h) aplicados por día, el poco tiempo en presencia de luz no permitió suministrar la energía necesaria a las diatomeas que son fotoautótrofas, y dependen exclusivamente de la luz para poder utilizar esta energía, de tal manera que al no adquirir una suficiente cantidad de energía durante la fase luminosa (2 h), no pudieron realizar y transformar energía durante en la fase oscura (22 h) mediante el ciclo de Calvin.

*Schizochytrium sp* a diferencia de las diatomáceas puede cambiar su metabolismo, de autótrofa a funcionar como heterótrofa (Quilodrán, 2010), aprovechando de manera eficiente lo que pueda bajo las condiciones presentes en en la fase oscura, que en este caso pudiera ser el suministro constante de aireación ($CO_2$).

Se ha estudiado que la intensidad de luz escasa o saturada no puede favorecer el crecimiento de microalgas. Cuando la intensidad de la luz es bastante baja, por ejemplo, por debajo del punto de compensación, se compromete la concentración de biomasa de microalgas, lo que lleva al empobrecimiento y por lo tanto afecta negativamente a la acumulación de lípidos (Zhu, 2015).

El proceso de fotosíntesis se divide en dos partes, la primera de las cuales requiere la presencia de luz, también llamadas reacciones de luz, es decir, la transformación de la energía solar que es capturada por los pigmentos (clorofila y ficocianina) en energía química en forma de ATP y NADH, liberando oxígeno como subproducto. Estas reacciones tienen lugar en un sistema de membrana interna que se llama sistema de membrana tilacoidal, y se producen en tres fases. Los pigmentos absorben la energía de la luz solar y eliminan los electrones. Las transferencias de electrones e hidrógeno conducen a la formación de NADPH y ATP, los pigmentos que dieron electrones en primer lugar obtien en reemplazos de electrones.

De acuerdo con Wen (2005), los sistemas que capturan energía solar para producir moléculas de energía, incluyendo ATP, se llaman fotosistemas. En las membranas tilacoides, hay dos tipos de fotosistemas que excitan electrones por dos sistemas de transporte de electrones diferentes de la siguiente manera: Fotosistema I, la ruta cíclica de “formación de ATP”; Fotosistema II La ruta no cíclica de formación de ATP. En el fotosistema II ocurre el proceso de fotólisis, que es una serie de reacciones que disocian las moléculas de agua en iones de oxígeno, iones de hidrógeno y electrones. Los electrones del fotosistema II se pasan al fotosistema I.

Durante la primera etapa de la fotosíntesis, es decir, las reacciones a la luz, los azúcares aún no se han producido. Los azúcares se producen durante la segunda etapa (Carrieri et al., 2007). La segunda etapa, o la etapa independiente de la luz, ya que puede tener lugar en ausencia de luz, siempre que haya suficiente ATP y NADPH para sintetizar moléculas orgánicas a partir de $CO_2$ y $H_2O$. El primer paso es la incorporación de moléculas de $CO_2$ en RuBP, catalizada por la enzima Rubisco, comúnmente conocida como fijación de carbono, seguida por el siguiente paso, es decir, el ingreso al ciclo de Calvin, a menudo denominado “ciclo de Calvin-Enson”, con el producto final siendo grupos orgánicos, como azúcares

(Bar-Even, 2010, Badger 2000, Laws 2004)**.** Es necesario realizar muchas investigaciones para analizar los límites teóricos de la eficiencia fotosintética en un esfuerzo por determinar qué se puede hacer para alcanzar estos objetivos. El investigador Ono en (2009) describió que la eficiencia fotosintética es la fracción de la radiación solar total que se convierte en energía química durante la fotosíntesis, expresada como la siguiente ecuación: $2H_2O + CO_2 + \text{energía} \rightarrow CH_2O + H_2O + O_2$ En organismos fotosintéticos oxigénicos, el $CO_2$ se fija en el ciclo de Calvin por la enzima Rubisco para aumentar la eficiencia (Laws, 2004). Las pérdidas sustanciales de la eficiencia fotosintética se encuentran entre las reacciones iniciales de transferencia de la fotosíntesis y la biosíntesis de carbohidratos. Dependiendo del mecanismo utilizado para fijar carbono y la cantidad de ATP y NADPH utilizados, y suponiendo radiación incidente total que incluye infrarrojos, la máxima eficiencia teórica en esta etapa, incluida la captura de luz y la transducción de energía, es entre 8 % y 13% antes de la fotorrespiración y respiración (Zhu, 2010). Por lo tanto, la eficiencia fotosintética se ve afectada por varios factores, es decir, la intensidad de la luz, la presión parcial de oxígeno y $CO_2$ (Ono, 2009), la transferencia de masa de $CO_2$ a los líquidos, la temperatura y la disponibilidad de nutrientes (Zhu, 2010). "De manera adicional, la cantidad de RuBisCO representa un límite intrínseco que determina la tasa de fijación de carbono (Bar-Even et al., 2010), sin embargo, en algunos casos, la eficiencia fotosintética será diferente en las especies acuáticas frente a las terrestres (Karube et al., 1992).

### *7.5 Evaluación post-cosecha de almacenamiento y la calidad de biomasa algal en refrigeración*

En este experimento se involucraron distintos factores que pudieran influir de forma directa o indirecta en la acumulación de material lipídico en las tres especies de microalgas con las que realizamos la evaluación de la biomasa algal colectada en cultivos en el exterior en la temporada de otoño. Dicha biomasa algal se almaceno en refrigeración a una temperatura de 4°C constantes durante todo el periodo de almacenamiento, aquí se evaluó la ausencia y presencia de luz en la biomasa, sin embargo el almacenamiento a 4 °C se consideró el ambiente controlado para este experimento, y a pesar de que se evaluaron solamente dos factores (ausencia y presencia de luz) hay otros factores no medibles, que también pudieron influir en los resultados: tales como la limitación de nutrientes, la presencia de bacterias, y el mismo almacenamiento con la temperatura tan baja.
Se encontró bajo este experimento que hubo un efecto positivo de incremento con los dos factores que se evaluaron: Ausencia y presencia de luz, ambos con influencias positivas en el incremento lipídico en la biomasa algal de las tres especies de microalgas utilizadas, sin embargo la evaluación en ausencia de luz favoreció aún más el incremento lipídico de igual manera para las tres especies, de las cuales: *Schizochytrium sp. logró* el incremento lipídico más alto, lo cual le atribuimos este resultado a su capacidad heterótrofa.

El nivel de lípidos en microalgas es un parámetro importante para la obtención y producción de biocombustibles y adquisición de ácidos grasos poliinsaturados. Sin embargo, algunas algas solo comienzan la producción de lípidos, cuando enfrentan cierto estrés ambiental (por ejemplo: Privación de nutrientes, alta intensidad de luz o ausencia de luz) (Rodolfi et al., 2009; Tang et al., 2011). Debido a esto, primero, es interesante cultivar las microalgas, para tener una alta concentración de biomasa, y luego, es necesario inducir la acumulación de lípidos bajo estrés nutricional (Jiang et al., 2011), ya que cuando se aplica algún estrés directamente a los cultivos, el resultado es una limitación en el crecimiento algal (biomasa).

Se piensa que la inanición o limitación de nutrientes es un enfoque factible y respetuoso con el medio ambiente para el control del ciclo celular para mejorar la

productividad de los lípidos (Breuer et al., 2013). Hasta el momento, la inanición de nutrientes se reconoce como la estrategia más exitosa y la más utilizada. En un intento de mejorar la productividad de lípidos, es importante obtener un rendimiento de biomasa sustancial y un alto contenido de lípidos en las células de microalgas. Estudios han comprobado que bajo estrés nutricional, se favorece la acumulación de lípidos y se forman triglicéridos (TAG) como el ingrediente dominante (Sibi et al., 2016). Numerosos estudios han informado que la mayoría de las especies de microalgas pueden mejorar la acumulación de lípidos y experimentar transformación bajo estrés nutricional (Zhu et al., 2013 - Li et al., 2014). Sin embargo, como para algunas especies, la deficiencia de nutrientes no favorecerá la acumulación de lípidos. Por ejemplo, bajo deficiencia de nutrientes, la microalga *Dunaliella salina* experimentó un descenso en el contenido de lípidos del 25 al 9%, pero un aumento de carbohidratos del 16 al 56% (Alabi et al., 2009).

