

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE  
CHIAPAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN EN  
ENERGÍAS RENOVABLES

TESIS

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y  
CARACTERIZACIÓN DE MICROALGAS  
PROVENIENTES DE ÁREAS  
HIDROGRÁFICAS DE CHIAPAS COMO  
MATERIA PRIMA PARA LA  
PRODUCCIÓN DE BIODIESEL

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR

EN MATERIALES Y SISTEMAS  
ENERGÉTICOS RENOVABLES

PRESENTA

YAZMIN SÁNCHEZ ROQUE

DIRECTORES

DR. JOEL MOREIRA ACOSTA  
DRA. YOLANDA DEL CARMEN PÉREZ LUNA

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Febrero 2020





# UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

## DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas a 07 de febrero de 2020  
Oficio No. DGIP/0131/2020

Asunto: Autorización de impresión de tesis

**C. Yasmin Sánchez Roque**  
**Candidata al Grado de Doctora en Materiales**  
**y Sistemas Energéticos Renovables UNICACH**  
**Presente**

Con fundamento en la **opinión favorable** emitida por escrito por la Comisión Revisora que analizó el trabajo terminal presentado por usted, denominado "**Aislamiento, identificación y caracterización de microalgas provenientes de áreas hidrográficas de Chiapas como materia prima para la producción de biodiesel**", mismo que cumple con los criterios metodológicos y de contenido, esta Dirección a mi cargo **autoriza** la impresión del documento en cita, para la defensa oral del mismo, en el examen que habrá de sustentar para obtener el **Grado de Doctora en Materiales y Sistemas Energéticos Renovables**.

Es imprescindible observar las características normativas que debe guardar el documento impreso, así como realizar la entrega en esta Dirección de un ejemplar empastado.

Respetuosamente  
"Por la Cultura de mi Raza"



DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN  
Y POSGRADO

**Dr. Ricardo David Estrada Soto**  
**Director General**

C.c.p. Lic. Aurora E. Serrano Roblero. Secretaria Académica UNICACH. - Para su conocimiento  
Dr. Pascual López de Paz. Director del IIIER UNICACH. - Para su conocimiento  
Dr. Carlos Alonso Meza Avendaño. Coordinador del DMySER IIIER UNICACH. - Para su conocimiento.  
Expediente  
\*RDES/rags



Libramiento Norte Poniente No. 1150, Colonia Lajas Maciel  
CP 29039, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas  
Tel: (961)6170440 Ext. 4360  
investigacionyposgrado@unicach.mx

## AGRADECIMIENTOS

A lo largo de nuestras vidas cumplimos metas y retos que elegimos para ser mejores profesionistas y personas, que además enriquecen nuestro camino con una serie de momentos alegres y tristes pero todos de aprendizaje. Desde el enojo de no obtener lo esperado en un experimento, hasta el logro más grande al recibir aquel correo de aceptación del artículo científico fruto del esfuerzo y la dedicación. Sin olvidar aquellas personas que han sido pieza fundamental en mi formación profesional, una de ellas la Dra. Yolanda del Carmen Pérez Luna que además de ser mi inspiración se convirtió en mi amiga y gran apoyo para que este trabajo de investigación fuese hoy una realidad, que con su experiencia y gran personalidad me indujo por el mejor camino para alcanzar el éxito, agradezco también al Dr. Joel Moreira Acosta y al Dr. Néin Farrera que sin su dirección y apoyo este proyecto hoy no sería una realidad. Agradezco infinitamente el respaldo de toda mi familia por apoyar cada una de mis decisiones que sin los buenos consejos de mi madre Concepción Roque Reyes y las enseñanzas de mi padre Marco Antonio Sánchez Espinosa no me hubiesen permitido terminar con entereza este proyecto de investigación que sin duda alguna define mi formación científica y profesional, como olvidar a mi mejor amigo Maestro Roberto Berrones Hernández que sin esos cafés por las mañanas, sus consejos y su gran apoyo, esta tesis no se habría terminado.

*“La ciencia es como aquel árbol con sus raíces amargas pero....  
con los frutos más dulces”*

## INDICE

INTRODUCCIÓN.....	10
<b>CAPÍTULO I</b> .....	13
1. LAS MICROALGAS.....	14
2. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS MICROALGAS.....	15
3. METABOLISMO DE LAS MICROALGAS.....	16
3.1 Red metabólica de carbono y nitrógeno.....	16
3.3 Síntesis de lípidos.....	18
3.5 Síntesis de proteínas.....	19
4. CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE LAS MICROALGAS.....	20
5. IMPORTANCIA DE LA TEMPERATURA Y LA LUZ DURANTE LA NOCHE.....	21
6. REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES.....	22
6.1 Micronutrientes.....	22
7. CLASIFICACIÓN DE MICROALGAS.....	23
<b>CAPÍTULO II</b> .....	26
1. BIOMASA MICROALGAL.....	27
1.1 Condiciones de crecimientos de las microalgas.....	27
1.1.1 Especies de microalgas.....	28
1.1.2 Condiciones de crecimiento mixotróficas.....	29
1.1.3 Condiciones de crecimiento autotrófica.....	30
1.2 La especie <i>Verrucodesmus verrucosus</i> .....	31
III. ANTECEDENTES.....	32
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	33
V. JUSTIFICACIÓN.....	34
VI. HIPOTESIS.....	35
VII. OBJETIVOS.....	36
VIII. METODOLOGÍA.....	37
3. Aislamiento, purificación e identificación de microalgas.....	37
6. Ensayos de crecimiento.....	39
Medios de cultivo en condición autotrófica.....	39
Medios de cultivo en condición mixotrófica: Preparación del lixiviado.....	40

7.	<b>Análisis bromatológico del lixiviado</b> .....	41
8.	<b>Evaluación de los medios de cultivos</b> .....	41
	<i>Análisis de densidad celular</i> .....	41
	<i>Tratamiento con antibióticos de las cepas de algas</i> .....	42
9.	<b>Análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME)</b> .....	42
12.	<b>Análisis estadístico</b> .....	44
<b>IX.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	45
1.	<b>Toma de muestra</b> .....	45
4.	<b>Especies de microalgas afines a la producción de biodiesel</b> .....	54
5.	<b>Evaluación en condiciones autotróficas</b> .....	56
	<i>Análisis de la densidad celular y parámetros cinéticos de crecimiento</i> .....	56
6.	<b>Caracterización fisicoquímica del lixiviado</b> .....	58
7.	<b>Condición de crecimiento mixotrófico</b> .....	58
	<i>Análisis de la densidad celular y parámetros cinéticos de crecimiento</i> .....	58
8.	<b>Interacción de medios autotróficos y mixotróficos</b> .....	61
	<i>Análisis de la densidad celular y parámetros cinéticos de crecimiento</i> .....	61
9.	<b>Evaluación de la producción de lípidos totales</b> .....	65
10.	<b>Evaluación de la relación lípido-nitrógeno</b> .....	66
	<i>Evaluación de las condiciones de crecimiento de la biomasa microalgal en un fotobiorreactor</i> .....	69
12.	<b>Producción de ácidos grasos de la biomasa microalgal a nivel de producción en un fotobiorreactor para la generación de biodiesel</b> .....	70
<b>X.</b>	<b>CONCLUSIÓN</b> .....	72
<b>XI.</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	73

## INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Perfil de ácidos grasos de *Nannochloropsis oculata* para cada tratamiento (% de ácidos grasos totales). (1) Centrifugación; (2) Centrifugación lavada con H<sub>2</sub>O; (3) Lavado centrífugo con formiato; (4) Floculación con adición de NaOH; (5) Floculación con adición de NaOH y lavado con H<sub>2</sub>O; (6) Floculación con adición de NaOH y lavado con formiato; (7) Floculación con adición de NaOH y neutralización con HCl; (8) Floculación con adición de NaOH, neutralización con HCl y lavado con H<sub>2</sub>O; (9) Floculación con adición de NaOH, neutralización con HCl y lavado con formiato. .... 15
- Figura 2.** Red metabólica central de una microalga, relevantes para la autotrofia: fotofosforilación, ciclo de Calvin, vía de las pentosas fosfato, glucólisis, ciclo de TCA, fosforilación oxidativa. .... 16
- Figura 3.** Adaptación de dFBA tomando el almacenamiento de carbono: A) Visión esquemática del metabolismo de un organismo, en el que los sustratos (S) se convierten, a través de metabolitos intermedios (Puntos verdes y naranjas), en productos (P) o biomasa (X) (Compuesto principalmente de proteínas (Prot), ADN, ARN, membrana, carbohidratos y lípidos (Mbm)); B) Vista esquemática del metabolismo de un organismo después de la aplicación de la QSSA clásica (sin acumulación de Metabolitos intracelulares). Los sustratos (S) son directamente convertidos en productos (P) o biomasa (X); C) Vista esquemática del metabolismo de un organismo, que representa el almacenamiento de carbono. Existen dos tipos de metabolitos intracelulares: 1) los que se supone siguen una QSSA (C, puntos verdes); Y 2) los que se supone actúan como unidades de almacenamiento de carbono (A, puntos naranjas). La biomasa X se divide así en dos grupos: metabolitos A y biomasa funcional B - compuestos principalmente de proteínas (Prot), ADN, ARN, carbohidratos de membrana y lípidos (Mbm); D) Vista esquemática del metabolismo de un organismo después de la aplicación de QSSA, teniendo en cuenta el almacenamiento de carbono. Los sustratos (S) se convierten directamente en productos (P), biomasa funcional (B) o indirectamente convertidos en productos (P), biomasa funcional (B) a través de metabolitos de almacenamiento de carbono (A). .... 17
- Figura 4.** Representación filogenética de las relaciones entre los mayores linajes de las algas verdes con base en análisis de secuencias de ADN. .... 23
- Figura 5.** Morfología de *Verrucodesmus verrucosus* (Roll 1925). .... 31
- Figura 6.** Evaluación visual de la eficiencia para el aislamiento en medios de cultivo BG11 (a) y CHU (b) a partir de la producción de biomasa microalgal; el nivel de concentración se observa con el número de asteriscos: \*\*\* Alta concentración; \*\* Concentración media; \* Baja concentración. 47
- Figura 7.** Evaluación de la producción de biomasa de microalgas en medio BG11 y CHU después de un período de 90 días con un fotoperíodo de 12/12 para las diferentes áreas hidrográficas del estado de Chiapas: SR: Río Suchiate; NAR: río Nandayapa; HR: río Huixtla; SWC: Agua de manantial Cahuaré; NR: río Novillero; WC: Aguas residuales "La chacona"; PR: río Pijijiapan; SDR: río Santo Domingo. Las barras son + una desviación estándar. Los valores corresponden al promedio de tres replicas. Los medios seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). .... 48
- Figura 8.** Abundancia relativa de los morfotipos y clases de microalgas identificadas en las diferentes zonas hidrográficas evaluadas en el estado de Chiapas. SR: río Suchiate; NAR: río Nandayapa; HR: río Huixtla; SWC: Agua de manantial Cahuaré; NR: río Novillero; WC: Aguas residuales "La chacona"; PR: río Pijijiapan; SDR: río Santo Domingo. .... 49
- Figura 9.** Las microalgas se identificaron en las diferentes zonas hidrográficas del estado de Chiapas utilizando una FlowCam acoplada a un microscopio (100x). Río Suchiate: a)

*Monoraphidium contortum*; b) *Neosporangiococcum gelatinosum*; c) *Desmodesmus serratus*; Río Nandayapa: d) *Raphidonema nivale*; e) *Nephrocytium lunatum*; Río Huixtla: f) *Superbus Asterococcus*; g) *Chlorococcum echinozygotum*; Agua de manantial Cahuaré: h) *Monoraphidium contortum*; i) *Scenedesmus quadricauda*; j) *Monoraphidium griffi thii*; Río Novillero: k) *Chlorococcum echinozygotum*; l) *Leptolyngbya sp.*; m) *Microspora flocosa*; Aguas residuales "La chacona": n) *Asterococcus superbis*; Río Pijijiapan: ñ) *Chlorococcum echinozygotum*; Río Santo Domingo: o) *Oscillatoria breve*; p) *Monoraphidium contortum*; q) *Chlorococcum echinozygotum*; r) *Desmodesmus serratus*; s) *Closteriopsis acicularis*; t) *Hydrodictyon reticulatum*. ..... 51

**Figura 10.** Evaluación de la producción de biomasa de microalgas en medio BG11 y CHU después de un período de 90 días con un fotoperíodo de 12/12 para las diferentes áreas hidrográficas del estado de Chiapas: SR: Río Suchiate; NAR: río Nandayapa; HR: río Huixtla; SWC: Agua de manantial Cahuaré; NR: río Novillero; WC: Aguas residuales "La chacona"; PR: río Pijijiapan; SDR: río Santo Domingo. Las barras son + una desviación estándar. A significa valores de tres réplicas. Los medios seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes (valor de  $p < 0,05$ ). ..... 51

**Figura 11.** Evaluación de la cinética de crecimiento de *Verrucodesmus verrucosus* (A), Morfotipo T (B) y mezcla de los morfotipos (C) en condiciones de crecimiento autotrófico. Los promedios de tres repeticiones ( $\pm$  error estándar) por cada punto, superíndice común no difieren significativamente a  $P < 0.05$ . ..... 56

**Figura 12.** Evaluación de la cinética de crecimiento de *Verrucodesmus verrucosus* (A), Morfotipo T (B y D) y mezcla de los morfotipos (C y E) en condiciones de crecimiento mixotrófico en lixiviado del biodigestor (LB) y lixiviado de lombricomposta (LL) al 30%; 50% y 80%. Los promedios de tres repeticiones ( $\pm$  error estándar) por cada punto, superíndice común no difieren significativamente a  $P < 0.05$ . ..... 59

**Figura 13.** Evaluación de la cinética de crecimiento de *Verrucodesmus verrucosus* (A), Morfotipo T (T) y la mezcla entre los morfotipos (T+V) en condiciones de crecimiento mixotrófico. GUI: Guillard; SUO: Suoeka; BG: BG11; LIX 30: Lixiviado al 30%; LIX 50: Lixiviado al 50%; LIX 80: Lixiviado al 80%. LB: Lixiviado de biodigestor; LL: Lixiviado de lombricomposta; Los promedios de tres repeticiones ( $\pm$  error estándar) por cada punto, superíndice común no difieren significativamente a  $P < 0.05$ . ..... 63

**Figura 14.** Cuantificación del contenido de lípido en la biomada microalgal de *Verrucodesmus verrucosus* (V), Morfotipo T (T) y la mezcla entre los morfotipos (T+V) en condiciones de crecimiento mixotrófico en lixiviado del biodigestor (LB) y lixiviado de lombricomposta (LL), así como una condición autotrófica. Los promedios ( $\pm$  error estándar) de tres repeticiones por cada columna sin superíndice común difieren significativamente a  $P < 0.05$ . GUI: Guillard; SUO: Suoeka; BG: BG11; LIX 30: Lixiviado al 30%; LIX 50: Lixiviado al 50%; LIX 80: Lixiviado al 80%. ..... 66

**Figura 15.** Evaluación de la relación lípidos-nitrógeno en la biomada microalgal de *V. verrucosus* evaluadas en condiciones mixotrófica: lixiviado del biodigestor (LB) y lixiviado de lombricomposta (LL) así como bajo una condición autotrófica. Los promedios ( $\pm$  error estándar) de tres repeticiones por cada columna sin superíndice común difieren significativamente a  $P < 0.05$ . GUI: Guillard; SUO: Suoeka; BG: BG11; LIX 30: Lixiviado al 30%; LIX 50: Lixiviado al 50%; LIX 80: Lixiviado al 80%. ..... 67

**Figura 16.** Análisis de interacción lípidos-nitrógeno en la biomasa microalgal de *V. verrocusis* evaluadas en condiciones mixotrófica y autotrófica. Los promedios ( $\pm$  error estándar) de tres repeticiones por cada columna sin superíndice común difieren significativamente ( $P < 0.05$ ). GUI: Guillard; SUO: Suoeka; BG: BG11; LIX 30: Lixiviado al 30%; LIX 50: Lixiviado al 50%; LIX 80: Lixiviado al 80%. ..... 67

**Figura 17.** Diseño de un fotobiorreactor ..... 68  
**Figura 18.** Evaluación de la cinética de crecimiento de *V. Verrucosus* en condiciones de crecimiento autotrófico en un fotobiorreactor de 3.L. Los promedios de dos repeticiones ( $\pm$  error estándar) por cada punto, superíndice común no difieren significativamente ( $P < 0.05$ ). ..... 69  
**Figura 19.** Cromatograma del perfil de ácidos grasos contenido en la biomasa microalgal de *V. verrucosus* ..... 70

## INDICE DE TABLA

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de las diferentes clases de microalgas .....	24
<b>Tabla 2.</b> Taxonomía de la especie <i>Verrucodesmus verrucosus</i> .....	31
<b>Tabla 3.</b> Distribución de la toma de muestra .....	37
<b>Tabla 4.</b> Caracterización fisicoquímica del agua de las diferentes zonas hidrográficas del estado de Chiapas, México.....	45
<b>Tabla 5.</b> Evaluación de la concentración de macroelementos y microelementos de muestras de agua de diferentes zonas hidrográficas del estado de Chiapas, México.....	46
<b>Tabla 6.</b> Análisis de los morfotipos identificados en las zonas hidrográficas del estado de Chiapas de acuerdo al entorno de aislamiento, clase, tamaño y características morfológicas.....	53
<b>Tabla 7.</b> Contenido lipídico de algunas microalgas identificadas en zonas hidrográficas del estado de Chiapas .....	54
<b>Tabla 8.</b> Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>Verrucodesmus verrucosus</i> (A), Morfotipo T (B) y mezcla de los morfotipos (C) en diferentes medios de cultivo en condiciones autotrófica .....	57
<b>Tabla 9.</b> Análisis bromatológico del lixiviado de un biodigestor y de lombricomposta .....	58
<b>Tabla 10.</b> Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>Verrucodesmus verrucosus</i> (V), Morfotipo T (T) y mezcla de los morfotipos (V+T) en condiciones de crecimiento mixotrófico en lixiviado del biodigestor (LB) y lixiviado de lombricomposta (LL) al 30%, 50% y 80% en diferentes medios de cultivo en condiciones heterotrófica. ....	60
<b>Tabla 11.</b> Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>Verrucodesmus verrucosus</i> (V), Morfotipo T (T) y la mezcla entre los morfotipos (T+V) en condiciones de crecimiento mixotrófico en lixiviado del biodigestor (LB) y lixiviado de lombricomposta (LL) al 30%; 50% y 80% en diferentes medios de cultivo en condiciones heterotrófica. ....	64
<b>Tabla 12.</b> Perfil de ácidos grasos proveniente de la biomasa microalgal de <i>V. verrucosus</i> sometida al tratamiento en fotobiorreactor a 1000 Lux.....	71

## INTRODUCCIÓN

A medida que aumenta la población humana, la demanda de energía en el mundo y la dependencia de los combustibles fósiles ha incrementado. En consecuencia, las emisiones globales de carbono, incluidos los gases de efecto invernadero, se han acrecentado contribuyendo al calentamiento climático global, por lo que la necesidad de avanzar hacia alternativas sustentables para sustituir el uso de combustibles fósiles no sólo es necesaria para hacer frente al cambio climático, sino también ante el agotamiento de las energías mundiales (Hook & Tang, 2013).