Esta evaluación está relacionada con la discusión anterior en el experimento de fotoperiodos de corto tiempo, los ciclos de luz y las fases de luz y oscuridad. Aquí la microalga *Schizochytrium sp.* de igual manera en nuestra evaluación coincide con los resultados obtenidos por Chen en 2015, encontrando que la microalga *C. zofingienesis* puede crecer de manera fotoautrofa, mixotrofica y heterótrofa, encontrando que en ausencia de luz esta especie incrementa considerablemente la acumulación de material lipídico. Sin embargo, no hay muchos datos explícitos sobre las diferencias en la proliferación celular y la acumulación de sustancias energéticas entre los cultivos con y sin luz. También faltan datos sobre el rendimiento de lípidos adicionando glucosa, que es un factor de costo importante para la producción de aceite de algas. *Chlorella zofingiensis* es una alga verde que puede crecer bien fotoautótroficamente y en glucosa, con (alternativamente llamada mixotróficamente) o sin (alternativamente llamada heterotroficamente) luz (Liu, 2011; Wu, 2015).

Otro factor importante involucrado en la evaluación es la baja temperatura. El efecto de la temperatura en la producción de microalgas y lípidos es similar a la intensidad de la luz. Tanto el crecimiento de microalgas como la producción de lípidos aumentaron de forma exponencial a medida que la temperatura aumentó

y alcanzó un nivel óptimo (Zhu & Hiltunen, 2016), esto también concuerda con la evaluación de lípidos Ma et al, 2017 en la cual probo diferentes temperaturas bajas (4 - 25°C) en la microalga mutante *Scenedesmus sp. Z-4,* resultando la temperatura de 4 °C la más baja en los porcentajes de lípidos en esta especie, y 25°C la temperatura que más favoreció la acumulación de material lipídico en esta especie. Sin embargo las microalgas de nuestra evaluación son microalgas que fueron aisladas de un clima cálido, por lo que tal vez temperaturas contrastantes (bajas) pudieron favorecer en la acumulación de material lipídico de las especies que evaluamos, recomendaría más experimentación con otras temperaturas bajas para estas especies y corroborar la hipótesis que se tiene.

Otro factor importante dentro de esta evaluación fue la calidad de la biomasa algal durante el periodo de almacenamiento. Mediante cultivos en medio TSA se encontró presencia de colonias de bacterias (UFC). Sin embargo no siempre las bacterias significan algo negativo en los cultivos, Hernandez-Castro en 2015 encontró que al someter el cultivo de la microlga *Schizochytrium sp*., a la cepa TD19, el cultivo no presento un daño alguno, todo lo contrario, se observó células grandes, con buena pigmentación, y formando grandes colonias a pesar de estar rodeadas de las bacterias probióticas, además logró identificar dos diferentes estadios de crecimiento, los cuales se consideraron como signo evidente de que no se presentó inhibición de crecimiento poblacional.

Darley et al. (1973), quienes al realizar un estudio de la composición en las paredes celulares, encontraron algunas microalgas del genero *Shizochytrium* (*aggregatum y motivum*) las cuales tenían una composición química inusual, se ha encontrado a L-galactosa como el carbohidrato mayoritario en estas especies, siendo este compuesto favorable para algunos tipos de bacterias, ya que las galactosas, son azúcares simples al igual que la glucosa, en la cual se pudieran estar beneficiando ambas, las bacterias y la microalga *Schizochytrium sp.,* la cual es heterótrofa y puede aprovechar las sustancias que liberan estas mismas bacterias interactuando con beneficio mutuo (Malone & Ducklow 1990, Sundh 1992).

Existen distintas evaluaciones de cultivos mixtróficos con buenos resultados, tanto en crecimiento, como en acumulación de lípidos, ya sean bacterias, levaduras o

microalgas (relación simbiótica) (Maruyama et al., 1989; Suminto y Hirayama, 1997). Las microalgas excretan algunas fuentes de carbón (material orgánico extracelular derivado de la fotosíntesis) u otros productos que estimulan la síntesis de DNA en bacterias (Natrah et al., 2013). Sin embargo, depende del tipo de bacteria, ya que en algunos casos estas bacterias pueden dañar a las microalgas como lo reporta Hernandez-Castro en 2015.

Reportó de-Bachan & Bachan en 2003, un incremento de lípidos en microalgas utilizando bacterias del genero *Azospirillun.*

En el entorno natural, las microalgas coexisten con muchos otros microorganismos, incluidas las bacterias que pueden tener influencia en el crecimiento de microalgas (Cheirsip et al., 2011, Cho et al., 2015). Las posibles relaciones simbióticas entre microalgas y bacterias no pueden ser ignoradas en sistemas abiertos de cultivo a gran escala. Por lo tanto, la selección y caracterización de bacterias promotoras del crecimiento de microalgas podrían ofrecer una nueva estrategia para mejorar el cultivo de microalgas a escala industrial (Olguin, 2014). Do Nascimento et al., 2013 investigó el efecto de *Rhizobium sp*. sobre el contenido de biomasa, lípidos y clorofila de las microalgas *Ankistrodesmus sp*. en su estudio, y encontraron que el co-cultivo de la cepa *Rhizobium sp*. resultó en un aumento en la clorofila (de 9 a 30 mgml1 ) y biomasa (699 a 1999 mgL1) ) contenidos de la cepa de las microalgas, además la productividad global de lípidos de la cepa se incrementó a 112 mgL1 d1 después de la optimización.

Le Chevanton et al., (2013) aisló 48 cepas bacterianas asociadas con microalgas marinas, y estudió sus efectos sobre el crecimiento de *Dunaliella sp*., entre estos, dos cepas bacterianas: *Alteromonas sp*. y *Muricauda sp*., mejoraron el crecimiento de *Dunaliella sp*. durante el cocultivo. Estas cepas bacterianas tienen la capacidad de desmineralizar compuestos orgánicos que pueden ser utilizados por microalgas, bajo condiciones limitadas de nitrógeno.

Zhao et al., (2014) estudió el efecto de consorcios microalgas-bacterias sobre la producción de lípidos y la fijación de $CO_2$ cuando se cultiva utilizando lixiviados de vertedero. La concentración máxima de biomasa de 1.58 gL1 y la mayor productividad de lípidos de 24.8 mgL1 d1 fué obtenido en una proporción de pico de lixiviado del 10%. A pesar de los beneficios potenciales observados hasta

ahora, hay margen para futuras investigaciones para determinar el grado de interacciones y mecanismos de microalgas y bacterias.

También se ha reportado Inhibición del crecimiento bacteriano con especies de diatomeas, en la mayoría de los casos se le atribuye al efecto de "Antagonismo microalgal", muy frecuente en el género *Chaetoceros*, este tipo de microalgas pueden producir sustancias antibacterianas y se ha determinado que estas sustancias se producen por la combinación de algunos ácidos grasos (Naviner et al. 1999), Kellam et al. (1988) señalan que ácidos grasos con más de 10 átomos de carbono en su estructura, inducen a la lisis del protoplasto bacteriano.