Los biocombustibles generados a partir de algas, en particular, se han identificado como una fuente excepcional de carbono y energía renovable (Sharif et al., 2008; Schenk et al., 2008; Clarens et al., 2010). Su alta eficiencia fotosintética, la producción de biomasa y la capacidad de acumular cantidades relativamente grandes de triacilglicéridos (TAG) para la conversión de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) los han convertido en una alternativa deseable para la producción de biocombustibles. Se conoce como microalgas al conjunto de microorganismos unicelulares eucariotas y procariotas (cianobacterias) que sintetizan una gran cantidad de clorofila *a* y otros pigmentos que define su coloración verde, lo cual les permite realizar la fotosíntesis y actuar como productores primarios en la generación de energía química a partir de energía lumínica; varían en cuanto a tamaño, toxicidad, grosor de la pared celular, movilidad y composición química. Aun cuando estos organismos pueden aislarse en efluentes pesqueros, ríos, manantiales e instalaciones de aguas residuales, se ha comprobado que la máxima producción es obtenida a un pH de 9, temperatura de 35°C, salinidad de 0, y una concentración de CO<sub>2</sub> de 1-5%. Las microalgas pueden cultivarse de forma discontinua a lo largo del año a partir de fotobiorreactores a escala industrial (Guischina & Harwood, 2006; Graef et al., 2009).

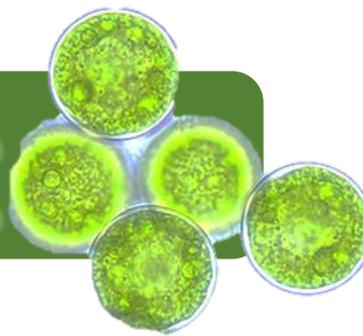
El éxito y la viabilidad económica de una industria de biocombustibles a base de microalgas dependerán de varios factores, incluyendo la selección de cepas resistentes que exhiben tasas de crecimiento excepcionales, perfiles de lípidos adecuados para la producción de biodiesel y tolerancia a una amplia gama de parámetros ambientales (Griffiths & Harrison, 2009).

Sin embargo, hasta el momento la identificación de microalgas con potencial para la producción de biocombustibles es un tema aun en formación, debido a que existen muchos espacios geográficos sin explorar y que pueden ser reservorios importantes de microalgas con potencial para la producción de biodiesel, por ello la importancia de aislarlas, identificarlas y caracterizarlas, tal es el caso de Chiapas que cuenta con una amplia hidrografía con características climáticas diversas. Muy probablemente se pueden identificar algas con un contenido de lípidos clave para la producción de biodiesel y una alta productividad de biomasa. Sin embargo, muchos parámetros fisicoquímicos son diferentes entre las cepas y requieren de su caracterización y optimización de forma individual.

Por otro lado, las microalgas tienen la capacidad de crecer y hacer fotosíntesis con diferentes fuentes de nutrientes como las sales minerales, en condiciones autotróficas, y sustancias orgánicas (como estiércoles y aguas residuales), en condiciones mixotróficas (Chinnasamy, 2010). Adicionalmente, algunas microalgas pueden crecer en condiciones heterotróficas, usando carbono orgánico en ausencia de luz (Xu et al., 2006). Esta plasticidad metabólica les permite adaptarse a diferentes ecosistemas y procesos biotecnológicos, generando biomasa que puede ser usada en la producción de alimentos, concentrados, compuestos bioactivos, biocombustibles, en la biorremediación y la producción de biofertilizantes, por lo que la identificación y caracterización de microalgas nativas del estado de Chiapas permite ampliar la visión biotecnológica y energética en el aprovechamiento de estos organismos como un mecanismo para aprovechar la diversidad biológica con la que cuenta esta región del país. De acuerdo a lo antes mencionado el presente trabajo de investigación tuvo como objetivo aislar e identificar microalgas nativas provenientes de áreas hidrográficas del estado de Chiapas, con su respectiva evaluación de crecimiento y producción de ésteres metílicos de ácidos grasos importantes en la producción de biodiesel. Los resultados demostraron que de las muestras de agua analizadas, se aislaron 13 morfotipos de microalgas, de estos consorcios el 90.47% de un total de 21 microorganismos están compuestos por microalgas pertenecientes a la clase Chlorophyceae, el área con la mayor riqueza específica de microalgas fue el río Santo Domingo del municipio de Chiapa de Corzo con 6 morfotipos identificados correspondientes al 28.57%. Así también se realizó un análisis del estado nutricional del

agua (oligotrofia final de la eutrofia) como un bioensayo para la identificación de microalgas marinas, generando una relación entre la calidad biológica del agua y los morfotipos, demostrando que esta riqueza nutricional comprende un rango taxonómico específico. Por otro lado se evaluó como control positivo a *Verrucodesmus verrucosus* en medio BG11 el cual permitió la mayor acumulación de lípidos con un 24.3% en un periodo de 60 días y un fotoperiodo 12:12 a nivel de laboratorio, sin embargo permite la acumulación del 50% de lípidos en un periodo de 15 días y un fotoperiodo 12:12 a 2000 lux en un fotobiorreactor tubular, dicha acumulación se alcanza con una concentración adecuada de nitrógeno de 0.23%, finalmente se determinó que la concentración máxima de ácidos grasos en la biomasa microalgal fue de ácido palmítico.

# CAPÍTULO I



## 1. LAS MICROALGAS

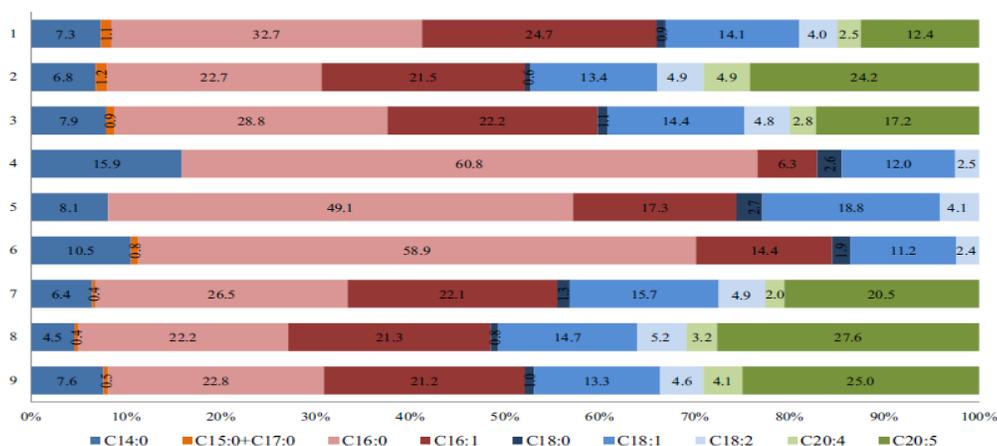
Se conoce como microalgas al conjunto de microorganismos unicelulares capaces de llevar a cabo la fotosíntesis. Organismos unicelulares eucariotas y procariotas (cianobacterias) que sintetizan una gran cantidad de clorofila *a* y otros pigmentos que define su coloración verde, les permite realizar la fotosíntesis y actuar como productores primarios en la generación de energía química a partir de energía lumínica; varían en cuanto a tamaño, toxicidad, grosor de la pared celular, movilidad y composición química (Moreno-García et al. 2017). La composición de las microalgas (contenido en lípidos, carbohidratos y proteínas) es variable, y puede ser manipulada mediante varios parámetros durante el proceso de su cultivo. Depende también de la especie considerada. En general, las cianobacterias tienen un contenido de hasta 20% en lípidos, mientras que el contenido lipídico de las algas eucariotas oscila entre un 20 y 50% en peso seco (Biller et al. 2014).

Las microalgas son microorganismos que se encuentran en diversos ambientes naturales y presentan varios tipos de adaptaciones para su crecimiento por lo que pueden vivir en agua dulce o salada. Existen alrededor de 300 mil especies de microalgas, pertenecen al reino Plantae y sus divisiones son: Cryptophyceae, Dinophyceae, Prymnesiophyceae, Chrysophyceae, Bacillariophyceae, Dictyochophyceae, Euglenophyceae y Chlorophyceae. Las condiciones necesarias de temperatura, nutrientes, pH, presión, salinidad, aireación y concentración de CO<sub>2</sub> en los medios de cultivo varían entre especies e influyen en la cantidad de biomasa final generada en un tiempo determinado (Taher et al. 2015; Han et al. 2016). El cultivo de microalgas puede ser desarrollado en condiciones extremas o normales, dependiendo de la especie en estudio los requerimientos nutricionales varían. Por ejemplo, algunos cultivos de *Chlorella*, *Spirulina* y *Dunaliella* crecen en concentraciones de nutrientes altas, pH extremo o salinidad elevada. Las estrategias que utilizan las microalgas para adaptarse a las condiciones extremas son varias, entre las más importantes se puede mencionar: la producción de sustancias mucilaginosas extracelulares para protegerse del estrés hidrodinámico, la acumulación de moléculas osmorreguladoras en condiciones salinas, la síntesis de pigmentos fotoprotectores para la respuesta a altas intensidades de luz y la acumulación de lípidos en condiciones limitadas de nitrógeno (Taleb et al. 2016; Pérez et al. 2016).

## 2. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS MICROALGAS

Se considera como fórmula molecular de las microalgas la propuesta por Biller et al. (2014) y Aliey et al. (2016):  $C_{106}H_{181}O_{45}N_{16}P$

La alta concentración de carbono puede indicar la presencia de lípidos, carbohidratos y proteínas, ya que se sabe que las microalgas tienen el potencial de acumular lípidos de interés en la alimentación, cosmética, farmacéutica y las industrias energéticas (por ejemplo: biodiesel). Las microalgas representan una plataforma atractiva para la producción de lípidos (Pérez-García et al. 2011; Yen et al. 2013). Células de microalgas pueden acumular lípidos de hasta 20-50% de su peso seco celular (Araujo et al. 2013), y pueden ser utilizadas como precursores para la producción de biodiesel después de una etapa de transesterificación (Cesarini et al. 2014; Liu et al. 2015). Se ha identificado que los lípidos provenientes de algas incluyen lípidos polares, que normalmente son estructuras como fosfolípidos y glicolípidos, así también se identifican a los lípidos neutros, que son principalmente lípidos de almacenamiento tales como mono-, di-, tri-acilglicéridos (TAG) y esteroides (ST) (Greenwell et al. 2009). Los lípidos que producen las microalgas representan la clase de lípidos preferibles para la producción de biodiesel, ya que contienen ácidos grasos que pueden ser removidos de su marco de glicerol y se transforman a través de la reacción de transesterificación en ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) (Islam et al. 2013). Tal como lo demostró Borges et al. (2016) al desarrollar un análisis de perfil lipídico de *Nannochloropsis oculata*, demostrando una concentración mayor del 60% de ácido palmítico, viable para usos futuros (Figura 1).



**Figura 1.** Perfil de ácidos grasos de *Nannochloropsis oculata* para cada tratamiento (% de ácidos grasos totales). (1) Centrifugación; (2) Centrifugación lavada con  $H_2O$ ; (3) Lavado centrífugo con formiato; (4) Floculación con adición de  $NaOH$ ; (5) Floculación con adición

de NaOH y lavado con H<sub>2</sub>O; (6) Floculación con adición de NaOH y lavado con formiato; (7) Floculación con adición de NaOH y neutralización con HCl; (8) Floculación con adición de NaOH, neutralización con HCl y lavado con H<sub>2</sub>O; (9) Floculación con adición de NaOH, neutralización con HCl y lavado con formiato.

Actualmente se han dedicado esfuerzos considerables para identificar los genes y las señales que regulan el metabolismo de microalgas (Peled-Zehavi et al. 2010; Nikkanen et al. 2014), y para optimizar las etapas que pueden generar biomasa celular rica en lípidos (Yu et al. 2011; Mendes et al. 2013). Sin embargo, el proceso representa la mayor parte de los costos de un proceso biotecnológico, poca atención se ha colocado en la mejora de los protocolos de extracción de lípidos (Ho et al. 2013; Li et al. 2014) este paso todavía se considera como uno de los principales cuellos de botella para la producción de biodiesel a escala comercial (Lee et al. 2010; Guldhe et al. 2016).

### 3. METABOLISMO DE LAS MICROALGAS

#### 3.1 Red metabólica de carbono y nitrógeno

La red metabólica de carbono y nitrógeno central entre las especies de microalgas la cual se ha reconstruido hasta ahora está relativamente bien conservada (Baroukh et al., 2015a). Se utiliza una red metabólica central compuesta por 160 reacciones, que incluye las siguientes vías metabólicas relevantes para la autotrofia: fotosíntesis, ciclo de Calvin, vía de las pentosas fosfato, glucólisis, ciclo de TCA, fosforilación oxidativa y síntesis de carbohidratos, lípidos, aminoácidos, nucleótidos y clorofila. A continuación, las reacciones de síntesis de macromoléculas (Proteínas, Lípidos, ADN, ARN y Biomasa) se agrupan en reacciones genéricas para llegar a un modelo bastante genérico, que probablemente describirá una amplia gama de especies de microalgas (Baroukh et al. 2015b) (Figura 2).

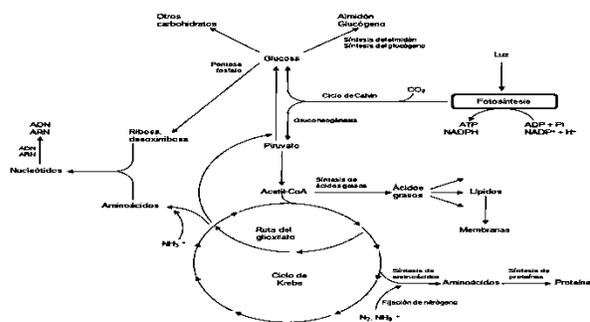
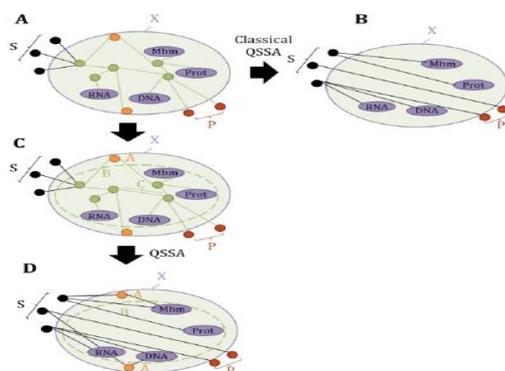


Figura 2. Red metabólica central de una microalga, relevantes para la autotrofia: fotosíntesis, ciclo de Calvin, vía de las pentosas fosfato, glucólisis, ciclo de TCA, fosforilación oxidativa.

El análisis dinámico del equilibrio del flujo (dFBA) (Mahadevan et al., 2002; Orth et al., 2010) es una técnica de análisis utilizada para describir el comportamiento metabólico de un organismo. Este marco se basa en una aproximación cuasi-estatal (QSSA), que no asume acumulación o agotamiento de los metabolitos intracelulares. Para representar el almacenamiento de carbono bajo la forma de algunos metabolitos intracelulares, se representan los metabolitos correspondientes como metabolitos externos, que son excretados como productos por la célula o consumidos como sustratos dentro de la célula. Se supone que estos metabolitos no desempeñan otro papel funcional en la célula además de actuar como almacenamiento (o tampones). Por lo tanto, existen dos tipos de metabolitos intracelulares (Figura 3): 1) los que se supone siguen una QSSA (denotada por C), consumida a medida que se producen para sintetizar nueva biomasa funcional (proteínas, ARN, carbohidratos de membrana y lípidos); y 2) aquellas que supuestamente actúan como unidades de almacenamiento de carbono (designadas por A), que no se consumen al mismo tiempo que se producen. La biomasa X se divide así en dos grupos: metabolitos A y biomasa funcional B.



**Figura 3.** Adaptación de dFBA tomando el almacenamiento de carbono: A) Visión esquemática del metabolismo de un organismo, en el que los sustratos (S) se convierten, a través de metabolitos intermedios (Puntos verdes y naranjas), en productos (P) o biomasa (X) (Compuesto principalmente de proteínas (Prot), ADN, ARN, membrana, carbohidratos y lípidos (Mbm)); B) Vista esquemática del metabolismo de un organismo después de la aplicación de la QSSA clásica (sin acumulación de Metabolitos intracelulares). Los sustratos (S) son directamente convertidos en productos (P) o biomasa (X); C) Vista esquemática del metabolismo de un organismo, que representa el almacenamiento de carbono. Existen dos tipos de metabolitos intracelulares: 1) los que se supone siguen una QSSA (C, puntos verdes); Y 2) los que se supone actúan como unidades de almacenamiento de carbono (A, puntos naranjas). La biomasa X se divide así en dos grupos: metabolitos A y biomasa funcional B - compuestos principalmente de proteínas (Prot), ADN, ARN, carbohidratos de membrana y lípidos (Mbm); D) Vista esquemática del metabolismo de un organismo después de la aplicación de QSSA, teniendo en cuenta el almacenamiento de carbono. Los sustratos (S) se convierten directamente en productos (P), biomasa funcional (B) o indirectamente convertidos en productos (P), biomasa funcional (B) a través de metabolitos de almacenamiento de carbono (A).

El modelo de crecimiento de las algas ha sido bien desarrollado con varias especies de algas en diferentes entornos de crecimiento (Quinn et al. 2011). Sin embargo, el modelo fácilmente adaptable del contenido de lípidos de algas se publica raramente con respecto a

varias concentraciones de nitrógeno. Sin embargo, Yang et al. 2017 desarrolló un nuevo modelo matemático aplicable ampliamente simplificado para diversos tratamientos de nitrógeno para comprender en su totalidad la productividad de los lípidos, proteínas y carbohidratos a partir de las microalgas. En el estudio desarrollado por Yang et al. 2017, el contenido de lípidos fue representado como una función lineal de la cuota de nitrógeno que se calculó sobre la base del balance de masa en el medio de crecimiento para estudiar la acumulación de lípidos. Fue validado en *Coelastrum sp.* HA-1 bajo varias concentraciones iniciales de nitrógeno y se aplicaron en *Chlorella sorokiniana* en diferentes condiciones de luz. El crecimiento fue modelado por una ecuación diferencial no autónoma incorporando la ecuación logística y la función de ajuste (Hong et al. 2016), mientras que la función de Michaelis-Menten se utilizó para modelar la absorción de nitrógeno (Legović et al. 1997).

### 3.3 Síntesis de lípidos

El exceso de carbono fijado por la fotosíntesis se cambia a la síntesis de triacilglicéridos para la acumulación de lípidos bajo inanición de nitrógeno, la tasa de crecimiento de las microalgas se reduce ya que las proteínas fundamentales no pueden ser sintetizadas (Breuer et al. 2012; Garnier et al. 2014; Gerber et al. 2016; Tran et al. 2016). Por otro lado, el mecanismo en la síntesis de lípidos neutros específicamente la manera en cómo las TAGs están biosintetizadas todavía está en su etapa inicial. Li et al. (2011) y Hong et al. 2016 observaron la relación competitiva entre TAGs y carbohidratos biosintetizados después de agotamiento de nitrógeno. Curiosamente, algunas cepas muestran significativas cantidades altas de carbohidratos y lípidos durante bajas concentraciones de nitrógeno (Wang et al. 2014). Por esta razón, una forma adecuada de aumentar el contenido de lípidos y la biomasa es una necesidad urgente para producir biocombustibles a partir de microalgas.

Los glicerolípidos son una de las clases de lípidos más abundantes en la naturaleza, y existen tanto en procariotas como eucariotas. El ensamblaje de glicerolípidos comienza con acilación escalonada de glicerol 3-fosfato (G3P) a ácido fosfatídico (PA) usando donantes de ácidos grasos. El glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) y la 2-lisofosfatídica aciltransferasa (LPAAT) catalizan la acilación en la posición sn -1 de G3P y la posición sn -2 de 2- Lisofosfatídico (LPA), para producir LPA y PA, respectivamente. Estas enzimas han sido bien estudiadas en la planta modelo superior *Arabidopsis thaliana*, donde dos conjuntos de enzimas homólogas catalizan dos vías de biosíntesis de glicerolípidos distintas

y paralelas, una en el plástido (la "vía procariótica") y la otra en el retículo endoplásmico (ER, La "vía eucariótica") (Ohlrogge y Browse, 1995, Roughan y Slack, 1982). Las plantas se pueden dividir en dos tipos principales, es decir 16:3 o 18:3, dependiendo del origen de sus lípidos plastidiales (Roughan y Slack, 1982). Los glicerolípidos de origen procariota contienen ácidos grasos 16:3 en la posición sn-2, mientras que los de origen eucariótico contienen ácidos grasos 18:3. Una encuesta de más de 400 especies de plantas a través de diferentes taxones sugiere que la vía plastidial se perdió durante la evolución de una cianobacteria unicelular a algunas plantas vasculares superiores, como la soya (*Glycine max*) (Mongrand et al., 1998). Por el contrario, algunas especies de plantas, incluyendo *Arabidopsis thaliana*, todavía emplean ambas vías para la biosíntesis de lípidos en tilacoides. La vía de producción lipídica puede variar y es específica de la especie. Los productos de las dos vías se distinguen generalmente basándose en sus especies de ácidos grasos en la posición sn-2, que se determinan por la especificidad de acilo de los homólogos de LPAAT en las dos vías (Frentzen, 1993; Heinz y Roughan, 1983). Estudios de LPAATs pueden proporcionar pistas en los flujos de metabolitos lipídicos.

### 3.5 Síntesis de proteínas

*Chlorella* se ha desarrollado a través de la fotosíntesis en los sistemas de estanques abiertos, se utiliza comúnmente en la actualidad para los suplementos, mientras que su utilización como fuente de proteínas en los alimentos convencionales se ha visto obstaculizada por un sabor fuerte y la falta de calidad. Con una población mundial que crece y demanda más proteínas, las microalgas heterótrofas son una fuente escalable y sostenible de la proteína. Debido a la flexibilidad en los tipos de azúcares vegetales renovables que pueden alimentar a las microalgas, toda la proteína generada a partir de microalgas puede ser producida en muchas partes del mundo. Además, datos recientes indican que las microalgas heterótrofas desarrolladas sobre el azúcar de caña pueden producir una fuente altamente sostenible de proteína, un excelente perfil de nutrientes y propiedades físicas que permiten su uso en una variedad de aplicaciones alimentarias. Tendencias para los alimentos producidos de forma sostenible y los ingredientes a base de algas harán que sea una de las fuentes importantes de proteínas para el futuro (Klamczynska and Mooney 2017).

#### 4. CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE LAS MICROALGAS

Las microalgas son consideradas como un recurso prometedor para la generación de biocombustible, así como para fijar dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) en el futuro. El modelado de crecimiento de microalgas es un método efectivo para estudiar el rendimiento del crecimiento de microalgas, se manifiesta por los parámetros que incluyen la distribución de luz, la dinámica de pigmento, la absorción de nitrógeno, tasa de crecimiento, tasa de respiración, dependencia de la temperatura y la dependencia de la profundidad, sin olvidar el control de cultivos de microalgas en biorreactores artificiales (Yuan et al. 2014).

Un reto importante es la identificación y selección de cepas que tienen el potencial de alcanzar alta productividad de biomasa anual en estanques al aire libre. A pesar de que una cepa puede crecer bien en cultivos de laboratorio en condiciones particulares de incubación (por ejemplo, temperatura ambiente y las intensidades relativamente bajas de luz), no hay ninguna garantía de que su crecimiento se llevará a cabo satisfactoriamente en cultivos estanque al aire libre que están sometidos a la temperatura, la luz diaria y estacional de agua que fluctúan. Además, muchos experimentos están diseñados específicamente para generar datos para la entrada a un modelo de crecimiento predictivo, es imposible extrapolar los hallazgos del laboratorio para determinar las condiciones de funcionamiento (es decir, la profundidad de cultivo, la tasa de dilución) y la ubicación geográfica del estanque para que la productividad de una cepa dada sea óptima. Una posible solución, que sugirió anteriormente Huesemann et al. (2013), es el uso de un modelo de crecimiento de la biomasa para predecir el rendimiento en un estanque al aire libre, utilizando un número limitado de parámetros de entrada del modelo en función de una cepa específica que se mide en cultivos de laboratorios, esta determinación a través de la Herramienta de Evaluación de Biomasa PNNL (BAT) (Wigmosta et al. 2011, Venteris et al. 2013 y 2014; Coleman et al. 2014), considerando también los datos de intensidad de la luz y temperatura del agua del estanque (o series de tiempo, denominado “scripts”).

Dado que la luz y la temperatura son los principales determinantes de la productividad de biomasa de cultivos en estanque al aire libre operados bajo nutrientes básicos (N, P, CO<sub>2</sub>, etc.) bien mezclados, es necesario conocer la tasa de crecimiento específico de la cepa seleccionada como una función de estas dos variables. Hay una gran cantidad de literatura

sobre los efectos de aumento de intensidad de la luz sobre la tasa específica máxima de crecimiento de una especie de microalgas, así como la velocidad de evolución del oxígeno fotosintético, resultando en conocimiento útil sobre la eficiencia cuántica, la intensidad de luz de saturación, y el potencial de foto-inhibición (Geider et al. 2004; Montagnes et al. 2011; Boyd et al. 2013).

## 5. IMPORTANCIA DE LA TEMPERATURA Y LA LUZ DURANTE LA NOCHE

La luz y la temperatura también afectan a la tasa de pérdida de biomasa durante la noche debido a la respiración oscura. Tasas de respiración en periodos de oscuridad en la biomasa específica en microalgas son altamente dependientes de la especie, oscilan entre 0,01 a 0,6 días y pueden comprender el 30% de la frecuencia de tensión máxima de crecimiento específico (Geider et al. 1989). Ryther y Guillard (1962) determinaron el coeficiente (g respirado de carbono por hora por gramo de clorofila) respiratoria en cinco diatomeas a los 5, 10, 15, 20, y 25 ° C, lo que demuestra una diferencia significativa entre estas especies. Grobbelaar y Soeder (1985) evaluaron la tasa de absorción de oxígeno respiratorio para dos especies de microalgas en estanques oscuros, por lo que se identificaron que estos son dependientes de la temperatura de incubación, la duración del tiempo en la oscuridad, de la temperatura y la intensidad de luz en la que las microalgas fueron previamente cultivadas. Torzillo et al. (1991) cultivó *Spirulina platensis* en fotobiorreactores tubulares e informó que la pérdida de biomasa nocturna dependía de la temperatura y la intensidad de la luz a la que se hicieron crecer los cultivos iniciales. Así también, Ogbonna & Tanaka (1996) al utilizar cultivos de *Chlorella pyrenoidosa* observaron que la magnitud de la pérdida de biomasa durante el período oscuro se correlacionó positivamente con la temperatura durante el periodo de oscuridad y negativamente correlacionada con la temperatura durante el período de luz. Además, las células en la fase de crecimiento exponencial de luz suficiente exhiben menor pérdida de biomasa que en la oscuridad, posiblemente indicando que la intensidad media de la luz que las células reciben durante el período de luz son enfocados a la acumulación de productos de almacenamiento de energía fotosintética y la producción de biomasa sin embargo al enfrentar la oscuridad el proceso de respiración continua utilizando la energía generada para el aprovechamiento de los recursos almacenados desatendiendo la producción de biomasa.

## 6. REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES

La biomasa de microalgas contiene productos con alta importancia comercial como proteínas, lípidos e hidratos de carbono (Torzillo & Vonshak, 2004), por lo que la disponibilidad de nutrientes tiene un impacto significativo sobre el crecimiento y la propagación de microalgas y amplios efectos en su composición de compuestos químicos.

Un aspecto importante que limita el crecimiento exponencial de las microalgas es la condición de estrés ambiental cuando los nutrientes son limitados, invariablemente provoca una tasa de división celular en constante disminución. Sorprendentemente, la biosíntesis activa de ácidos grasos se mantiene en algunas especies de algas bajo tales condiciones, siempre que haya suficiente luz y CO<sub>2</sub> disponible para la fotosíntesis (Thompson, 1996).

El nitrógeno y el fósforo son dos macronutrientes importantes para el crecimiento y el metabolismo de las células de algas. El nitrógeno es un elemento fundamental para la formación de proteínas y ácidos nucleicos. Al ser una parte integral de moléculas esenciales tales como ATP, el portador de energía en las células, el fosfato es otro nutriente muy importante. El fosfato es también una parte de la columna vertebral de ADN y ARN, que son macromoléculas esenciales para todas las células vivas. El fósforo es también un componente clave de los fosfolípidos (Harris, 1986).

Muchas microalgas producen ácidos grasos saturados e insaturados, naturalmente, en condiciones ideales de crecimiento, que tienen un alto valor nutricional, pero no son ideales para la producción de biocombustibles. Sin embargo, la síntesis de lípidos neutros en forma de triacilglicéridos (CTC) puede ser inducida en muchas especies bajo condiciones de estrés. (Miao & Wu, 2006; Hu et al. 2008; Juneja et al. 2013). Debido a las altas tasas de crecimiento y facilidad de producción metabólica la microalga *Chlorophyta* es el cultivo considerado como un phylum prometedor para la producción de biocombustibles.

### 6.1 Micronutrientes

Los micronutrientes presentes en el medio de cultivo mantienen la presión osmótica y el equilibrio de los electrolitos. Algunos micronutrientes forman parte de la biomasa o de las proteínas, como es el caso del Mg, ión central en el núcleo de la porfirina de las clorofilas. Se emplean Cl, K, Ca, Mg y sulfatos en mayor medida en los medios de cultivo (Hussain et al. 2017). Existen otros micronutrientes utilizados en menor cantidad por las microalgas,

estos son: Mn, Cu, Co, Zn, Mo, V y Si. Estos microelementos actúan como cofactores de enzimas, productores de vitaminas y mantienen la pared celular. Su concentración en el medio de cultivo es tan baja que su exceso puede ser tóxico para las microalgas.

## 7. CLASIFICACIÓN DE MICROALGAS

En 1995, Hoek, Mann y Jahns proponen la división de las microalgas, de acuerdo al tipo de estructura celular, en dos grandes grupos. Microalgas con estructura celular procariota: Cyanophyta y Prochlorophyta, y microalgas con estructura celular eucariota: Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Prymnesiophyta, Cryptophyta y Dinophyta.

En el año 2000, Graham and Wilcox usando la clasificación de Hoek, Mann y Jahns, proponen una nueva clasificación de las algas en 12 grandes grupos: Cianobacteria, algas rojas, algas verdes, Euglénidos, algas verdes-amarillas, Crisófitas, Haptófitas, Sinurófitas, Diatomeas, Dinoflagelados, Criptomónadas y algas pardas (Sheath & Wehr, 2003). A partir de ese año, diferentes clasificaciones se han propuesto con base en secuencias de ADN, sin embargo, aún siguen inconclusas las relaciones filogenéticas existentes entre algunos clados (líneas punteadas, Figura 4) (Lewis & Mccourt, 2004).

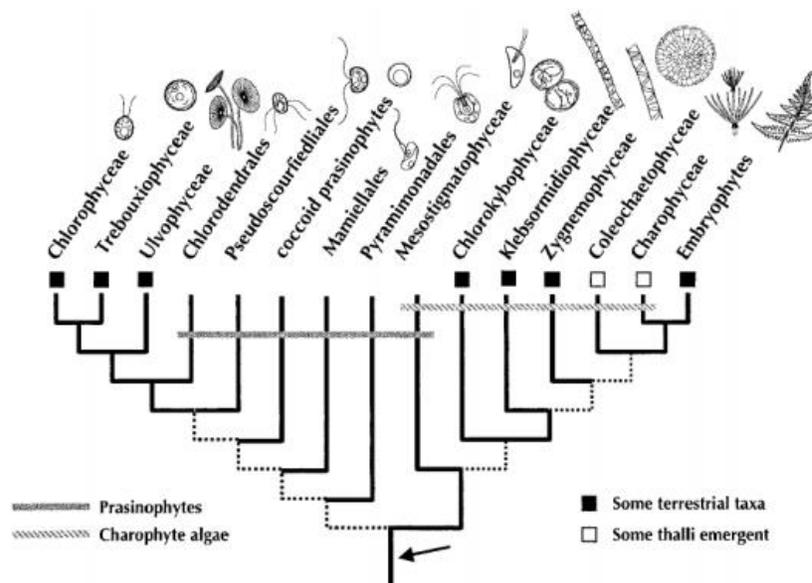


Figura 4. Representación filogenética de las relaciones entre los mayores linajes de las algas verdes con base en análisis de secuencias de ADN.

Debido a las diversas clasificaciones de las microalgas hasta el momento Sharma et al. (2016) clasificó en seis tipos principales. Algunos son: 1. Organización Nuclear 2. Naturaleza de la pared celular componentes 3. La pigmentación y fotosintética Aparato 4. Naturaleza de la Reserva Alimentaria, tal como se clasifica en la Tabla 1.

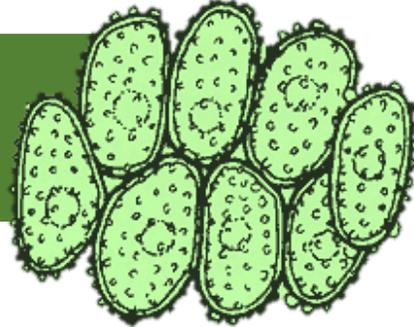
**Tabla 1.** Clasificación de las diferentes clases de microalgas

<i>Algas</i>	<i>Organización celular</i>	<i>Número, posición y ubicación de flagelos</i>	<i>Composición química de la pared</i>	<i>Pigmentos</i>	<i>Arreglo tilacoidal</i>	<i>Principales productos de almacenamiento</i>	<i>Comentarios taxonómicos</i>
Cyanophyta (algas verde-azules)	Procarionte	No presentan	Mureínas, azúcares, etc., y vaina mucilagionosa	Clorofila a, ficobilinas, carotenos y varias xantofilas	Tilacoides sencillos sin asociar	Almidón, cianficeano, poliglucosa	Algunos autores las consideran como bacterias
Rhodophyta (algas rojas)	Eucarionte	No presentan	Celulosa y/o xilanos y mananos y galactanos sulfatados	Clorofilas a y en algunos d, ficobilinas, carotenos y xantofilas	Tilacoides sencillos sin asociar	Almidón, cianficeano	
Chlorophyta (algas verdes)	Eucarionte	1, 2-8 muchos iguales localizados anteriormente en células vegetativas y/o gametos	Celulosa, glucósido de hidroxiprolina, xilanos y mananos	Clorofilas a y b, xantofilas y carotenos	Grana de 2 a 5 tilacoides	Almidón	
Chromophyta* Chrysophyceae (algas doradas)	Eucarionte	1 o 2 iguales o desiguales localizados anteriormente en esporas y en algunas células vegetativas	Cuando hay pared, es de celulosa y a veces contiene sílice y/o carbonato de calcio	Carotenos, clorofilas a y c, y xantofilas	Grana de 3 tilacoides	Crisolaminarina	Existen muchas opiniones respecto a la clasificación de estas algas, algunos autores consideran a cada clase como una División; otros separan en Phaeophyta y las otras tres, etc.

Tabla 1

Chromophyta* Xanthophyceae (algas verde-amarillentas)	Eucarionte	2 o múltiplo, desiguales localizados anteriormente en células vegetativas	Celulosa y pectina	Carotenos, clorofilas a y c, y xantofilas	Grana de 3 tilacoides	Crisolaminarina	
Chromophyta* Bacillariophyta (diatomeas)	Eucarionte	1 localizado anteriormente	Sílice y pectina	Carotenos, clorofilas a y c, y xantofilas	Grana de 3 tilacoides	Crisolaminarina	
Chromophyta* Phaeophyceae (algas pardas)	Eucarionte	2 desiguales localizados lateralmente o subapicalmente en gametos y/o esporas	Celulosa, ácido algínico y fuccidiano	Carotenos, clorofilas a y c, y xantofilas	Grana de 2 a 6 tilacoides	Laminaria y maritol	
Euglenophyta	Eucarionte	2 desigualdades colocados en una invaginación anterior de la célula	No presentan pared sino una membrana flexible llamada preiplasto, localizada por debajo de la membrana citoplásmica	Clorofilas a y b	Grana de hasta 3 tilacoides	Paramilón	Algunos autores las consideran dentro del reino Animalia
Pyrrophyta (dinoflagelados)	Eucarionte	2 desiguales, 1 transversal y 1 longitudinal en células vegetativas	Cuando presentan es de celulosa; producen además sustancias mucilaginosas	Clorofilas a y c, caroteno, xantofilas	Grana de 3 tilacoides	Almidón	Algunos autores separan esta División en dos, Dinophyta y Cryophyta

# CAPÍTULO II



Optimización de la producción de biomasa de microalgas a través de cultivos en condición autotrófica y mixotrófica.

---

## CAPITULO II

### 1. BIOMASA MICROALGAL

En las últimas décadas se han realizado esfuerzos cada vez mayores, por aplicar tecnologías basadas en microalgas para una producción más sostenible de muchos compuestos diferentes utilizados en las industrias de los biocombustibles, los productos farmacéuticos, los alimentos funcionales y la acuicultura (Barclay & Apt, 2013). Además de su biomasa nutritiva y su alta productividad, las microalgas pueden ser cultivadas en agua de mar y en tierras no cultivables por lo que no compiten por recursos con la agricultura convencional (Draaisma et al. 2013). Sin embargo, las muchas ventajas derivadas del uso de microalgas como materias primas contrastan con su costo-ineficiente de producción a gran escala (Breuer et al. 2012).

#### 1.1 Condiciones de crecimientos de las microalgas

Las microalgas tienen la capacidad de crecer y hacer fotosíntesis con diferentes fuentes de nutrientes como las sales minerales, en condiciones autotróficas y sustancias orgánicas (como estiércoles y aguas residuales), en condiciones mixotróficas (Chinnasamy, 2010). Adicionalmente, algunas microalgas pueden crecer en condiciones heterotróficas, usando carbono orgánico en ausencia de luz (Xu et al. 2006). Esta plasticidad metabólica les permite adaptarse a diferentes ecosistemas y procesos biotecnológicos, generando biomasa que puede ser usada en la producción de alimentos, concentrados, compuestos bioactivos, biocombustibles, en la biorremediación y la producción de biofertilizantes (Chisti, 2007).

Tal como Steinrücken et al. (2017) encontraron datos prometedores para tres cepas representadas por las diatomeas *Phaeodactylum tricornutum* (fjord) y *Attheya septentrionalis* (Artic), que mostraron altas tasas de crecimiento ( $\geq 0,7 \text{ d}^{-1}$ ), junto con un mayor contenido de ácido eicosapentaenoico (EPA)  $> 3\%$  de peso seco de biomasa(DW), las condiciones de crecimiento fueron 1% de  $\text{CO}_2$  a  $15^\circ\text{C}$  considerando una salinidad de 11-32‰ y un fotoperiodo de 19:5 (Luz : Oscuridad), lo que sugiere su uso potencial en tecnologías basadas en microalgas y la producción de EPA. Este valor es mayor que los típicamente reportados para microalgas aplicadas industrialmente (*Nannochloropsis sp.* 2.1-3.8%, *P. tricornutum* 2.6-3.1%).

Dichas condiciones de crecimiento fueron discutidas por Zhan et al. (2017) quienes realizaron una comparación de los modos de crecimiento fotoautotrófico, heterotrófico, mixotrófico y fotoheterotrófico de las microalgas y ellos discutieron las ventajas del modo mixotrófico en la producción de bioenergía considerando la diferencia en el crecimiento, fotosíntesis característica y producción de bioenergía. También se discuten los factores de influencia del cultivo mixotrófico y la aplicación de microalgas mixotróficas en la biorremediación, sentando bases teóricas para el cultivo de microalgas a gran escala para producción de biomasa, producción de bioenergía y protección ambiental.