Las comunidades de plancton, en las que se incluyen muchas microalgas y bacterias, influyen en el ciclo global del carbono, y por lo tanto, en el clima. Se demostró que las bacterias heterótrofas no solo descomponen la materia orgánica sino que también promueven el crecimiento de las plantas mediante ciertos mecanismos complejos de comunicación e intercambio de nutrientes (Philippot et al., 2013). En los últimos años, el mismo fenómeno también se ha observado para las algas en el contexto de la coevolución (Kim et al., 2014, Ramanan et al., 2015, Copper et al., 2015, Goecke et al., 2013). Por lo tanto, cualquier innovación en biotecnología de algas, siempre debe tener en cuenta la relación existente entre las algas y las bacterias. Influyen en el ecosistema de forma natural y, por lo tanto, podrían estar implicados en la futura industria de la biotecnología (Subashchandrabose et al., 2011, Wang et al., 2015).

Las interacciones algas-bacterias cubren todas las formas posibles de relaciones simbióticas, sin embargo, muchos tipos de interacciones en la zona planctónica aún no se han explorado completamente, principalmente debido a la onerosa tarea de separar a los compañeros que están naturalmente vinculados entre sí (Ramanan et al., 2016).

Hasta ahora, se ha prestado muy poca atención a las bacterias en la acuacultura y normalmente se ha encontrado que su presencia está asociada con el control de las enfermedades bacterianas. La interacción entre las bacterias y las microalgas implica diferentes mecanismos, incluida la producción de estimulantes del crecimiento o de compuestos inhibidores, la señalización cruzada y, en términos

generales, la capacidad natural de las microalgas para adherirse a microorganismos específicos asociados (Rivas et al., 2010). La selección de los consorcios de microorganismos apropiados podría mejorar en gran medida la productividad, la eficiencia y la sustentabilidad de la acuicultura (Natrah et al., 2011).

### *7.6 Estrés mecánico por aireación*

En los resultados obtenidos las bombas utilizadas, tuvieron un efecto positivos respecto al control, una mayor concentración celular y también un ligero incremento de los porcentajes de lípidos, hubo mejor oxigenación y recirculación de la biomasa algal, permitiendo que toda la biomasa algal no se adhiriera en gran medida a las paredes y al fondo de los tanques, evitando así los parches de biomasa algal, a la cual se le atribuyen estos resultados. Sin embargo hay distintas evaluaciones donde es crítico el tamaño de las burbujas que se generan mediante las bombas de suministro de aireación. Hay suficiente evidencia experimental de que las burbujas pequeñas se rompen en la superficie, conducen a la formación de espuma, la cual puede ser una causa importante de muerte celular (Wang et al., 1994).

Garcia-Camacho et al., (2001) informaron que la ruptura de pequeñas burbujas en la superficie de la columna del agua fue la causa del daño celular en la microalga *P. tricornutum*. Garcia-Camacho et al., (2000) evaluaron los efectos de las fuerzas mecánicas e hidrodinámicas sobre las células de la microalga *Porphyridium cruentum*, he informan para cultivos aireados en recipientes con agitación, donde la tasa específica de muerte celular varió linealmente con el área interfacial específica, lo que sugiere la importancia del contacto entre las células y las burbujas en el proceso dañino, a bajas tasas de agitación mecánica, la ruptura de burbujas en la superficie de cultivo fue la causa predominante de daño. Por el contrario, a intensidades de agitación más altas, el daño celular fue causado predominantemente por el estrés hidrodinámico en el flujo turbulento a granel.

Por lo cual, en la presente evaluación, no recomendaría utilizar bombas de menor capacidad a las evaluadas, para evitar el efecto mencionado y tan reportado,

además este tipo de bombas solo funcionarían en volúmenes relativamente pequeños (<450 L), de manera que este tipo de bombas, o de mayor capacidad no son costeables en este tipo de cultivos por los insumos y mantenimientos adicionales.

Los investigadores han demostrado que el diámetro de los tubos en reactores tubulares influye en la cantidad de luz disponible (Hu y Richmond, 1994, Molina-Grima et al. al., 2001), sin embargo, la producción de microalgas a gran escala requiere reactores de gran volumen, que se logran más fácilmente con diámetros de tubo más grandes. La circulación de volúmenes más grandes de algas requiere más aire impulsado por un sistema de aireación (Blowers). Volúmenes grandes demandan una buena potencia neumática para poder soportar los niveles suficientes de mezcla en las columnas de agua de los cultivos.

La mayoría de estudios del efecto de la aireación están relacionados a la supervivencia o crecimiento de los microorganismos. Ronda et al., 2012 evaluó crecimiento y producción de ácido linoleico en *Spirulina platensis* con diferentes velocidades de aireación (0.2-2.5 vvm). La operación estática, contínua y periódica del aire resultó en 41.9%, 88.4% y 108% de saturación de aire de oxígeno disuelto, para lo cual los valores correspondientes de GLA fueron 2.3, 6.5 y 7.5 mg · g-1 de peso en células secas. Un aumento en la tasa de aireación de 0.2 a 2.5 vvm mejoró tanto la tasa de crecimiento específico como el contenido de GLA bajo burbujeo periódico en el medio de bicarbonato. Con un aumento de 6 veces en la tasa de aireación, el contenido de GLA del alga aumentó en un 69.64% (5.6-9.5 mg · g-1 peso de células secas). Además, el contenido total de ácidos grasos (TFA) en la biomasa seca aumentó del 2,22% a 4,41%, mientras que las algas mantuvieron una proporción constante de GLA y TFA dentro de la tasa de aireación probada.

La evaluación de estrés mecánico por aireación del presente trabajo se realizó de manera adicional, ya que se tenía la disposición de estas bombas, y se quiso ver si habría un efecto en los incrementos lipídicos, utilizando otro tipo de aireación diferente a la convencional suministradas en los laboratorios de acuacultura con blowers, solamente considerando la capacidad de las bombas indicada por el fabricante, sin embargo recomendaría evaluar algunos parámetros adicionales al probar las bombas en los cultivos, como lo es el oxígeno disuelto, así mismo

evaluar los flujos para poder indagar más, y tener más herramientas para discutir, ya que se obtuvo un resultado positivo respecto al crecimiento y acumulación de lípidos aunque en un ligero porcentaje, además de que en la actualidad existe muy poca investigación del estrés mecánico por aireación directamente asociado a la acumulación de material lipídico en microalgas.

### *6.7 Efecto de la técnica de cosecha sobre la composición lipídica de la biomasa algal (uso de floculantes)*

En ésta evaluación realizada, se obtuvo que existe un efecto del tipo de método de cosecha sobre el contenido de lípidos totales en dos de las tres microalgas utilizadas, siendo *Grammatophora sp.* y *Navicula* sp. las que tuvieron un efecto positivo en el incremento de lípidos totales, la única asociación que tienen estas especies, es que ambas son diatomeas. El sulfato ferroso como floculante tuvo un efecto muy significativo en el incremento de lípidos en *Grammatophora sp*., y el sulfato ferroso y el hidróxido de sodio tuvieron un efecto positivo en el incremento de lípidos para *Navicula sp.,* sin embargo éste incremento no es tan alto comparado con el de la otra especie (*Grammtophora sp.-* Sulfato ferroso).

Es necesario elegir cuidadosamente el proceso de cosecha que se utilizará en la producción de microalgas a gran escala, ya que se ha encontrado que el método de cosecha afecta el contenido de lípidos totales. Un estudio de Borges et al., (2011) investigaron el efecto del aniónico y floculantes catiónicos, y concluyeron que los extractos de las cosechas, la biomasa con floculantes aniónicos resultó en ácidos grasos saturados que son deseables para la producción de biodiesel. Sin embargo, la biomasa cosechada utilizando floculantes catiónicos mostraron una mayor capacidad de extracción de ácidos grasos insaturados para la industria farmacéutica y alimentaria. En otro estudio, el sulfato de aluminio y el cloruro férrico afectaron a la digestibilidad anaeróbica de compuestos orgánicos separados de las aguas residuales, tales como aminoácidos, proteínas y ácidos grasos de cadena larga (Dentel y Gossett, 1982).

Borges et al., en 2016 encontraron que en la microalga *Nannochloropsis oculata* cosechada con el floculante hidróxido de sodio (NaOH) afectaba de manera

negativa el rendimiento de lípidos, así como desaparecían los contenidos de los ácidos grasos poliinsaturados de interés comercial presentes en estos, como el ácido eicosapentaenoico (EPA C20: 5) y el ácido eicosatetraenoico (ETA C20: 4) y encontraron que la centrifugación y el lavado con formato de amonio ($NH_4HCO_{2)}$ era el más efectivo en la acumulación de lípidos, y ácidos grasos poliinsaturados como EPA y ETA, sin embargo también comentan los altos costos en este último método.

Sasireka & Muthuvelayudham (2015) utilizaron cloruro de sodio (NaCl) y sulfato ferroso (FeSO4) no como floculantes, pero si como fuente de sal y hierro en el crecimiento y la acumulación lipídica en la microalga *Skeletonema costatum* con diferentes concentraciones y encontraron que la mejor combinación fue la de la adición de 30µM de sulfato ferroso (FeSO4) combinada con 0.4 µM de cloruro de sodio (NaCl). La microalga que se utilizó en esta evaluación (*Skeletonema costatum*) es una diatomea, cosa que tiene en común con las dos microalgas que evaluamos en este experimento, las cuales tuvieron un efecto positivo en el incremento de lipídicos con la adición de sulfato ferroso y con hidróxido de sodio (NaOH) como floculantes, tal vez este tipo de microalgas responda más eficaz a estímulos de hierro y salinos, que involucran incremento de pH.

A pesar de la alta eficiencia de NaOH para la floculación de biomasa de microalgas (Vandamme et al., 2012, 2015; Wu et al., 2012, 2015; Besson & Guiraud 2013; Pirwitz et al., 2015), no hay mucha información disponible sobre los posibles efectos de este compuesto sobre la composición bioquímica de microalgas marinas, particularmente sobre la concentración total de lípidos y el perfil de ácidos grasos, coproductos principales de la biomasa de microalgas. Así mismo no hay mucha información del sulfato ferroso como floculante y mucho menos del efecto que pueda tener en la concentración de lípidos totales y el metabolismo de las células.

# 8. CONCLUSIONES

Se encontró un potencial biotecnológico en las tres especies evaluadas, provenientes de la bahía de La Paz, Baja California Sur, México, de las cuales destaca la microalga *Schizochytrium sp.,* debido a su capacidad autótrofa, heterótrofa y mixtrófica. Ésta microalga fue la que obtuvo mayor variación en el incremento de lípidos bajo los distintos experimentos aplicados, mostró incrementos considerables en el período de almacenamiento (4°C) en ausencia de luz (incrementó 13%), así como en el experimento de la adición de melaza como fuente de carbono, implícito también en el incremento de biomasa en ésta misma evaluación. Además el experimento con un fotoperíodo de corto tiempo (2h/ día) tuvo un efecto positivo en el incremento de lípidos para *Schzochytrium sp*. También se encontró para esta especie que las temperaturas bajas le favorecen, tanto en crecimiento, así como en la productividad de lípidos (temperaturas inferiores a 31 °C), en donde crece muy bien en otoño e invierno, logrando en invierno obtener una mayor productividad de biomasa y de lípidos comparada con la estación de otoño.

*Schizochytrium sp.* muestra un gran potencial para la utilización en sistemas de biofloc, cultivos mixtróficos, con bacterias, hongos y levaduras, todo esto la hace atractiva a las necesidades actuales, ya que se buscan especies resistentes, que puedan lograr un objetivo bajo distintos ambientes y mediante diferentes mecanismos celulares-metabólicos, con la finalidad de tener un beneficio y un aporte en la interacción con otras especies.

Así mismo las diatomeas evaluadas: *Grammatophora sp. y Navicula sp*. mostraron un efecto positivo en el incremento de lípidos con el uso de floculantes químicos aplicados como métodos de cosecha, donde *Grammatophora sp*. logró un considerable incremento con la adición de sulfato ferroso (incremento del 6%), *Navicula sp.* con ambos floculantes aplicados (sulfato ferroso e hidroxido de sodio) logró aumentos del 2% de lípidos totales. Además, el experimento más favorecedor para estas especies fue durante el almacenamiento en refrigeración en ausencia de luz, teniendo un incremento significativo de los porcentajes de lípidos totales.

Las dos diatomeas evaluadas mostraron ser muy resistentes a las condiciones ambientales en el exterior, de las cuales *Navicula sp*. sobrevivió a las condiciones de verano, temperaturas arriba de los 42 °C, llegando al tope de 47 °C que fue la temperatura máxima registrada, a la cual ya había una gran cantidad de células muertas en el ultimo día de cultivo. Por tal razón ésta microalga presenta grandes cualidades para utilizarse en la bioremediación de aguas residuales o en diferentes condiciones desfavorables. Además es una microalga que tiene la capacidad de producir grandes cantidades de biomasa durante todo el año, al igual que *Grammatophora sp*., las cuales superan en producción de biomasa a la microalga *Schizochytrium sp*., así mismo ambas diatomeas contienen una buena cantidad de lípidos.

En la actualidad se busca minimizar costos de producción en laboratorios, sin duda alguna *Navicula sp*. muestra un gran potencial para cultivos al exterior, bajo casi cualquier condición extrema, incluidas *Grammatophora sp y Schizochytrium sp*., aunque con consideraciones en los cultivos en verano o en ambientes donde se superan los 38 °C. *Schizochytrium sp. y Grammatophora sp. en verano* deben cultivarse en volúmenes superiores a 450 L, ya que volúmenes de esta capacidad o inferiores se calientan demasiado, más si las tapas o cubiertas de estos son herméticas, que fue el caso de ésta evaluación, donde se quiso llevar a esas condiciones para ver la respuesta de las microalgas a nivel lipídico. Otra opción para cultivos en el exterior sería colocar protección adicional, como malla sombra, para mitigar el aumento de temperatura en los cultivos en verano, que es donde se alcanzan temperaturas muy altas en la localidad.

La evaluación de estrés mecanico por aireación resultó favorable, aunque en porcentajes no tan destacables.

Se lograron encontrar tratamientos particulares para cada una de las especies evaluadas, tratamientos o métodos sencillos, de los cuales beneficiaron a la acumulación de material lipídico.

Sin duda alguna, la mayoría de las evaluaciones asociadas a la inducción de lípidos con diferentes tratamientos de estrés aplicados varía su efecto de una especie a otra, distintas microalgas muestran diferentes respuestas a nivel bioquímico y metabólico, por lo cual, las herramientas de biología molecular cada

vez cobran mayor relevancia para conocer los cambios metabólicos a un detalle más fino en estas células, bajo diferentes condiciones.

Recomendaría evaluar el efecto de la interacción de las bacterias (tipos de bacterias) sobre la acumulación de lípidos en *Schizochytrium sp*., la cual es una microalga heterótrofa, ya que en esta evaluación se identificó presencia de gran cantidad de bacterias (UFC/mL) en una de las evaluaciones donde se encontró mayor acumulación lipídica, y existe gran cantidad de información la cual vincula un efecto positivo en la inducción de lípidos con un beneficio mutuo de asociaciones de bacterias. Sería interesante evaluar distintas fuentes de carbono para ésta especie, a manera de maximizar cantidades de lípidos de forma autótrofa, heterótrofa, y mixtrofica, que es adonde se direccionan las tendencias de investigación. También recomendaría evaluar más a detalle los tipos de aireación y las variantes que pueden existir en cultivos en volúmenes grandes, ya que hace falta mucha investigación con sustento en esta parte directamente relacionado a la acumulación lipídica. Otras recomendaciones serían: probar más tipos de floculantes, así como diferentes medios de cultivos, ya que en la actualidad estos representan uno de los mayores costos en la producción de microalgas, además se sabe, que la calidad y cantidad de nutrientes en cada medio de cultivo se ven reflejados en la variación de lípidos de las microalgas cultivadas.