### 1.1.1 Especies de microalgas

La elección de las especies a cultivar depende directamente de la finalidad que se le desea brindar a la biomasa resultante (pigmentos, alimento o biocombustibles). Las especies algales predominantes dentro de un sistema abierto dependen de factores ambientales, operacionales y parámetros biológicos (Umdu et al. 2009; Park et al. 2011). En un sistema cerrado se pueden lograr cultivos mono específicos aislados del medioambiente (Posten, 2009). Debido a su alta plasticidad metabólica varias de éstas son utilizadas para fines comerciales específicos (Pérez-García et al. 2011). Los géneros *Chlorella*, *Ankistrodesmus*, *Scenedesmus*, *Euglena*, *Nannochloropsis*, *Oscillatoria*, *Micractinium*, *Golenkinia*, *Phormidium*, *Dunaliella*, *Spirulina*, *Nitzschia*, *Navicula* y *Stigeoclonium* han sido registrados desde distintas procedencias (Rawat et al. 2011; Araujo et al. 2011; Cobos Ruiz et al. 2016). Varias de éstas son comercialmente interesantes para la obtención de biocombustibles, aceites esenciales, pigmentos, entre otros usos (Borowitzka 1999; Harun et al. 2010).

Tal como lo demostró Araujo et al. (2011) quienes evaluaron diez especies de microalgas para determinar su capacidad para la producción de petróleo: *Chaetoceros gracilis*, *Chaetoceros mulleri*, *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella sp.*, *Isochrysis sp.*, *Nannochloropsis oculata*, *Tetraselmis sp.*, *Tetraselmis chui*, *Tetraselmis tetrathele* y *Thalassiosira weissflogii*. El estudio se realizó en matraces de vidrio de 3 litros sometidos a aireación constante e iluminación artificial controlada y temperatura a dos salinidades diferentes. Después de la cosecha, la extracción de aceite se llevó a cabo utilizando el método de Bligh y Dyer asistido por ultrasonido. Los resultados mostraron que *C. gracilis* presentó el mayor contenido de aceite y que *C. vulgaris* presentó la mayor producción de aceite.

### 1.1.2 Condiciones de crecimiento mixotróficas

Una de las principales limitantes para el cultivo de microalgas a escala industrial son los costos de los componentes del medio de cultivo, que generalmente contiene fertilizantes inorgánicos derivados del petróleo (Chisti, 2007). El creciente aumento en los precios de los fertilizantes inorgánicos y su impacto ambiental negativo, han tenido como consecuencia la búsqueda de fuentes alternativas de nutrientes para los organismos fotosintéticos como las microalgas. Por tanto, la atención mundial se ha vuelto hacia el uso de materiales orgánicos de diversos orígenes como fertilizantes (Ortiz-Moreno et al. 2012; Wang et al. 2017). Dentro de los medios de carácter mixotrófico se encuentran los desechos animales, en su forma líquida, los cuales tienen una larga historia de uso como fuente de fósforo, nitrógeno y carbono para el crecimiento microalgal siendo de particular interés los desechos de la avicultura y porcicultura por sus grandes volúmenes y constante producción (Knud-Hansen, 1998; Venglovsky et al. 2006).

Paranjape et al. (2016) menciona que el cultivo de algas en latitudes altas es desafiado por el flujo solar anual relativamente bajo por lo que un posible escenario para superar esta limitación es el uso del crecimiento mixotrófico para potencializar la producción de biomasa y lípidos; los resultados muestran que existe una variación considerable dependiente de la tensión en la velocidad de crecimiento máxima en condiciones mixotróficas con la adición de glicerol que causa, en algunos, casos hasta un aumento de 2,4 veces en la tasa de crecimiento y hasta un aumento de 1,9 veces en la biomasa. Además, el glicerol aumentó la producción total de lípidos del 40-60% en algunas cepas.

Así también, Velea et al. (2017) determinaron que los cultivos mixotróficos tienen las ventajas de reducir el costo de operación y un mayor rendimiento. Tal técnica de cultivo que permite la transformación de residuos con energía solar en biomasa algal, es por lo tanto una tecnología clave que permite una bioeconomía circular. Las microalgas cultivadas mixotróficamente secuestran CO<sub>2</sub> mientras simultáneamente sintetizan productos de valor agregado. Para constatar las cualidades de las condiciones de crecimiento mixotrófico Wu et al. (2017) evaluaron la eficiencia en la producción de luteína en la cepa *Chlorella sorokiniana* Mb-1, los resultados mostraron que la composición óptima de acetato y nitrato fue de 4,88 g/L y 1,83 g/L, respectivamente, lo que condujo a una productividad de luteína pronosticada de 3,96 mg/L/día. Este valor predicho se verificó mediante experimentos que

indicaron que la productividad de la luteína podría aumentarse de 2,79 mg/l /día a 3,97 mg/l /día (mejora del 42%) a través de la optimización de las fuentes de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo mixotrófico (Adesanya et al. 2014; Barros et al. 2017; Chen et al. 2017; Cho et al. 2017). Finalmente, Lin & Wu (2015) Con el fin de producir microalgas con potencial lipídico que se pueda transformar a biodiesel identificaron a *Chlorella sp* Y8-1; la cual fue evaluada bajo diferentes condiciones de cultivo, crecimiento autotrófico (CO<sub>2</sub>, con luz), crecimiento heterotrófico (sacarosa, sin luz) y crecimiento mixotrófico (fuentes de carbono orgánico y CO<sub>2</sub>, con luz). Sin embargo, la condición mixotrófica mostró mayor contenido de lípidos (35,5 ± 4,2%) y mayor productividad de lípidos (0,01 g/L/d) que la cepa *Chlorella sp*. Y8-1 cultivadas en condiciones autotróficas y heterotróficas en medio Walne modificado. El análisis de ácidos grasos de *Chlorella sp*. Y8-1 mostró la mayor presencia de ácido palmítico (C16: 0), ácido oleico (C18: 1), ácido linoleico (C18: 2) y ácidos linolénicos (C18: 3).

### 1.1.3 Condiciones de crecimiento autotrófica

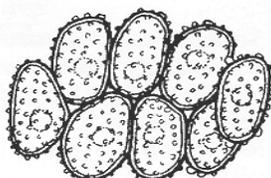
Las microalgas tienen la capacidad de crecer y hacer fotosíntesis con diferentes fuentes de nutrientes como las sales minerales, denominada condiciones autotróficas, para tal efecto Purkayastha et al. (2017) analizaron varios medios autótrofos el medio basal de Bold (BBM), el medio criptófito de Wright (WC), el medio de closterium (C) y el medio de color verde azul (BG11). Sin embargo, se demostró que el medio BG11 era el medio idóneo para el crecimiento y la producción de biomasa (una fracción másica del 37% en peso seco) cuando las células en la fase de crecimiento exponencial tardío en medio BG11 se recogieron por centrifugación y se volvieron a inocular en medios WC. Los hallazgos del método gravimétrico fueron comparables con el método de determinación de lípidos rojo de fluorescencia de Nilo. La composición de ácidos grasos totales (TFA) varió con la composición de los medios de cultivo. El mayor rendimiento de TFA de 2.2 gL<sup>-1</sup> fue descubierto como fuente rica de proteínas y un contenido de TFA de una fracción de masa del 24.1% (DW) con una fracción másica del 95% de TFA C18 (una fracción másica de ~ 71.5%) y C16 (una fracción másica de ~ 23.5 %) se obtuvo con medio BG11 después de reinoculación en medio WC. de *C. elipsoidea* de carbohidratos también.

Tratando de identificar patrones de producción autotrófica Adesanya et al. (2014) desarrollaron un modelo matemático que describe el crecimiento de biomasa y la

acumulación de moléculas de almacenamiento (lípidos y almidón TAG) en la microalga de agua dulce *Chlorella vulgaris*, en condiciones mixotróficas y autótrofas. La productividad máxima y la concentración de biomasa se lograron en condiciones suficientes de nitrógeno mixotrófico, mientras que el contenido de almacenamiento máximo se obtuvo en condiciones deficientes de nitrógeno mixotrófico (Silkina et al. 2017)

## 1.2 La especie *Verrucodesmus verrucosus*

*Verrucodesmus verrucosus* (Roll) Hegewald son células de 4.0-5.2  $\mu\text{m}$  de largo y 2.0-3.4  $\mu\text{m}$  de ancho. Forman cenobio de 11.0-12.0  $\mu\text{m}$  de ancho y 9.0-12.0  $\mu\text{m}$  de alto (López-Mendoza et al. 2015) (Figura 5). A través del estudio filogenético desarrollado por Hegewald et al. (2013) separó el género *Scenedesmus* en cuatro géneros más, por lo tanto la especie *Verrucodesmus verrucosus* es apartada de la anteriormente clasificada por Roll (1925) como *Scenedesmus verrucosus*; su clasificación taxonómica se observa a continuación:



**Figura 5.** Morfología de *Verrucodesmus verrucosus* (Roll 1925)

**Tabla 2.** Taxonomía de la especie *Verrucodesmus verrucosus*

<b>Dominio</b>	Eucariota
<b>Reino</b>	Plantae
<b>Subreino</b>	Viridiplantae
<b>Infrareino</b>	Chlorophyta
<b>División</b>	Chlorophyta
<b>Subdivisión</b>	Chlorophytina
<b>Clase</b>	Chlorophyceae
<b>Orden</b>	Sphaeropleales
<b>Familia</b>	Scenedesmaceae
<b>Subfamilia</b>	Scenedesmoidea
<b>Género</b>	Verrucodesmus
<b>Especie</b>	Verrucosus

Se caracteriza por ser una nueva especie, por lo que no hay reportes sobre su uso en el área de los bioenergéticos.

### III. ANTECEDENTES

En función del aislamiento y la producción masiva de biomasa de microalgas se identifican los siguientes trabajos experimentales que respaldan la presente propuesta de investigación.

Jazzar et al. (2015), en su trabajo proceso de conversión de biodiesel in situ de microalgas nativas, aislaron dos cepas, identificadas como *Chlorella* sp. y *Nannochloris* sp., las cuales se cultivaron logrando una máxima productividad durante cultivos continuos con 318mg/día y 256 mg/día de *Chlorella* sp. y *Nannochloris* sp., respectivamente. Así también se alcanzaron rendimientos máximos de biodiesel de 45.62% y 21.79% para *Chlorella* sp. y *Nannochloris* sp., respectivamente. El análisis de ácidos grasos poliinsaturados de *Chlorella* sp. mostró una disminución en su proporción cuando se comparan los procesos de transesterificación convencionales y supercríticos (de 37,4% a 13,9%, respectivamente), lo que mejora la calidad del biodiesel.

Por otro lado, en cuestión de la importancia molecular y genética, Hadi et al. (2016) evaluaron un conjunto de muestras de agua dulce utilizando dos marcadores (nuITS1 y nuITS2) para la identificación molecular. Los datos que presentaron indican que nuITS1 o nuITS2 son marcadores útiles para el código de barras de ADN de agua dulce para microalgas, con ventaja para nuITS2 debido a la mayor disponibilidad de herramientas analíticas y códigos de barras de referencia depositadas en las bases de datos del NCBI para este marcador, confirmando la exactitud de identificación en un 92% de 47 muestras amplificadas.

En función de los trabajos antes expuestos se observa la importancia de la relación aislamiento y potencial lipídico con fines biotecnológicos y energéticos en la producción de biodiesel, así también Minhas et al. (2016) identificaron la taxonomía y filogenia de veintidós cepas de microalgas que fueron examinadas usando cebadores moleculares universales y de nuevo diseño. Entre los aislados, *Scenedesmus bijugus*, *Coelastrella* sp., *Protothecoides Auxenochlorella*, y *Chlorella* sp, fueron prometedores sobre todo en términos de la producción de lípidos medido por el análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) y concentraciones significativas de los carotenoides. Un experimento comparativo mostró que *S. bijugus* y *Chlorella* sp. Eran los candidatos más prometedores en producción de biomasa ( $174,77 \pm 6,75$ ,  $169,81 \pm 5.22$  mg), lípidos ( $40.14 \pm 3.31$ ,  $39.72$

± 3.89mg), luteína (0,47, 0,36 mg) y astaxantina (0,27, 0,18 mg). Los ácidos grasos producidos por estas cepas de microalgas eran principalmente palmítico, esteárico, oleico, linoleico y ácido linolénico. El estudio determinó que las microalgas provenientes de agua dulce representan el aislamiento más adecuado para la producción de biodiesel y los carotenoides, debido a la alta productividad de biomasa, lípidos, metabolitos y su excelente perfil de ácidos grasos.

Finalmente, Ortiz et al. (2011) con el objetivo de identificar el medio de cultivo que permita un máximo crecimiento de *C. sorokiniana* para su producción masiva evaluaron los medios de cultivo Sueoka, Guillard y Remital, que ofrecen nutrientes en condiciones autotróficas y lixiviadas de gallinaza en régimen mixotrófico. Se registró una densidad celular máxima en medio Remital de  $86,5 \pm 0,75 \times 10^7$  células/ml y una velocidad específica de crecimiento media de 0,3 generaciones/día. Los test estadísticos indicaron que el Remital fue el mejor medio de cultivo y las condiciones autotróficas fueron ideales para el crecimiento de *C. sorokiniana*. Por tanto, se recomienda el uso de Remital en bajas concentraciones (1g/L) como la mejor opción para la producción masiva de biomasa de *C. sorokiniana*.

#### **IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Con el incremento acelerado de la población, se ha acrecentado la demanda de energía del mundo y la dependencia de los combustibles fósiles. En México la producción de energía primaria se ubica en los 13,611.81 millones de toneladas equivalentes de petróleo (MMtep) identificando en primer lugar la producción de petróleo crudo con un 31.4%, carbón con un 28.8%, gas natural con un 21.3% y las energías renovables producen el 13.7% de acuerdo a datos emitidos por la Secretaria de Energía (SENER), así también han estimado que la demanda energética para el 2030, incrementará hasta en un 53%.

Dentro de los combustibles fósiles más atractivos se encuentra el biodiesel, combustible sustituto del gasóleo o diesel de petróleo compuesto por una mezcla de ésteres alquílicos de ácidos grasos (FAME) de cadena larga (C14 - C22), que debido a su composición puede ser obtenido por transesterificación de aceites vegetales, grasas animales, aceites usados o lípidos de microalgas (Miao & Wu, 2006; Demirbas, 2009). Suele emplearse a gran escala

en la industria automotriz (Demirbas, 2009). En consecuencia, las emisiones globales de carbono, incluidos los gases de efecto invernadero han incrementado contribuyendo al calentamiento climático global, por lo que la necesidad de avanzar hacia alternativas sustentables para sustituir el uso de combustibles fósiles no sólo es necesario para hacer frente al cambio climático, sino también al agotamiento de las energías mundiales (Hook & Tang, 2013).

Actualmente se considera como sustituto ideal al aceite de microalgas para la producción de biodiesel; sin embargo, aún no se ha logrado un costo competitivo debido a la falta de investigación para determinar las cepas con mayor potencial para la producción de lípidos, así como de sus características y condiciones óptimas de desarrollo, respuesta a ambientes extremos y a diferentes fuentes nutricionales que resulten ser más económicas y de fácil acceso.

Debido a la plasticidad de las microalgas se pueden identificar en diversas áreas hidrográficas sin explorar, áreas con riqueza que prometan la existencia de organismos fotosintéticos con potencial para la producción de biodiesel. Chiapas cuenta con áreas hidrográficas con las condiciones necesarias para la identificación de microalgas; sin embargo, hasta el momento no se han generado estudios relacionados con la población de estos microorganismos existentes en dicha zona, tampoco se ha evaluado su potencial lipídico para la producción de biodiesel.

## V. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad existe una tendencia internacional hacia la búsqueda de combustibles más limpios y nuevas fuentes de energía de baja emisión de carbono, como la energía solar, la térmica, la fotovoltaica, la hidroeléctrica, la geotérmica, la eólica y los biocombustibles, entre otras; las cuales están siendo evaluadas y se encuentran en diferentes fases de estudio y aplicación, cada una con sus propias ventajas y problemas. En este escenario, se espera que los biocombustibles líquidos, biodiesel y bioetanol puedan sustituir al gasóleo y la gasolina respectivamente (Posten & Schaub, 2009), así también promuevan nuevas fuentes de empleo en las zonas rurales, reduzcan las emisiones de gases efecto invernadero y aumenten la seguridad de abastecimiento energético (Mata et al. 2010).

Los biocombustibles generados a partir de algas, en particular, se han identificado como una fuente excepcional de carbono y energía renovable (Sharif et al. 2008; Schenk et al. 2008; Clarens et al. 2010). Su alta eficiencia fotosintética, la producción de biomasa y la capacidad de acumular cantidades relativamente grandes de triacilglicéridos (TAG) para la conversión de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) los han convertido en una alternativa deseable para la producción de biocombustibles.

Chiapas cuenta con una amplia hidrografía con características climáticas diversas. Muy probablemente se pueden identificar algas con un contenido de lípidos óptimo para la producción de biodiesel y una alta productividad de biomasa. Sin embargo, muchos parámetros fisicoquímicos son diferentes entre las cepas y requieren de su caracterización y optimización de forma individual, por lo que la selección de las mejores cepas y de las mejores condiciones de cultivo permitirán alcanzar la máxima productividad de lípidos con un perfil de ácidos grasos que otorgue calidad al biodiesel; así como la disminución de los costos de cosecha, extracción de lípidos y su conversión a biodiesel (Demirbas, 2009; Brennan & Owende, 2010), que al mismo tiempo permita establecer una competencia económica con el diesel.

## VI. HIPOTESIS

- a) De las microalgas nativas analizadas se identificarán y aislarán en mayor número microalgas del género *Chlorella* en aguas dulces con potencial lipídico.
- b) De los medios de cultivos analizados el medio Remital enriquecido con lixiviado de lombricomposta como medio de cultivo mixotrófica permitirá mayor producción de biomasa de microalgas y de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) con potencial energético.

## VII. OBJETIVOS

### Objetivo general

- ❖ Aislar e identificar microalgas nativas provenientes de áreas hidrográficas del estado de Chiapas, para evaluar su máximo crecimiento y producción de ésteres metílicos de ácidos grasos importantes en la producción de biodiesel.

### Objetivo específico

- Caracterizar microalgas nativas con potencial lipídico provenientes de 6 ríos, 1 manantial y 1 galera filtrante del estado de Chiapas con potencial lipídico.
- Identificar nuevas especies de microalgas en las bases de datos del NCBI, proveniente de áreas hidrográficas de Chiapas con potencial para la producción de biodiesel.
- Optimizar la producción de biomasa de microalgas a través de cultivos en condición autotrófica y mixotrófica.
- Evaluar el potencial de las microalgas en la producción de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) para la producción de biodiesel.
- Construir y optimizar un fotobiorreactor con capacidad de 10L tipo panel que permita escalar las condiciones de la mejor cepa productora de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) para la producción de biodiesel.

## VIII. METODOLOGÍA

### 1. Sitio de estudio

El experimento se estableció en la Universidad Politécnica de Chiapas, ubicada en la ciudad de Suchiapa, Chiapas, México. La ubicación geográfica era latitud  $16^{\circ} 45' 11''$  norte y longitud  $93^{\circ} 06' 56''$ , correspondiente a las regiones tropicales, con más de 1100 mm de precipitación anual. Durante el período experimental, la temperatura del invernadero se mantuvo a  $28^{\circ} \text{C}$  y una humedad relativa del aire de 60 a 65%.

### 2. Toma de muestra

Tres muestras de agua de 1 L por área se obtuvieron de 6 ríos, 1 manantial y 1 galera filtrante del estado de Chiapas, México, las ubicaciones se presentan en la tabla 3.