# 9. BIBLIOGRAFÍA


1. A. Besson, P. Guiraud. 2013. High-pH-induced flocculation–flotation of the hypersaline microalga *Dunaliella salina*. Bioresour. Technol., 147 (2013), pp. 464-470.
2. A. Converti, A. A. Casazza, E. Y. Ortiz, P. Perego, and M. Del Borghi, 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, vol. 48, no. 6, pp. 1146–1151, 2009.
3. A.I. Barros, A.L. Gonçalves, M. Simões, J.C.M. Pires, 2015. Harvesting techniques applied to microalgae: a review Renew. Sustain. Energy Rev., 41 (2015), pp. 1489-1500.
4. Abedini Najafabadi, H., Pazuki, G., Vossoughi, M., 2015. Experimental study and thermodynamic modeling for purification of extracted algal lipids using an
5. Alabi A. O., Tampier M., Bibeau E. *Current Technology, Suitability and Barriers to Implementation. Final Report*. The British Columbia Innovation Council. Seed Science Press; 2009. Microalgae technologies and processes for biofuels/bioenergy production in British Columbia.
6. Badger MR, Spalding MH. Photosynthesis Physiology and Metabolism. Switzerland Springer. 2000, Pp.369 –397.
7. Bar-Even A, Noor E, Lewis NE, Milo R. Design and analysis of synthetic carbon fixation pathways. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. 2010; 107: 8889 – 8894.
8. Bashan LE, Bashan Y. Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. Bioresour Technol. 2010; 101: 1611–27.
9. Basic Practical Microbiology A Manual by Society for General Microbiology (SGM),2006.http://microbiologyonline.org/file/7926d7789d8a2f7b2075109f68c3175e.pdf , Revisado el 07 de agosto de 2017.
10. Benemann JR, 1992. Microalgae aquaculture feeds. J Appl Phycol 4: 233–245.

11. Bhatnagar A, Chinnasamy S, Singh M, Das KC. Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. Appl Energy. 2011; 88: 3425–31. 11.
12. Bhatnagar, A., Chinnasamy, S., Singh, M., Das, K.C. 2011. Renewable biomass Bioresour Technol. 2011; 97: 841–6. 5.
13. Bligh, E.G. & W.J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol., 37: 911-917.
14. Bligh, E.G., Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol, 37(8), 911-7.
15. Borges, Lucelia, Morón-Villarreyes, Joaquin A., Montes D'Oca, Marcelo G., Abreu, Paulo Cesar, 2011. Effects of flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae Nannochloropsis oculata and Thalassiosira weissflogii. Biomass and Bioenergy 35 (10), 4449–4454. http://dx.doi.org/ 10.1016/j.biombioe.2011.09.003.
16. Borowitzka MA (1997) Microalgae for aquaculture: opportunities and constraints. J Appl Phycol 9:393–401.
17. Brennan L, Owende P. Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and coproducts. Renew Sustain Energy Rev. 2010; 14:557–77. 4.
18. Breuer, G., Lamers, P.P., Martens, D.E., Draaisma, R.B., Wijffels, R.H. 2012. The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. Bioresource Technology, 124(0), 217-226.
19. C. Yeesang and B. Cheirsilp, "Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand," Bioresource Technology, vol. 102, no. 3, pp. 3034– 3040, 2011.
20. Carrieri D, Ananyev G, Brown T, Dismukes GC. In vivo bicarbonate requirement for water oxidation by photosystem ii in the hypercarbonate-requiring cyanobacterium Arthrospira maxima. Journal of Inorganic biochemistry. 2007; 101:1865-1874.
21. Chao Ma, Hanquan Wen, Defeng Xing, Xuanyuan Pei, Jiani Zhu, Nanqi Ren and Bingfeng Liu, 2017, Molasses wastewater treatment and lipid

production at low temperature conditions by a microalgal mutant Scenedesmus sp. Z-4.

22. Cheirsilp B, Suwannarat W, Niyomdecha R. Mixed culture of oleaginous yeast Rhodotorula glutinis and microalga Chlorella vulgaris for lipid production from industrial wastes and its use as biodiesel feedstock. New Biotechnol 2011; 28: 362–8.
23. Chen, G. Q.; Feng, C. Growing phototrophic cells without light. Biotechnol. Lett. 2006,28, 607-616.
24. Chen, J., Y. Wang, J. R. Benemann, X. Zhang, H. Hu y S. Qin (2015), "Microalgal industry in China: challenges and prospects", Journal of Applied Phycology, 28: 715-725.
25. Chiaverina, J. 1972. Techniques d'extraction et analyses des lipids. Université de Paris, Station Zoologique, Villefranche-sur-Mer, Notes de Travail, 12: 12.
26. Chlorella vulgaris and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. Biomass and Bioenergy, 35(5), 2245-2253.
27. Cho D-H, Ramanan R, Heo J, Lee J, Kim B-H, Oh H-M, et al., 2015. Enhancing microalgal biomass productivity by engineering a microalgal–bacterial community. Bioresour Technol 2015; 175:578–85.
28. Converti, A. A. Casazza, E. Y. Ortiz, P. Perego, and M. Del Borghi, 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, vol. 48, no. 6, pp. 1146–1151, 2009.
29. Cooper, M.B.; Smith, A.G. Exploring mutualistic interactions between microalgae and bacteria in the omics age. Curr. Opin. Plant Biol. 2015, 26, 147–153.
30. D. Duanmu, C. Bachy, S. Sudek, C.H. Wong, V. Jiménez, N.C. Rockwell, S. S.Martin, C.Y. Ngan, E.N. Reistetter, M.J. van Baren, D.C. Price, C.-L. Wei, A. Reyes Prieto, J.C.Lagarias, A.Z. Worden. Marine algae and land plants share conserved phytochrome signaling systems**.**
31. D. Vandamme, I. Foubert, I. Fraeye, B. Meesschaert, K. Muylaert, Flocculation of *Chlorella vulgaris* induced by high pH: role of magnesium

and calcium and practical implications. Bioresour. Technol., 105 (2012), pp. 114-119.

32. D. Vandamme, P.I. Pohl, A. Beuckels, I. Foubert, P.V. Brady, J.C. Hewson, K.Muylaert, Alkaline flocculation of Phaeodactylum tricornutum induced by brucite and calcite Bioresour. Technol., 196 (2015), pp. 656-661.
33. Darley WM, Porter D y MS Fuller. 1973. Cell wall composition andsynthesis via Golgi-directed scale formation in the marine eukaryote, Schizochytrium aggregatum, with a note on Thraustochytrium sp. Arch Mikrobiol 90, 89-106.
34. De los Santos-Noyola, 2016. Tesis de Licenciatura: Caracterización parcial del cultivo de cuatro cepas de microalgas y de una cianobacteria aisladas en Baja California Sur, México.
35. Dentel, Steven K., Gossett, James M., 1982. Effect of chemical coagulation on anaerobic digestibility of organic materials. Water Research 16 (5), 707–718. http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354(82)90095-1.
36. Devi MP, Venkata SG, Venkata MS. Heterotrophic cultivation of mixed microalgae for lipid accumulation and wastewater treatment during sequential growth and starvation phases: effect of nutrient supplementation. Renew Energ. 2012; 43: 276–83.
37. Do Nascimento M, Dublan Mde L, Ortiz-Marquez JC, Curatti L. High lipid productivity of an Ankistrodesmus – Rhizobium artificial consortium. Bioresour Technol 2013; 146: 400–7.
38. Doebbe, A.; Rupprecht, J.; Beckmann, J.; Mussgnug, J. H.; Hallmann, A.; Hankamer, B.; 5 Kruse, O. Functional integration of the HUP1 hexose symporter gene into the genome of C. reinhardtii: impacts on biological H2 production. J Biotechnol. J. Biotechnol. 2007, 131, 27-33.
39. F. Garcia Camacho *, A. Contreras Go´mez, T. Mazzuca Sobczuk, E. Molina Grima. 2000. Effects of mechanical and hydrodynamic stress in agitated, sparged cultures of Porphyridium cruentum.
40. F. Alkayal, R.L. Albion, R.L. Tillett, L.T. Hathwaik, M.S. Lemos, J.C. Cushm an.2010 Expressed sequence tag (EST) profiling in hyper saline shocked *Dunaliella salina* reveals high expression of protein synthetic

apparatus components. Plant Sci., 179 (2010), pp. 437-449, 10.1016/j.plantsci.2010.07.001.

41. G. Breuer, P. P. Lamers, D. E. Martens, R. B. Draaisma, and R. H. Wijffels, “Effect of light intensity, pH, and temperature on triacylglycerol (TAG) accumulation induced by nitrogen starvation in Scenedesmus obliquus,” Bioresource Technology, vol.143, pp.1–9, 2013.
42. G. O. James, C. H. Hocart, W. Hillier, G. D. Price, and M. A. Djordjevic, “Temperature modulation of fatty acid profiles for biofuel production in nitrogen deprived Chlamydomonas reinhardtii,” BioresourceTechnology, vol.127, pp.441 – 447, 2013.
43. G.Sibi, V.Shetty, and K. Mokashi, “Enhanced lipid productivity approaches in microalgae as an alternate for fossil fuels—a review,” Journal of the Energy Institute, vol. 89, no. 3, pp. 330– 334, 2016.
44. G.Sibi, V. Shetty, and K.Mokashi,“Enhanced lipid productivity approaches in microalgae as an alternate for fossil fuels—a review,” Journal of the Energy Institute, vol. 89, no. 3, pp. 330– 334, 2016.
45. Gao CF, Wang Y, Shen Y, Yan D, He X, Dai JB. Oil accumulation mechanisms of the oleaginous microalga Chlorella protothecoides revealed through its genome, transcriptomes, and proteomes. BMC Genom. 2014; 15: 1–14.
46. Garcia-Camacho, F., Contreras-Gomez, A., & Mazzuca-Sobczuk, T., et al. (2000). Effects of mechanical and hydrodynamic stress in agitated, sparged cultures of Porphyridium cruentum. Process Biochemistry, 35, 1045-1050.
47. Gardner R, Peters P, Peyton B, Cooksey K (2011) Medium pH and nitrate concentration effects on accumulation of triacylglycerol in two members of the Chlorophyta. J Appl Phycol 26:1005– 1016.
48. Goecke, F.; Thiel, V.; Wiese, J.; Labes, A.; Imhoff, J.F. Algae as an important environment for bacteria-phylogenetic relationships among new bacterial species isolated from algae. Phycologia 2013, 52, 14–24.
49. Haiying Wang, Ru Fu, and Guofeng Pei, 2012. A study on lipid production of the mixotrophic microalgae Phaeodactylum tricornutum on various carbon sources.
50. Hakim A R. 2012. The potencial of heterotrophic microalgae (Schizochytrium sp.) as a source of DHA. Squalen vol 7 (1). 29-38.

51. Halim R, Danquah MK, Webley PA. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: a review. Biotechnol Adv. 2012; 30: 709–32. 3.
52. Hamed Abedini- Najafabadia, Mohammad Malekzadeha, Farhad Jaliliana, Manouchehr Vossoughi, Gholamreza Pazuki. 2014. Effect of various carbon sources on biomass and lipid production of Chlorella vulgaris during nutrient sufficient and nitrogen starvation conditions.
53. Hemaiswarya S, Raja R, Kumar RR, Ganesan V, Anbazhagan C, 2011. Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture. World J Microbiol Biotechnol 27:1737–1746.
54. Hemalatha M, Mohan SV. Microalgae cultivation as tertiary unit operation for treatment of pharmaceutical wastewater associated with lipid production. Bioresour Technol. 2016; 215: 117–22. 8.
55. Heredia-Arroyo, T., Wei, W., Ruan, R., Hu, B. 2011. Mixotrophic cultivation.
56. Hernández, E. Olguín, E.J. 2002. Biosorption of heavy metals influenced by the chemical composition of Spirulina biomass. Environ Technol 23:1369-1377.
57. Hernández-Castro, 2014. Tesis de licenciatura: Interacción mixtrófica de microalgas marinas y bacterias probioticas con enfoque a la formación de bioflocs para acuicultura.
58. Ho, S.-H., Chen, C.-Y., Chang, J.-S. 2012. Effect of light intensity and nitrogen.
59. Hoys C. 2012. El uso de microalgas en la acuicultura aumenta la calidad de los peces: De la piscifactoría a la mesa. Centro de investigaciones científicas isla de la cartuja. Reportaje de la semana nacional de la Ciencia y la Tecnología.
60. https://www.eoas.ubc.ca/research/phytoplankton/diatoms/pennate/navicula/navicula_spp.html. Revisado el 23 de Febrero de 2018.
61. 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.
62. J. Cao, H. Yuan, B. Li, and J. Yang, “Significance evaluation of the effects of environmental factors on the lipid accumulation of Chlorella minutissima UTEX 2341 under low-nutrition heterotrophic condition,”Bioresource Technology, vol.152, pp.177– 184, 2014.

63. J. Wu, J. Liu, L. Lin, C. Zhang, A. Li, Y. Zhu, Y. Zhang, Evaluation of several flocculants for flocculating microalgae.Bioresour. Technol., 197 (2015), pp. 495-501.
64. Jacob-Lopes E, Franco TT. Microalgae-based Systems for Carbon dioxide Sequestration and Industrial Biorefineries, in Momba M and Bux F ed. biomass. www.sciyo.com . ISBN ----, Croatia Intechopen .2010, pp. 202 .
65. Jiang, L., Luo, S., Fan, X., Yang, Z. and Guo, R. 2011. Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO2. Applied Energy 88: 3336-3341.
66. Juan M. Pacheco-Vega, Felipe Ascencio, Marco A. Cadena-Roa, Carlos Rangel-Dávalos, y Maurilia Rojas-Contreras, 2015. Assessment of endemic microalgae as potential food for Artemia franciscana culture.
67. Kamlangdee N y KW Fan. 2003. Polyunsaturated fatty acids production by Schizochytrium sp. Isolated from mangrove. J. Sci.Tech. 25: 643–650.
68. Karube I, Takeuchi T., Barnes DJ. Biotechnological reduction of CO2 emmision. advances in biochemical Engineering/Biotechnology. 1992; 46: 63 –79.
69. Kayuri Mokashi - 2016, Sodium Bicarbonate as inorganic Carbon source for higher biomass and lipid production integrated Carbón capture in Chlorella vulgaris.
70. Kayuri Mokashi - 2016, Sodium Bicarbonate as inorganic Carbon source for higher biomass and lipid production integrated Carbón capture in Chlorella vulgaris.
71. Kellam SJ, Cannell RJ, Owsianka AM y J M Warker. 1988. Result of a large scale screening programme to detect antifungical activity from marine and freshwater microalgae in laboratory culture. British Phycological Journal 23: 45-47.
72. Kim, B.H.; Ramanan, R.; Cho, D.H.; Oh, H.M.; Kim, H.S. Role of Rhizobium, a plant growth promoting bacterium, in enhancing algal biomass through mutualistic interaction. Biomass Bioenerg. 2014, 69, 95–105.
73. Klok, A.J., Lamers, P.P., Martens, D.E., Draaisma, R.B., Wijffels, R.H. 2014. Edible oils from microalgae: insights in TAG accumulation. Trends in Biotechnology, 32(10), 521-528.