**Tabla 3.** Distribución de la toma de muestra

Ríos del estado de Chiapas			
N.	Río	Municipio	Coordenadas geográficas
1	Nandayapa	Acala	$16^{\circ} 33' 12'' \text{N}; 92^{\circ} 48' 25'' \text{O}$
2	Huixtla	Huixtla	$15^{\circ} 08' 00'' \text{N}; 92^{\circ} 28' 00'' \text{O}$
3	Novillero	Tonalá	$16^{\circ} 05' 22'' \text{N}; 93^{\circ} 45' 05'' \text{O}$
4	Sto Domingo	Chiapa de Corzo	$16^{\circ} 45' 11'' \text{N}; 93^{\circ} 06' 56'' \text{O}$
5	Suchiate	Suchiate	$14^{\circ} 41' 00'' \text{N}; 92^{\circ} 09' 00'' \text{O}$
6	Pijijiapan	Pijijiapan	$15^{\circ} 41' 12'' \text{N}; 93^{\circ} 12' 33'' \text{O}$
Manantiales del estado de Chiapas			
1	Manantial Cahuaré	Chiapa de Corzo	$16^{\circ} 42' 30'' \text{N}; 93^{\circ} 01' 01'' \text{O}$
Galera filtrante de Chiapas			
1	La Chacona	Tuxtla Gutiérrez	$16^{\circ} 45' 11'' \text{N}; 93^{\circ} 06' 56'' \text{O}$

Cada área muestral fue evaluada por triplicado. Las muestras se colocaron en frascos de 1 L y fueron transportadas en para su conservación.

### 3. Aislamiento, purificación e identificación de microalgas

Submuestras de toda el agua seleccionada se adicionó en matraces Erlenmeyer estériles de 250 ml con tapón de algodón, se colocaron en una mesa con suficiente iluminación (12:12 ciclo luz/oscuridad) con una iluminación de 3000 Lux, por triplicado. Tras la confirmación de crecimiento de las algas mediante inspección visual, se tomó una alícuota de 10 ml de muestra y se adicionó a matraces Erlenmeyer de 250 ml, enriquecido con 90 ml de dos medios definidos BG11 (Rippka et al., 1979; Wang et al. 2003) modificado mediante la

reducción de  $\text{AgNO}_3$  por una décima parte de la concentración Stock, y el medio CHU10 (Stein, Hellebust & Craigie, 1973) por tres semanas. Se utilizaron ambos medios para mejorar el aislamiento y diversidad de las cepas, ambos contenían concentraciones de nitrógeno y fósforo que se encuentran típicamente en los sistemas municipales de aguas residuales debido a la incorporación de aguas sucias en ríos. Así también la vitamina F2 fue adicionada a través de un filtro Millipore estéril número 1 de  $0,45\mu\text{m}$  con ayuda de una jeringa de acuerdo a Guillard, 1973. Posteriormente se realizó un segundo aislamiento de cepas unialgales, este se llevó a cabo mediante el método descrito por Andersen Kawachi (2005). En breve, las muestras de cultivo mixto se diluyeron en serie, de uno a diez con agua Millipore estéril y se propagaron sembrando en placas de agar al 1,5%, posterior a tres semanas, colonias visibles y distintas se aislaron con un asa estéril y se recultivaron en medio BG11 y medio CHU10, éstas se examinaron al microscopio invertido (400X) para verificar que finalmente se trata de una sola cepa durante todo el período de estudio. La identificación de las cepas desde el punto de vista taxonómico se realizó a partir de las descripciones morfológicas establecidas por Sheath & Wehr (2003).

Todas las especies de microalgas fueron validadas morfológicamente, el nombre y la clase de ciencia latina se confirmaron en la base de datos de AlgaeBase” (<http://www.algaebase.org>) y en la base de datos de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

#### **4. Determinación de la frecuencia de tamaño de las células algales**

Después del tratamiento, se recogieron alícuotas en viales de 50 ml y luego se analizaron para determinar la frecuencia de tamaño de las células de algas por ml de suspensión utilizando una FlowCam (Fluid imaging Technologies). Los tamaños se expresaron como longitud equivalente (EL, por sus siglas en ingles) de acuerdo con la forma de las microalgas identificadas. FlowCam es un citómetro de flujo de imágenes continuo diseñado para caracterizar partículas que pasan a través de una cámara de flujo. La FlowCam captura imágenes digitales de partículas en un flujo de fluido mediante la detección de luz láser, lo que permite la medición de muchos parámetros celulares, como la longitud (Sieracki et al. 1998). Para comenzar, se encendió la FlowCam, incluida la computadora y el láser integrados, luego se abrió el programa de software FlowCam (vs programa 20x). El

enfoque en la cámara se ajustó para garantizar imágenes claras y se verificó la celda de flujo para eliminar burbujas o residuos. El modo de autoimagen se estableció en 2 minutos. Una cámara de video o framegrabber captura una imagen de cada objeto que pasa a través del campo de visión en una lente de microscopio objetivo de 20x. Las imágenes digitalizadas se recopilan y almacenan en la computadora, donde se pueden analizar con el software FlowCam.

## **5. Análisis de minerales en las muestras de agua con el espectrómetro de absorción atómica.**

La determinación de pH se realizó mediante un potenciómetro con electrodo de vidrio. La preparación de la muestra consistió únicamente en acidificar cada agua con HNO<sub>3</sub> al 1% (v / v) y agregar cloruro de lantano al 0,1% como reactivo de liberación de calcio (Ca) y magnesio (Mg) y como supresor de ionización para sodio (Na) y potasio (K). Todos los análisis se llevaron a cabo con el espectrómetro de absorción atómica (AA) de la llama PerkinElmer PinAAcle 500. Las mediciones se realizaron a una longitud de onda de 422.67, 324.75, 248.33, 285.21, 766.49, 589.00 y 213.86 nm para Ca, Cu, Fe, Mg, K, Na y Zn, respectivamente, y un ajuste de corte de 0.7 para Ca, Cu, Mg, K y Zn y 0.2 para Fe y Na. Se utilizó el rango visible y la corriente de la fuente se estableció en 14 ma. Se utilizaron un ajuste de escala de 1 y un caudal de aire de 2,5 l / min. Antes del inicio de cada serie de análisis, la tasa de flujo de gas (acetileno) se ajustó para proporcionar la máxima absorbancia mientras se aspiraba una solución estándar. Este valor suele ser de 10 l / min. La tasa de aspiración se verificó utilizando un cronómetro y un cilindro graduado. El taponamiento del aspirador no fue excesivo y, cuando ocurrió, se rectificó aspirando ácido clorhídrico 1:1 durante 1 minuto (Marguí et al. 2010; Dias Peronico and Raposo 2016; Hajigholizadeh & Melesse 2017).

## **6. Ensayos de crecimiento**

### *Medios de cultivo en condición autrófica*

El medio Suoeka se compone de los siguientes elementos: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8,3Mm; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5,3Mm; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,25 Mm; CaCL<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,133Mm; Trazas Hutner 1x; NH<sub>4</sub>Cl 9,35Mm. Trazas Hutner 200x: 12,7g de EDTA-Na.2H<sub>2</sub>O en 250ml de agua, se

mezclaron uno a uno en el siguiente orden en 500ml de agua a 100°C: 2,28g de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 4,40g de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 1,02g de MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O; 1,00g de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,32g de CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O; 0,32g de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O; 0,22g de (NH<sub>4</sub>) MoO<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O. Se mezclaron las soluciones anteriores, se llevó a 100°C y se ajustó el pH a 6,8 con KOH al 20%. (Una temperatura inferior a 70°C) (Yang et al. 2016).

El medio f/2 de Guillard contiene: 1ml de solución resultante de la mezcla de 0,08g de CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O y 0,8g de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O en 100ml de agua destilada; que se agregó a una solución de 800ml con: 0,2g de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0,06g de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,12g de MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 0,03g de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O; 1ml de solución de 1,2g de EDTA-Na en 900ml de agua destilada. Se ajustó el pH a 7,0 y se adicionó 10g de KNO<sub>3</sub> y 1,4g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Se llevó a volumen final de 1litro a 100°C (De godos et al. 2016).

El medio Remital se preparó con 1g/L de abono Remital-M de la empresa Abocol que contiene 17% de nitrógeno total, fósforo asimilable 6%, potasio soluble en agua 18%, magnesio 2%, azufre total 1,6%, boro 0,2% y 0,1% de zinc (Kumar et al. 2016).

Durante el desarrollo del presente trabajo también se analizó el crecimiento de biomasa para cada uno de los medios de cultivo utilizados, con el objetivo de encontrar aumentos en los parámetros de crecimiento de la microalga.

#### *Medios de cultivo en condición mixotrófica: Preparación del lixiviado*

El lixiviado fué proporcionado por el Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Energía Renovables, ubicado en el municipio de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México a 16°45'11" latitud norte y 93°06'56" longitud oeste. El lixiviado líquido resultante se dejó fermentar por 8 días en un recipiente abierto cubierto con una tela, esto se hace para favorecer la degradación aeróbica por parte de su microflora acompañante. El lixiviado obtenido se filtró con ayuda de una bomba de vacío con papel filtro Whatman número1 de 0,45µm. El filtrado se adicionó en dosis de 30, 50 y 80% en los medios de cultivo (Suoeka, Guillard y Remital) y se esterilizó en autoclave a 121°C por 20 minutos (Rosales et al., 2007).

## 7. Análisis bromatológico del lixiviado

Este análisis se desarrolló en el laboratorio de análisis físicoquímico de la Universidad Politécnica de Chiapas, aplicando los siguientes procedimientos: Se determinó el contenido foliar de nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K). La cuantificación de N foliar se realizó por el método Kjeldhal (Method 928.08, AOAC, 2000; Li et al., 2015). Los contenidos de P se analizaron por análisis colorimétrico, en un espectrofotómetro usando el reactivo de ácido molibdato-ascórbico de amonio. El contenido de K se evaluó con un espectrofotómetro después de la extracción con acetato de amonio, según lo establecido por Shamim et al. (2015). La capacidad de intercambio catiónico (CIC) se determinó de acuerdo con el método propuesto por Cely et al. (2015), utilizando 1 M  $\text{NH}_4^+$  OAc como agente de saturación. Así también el pH se evaluó realizando un extracto (v/w) en una relación 01:10 (Konca et al., 2016), el contenido de humedad se obtuvo mediante un secado a 105 °C durante 24 h, la concentración de Carbono orgánico (CO) y la materia orgánica (MO) se deriva de la determinación de ceniza con el uso de una mufla a 550 °C (TMECC, 2002).

Este análisis se aplicó a una muestra de 1L del lixiviado para conocer el contenido de nutrientes.

## 8. Evaluación de los medios de cultivos

Los cultivos se realizaron por quintuplicado iniciando con una densidad celular de  $1 \times 10^3$  cel/ml en matraces Erlenmeyer de 350ml con 200ml de medio de cultivo. Estos experimentos se realizaron con una intensidad luminosa de  $2629 \pm 306$  lux en fotoperiodo de 12 horas, aireación constante y temperatura de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 15 días.

### *Análisis de densidad celular*

La concentración de células de algas se determinó en todos los tratamientos, por recuento cada tres días hasta alcanzar la fase estacionaria, usando una cámara de Neubauer sobre un microscopio con objetivo 100X de aumento. Así también se utilizó un método de confirmación para la biomasa de algas por medio de la densidad óptica, de cada tratamiento se tomó una alícuota de 1mL y se midió en un espectrofotómetro a 550nm cada 24 horas

hasta alcanzar una fase estacionaria, los datos generados se utilizaron para construir las curvas de crecimiento de cada cepa aislada, se determinó la tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ), tiempo de duplicación ( $T_d$ ) y número de generación ( $n$ ) se calculó según Guillard (1973); Lobban et al., (1988).

#### *Tratamiento con antibióticos de las cepas de algas*

Para lograr cultivos axénicos con la finalidad de eliminar la influencia de las bacterias en los perfiles de FAME (Esteres Metílicos de Ácidos Grasos) (Stemmler, Massimi & Kirkwood, 2016) se utilizó un método de tratamiento con antibiótico modificado por Jones, Rhodes & Evans (1973). Las cepas aisladas se trataron primero con una dilución en serie de antibióticos (combinación de sal de sodio, penicilina G y sulfato de estreptomina) por un período de exposición de 24 h. Las colonias de algas fueron seleccionadas en función de la concentración de antibiótico más baja que no presentó crecimiento bacteriano. Las alícuotas de las cepas expuestas se enviaron a un medio sin antibióticos, después de 24 h, posteriormente una alícuota de 1mL se adicionó en placas al 1% de peptona y 1,5% de agar, para evaluar la contaminación bacteriana, además de la observación microscópica. Las cepas que resultaron no ser axénicas se trataron de nuevo. Para los análisis de ácidos grasos sólo se evaluaron cepas axénicas.

### **9. Análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME)**

Para evitar posibles efectos de confusión de las bacterias, sólo los aislados axénicos se sometieron a análisis de ácidos grasos. Las cepas aisladas se cultivaron hasta la fase estacionaria en condiciones de crecimiento descrita anteriormente, 10 ml de submuestras se enviaron a tubos de vidrio de 14 ml con tapas y se centrifugaron a 16000 rpm (Sorval ST16, Thermo Scientific, MA, USA) durante 5 min. La Biomasa granulado se congeló a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 48h seguido de 24-48 h de liofilización utilizando un liofilizador (Thermo Scientific, EE.UU.). Se realizó un método directo para la determinación de transesterificación de los ácidos grasos de algas de acuerdo a O'Fallon et al. (2007). Se evaluó las muestras liofilizadas a través de una cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masa (GC/MS), para tal efecto se utilizaron 100 ppm de nonadecanoico (C19) éster metílico del ácido (Sigma Aldrich,) como control positivo.

## 10. Diseño de un fotobiorreactor

Con las condiciones previamente evaluadas se seleccionó la cepa microalgal, *V. verrucosus* se cultivó en un sistema de producción de biomasa o fotobiorreactor cuyo material es de PMMA (polimetil-metacrilato). El cual presenta propiedades adecuadas para el cultivo, tales como la transparencia, resistencia química y resistencia a la presión de fluidos. El tipo de fotobiorreactor en el que se trabajó es de tipo tubular. Inicialmente se adquirió un tubo de PMMA con dimensiones de 37cm de longitud, con 10.37cm de diámetro interno, con un volumen de 3L. Para el cierre del fotobiorreactor se realizaron 4 orificios a la placa superior y se insertaron 4 tornillos. Se le adicionó caucho en la parte superior del fotobiorreactor para facilitar su cierre, logrando así que no se afectaran las paredes laterales, ya que el exceso de fuerza al cerrar el equipo podía provocar daño al material.

El sistema de control de temperatura fue proporcionado por un termostato para mantener el cultivo a una temperatura de 26°C. El sistema de agitación fue generado por una bomba centrífuga RICOH de ½ HP de potencia, el aire se transportó a unas mangueras de ¼ de pulgada para luego terminar en el tubo de aireación del equipo que fue ubicado en la parte inferior de este para generar el burbujeo manteniendo el equipo en constante agitación (Hindersin et al. 2013; Zijffers et al. 2010). Para la iluminación se emplearon lámparas Voltech® de (l) 32 cm, (h) 3 cm de 8 W, que permitan alcanzar 1000 lux, 2000 lux y 3000 lux. Se puso en marcha el fotobiorreactor, sembrando la microalga en el medio de cultivo dentro del fotobiorreactor, la siembra se realizó en función de los resultados de mayor producción de biomasa de las cepas de microalgas identificadas, donde la concentración inicial de cultivo será fue de  $1.0 \times 10^4$  células por mililitro, haciendo 2 réplicas por muestra, permaneciendo en el equipo por 19 días.

### *Evaluación de variables en el fotobiorreactor*

Para el desarrollo de este trabajo los experimentos se realizaron bajo fotoperiodos naturales 16 horas luz y 8 horas oscuridad, la intensidad de luz se midió con un luxómetro HoldPeak® HP-881<sup>a</sup> de acuerdo a Oncel et al. (2014). La concentración de CO<sub>2</sub> se determinó con un medidor portátil multiparamétrico modelo sension TM 156 (Hach Company, Loveland, USA) de acuerdo a He et al. (2015). Así también se evaluó la

densidad celular y la concentración de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) en las microalgas de acuerdo a las metodologías antes citadas.

### 11. Diseño de experimentos

El experimento se realizó de acuerdo al diseño factorial multivariable desarrollado en el programa *Statgraphics Centurion XVI* en función de los medios de cultivos, lixiviado y concentraciones de cada sustrato. Por lo que generó 8 tratamientos, sin incluir el escalamiento de los tratamientos por el número de cepas identificadas, estos se realizaron por duplicado, considerando 16:8 horas luz: oscuridad en condición autotrófica al utilizar el medio BG11 como medio de cultivo.

Tratamientos	Medio	Luz(Lux)
1	BG11	1000
2	BG11	1000
3	BG11	2000
4	BG11	2000
5	BG11	3000
6	BG11	3000
7	BG11	Ambiente
8	BG11	Ambiente

### 12. Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) con un  $\alpha=0,05$ . Se emplearon análisis de comparaciones múltiples (Test de Tukey y Fisher, Hsu y Dunnett, según el caso) para identificar el mejor tratamiento, con un nivel de confianza del 95%, mediante el programa *Statgraphics Centurion XVI*.

## IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Toma de muestra

Una vez realizada la toma de muestras en los diferentes sitios seleccionados, éstas fueron evaluadas para identificar la presencia de microalgas, de tal forma que se reportan microalgas y cianobacterias que permanecen asociadas en consorcios y las aisladas en los diferentes medios de cultivos, así como también las que se mantienen en las muestras originales. Este estudio, permitió identificar en una primera instancia las poblaciones existentes en los microambientes estudiados, así como el análisis de los medios de cultivo ideales para el aislamiento.

Para tal efecto se recolectaron muestras de 8 lugares correspondientes a 6 ríos, y una galera filtrante y un manantial (Tabla 3)

#### Análisis físicos y químicos de muestras de agua.

En la caracterización fisicoquímica de las áreas hidrográficas del estado de Chiapas, se observó que el río Santo Domingo presentó las mayores concentraciones de nitratos, nitritos y amonio con 0.03, 0.006 y 0.08 mg / l, respectivamente. Sin embargo, la galería de filtración de las aguas residuales "La Chacona" presentó las concentraciones más bajas de nitratos, nitritos, amoníaco y fósforo total con 0.01, 0.002, <0.01 y 0.08 mg / l respectivamente (Tabla 4).

**Tabla 4.** Caracterización fisicoquímica del agua de las diferentes zonas hidrográficas del estado de Chiapas, México.

Áreas evaluadas	Nitratos (mg/L)	Nitritos (mg/L)	Amonio (mg/L)	Fósforo total (mg/L)
Suchiate river	*0,02 <sup>a</sup> ± 0.04	0,003 <sup>ab</sup> ± 0.01	0,04 <sup>b</sup> ± 0.01	0,18 <sup>a</sup> ± 0.02
Nandayapa river	0,02 <sup>a</sup> ± 0.01**	0,003 <sup>ab</sup> ± 0.01	< 0,01 <sup>c</sup> ± 0.00	< 0,02 <sup>d</sup> ± 0.00
Huixtla river	0,02 <sup>a</sup> ± 0.02	0,005 <sup>ab</sup> ± 0.02	< 0,01 <sup>c</sup> ± 0.00	0,12 <sup>b</sup> ± 0.01
Spring water Cahuaré	0,03 <sup>a</sup> ± 0.04	0,004 <sup>ab</sup> ± 0.00	< 0,01 <sup>c</sup> ± 0.00	0,1 <sup>bc</sup> ± 0.01
Novillero river	0,02 <sup>a</sup> ± 0.01	0,005 <sup>a</sup> ± 0.01	< 0,01 <sup>c</sup> ± 0.00	0,1 <sup>bc</sup> ± 0.01
Wastewaters "La chacona"	0,01 <sup>a</sup> ± 0.00	0,002 <sup>b</sup> ± 0,00	< 0,01 <sup>c</sup> ± 0.00	0,08 <sup>c</sup> ± 0.02
Pijijiapan river	0,02 <sup>a</sup> ± 0.01	0,002 <sup>b</sup> ± 0.00	0,04 <sup>b</sup> ± 0.01	0,04 <sup>d</sup> ± 0.02
Santo Domingo river	0,03 <sup>a</sup> ± 0.02	0,006 <sup>a</sup> ± 0.00	0,08 <sup>a</sup> ± 0.02	0,03 <sup>d</sup> ± 0.01

\* Valores medios de tres repeticiones. \*\* Las medias (± error estándar) dentro de cada columna sin superíndice común difieren significativamente en P < 0.05.

El río Santo Domingo presentó las mayores concentraciones de nitrógeno en comparación con las otras áreas hidrográficas. Esto se relaciona con la abundancia relativa en la identificación de morfotipos, ya que fue el área con el mayor número de morfotipos identificados (29%).

## 2. Análisis de minerales en las muestras de agua con un espectrómetro de absorción atómica.

En la evaluación de minerales, las 8 zonas hidrográficas del estado de Chiapas analizadas mostraron concentraciones inferiores a 0.2 mg / l de microelementos como cobre, zinc, hierro y manganeso. Sin embargo, el río Santo Domingo mostró las mayores concentraciones de sodio, potasio, magnesio y calcio con 62.93, 5.46, 34.52 y 48.78 mg / l, respectivamente. Por otro lado, el río Pijijiapan mostró las concentraciones más bajas de sodio, potasio, magnesio y calcio con 8.87, 0.05, 0.81 y 6.59 mg / l, respectivamente (Tabla 5).

**Tabla 5.** Evaluación de la concentración de macroelementos y microelementos de muestras de agua de diferentes zonas hidrográficas del estado de Chiapas, México.

Muestras áreas	Microelementos				Macroelementos			
	Cobre (mg/L)	Zinc (mg/L)	Hierro (mg/L)	Manganeso (mg/L)	Sodio (mg/L)	Potasio (mg/L)	Magnesio (mg/L)	Calcio (mg/L)
Río Suchiate	< 0.2 <sup>a*</sup> ± 0.01	< 0.2 <sup>a</sup> ± 0.01	< 0.2 <sup>a</sup> ± 0.00	< 0.2 <sup>a</sup> ± 0.01	17,09 <sup>d</sup> ± 0.11	2,77 <sup>ab</sup> ± 0.01	5,89 <sup>d</sup> ± 0.02	14,36 <sup>c</sup> ± 0.11
Río Nandayapa	< 0.2 <sup>a</sup> ± 0.01	< 0.2 <sup>a</sup> ± 0.01	< 0.2 <sup>a</sup> ± 0.01	< 0.2 <sup>a</sup> ± 0.11	57,87 <sup>b</sup> ± 0.12	4,13 <sup>a</sup> ± 0.12	21,45 <sup>b</sup> ± 0.16	51,06 <sup>a</sup> ± 0.15
Río Huixtla	< 0.2 <sup>a</sup> ± 0.03 <sup>**</sup>	< 0.2 <sup>a</sup> ± 0.00	< 0.2 <sup>a</sup> ± 0.01	< 0.2 <sup>a</sup> ± 0.00	23,71 <sup>c</sup> ± 0.03	2,76 <sup>ab</sup> ± 0.11	13,74 <sup>c</sup> ± 0.04	13,78 <sup>c</sup> ± 0.12
Manantial Cahuaré	< 0.2 <sup>a</sup> ± 0.02	< 0.2 <sup>a</sup> ± 0.01	< 0.2 <sup>a</sup> ± 0.02	< 0.2 <sup>a</sup> ± 0.02	17,06 <sup>d</sup> ± 0.17	2,41 <sup>ab</sup> ± 0.10	14,97 <sup>c</sup> ± 0.09	45,62 <sup>a</sup> ± 0.13
Río Novillero	< 0.2 <sup>a</sup> ± 0.01	< 0.2 <sup>a</sup> ± 0.02	< 0.2 <sup>a</sup> ± 0.01	< 0.2 <sup>a</sup> ± 0.01	9,07 <sup>e</sup> ± 0.14	0,92 <sup>b</sup> ± 0.01	1,63 <sup>e</sup> ± 0.02	15,06 <sup>c</sup> ± 0.09
Galera filtrante "La chacona"	< 0.2 <sup>a</sup> ± 0.01	< 0.2 <sup>a</sup> ± 0.01	< 0.2 <sup>a</sup> ± 0.00	< 0.2 <sup>a</sup> ± 0.00	10,82 <sup>e</sup> ± 0.08	1,69 <sup>b</sup> ± 0.11	13,51 <sup>c</sup> ± 0.11	40,50 <sup>b</sup> ± 0.12
Río Pijijiapan	< 0.2 <sup>a</sup> ± 0.00	< 0.2 <sup>a</sup> ± 0.03	< 0.2 <sup>a</sup> ± 0.03	< 0.2 <sup>a</sup> ± 0.02	8,87 <sup>e</sup> ± 0.07	0,05 <sup>c</sup> ± 0.09	0,81 <sup>e</sup> ± 0.01	6,59 <sup>d</sup> ± 0.09
Río Santo Domingo	< 0.2 <sup>a</sup> ± 0.01	< 0.2 <sup>a</sup> ± 0.02	< 0.2 <sup>a</sup> ± 0.00	< 0.2 <sup>a</sup> ± 0.00	62,93 <sup>a</sup> ± 0.14	5,46 <sup>a</sup> ± 0.14	34,52 <sup>a</sup> ± 0.12	48,78 <sup>a</sup> ± 0.11

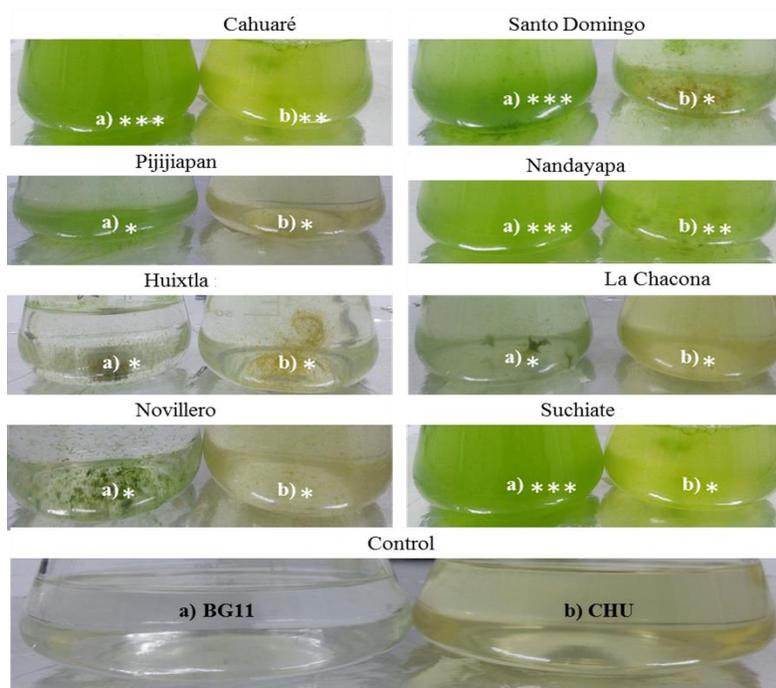
\* Valores medios de tres repeticiones. \*\* Las medias (± error estándar) dentro de cada columna sin superíndice común difieren significativamente en P < 0.05.

Por lo tanto, en el presente trabajo de investigación, se demuestra que la riqueza de nutrientes de las diferentes áreas hidrográficas permite la identificación de la dinámica poblacional de las microalgas en grupos taxonómicos específicos, como lo demostraron Domenighini y Giordano (2009). Mostraron que es posible identificar con precisión las especies según el estado nutricional de su entorno familiar (por ejemplo, la fuente de N) además de la evaluación de la biodiversidad en muestras de fitoplancton natural, que

permite el control de la calidad del agua del ambiente natural. Por otro lado, Garrido-Pérez et al. (2003) también realizaron un análisis del estado nutricional del agua (oligotrofia final de la eutrofia) como un bioensayo para la identificación de microalgas marinas, generando una relación entre la calidad biológica del agua y los morfotipos demostrando que esta riqueza nutricional comprende un rango taxonómico específico.

### 3. Aislamiento, purificación, identificación y determinación del tamaño de las microalgas.

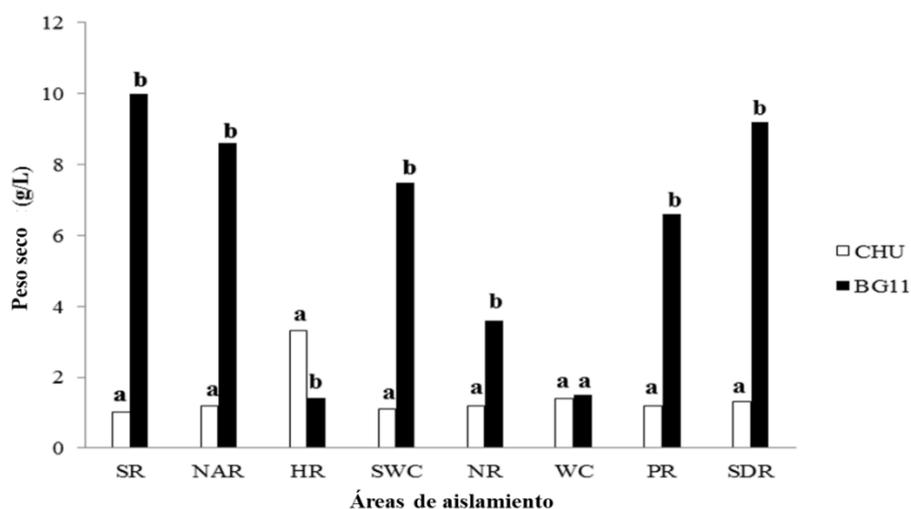
En nuestro estudio, se aislaron más de veintidós aislamientos de las muestras de agua recolectadas, pero solo se seleccionaron trece aislamientos de microalgas axénicas y se subcultivaron en medios de aislamiento específicos (BG11) y se mantuvieron en un refrigerador para investigación adicional debido a su pureza. El aislamiento de microalgas se desarrolló con el uso de medios de cultivo BG11 y CHU, de los cuales, después de un período de 90 días con un fotoperíodo de 12/12, se demostró que el medio más eficaz para el aislamiento de microalgas era el medio BG11 con 80.53% de efectividad. Sin embargo, el medio CHU fue eficiente en 19,46%, mostrando una diferencia estadísticamente significativa con  $\alpha = 0,05$  (Fig. 6).



**Figura 6.** Evaluación visual de la eficiencia para el aislamiento en medios de cultivo BG11 (a) y CHU (b) a partir de la producción de biomasa microalgal; el nivel de concentración se observa con el número de asteriscos: \*\*\* Alta concentración; \*\* Concentración media; \* Baja concentración.

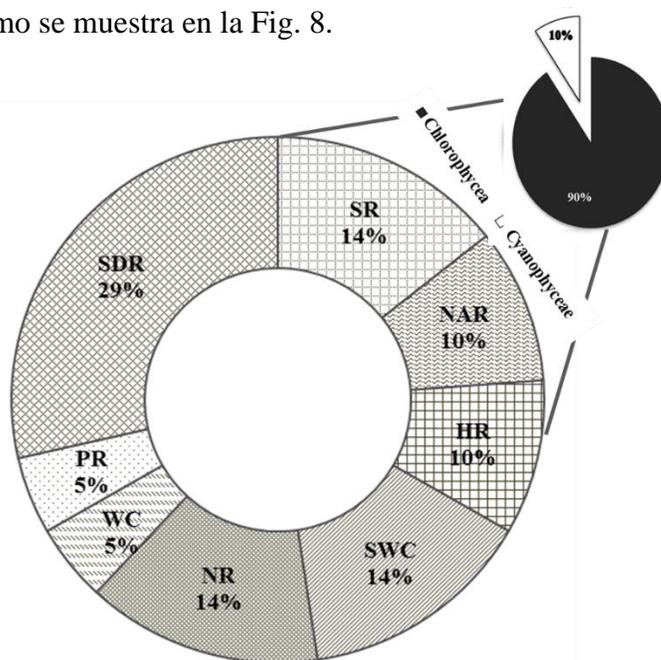
En la Fig. 7, se observa que, los ríos Suchiate y Santo Domingo, presentaron un mayor crecimiento de la biomasa microalgal en medio BG11 a los 90 días de la inoculación. El fenómeno observado fue demostrado por Ambrosio et al. (2017), al evaluar la ingeniería metabólica en la absorción y asimilación de nitrógeno y carbono en plantas y microalgas, para incluir fuentes de C y N, dando como resultado una fuerte proliferación de microalgas. Para lograr un crecimiento óptimo de las microalgas, es importante determinar la cantidad de diferentes nutrientes que se agregarán en el medio de cultivo. Los nutrientes más importantes son aquellos que representan fuentes de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo (Bilanovic et al. 2016), por lo que el medio BG11 tiene concentraciones más altas de N y C en 6 de sus compuestos químicos, mientras que el medio CHU incluye estos elementos en 4 de sus moléculas químicas (Patel et al. 2015).

A nivel del metabolismo, el carbono es vital para las microalgas como generador de energía del ciclo de Calvin (Soreanu et al. 2017). Por otro lado, el nitrógeno suministrado a las microalgas en el medio de cultivo le permite producir proteínas que forman parte de la biomasa (Breuer et al. 2012). Como muestra Pancha et al. (2014), sus resultados revelaron que la limitación de nitrógeno y las condiciones secuenciales de inanición de nitrógeno redujeron significativamente la actividad fotosintética y, por lo tanto, la producción de biomasa microalgal de *Scenedesmus* sp.



**Figura 7.** Evaluación de la producción de biomasa de microalgas en medio BG11 y CHU después de un período de 90 días con un fotoperíodo de 12/12 para las diferentes áreas hidrográficas del estado de Chiapas: SR: Río Suchiate; NAR: río Nandayapa; HR: río Huixtla; SWC: Agua de manantial Cahuaré; NR: río Novillero; WC: Aguas residuales "La chacona"; PR: río Pijijiapan; SDR: río Santo Domingo. Las barras son + una desviación estándar. Los valores corresponden al promedio de tres replicas. Los medios seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Después de un período de 90 días con un fotoperíodo 12/12, se desarrolló la evaluación del medio BG11 y CHU para determinar la efectividad de ambos medios en la producción de biomasa microalgal que permitió la identificación de los morfotipos existentes de microalgas. Para ese efecto, se demostró una mayor producción de biomasa de microalgas en el medio BG11 de 1,4 a 10 g, mientras que el medio CHU mostró una producción de 1 a 1,4 g de biomasa de microalgas, por lo que se observó una diferencia estadística significativa entre los dos medios. Por lo tanto, el medio BG11 es el mejor medio para el aislamiento y la producción de biomasa. Se observó que, en el río Suchiate y en el río Santo Domingo, se demostró un mayor crecimiento de la biomasa microalgal en el medio BG11 con 10 y 9.2 g, respectivamente, después de 90 días de inoculación (Fig. 7). De las muestras de agua analizadas, se aislaron 13 morfotipos de microalgas. De los consorcios de microalgas identificados, el 90,47% de un total de 21 microorganismos están compuestos por microalgas pertenecientes a la clase Chlorophyceae y el 9,52% corresponde a la clase Cyanophyceae, como se muestra en la Fig. 8.



**Figura 8.** Abundancia relativa de los morfotipos y clases de microalgas identificadas en las diferentes zonas hidrográficas evaluadas en el estado de Chiapas. SR: río Suchiate; NAR: río Nandayapa; HR: río Huixtla; SWC: Agua de manantial Cahuaré; NR: río Novillero; WC: Aguas residuales "La chacona"; PR: río Pijiapan; SDR: río Santo Domingo.

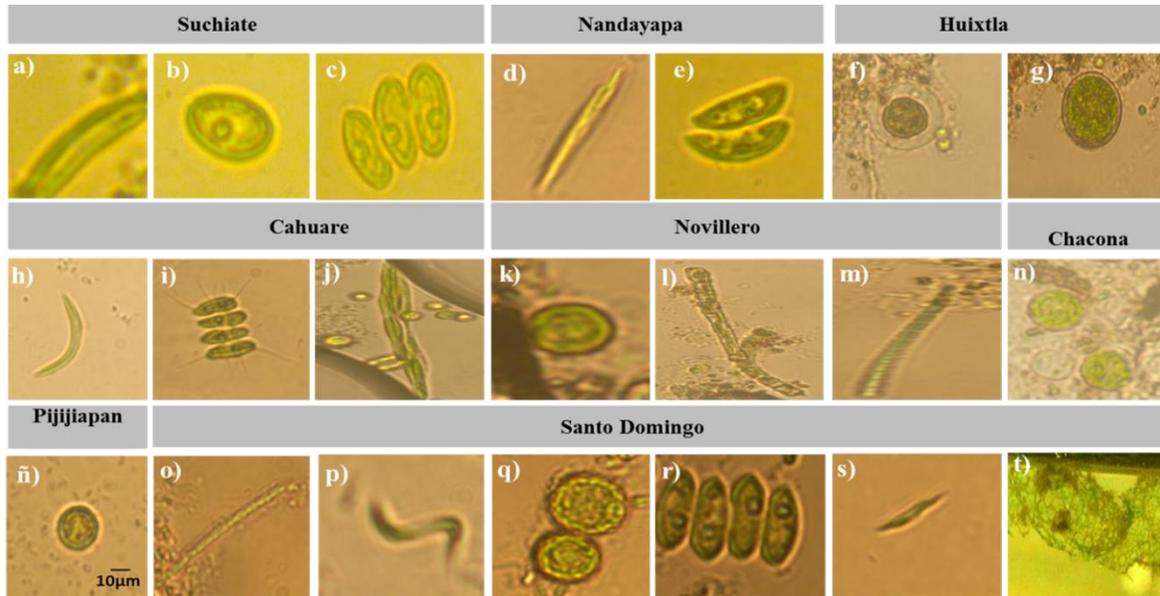
Es importante mencionar que las áreas con la mayor riqueza específica de microalgas fueron el río Santo Domingo del municipio de Chiapa de Corzo con 6 morfotipos identificados correspondientes al 28.57%, seguido del río Suchiate del municipio de Suchiate con 3 morfotipos identificados correspondientes al 14,28% de la abundancia relativa (Fig. 8). El río Santo Domingo fue el área con

el mayor número de morfotipos identificados, los resultados muestran la importancia del nitrógeno, según lo explicado por Yuan et al. (2014) quienes establecieron que el nitrógeno es un elemento fundamental para la formación de proteínas y ácidos nucleicos, ya que forman parte integral de moléculas esenciales como el ATP, el portador de energía en las células. Breuer et al. (2012) también mencionan que el nitrógeno suministrado a las microalgas en el medio de cultivo le permite producir proteínas y nucleótidos que forman parte de la biomasa. Cuando se suministran nitratos al medio de cultivo, las microalgas desnitrifican el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) al nitrógeno inorgánico (N); una vez que se obtiene el nitrógeno inorgánico, entra como  $\text{NH}_4^+$  en las proteínas microalgales. Es importante mencionar que otro factor que favorece la riqueza de los morfotipos identificados en el río Santo Domingo se asocia con una concentración adecuada de amonio, según lo establecido por Ayre et al. (2017). Otro elemento importante para la producción de microalgas es el fósforo porque es un macroelemento que se encuentra en proporciones más pequeñas que el resto en la biomasa y es utilizado por las microalgas en la síntesis de enzimas, lípidos y ácidos nucleicos (Xin et al. 2010, Tan et al. 2016). Por lo tanto, la relación correcta entre N y P es muy importante para garantizar la producción de biomasa de microalgas (Pereira et al. 2016), como lo demuestra Myint (2014), quienes mencionan que es conveniente manejar una proporción de óptima de nitrógeno y fósforo. (N: P) para el crecimiento de microalgas (7: 1). Según lo mencionado anteriormente, en la Tabla 4, se observa que la relación N: P es 3: 1 para el río Santo Domingo, por lo que es la zona hidrográfica con la mejor relación N: P cercana a la relación óptima para la producción de Biomasa microalgal.