74. L. - D. Zhu and E.Hiltunen,“Methylation of DACT2 accelerates esophageal cancer development by activating Wnt signaling,” Renewable and Sustainable Energy Reviews, vol. 54, pp. 1285 – 1290, 2016.
75. L. D. Zhu, J. Takala, E. Hiltunen, and Z. M. Wang, “Recycling harvest water to cultivate Chlorella zofingiensis under nutrient limitation for biodiesel production,” Bioresource Technology, vol.144, pp.14–20,2013.
76. L. Wei, X. Huang, and Z. Huang, “Temperature effects on lipid properties of microalgae *Tetraselmis subcordiformis* and *Nannochloropsis oculata* as biofuel resources,” Chinese Journal of Oceanology and Limnology, vol.33, no.1, pp.99 –106, 2015.
77. L. Zhu, “Microalgal culture strategies for biofuel production: a review,” Biofuels, Bioproducts and Biorefining, vol. 9, no. 6, pp. 801–814, 2015.
78. L.Xin, H.Hong-ying, and Z.Yu ping, “Growth and lipid accumulation properties of a fresh wáter microalga Scenedesmussp. under different cultivation temperature,” Bioresource Technology, vol.102, no.3, pp.3098–3102,2011.
79. Laws EA, Terry KL, Wickman J, Chalup MS. A simple algal production system designed to utilize the flashing light effect. Biotechnology and Bioengineering. 2004; 25(10): 2319 –2335.
80. Le Chevanton M, Garnier M, Bougaran G, Schreiber N, Lukomska E, Bérard JB, et al. Screening and selection of growth-promoting bacteria for Dunaliella cultures. Algal Res 2013; 2:212–22.
81. Le L, He H, Yang C, Shan W, Zeng G, Wu M. Nutrient removal and lipid production by Coelastrella sp. in anaerobically and aerobically treated swine wastewater. Bioresour Technol. 2016; 216: 135–41. 7.
82. Li, Y., Han, D., Sommerfeld, M., Hu, Q. 2011. Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalga Pseudochlorococcum sp. (Chlorophyceae) under nitrogen-limited conditions. Bioresour Technol, 102(1), 123-9.
83. Liu, J. et al. Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic Chlorella zofingiensis: Assessment of algal oils for biodiesel production. Bioresour. Technol. 102, 106–110 (2011).
84. Lucas-Salas, L.M., Castrillo, M., Martínez, D. 2013. Effects of dilution rate and water reuse on biomass and lipid production of Scenedesmus obliquus

in a two-stage novel photobioreactor. Bioresource Technology, 143(0), 344-352.

85. Lucelia Borges, Sergiane Caldas, Marcelo G.Montes D'Oca, Paulo Cesar Abreu, 2016. Effect of harvesting processes on the lipid yield and fatty acid profile of the marine microalga *Nannochloropsis oculata.* Aquaculture Reports Volume 4, November 2016, Pages 164-168.
86. Luz. E de-Bachan & Yoav Bachan, 2003. Microalgae growth-promothing bacteria: A novel approach in wastewarer treatment.
87. M. Vitova, K. Bisova, S. Kawano, and V. Zachleder, "Accumulation of energy reserves in algae: from cell cycles to biotechnological applications,"Biotechnology Advances, vol.33, no.6, pp. 1204–1218, 2015.
88. MALONE TC & HW DUCKLOW (1990) Microbial biomass in the coasts plume of Chesapeake Bay: Phytoplankton-bacterioplankton relationship. Limnology and Oceanography 35: 296-312.
89. Maribel M. Loera-Quezada y Eugenia J. Olguín, 2010. Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel: Retos y oportunidades. Rev. Latinoamericana de Biotecnologia Amb Algal 1(1):91-116.
90. Maruyama A, Maeda M y U Simidu. 1989. Microbial production of auxin indole3-acetic acid in marine sediments. Marine Ecology Progress Series, 58: 69-75.
91. Miao X, Wu Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil.
92. Mitra, D., VAN Leeuwen, J. and Lamsal, B. 2012. Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous Chlorella vulgaris on industrial co-products. Algal Research 1: 40-48.
93. Mostafa El-Sheekh, Abd El-Fatah Abomohra, Dieter Hanelt, 2012, Optimization of biomass and fatty acid productivity of Scenedesmus obliquus as a promising microalga for biodiesel production
94. Mostafa M. El-Sheekh, Mohamed Y. Bedaiwy, Mohamed E. Osman, Mona M. Ismail, 2014, Influence of Molasses on Growth, Biochemical Composition and Ethanol Production of the Green Algae Chlorella Vulgaris and *Scenedesmus Obliquus*.
95. Mujtaba, G., Choi, W., Lee, C.-G., Lee, K. 2012. Lipid production by Chlorella

96. Muñoz, R. Guieysse, B. 2006. Algal-bacteria processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. Water Res 40:27992815.
97. N. Uduman, Y. Qi, M.K. Danquah, G.M. Forde, A. HoadleyDewatering of microalgal cultures: a major bottleneck to algae-based fuels J. Renew. Sustain. Energy, 2 (1) (2010), pp. 01-15.
98. Natrah FM, Bossier P, Sorgeloos P, Yusoff FM y T Defoirdt. 2013. Significance of microalgal–bacterial interactions for aquaculture. Reviews in Aquaculture. 1-14.
99. Natrah, F.M.I.; Kenmegne, M.M.; Wiyoto, W.; Sorgeloos, P.; Bossier, P.; Defoirdt, T. Effects of microalgae commonly used in aquaculture on acyl-homoserine lactone quorum sensing. Aquaculture 2011, 317, 53–57.
100. Naviner MJ, Bergé P, Durand P y HL Bris. 1999. Antibacterial activity of marine diatom *Skeletonema costatum* against aquacultural pathogens. Aquaculture 174: 15-24.
101. O. Sorokina, F. Corellou, D. Dauvillée, A. Sorokin, I. Goryanin, S. Bal l, F.-Y. Bouget, A.J. Millar, Microarray data can predict diurnal changes of starch content in the picoalga *Ostreococcus.* BMC Syst. Biol., 5 (2011), p. 36, 10.1186/1752-0509-5-36
102. Olguin EJ. Dual purpose microalgae-bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a biorefinery. Biotech Adv 2012; 30: 1031 – 46.
103. Olguín, E.J. 2003. Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes. Biotechnol Adv 22(1-2):81-91.
104. Ono E, Cuello JL. Mini Review Selection of Optimal Microalgae Species for CO Sequestration. USA Department of Agricultural and Biosystem Engineering. 2009.
105. organic/aqueous two-phase system. RSC Advances, 5(2), 1153-1160.
106. Otto Pulz, Wolfgang Gross. Valuable products from biotechnology of microalgae. applied Microbiology and biotechnology. 2004; 65(6):635 –648.
107. P. Bondioli, Della, L. Bella. 2005. An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. Eur. J. Lipid Sci. Technol., 107 (2005), pp. 153-157, 10.1002/ejlt.200401054

*108. Park J, R Craggs & A Shilton. 2011. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. Bioresource Technology 102: 35 - 42.*

109. Philippot, L.; Raaijmakers, J.M.; Lemanceau, P.; Van der Putten, W.H. Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere. Nat. Rev. Microbiol. 2013, 11, 789–799.

110. PriyadarshaniI, RathB, (2012). Commercial and industrial application sof microalgae—a review. J Algal Biomass Utln 3:89–100. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2014 (2014), p. 16751, 10.1073/pnas.1416751111

111. Q. Y., Yin, S., Sheng, G. and Fu, J. 1994. New discoveries in study on hydrocarbons from thermal degradation of heterotrophically yellowing algae. Science in China Series B: Chemistry 37: 326–335

112. Quilodrán B. 2010. Utilización de residuos industriales líquidos por microorganismos de la familia thraustochytriaceae para la producción de ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6 n-3). Universidad de la Frontera. Facultad de Ingeniería, Ciencias y Administración. Tesis para optar al grado académico de doctor en ciencias de recursos naturales. Temuco, Chile. 138.