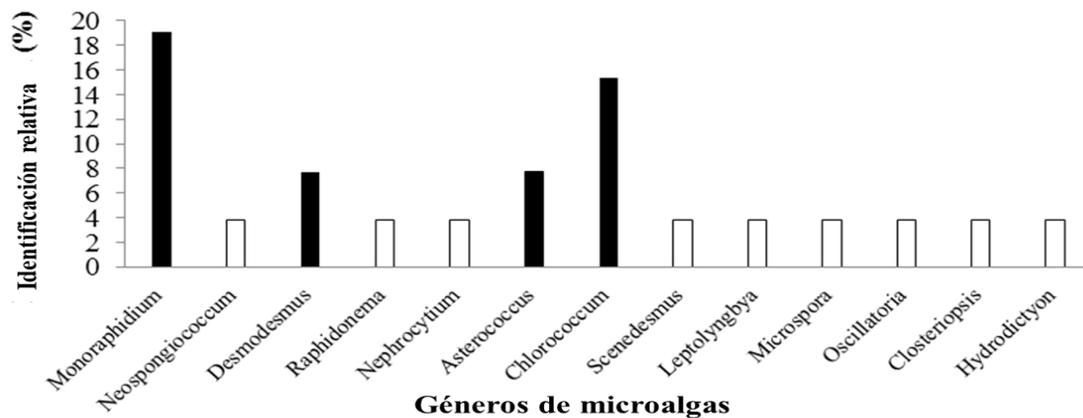
De acuerdo con los resultados obtenidos en la Tabla 5, el río Santo Domingo mostró altas concentraciones de sodio, potasio, magnesio y calcio, lo que permitió la abundancia relativa de los morfotipos identificados como lo mencionaron Hussain et al. (2017) quienes establecieron que los nutrientes presentes en el medio de cultivo mantienen la presión osmótica y el equilibrio de electrolitos. Algunos nutrientes forman parte de la biomasa de las proteínas, especialmente el ion Mg que se encuentra en el centro del núcleo de porfirina de las clorofilas, que son actores importantes en el proceso de la fotosíntesis. Por lo tanto, los microelementos como Mn, Cu, Co y Zn actúan como co-factores para las enzimas, produciendo vitaminas y manteniendo la pared celular. Su concentración en el medio de cultivo es tan baja que su exceso puede ser tóxico para las microalgas, dado las condiciones de las diferentes áreas hidrográficas del estado de Chiapas que se han evaluado con una baja concentración de microelementos, fue posible identificar las microalgas (Valverde- Pérez et al. 2015).

De acuerdo con el examen morfológico bajo un microscopio basado en formas de células, se identificaron catorce microalgas aisladas como: *Monoraphidium contortum*, *Neosporangium*

*gelatinosum*, *Desmodesmus serratus*, *Raphidonema nivale*, *Nephrocytium lunatum*, *Asterococcus superbis*, *Chlorococcum echinozygotum*, *Scenedesmus quadricauda*, *Monoraphidium griffithii*, *Leptolyngbya sp.*, *Microspora floccosa*, *Oscillatoria brevis*, *Closteriopsis acicularis* and *Hydrodictyon reticulatum*. Los morfotipos mencionados anteriormente se muestran en la Fig. 9.



**Figura 9.** Las microalgas se identificaron en las diferentes zonas hidrográficas del estado de Chiapas utilizando una FlowCam acoplada a un microscopio (100x). Río Suchiate: a) *Monoraphidium contortum*; b) *Neosporangiococcum gelatinosum*; c) *Desmodesmus serratus*; Río Nandayapa: d) *Raphidonema nivale*; e) *Nephrocytium lunatum*; Río Huixtla: f) *Superbus Asterococcus*; g) *Chlorococcum echinozygotum*; Agua de manantial Cahuaré: h) *Monoraphidium contortum*; i) *Scenedesmus quadricauda*; j) *Monoraphidium griffithii*; Río Novillero: k) *Chlorococcum echinozygotum*; l) *Leptolyngbya sp.*; m) *Microspora floccosa*; Aguas residuales "La chacona": n) *Asterococcus superbis*; Río Pijijiapan: ñ) *Chlorococcum echinozygotum*; Río Santo Domingo: o) *Oscillatoria brevis*; p) *Monoraphidium contortum*; q) *Chlorococcum echinozygotum*; r) *Desmodesmus serratus*; s) *Closteriopsis acicularis*; t) *Hydrodictyon reticulatum*.



**Figura 10.** Evaluación de la producción de biomasa de microalgas en medio BG11 y CHU después de un período de 90 días con un fotoperíodo de 12/12 para las diferentes áreas hidrográficas del estado de Chiapas: SR: Río Suchiate; NAR: río Nandayapa; HR: río Huixtla; SWC: Agua de manantial Cahuaré; NR: río Novillero; WC: Aguas residuales "La chacona"; PR: río Pijijiapan; SDR: río Santo Domingo. Las barras son + una desviación estándar. A significa valores de tres réplicas. Los medios seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes (valor de  $p < 0,05$ ).

Como puede verse en la figura 10, hay una gran diversidad de morfotipos de microalgas con características específicas; sin embargo, es importante mencionar que se identificaron 13 géneros diferentes, de los cuales cuatro tenían mayor abundancia, siendo *Monoraphidium* y *Chlorococcum* con 18% y 16%, respectivamente, y los géneros *Asterococcus* y *Desmodesmus* con 7.69%.

De los 14 morfotipos identificados, las mediciones tenían entre 10  $\mu\text{m}$  y 150  $\mu\text{m}$  de longitud. Los morfotipos identificados de mayor tamaño fueron *Monoraphidium griffithii* y *Microspora floccosa* con 50 y 150  $\mu\text{m}$ , respectivamente, ambos correspondientes a la clase Chlorophyceae (Tabla 6), lo cual coincide con Romero et al. 2012, quienes desarrollaron la identificación taxonómica de los actinomicetos marinos por medio de un análisis morfológico en primer lugar y la selección se llevó a cabo a través de una selección rápida de cepas por inspección visual del color. Wu et al. 2013 también realizó el análisis microscópico de luz de las muestras de microalgas aisladas, lo que permitió la identificación morfológica del género *Cosmarium*.

Los géneros identificados forman parte de la clase de cloroficia cuya abundancia fue evaluada por Blokker et al. (1998) quienes demostraron que las paredes celulares de microalgas de agua dulce frescas o residuales están compuestas por biopolímeros alifáticos altamente resistentes, no hidrolizables por degradaciones térmicas y químicas. Los biopolímeros están compuestos por largas cadenas de ácidos grasos que varían en longitud (de 30 a 34 átomos de carbono). Estos monómeros intermoleculares unidos por un grupo éster forman cadenas lineales que resisten las insaturaciones. La naturaleza de estas algas poliéteres las hace altamente resistentes a la degradación, por lo que se conservan en ríos con flujo residual o flujos de alta carga contaminante (Cardoso et al. 2012), características que predominan en los ríos del estado de Chiapas, analizadas en el presente estudio.

**Tabla 6.** Análisis de los morfotipos identificados en las zonas hidrográficas del estado de Chiapas de acuerdo al entorno de aislamiento, clase, tamaño y características morfológicas.

N.	Nombre	Clase	Medio ambiente	Tamaño (µm)	Características	Referencias
1	<i>Monoraphidium contortum</i> ID: 307511*		Agua dulce	40	Posee un cuerpo fusiforme, estrecho hacia los extremos, de punta afilada, es sigmoide además contiene dos cloroplastos parietales	Fawley et al. 2006
2	<i>Neosporangiococcum gelatinosum</i> ID: 1158268		Terrestre	21	Especie multinucleada, formada por una rígida pared, se caracteriza por ser individualista y mantenerse dentro de una esfera gelatinosa	Guiry et al. 2017
3	<i>Desmodesmus serratus</i> ID: 91204	C	Agua dulce	26	Cenobios de 2-4-8 células lineales. Células ovoides con 1-4 dientes en los extremos que son redondeados o truncados, paredes externas convexas	Tsarenko et al. 2011
4	<i>Raphidonema nivale</i> ID: 155715	L O R	Agua dulce / especies terrestres	20	Estructura filamentososa, formando un cenocito no tabicado de color verde de aproximadamente 0.5µm de grosor con una punta polar	Hu et al. 2006 John, 2011
5	<i>Nephrocytium lunatum</i> ID: 1662585	O P	Agua dulce	31	Colonias de 2-4 células, incrustado dentro de una vaina gelatinosa; cuerpo de celda en forma de media luna, contiene una sola placa como cloroplasto con un pirenoide	Freire-Nordi et al. 2003
6	<i>Asterococcus superbis</i> ID: 269637	H Y C	Agua dulce	25	El cuerpo es esférico y elipsoidal. Posee una pared celular lisa y transparente que contiene un único cloroplasto estrellado, un sólo núcleo y dos vacuolas contráctiles	Korshikov. 1953; Massjuk and Lilitska, 2011
7	<i>Chlorococcum echinozygotum</i> ID: 48000	E A	Una especie terrestre	15	Células casi esféricas. Membrana no engrosada en una papila anterior. Cloroplasto con un gran pirenoide. Mancha ocular grande.	O'Kelley, 1984 Wu et al. 1970
8	<i>Scenedesmus quadricauda</i> ID: 3089	E	Agua dulce	15	Individuo colonial, constituido por 4, 8 ó 12 células. Las células centrales son alargadas y sin apéndices, las terminales, se abomban en el centro y presentan dos espinas que se proyectan hacia el exterior.	Korshikov, 1953; Day et al. 1995
9	<i>Monoraphidium griffithii</i> ID: 307514		Agua dulce	50	Células fusiformes, rectas, más de 12 veces más largas que anchas (50-72 x 1,5-4,5 µm), atenuadas hacia los extremos y terminadas en una corta punta. Cloroplasto parietal claramente constricto en el centro y sin pirenoide	Fawley et al. 2006
10	<i>Hydrodictyon reticulatum</i> ID: 3107		Agua dulce y residuales	30	Tiene forma de red transparente con tonalidad verde en forma de saco con miles de células cilíndricas a oblongo-oval, con paredes gruesas y angulares	Buchheim et al. 2005; Tsarenko, 2011.
11	<i>Microspora floccosa</i> ID: 1603044		Agua dulce	150	Hilera verde en forma de H, formada por células cilíndricas, los extremos de los filamentos presentan un disco adhesivo con el que se fijan, los cloroplastos no encierran pirenoides	Prescott, 1962; Tsarenko, 2011
12	<i>Closteriopsis acicularis</i> ID: 82138		Agua dulce	10	Tallos unicelulares de puntas alargadas y puntiagudas, cloroplastos parietales o centrales en forma de banda, formados por múltiples pirenoides de 2 a 14.	Guiry et al. 2017;



13	<i>Oscillatoria brevis</i> ID: 177969	C Y A N O P	Agua dulce	70	Cada filamento consta de tricomas que se compone de filas de células, formada por fragmentos llamados hormogonias. La punta de la tricoma oscila como un péndulo, de color marrón verde.	Geitler, 1932; Whitton et al. 2011
14	<i>Leptolyngbya sp.</i> ID: 47254	H Y C E A E	Agua dulce o residual	62	Filamentos largos, solitarias o enrollados en grupos y esteras finas formada por vainas facultativos generalmente incoloros unidos a los tricomas o ligeramente distante de ellos, están constituidos por células apicales redondeadas	Komárek, & Marvan, 1992

\* ID de taxonomía del NCBI (Recursos de Información)

Las algas se identificaron a través del análisis morfológico basado en las características generales de las algas de agua dulce que aparecen con mayor frecuencia y están descritas por Bellinger y Sigeo (2010) Ettl y Schlösser (1992) y Wehr y Sheath (2003). La observación morfológica se realizó mediante microscopía de campo de luz, según el tamaño y la comparación con registros generales de bases de datos taxonómicas externas como “AlgaeBase” (<http://www.algaebase.org>) y la base de datos de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), los autores Eibl et al. (2014) mencionaron que estos datos son relevantes e importantes para la identificación de nuevos morfotipos (Tabla 6).

#### 4. Especies de microalgas afines a la producción de biodiesel

De las 13 especies identificadas en el presente estudio, 5 se han estudiado para identificar ácidos grasos para la producción de biodiesel, de modo que en la Tabla 5 se puede observar que el contenido de lípidos en las microalgas identificadas de las áreas hidrográficas del estado de Chiapas puede ser de 2% a 90%, según estudios desarrollados por Bogen et al. (2013), Rajab Aljuboori et al. (2016), Bonnefond et al. (2016) y Sattar Memon et al. (2016), siendo *Chlorococcum* y *Monoraphidium* los más abundantes en este estudio, con importantes contenidos de lípidos informados (Tabla 7).

**Tabla 7.** Contenido lipídico de algunas microalgas identificadas en zonas hidrográficas del estado de Chiapas

Especie	Contenido de lípidos (%)	Referencias
<i>Monoraphidium contortum</i>	2 - 20	Bogen et al. 2013
<i>Chlorococcum echinozygotum</i>	10 - 43	Graef et al. 2009
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	11- 55	Aljuboori et al. 2016
<i>Microspora floccosa</i>	04 - 90	Memon et al. 2016
<i>Dunaliella salina</i>	09 - 47	Bonnefond et al. 2016

Al observar el potencial de *Microspora floccosa* para producir hasta un 90% de los lípidos, podemos generar una relación entre los nutrientes presentes en el medio del cual se aislaron. Así, observamos que este morfotipo proviene del río Novillero, que se caracteriza por bajas concentraciones de nitrato, nitrito y amonio con 0.02, 0.005 y <0.001 mg / l, respectivamente, y la concentración más baja de sodio con 9.07 mg / l, por lo que esta relación beneficia la síntesis de lípidos a favor de la producción de bioenergética como lo demuestran Liang et al. (2017). Se sugirió que las bajas salinidades y la falta de nitrógeno se consideran formas eficaces para estimular la acumulación de lípidos en *D-tertiolecta*. Por lo tanto, *Microspora floccosa* es una microalga con potencial para la producción de biodiesel (Tabla 7).

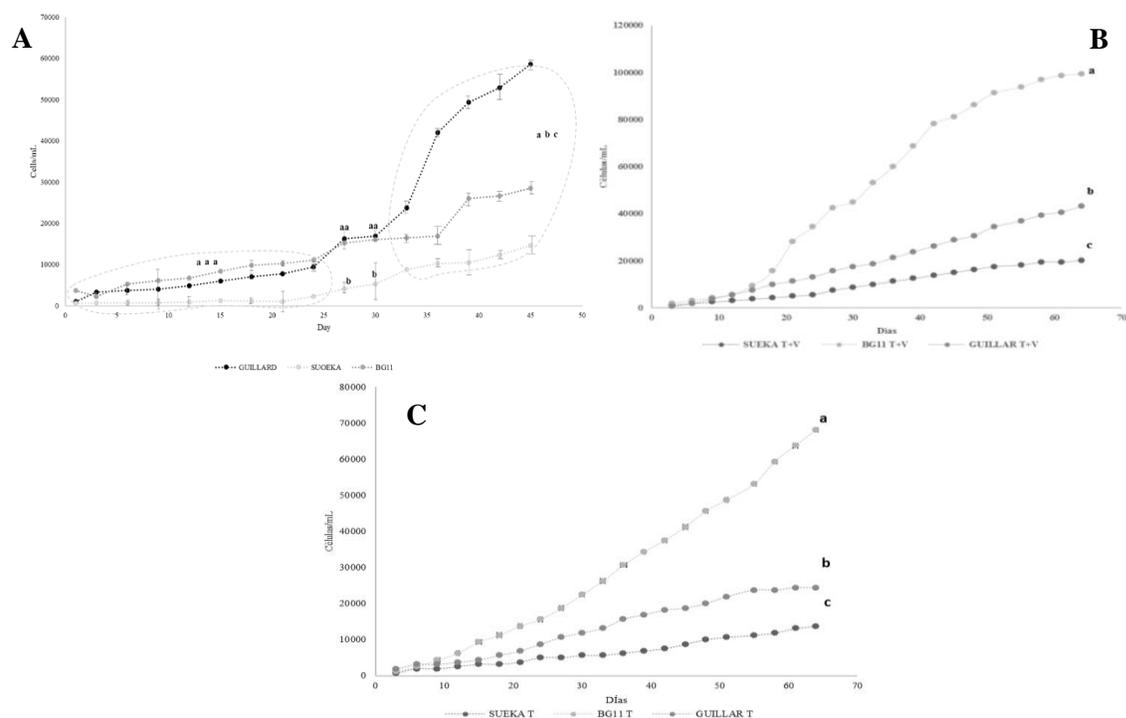
Es importante mencionar que la identificación de nuevos morfotipos en diferentes espacios hidrográficos genera un área de investigación científica para identificar el potencial biotecnológico de las microalgas asociadas con la alta generación de lípidos, proteínas, pigmentos o como microorganismos ambientalmente beneficiosos involucrados en los procesos de biorremediación. Por lo tanto, los nuevos aislamientos también permiten observar la evolución taxonómica de las clases de microalgas, lo que demuestra la conservación, pérdida y / o aparición de biomoléculas (Bogen et al. 2013a, Serive et al. 2017, Bogen et al. 2013b).

*Verrucodesmus* es un género de microalgas clorofíceas que se caracteriza por presentar un rápido crecimiento en cultivo celular por lo que tiene la capacidad de utilizar como sustrato nutricional compuestos orgánicos e inorgánicos (Wehr & Sheath, 2003; Xu et al. 2006; Chinnasamy, 2010).

## 5. Evaluación en condiciones autotróficas

### *Análisis de la densidad celular y parámetros cinéticos de crecimiento*

Se evaluó el crecimiento de *Verrucodesmus verrucosus* y del morfotipo *T* aislado de la zona hidrográfica del municipio de Tapachula, Chiapas, estos morfotipos están formados por una pared rígida, se caracterizan por ser individualistas y forman parte de las microalgas verdes clorofíceas, ambas se evaluaron en condiciones autotróficas con el uso de los medios BG11, Guillard y Suoeka durante 8 semanas con ciclos 12:12 luz / oscuridad. En la figura 26 se observa que el medio Suoeka permanece en una etapa de adaptación por 25 días a diferencia de los otros medios donde la etapa de adaptación fue menor a los 10 días. Los medios de cultivos evaluados demostraron la etapa de crecimiento exponencial a los 13 días, por lo que antes del día 30 no se demostró diferencias estadísticas significativas entre los tres medios de cultivo evaluados, sin embargo, a partir del día 33 el medio Guillard demostró diferencias estadísticas significativa produciendo una biomasa de  $6 \times 10^4$  células/mL (Figura 11).



**Figura 11.** Evaluación de la cinética de crecimiento de *Verrucodesmus verrucosus* (A), Morfotipo *T* (B) y mezcla de los morfotipos (C) en condiciones de crecimiento autotrófico. Los promedios de tres repeticiones ( $\pm$  error estándar) por cada punto, superíndice común no difieren significativamente a  $P < 0.05$ .

En este primer ensayo se analizó la cinética de crecimiento de los medios de cultivo que generan una condición autotrófica por lo que se identificaron diferencias significativas entre los tratamientos con un valor  $P=0,005$  en el ANOVA. Las pruebas de comparaciones múltiples de Dunnet, indican que el medio Guillard superó ampliamente las demás fuentes de nutrientes (Tabla 8). La densidad celular máxima para el medio Guillard fue de  $5.8 \times 10^4$  células/mL con un tiempo de generación de 7.56 días y una velocidad específica de crecimiento de 0.90 generaciones/día superando al medio Sueoka y BG11.

La eficiencia del medio de cultivo Guillard evaluado en este trabajo concuerda con lo reportado por Ortiz-Moreno et al. (2012) quienes evaluaron la producción de *C. sorokiniana* en condición autotrófica, por lo que recomienda el uso de Guillard en bajas concentraciones (1g/L) como la mejor opción para la producción masiva de biomasa microalgal.