113. Ramanan, R.; Kang, Z.; Kim, B.H.; Cho, D.H.; Jin, L.; Oh, H.M.; Kim, H.S. Phycosphere bacterial diversity in green algae reveals an apparent similarity across habitats. Algal Res. 2015, 8, 140–144.

114. Ramanan, R.; Kim, B.H.; Cho, D.H.; Oh, H.M.; Kim, H.S. Algae-bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications. Biotechnol. Adv. 2016, 34, 14–29.

115. Ratanaporn Leesing & Supaporn Kookkhunthod, 2011. International Conference on Food Engineering and Biotechnology IPCBEE vol.9 (2011). IACSIT Press, Singapoore. Heterotrophic Growth of Chlorella sp. KKU-S2 for Lipid Production using Molasses as a Carbon Substrate

116. Rivas, M.O.; Vargas, P.; Riquelme, C.E. Interactions of Botryococcus braunii cultures with bacterial biofilms. Microb. Ecol. 2010, 60, 628–635.

117. Rodrigo Fernandes Castanha, Adriano Pinto Mariano, Lilia Aparecida Salgado de Morais , Shirlei Scramin, Regina Teresa Rosim Monteiro, 2012, Optimization of lipids production by Cryptococcus laurentii 11 using cheese whey with molasses

118. S. K. Mandotra, P. Kumar, M. R. Suseela, S. Nayaka, and P. W. Ramteke, “Evaluation of fatty acid profile and biodiesel properties of microalga Scenedesmus abundans under the influence of phosphorus, pH and light intensities,” Bioresource Technology, vol.201, pp.222–229, 2016.

119. S. Wahidin, A. Idris, S.R.M. Shaleh.The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. Bioresour. Technol., 129 (2013), pp. 7-11, 10.1016/j.biortech.2012.11.032

120. Sasireka.G and Muthuvelayudham R, 2015. Effect of Salinity and Iron Stressed on Growth and Lipid Accumulation In Skeletonema costatum for Biodiesel Production. Bioprocess Laboratory, Department of Chemical Engineering, Annamalai University, Annamalai nagar, TN-608 002, INDIA.

121. Scott SA, Davey MP, Dennis JS, Horst I, Howe CJ, Lea-Smith DJ. Biodiesel from algae: challenges and prospects. Curr Opin Biotech. 2010; 21: 277– 86. 6.

122. Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., Roessler, P., 1998. A Look Back at the US Department of Energy’s Aquatic Species Program-Biodiesel from Algae. NREL/TP-580 24190, National Renewable Energy Laboratory.

123. Srinivasa Reddy Ronda; Chandra Sekhar Bokka; Chandrika Ketineni; Binod Rijal; Prasada Rao Allu, 2012. Aeration effect on *Spirulina platensis* growth and γ-linolenic acid production starvation on CO2 fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga Scenedesmus obliquus CNW-N. Bioresource Technology, 113(0), 244-252.

124. Subashchandrabose, S.R.; Ramakrishnan, B.; Megharaj, M.; Venkateswarlu, K.; Naidu, R. Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: Biotechnological potential. Biotechnol. Adv. 2011, 29, 896–907.

125. Sun, X., Cao, Y., Xu, H., Liu, Y., Sun, J., Qiao, D., Cao, Y. 2014. Effect of nitrogen starvation, light intensity and iron on triacylglyceride/carbohydrate production and fatty acid profile of Neochloris oleoabundans HK-129 by a two-stage process. Bioresource Technology, 155(0), 204-212.

126. SUNDH I (1992) Biochemical composition of dissolved organic carbon derived from phytoplankton and used by hetrotrophic bacteria. Applied and Environmental Microbiology 58: 2938-2947.

127. T. Matsuo, M. Ishiura*Chlamydomonas reinhardtii* as a new model system for studying the molecular basis of the circadian clock. FEBS Lett., 585 (2011), pp. 1495-1502, 10.1016/j.febslet.2011.02.025

128. Tang, H., Abunasser, N., Garcia, M. E. D., Chen, M., Simon NG, K. Y. and Salley, S. O. 2011. Potential of microalgae oil from Dunaliella tertiolecta as a feedstock for biodiesel. Applied Energy 88: 33243330.

129. Tianpeng Chen, Jin Liu, Bingbing Guo, Xiaonian Ma, Peipei Sun, Bin Liu & Feng Chen, 2015. Light attenuates lipid accumulation while enhancing cell proliferation and starch synthesis in the glucose-fed oleaginous microalga Chlorella zofingiensis.

130. Tuchman, N. C.; Schollett, M. A.; Rier, S. T.; Geddes, P. Differential heterotrophic utilization of organic compounds by diatoms and bacteria under light and dark conditions. Hydrobiologia 2006, 561, 167-177.

131. Venkata MS, Rohit MV, Chiranjeevi P, Chandra R, Navaneeth B. Heterotrophic microalgae cultivation to synergize biodiesel production with waste remediation: progress and perspective. Bioresour Technol. 2015; 184:169–78. 10.

132. vulgaris after a shift from nutrient-rich to nitrogen starvation conditions. Bioresource Technology, 123(0), 279-283.

133. Wang, H.; Hill, R.T.; Zheng, T.; Hu, X.; Wang, B. Effects of bacterial communities on biofuel producing microalgae: Stimulation, inhibition and harvesting. Crit. Rev. Biotechnol. 2015, 36.

134. Wang, N.S., Yang, J.D., Calabrese, R.V., & Chang, K.C.(1994). Unified modeling framework of cell death due to bubbles in agitated and sparged bioreactors. Journal of Biotechnology, 33, 107-1022. wastewaters. Applied Energy, 88(10), 3425-3431.

135. Wu, S. et al. Enzyme activity highlights the importance of the oxidative pentose phosphate pathway in lipid accumulation and growth of Phaeodactylum tricornutum under CO2 concentration. Biotechnol. Biofuels 8, 78 (2015).

136. X.Sun, Y.Cao, H.Xuetal., “Effect of nitrogen-starvation, light intensity and iron on triacyl glyceride /carbohydrate production and fatty acid profile of Neochloris oleoabundans HK-129 by a two-stage process,” Bioresource Technology, vol. 155, pp. 204– 212, 2014.

137. Xu, H., Miao, X. L. and Wu, Q. Y. 2006. High quality biodiesel production from a microalga Chlorella protothecoides by heterotrophic growth in fermenters. Journal of Biotechnology 126: 499-507.

138. Y. Li, F. Han, H. Xu et al., “Potential lipid accumulation and growth characteristic of the green alga Chlorella with combination cultivation mode of nitrogen (N) and phosphorus (P),”BioresourceTechnology, vol.174, pp.24 – 32, 2014.

139. Y. Chisti. Biodiesel from microalgae Biomass, 25 (2007), pp. 294-306.

140. Z. Wu, Y. Zhu, W. Huang, C. Zhang, T. Li, Y. Zhang, A. Li. Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated médium. Bioresour. Technol., 110 (2012), pp. 496-502.

141. Zhao X, Zhou Y, Huang S, Qiu D, Schideman L, Chai X, et al. Characterization of microalgae-bacteria consortium cultured in landfill leachate for carbon fixation and lipid production. Bioresour Technol 2014; 156: 332.

142. Zhu X-G, Long SP, Ort DR. Towards more efficient crop photosynthesis. annual Reviews of Plant biology. 2010; 61: 235 –261.

143. Zumaya-Higuera, 2013. Tesis de licenciatura: Aislamiento e identificación de microalgas con potencial acuícola.