**Tabla 8.** Parámetros cinéticos de crecimiento de *Verrucodesmus verrucosus* (A), Morfotipo T (B) y mezcla de los morfotipos (C) en diferentes medios de cultivo en condiciones autotrófica

Medio de cultivo	Densidad celular inicial en la fase exponencial (Células/ml)	Densidad celular final en la fase exponencial (Células/ml $\times 10^4$ )	Velocidad de crecimiento (Generaciones/día)	Tiempo de generación (Días)	Número de generación
<i>V. verrucosus</i> (V)					
<b>GUILLARD</b>	$1042 \pm 0.02^b$	$*6.0 \pm 0.01^a$	$0.90 \pm 0.01^a$	$7.56 \pm 0.11^a$	$6.81 \pm 0.02^a$
<b>SUOEKA</b>	$625 \pm 0.01^c$	$1.4 \pm 0.02^c$	$0.78 \pm 0.02^c$	$6.52 \pm 0.05^c$	$5.90 \pm 0.01^b$
<b>BG11</b>	$3750 \pm 0.12^a$	$2.8 \pm 0.11^b$	$0.64 \pm 0.04^b$	$5.37 \pm 0.06^b$	$4.84 \pm 0.03^c$
<i>Morfotipo</i> (T)					
<b>GUILLARD</b>	$1775 \pm 0.11^a$	$2.4 \pm 0.12^b$	$0.041 \pm 0.11^b$	$16.66 \pm 0.14^b$	$3.77 \pm 0.11^b$
<b>SUOEKA</b>	$1625 \pm 0.06^a$	$1.3 \pm 0.02^c$	$0.033 \pm 0.10^c$	$20.48 \pm 0.13^a$	$3.08 \pm 0.14^b$
<b>BG11</b>	$1550 \pm 0.04^a$	$6.8 \pm 0.01^a$	$0.060 \pm 0.11^a$	$11.54 \pm 0.11^c$	$5.45 \pm 0.08^a$
<i>Mezcla</i> (V+T)					
<b>GUILLARD</b>	$1625 \pm 0.01^a$	$4.3 \pm 0.02^b$	$0.052 \pm 0.12^b$	$13.31 \pm 0.09^b$	$4.73 \pm 0.07^c$
<b>SUOEKA</b>	$1650 \pm 0.02^a$	$2.0 \pm 0.03^c$	$0.039 \pm 0.07^c$	$17.50 \pm 0.07^c$	$3.59 \pm 0.05^b$
<b>BG11</b>	$1745 \pm 0.12^a$	$9.9 \pm 0.04^a$	$0.064 \pm 0.09^a$	$10.80 \pm 0.06^a$	$5.83 \pm 0.06^a$

\* Media de tres repeticiones. \*\* Los promedios ( $\pm$  error estándar) dentro de cada columna sin superíndice común difieren significativamente a  $P < 0.05$ .

## 6. Caracterización fisicoquímica del lixiviado

El análisis bromatológico del lixiviado proveniente de un biodigestor demostró ser una fuente de nutrientes que aporta 0.43% de nitrógeno en forma de proteína y 0.12% de minerales en la forma de cenizas (Tabla 9). El análisis fisicoquímico del lixiviado mostró un pH ácido (6,5 unidades de pH), con un alto contenido de sólidos totales (1116 mg/L) y alta turbidez (5720 NTU).

**Tabla 9.** Análisis bromatológico del lixiviado de un biodigestor y de lombricomposta

Parámetro	Lixiviado de biogás	Lixiviado de lombricomposta
Nitrógeno	0.43%	0.53%
Amonio	0.03g/L	0.13g/L
Fosforo	0.02g/L	0.12 g/L
Cenizas	0.12%	22.01%
C.O	7.40%	6.80%
M.O	12.76%	10.92%
C/N	17.22	15.89
Turbidez	5720 NTU	3720 NTU
ST	1116mg/L	998 mg/L
pH	6.5	6.0

NTU: Unidades Nefelométricas de Turbidez; C.O: Carbono orgánico;  
C/N: Relación carbono nitrógeno; pH: Potencial de hidrógeno; ST: Sólidos totales

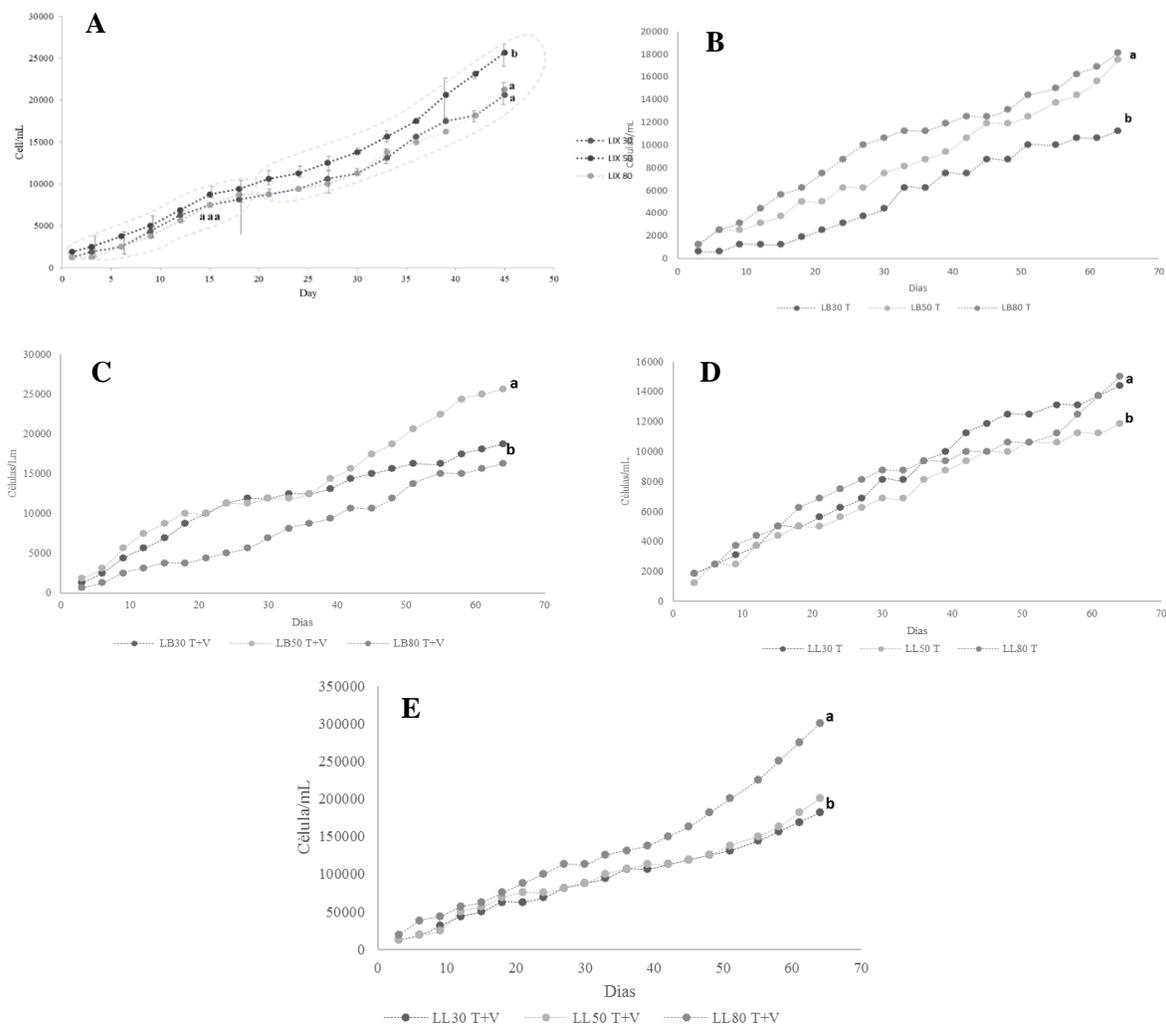
Analizando que el lixiviado es considerado un medio para el crecimiento de microalgas se identificó una concentración muy baja de fósforo lo cual limita la producción de biomasa pues es un elemento fundamental en muchos procesos celulares, tales como la formación de ácidos nucleicos y transferencia de energía (Grobbelaar, 2004), su deficiencia en el medio de cultivo es una de las mayores limitaciones al crecimiento.

## 7. Condición de crecimiento mixotrófico

### *Análisis de la densidad celular y parámetros cinéticos de crecimiento*

En la producción industrial de biomasa de microalgas se requiere utilizar un medio de cultivo que ofrezca los nutrientes necesarios para el adecuado crecimiento de algas a bajo costo. Los lixiviados constituyen una alternativa viable para reducir los costos en el cultivo de microalgas, pero estos sustratos deben ser pretratados adecuadamente para obtener los resultados deseados (Vasquez, 1994; Travieso et al. 2006; Rosales et al. 2007; Kumar et al. 2010).

Para tal efecto se evaluaron tres medios de cultivos que condicionan a *Verrucodesmus verrucosus* en un ambiente mixotrófico, los medios de cultivos están enriquecidos por un lixiviado obtenido del proceso de fermentación de un biodigestor, dichos lixiviados se evaluaron en tres concentraciones a 30, 50 y 80%. Es importante mencionar que *V. verrucosus* se adaptó en condiciones mixotróficas por lo que su plasticidad metabólica le permite adaptarse a diferentes ecosistemas y procesos biotecnológicos, generando biomasa (Chisti, 2007). En la figura 12 se observa que el lixiviado a una concentración del 50% demuestra mayor producción de biomasa microalgal ( $2.5 \times 10^4$  células/mL), sin embargo, no se demostró diferencia estadística significativa con los medios de cultivo enriquecidos con lixiviados al 30 y 80%.



**Figura 12.** Evaluación de la cinética de crecimiento de *Verrucodesmus verrucosus* (A), Morfotipo T (B y D) y mezcla de los morfotipos (C y E) en condiciones de crecimiento mixotrófico en lixiviado del biodigestor (LB) y lixiviado de lombricomposta (LL) al 30%; 50% y 80%. Los promedios de tres repeticiones ( $\pm$  error estándar) por cada punto, superíndice común no difieren significativamente a  $P < 0.05$ .

En el segundo ensayo se comparó la cinética de crecimiento de los medios de cultivo que generan una condición heterotrófica, identificando diferencias significativas entre los medios de cultivo con lixiviado al 30% y 50%, así también entre los medios de cultivo a una concentración del 80% y 50% de lixiviado, sin embargo, no se demostró diferencias estadísticas significativas entre los medios de cultivo enriquecidos con lixiviado a una concentración de 30% y 80% con un valor  $P=0,005$  en el ANOVA. Las pruebas de comparaciones múltiples de Dunnet, indican que el medio enriquecido por el lixiviado al 50% superó ampliamente los demás medios de cultivos (Tabla 10). La densidad celular máxima para el medio con lixiviado al 50% fue de  $2.56 \times 10^4$  células/ml con un tiempo de generación de 7.64 días y una velocidad específica de crecimiento de 1.93 generaciones/día superando al medio con lixiviado al 30% y 80%. Esto puede deberse a la diferencia en el contenido de nutrientes del lixiviado, ya que los estiércoles líquidos poseen una alta heterogeneidad dependiendo de su origen (Cheeke et al. 1977; Groeneweg & Schluter, 1981; Travieso et al. 2006).

**Tabla 10.** Parámetros cinéticos de crecimiento de *Verrucodesmus verrucosus* (V), Morfotipo T (T) y mezcla de los morfotipos (V+T) en condiciones de crecimiento mixotrófico en lixiviado del biodigestor (LB) y lixiviado de lombricomposta (LL) al 30%, 50% y 80% en diferentes medios de cultivo en condiciones heterotrófica.

Medio de cultivo	Densidad celular inicial en la fase exponencial (células/ml)	Densidad celular final en la fase exponencial (Células/ml $\times 10^4$ )	Velocidad de crecimiento (generaciones/día)	Tiempo de duplicación (día)	Número de generación
<b>V. verrucosus (v)+ Lixiviado de biodigestor</b>					
LIX 30	1250 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	*2.06 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	1.38 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	5.10 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	4.04 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
LIX 50	1875 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	2.56 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	1.93 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	7.64 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	5.64 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
LIX 80	1250 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	2.12 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	1.08 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	3.63 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	3.16 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>
<b>Morfotipo t + Lixiviado de biodigestor</b>					
LB30	1265 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	1.12 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	0.034 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	19.98 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	3.16 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
LB50	1250 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	1.75 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.041 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	16.54 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	3.80 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
LB80	1250 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	1.81 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	0.042 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	16.32 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	3.85 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
<b>V. verrucosus (v) + Morfotipo t + Lixiviado de biodigestor</b>					
LB30	1250 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	1.87 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	0.042 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	16.12 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	3.90 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>
LB50	1275 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	2.56 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.047 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	14.59 $\pm$ 0.09 <sup>c</sup>	4.33 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
LB80	1250 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	1.62 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	0.040 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	17.02 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	3.70 $\pm$ 0.09 <sup>c</sup>
<b>Morfotipo T + Lixiviado de lombricomposta</b>					
LL30	1267 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup>	1.43 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.038 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	17.97 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	3.50 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>
LL50	1278 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	1.18 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.035 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	19.58 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	3.21 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>
LL80	1278 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	1.50 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.038 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	17.78 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	3.54 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>

	<b>Morfotipo T+V + Lixiviado de lombricomposta</b>				
<b>LL30</b>	1250 ± 0.06 <sup>b</sup>	18.12 ± 0.12 <sup>c</sup>	0.042 ± 0.18 <sup>c</sup>	16.32 ± 0.13 <sup>a</sup>	3.85 ± 0.13 <sup>c</sup>
<b>LL50</b>	1250 ± 0.07 <sup>b</sup>	20.00 ± 0.13 <sup>b</sup>	0.044 ± 0.09 <sup>b</sup>	15.75 ± 0.14 <sup>b</sup>	4.10 ± 0.16 <sup>b</sup>
<b>LL80</b>	1270 ± 0.12 <sup>a</sup>	30.00 ± 0.14 <sup>a</sup>	0.050 ± 0.07 <sup>a</sup>	13.80 ± 0.12 <sup>c</sup>	4.56 ± 0.22 <sup>a</sup>

\* Media de tres repeticiones. \*\* Los promedios (± error estándar) dentro de cada columna sin superíndice común difieren significativamente a P < 0.05: LB: Lixiviado de biodigestor; LL: Lixiviado de lombricomposta; LIX 30: Lixiviado al 30%; LIX 50: Lixiviado al 50%; LIX 80: Lixiviado al 80%.

Así también en la figura 12 y tabla 10 se observa una ineficiencia en la producción de biomasa microalgal en condiciones mixotróficas a mayor concentración del lixiviado a diferencia de los medios químicos de condición autotrófica, esto se debe al punto de fotoinhibición ya que la saturación de sólidos en el medio es una condición que resulta perjudicial para la misma célula algal causando incluso la muerte, implicando pérdida de eficiencia fotosintética y productividad del cultivo en términos de biomasa (Tomaselli & Richmond 2004).

## **8. Interacción de medios autotróficos y mixotróficos**

### *Análisis de la densidad celular y parámetros cinéticos de crecimiento*

Se evaluaron 9 medios de cultivo, 3 de los cuales corresponden al medio Guillard, Suoeka y BG11 enriquecido con un lixiviado a concentraciones de 30, 50 y 80%, de los cuales el medio Guillard demostró mayor producción de biomasa microalgal ( $4 \times 10^4$  células/mL) enriquecido con el lixiviado en las tres concentraciones. En la figura 35 se logra apreciar que el medio Guillard enriquecido con el lixiviado al 50% demostró la mayor producción de biomasa, sin embargo no hay diferencia estadística significativa entre los tratamientos que emplean el medio Guillard (Figura 13). Es importante mencionar que al enriquecer el medio Guillard con el lixiviado al 50%, la producción de biomasa microalgal incrementa en un 28% comparado con el medio de cultivo que solo incluye el lixiviado, así también se observó que el medio Guillard puro es más eficiente que con la adición del lixiviado a cualquier concentración de las evaluadas. El fenómeno antes expuesto se debe a las adaptaciones fisiológicas y metabólicas que enfrenta la microalga para la incorporación de

los compuestos orgánicos presentes en el medio (Xu et al. 2006; Chinnasamy et al. 2010).

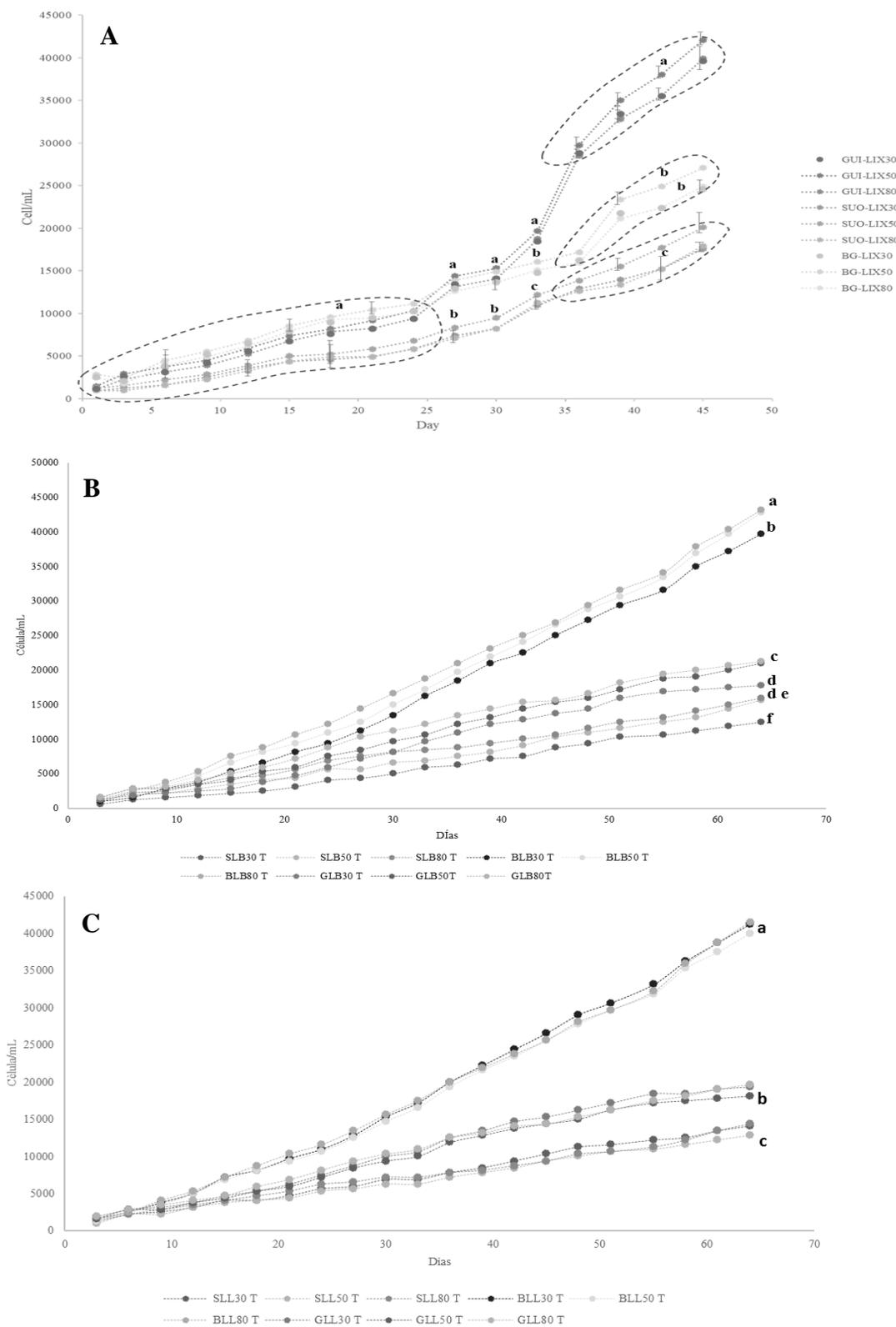
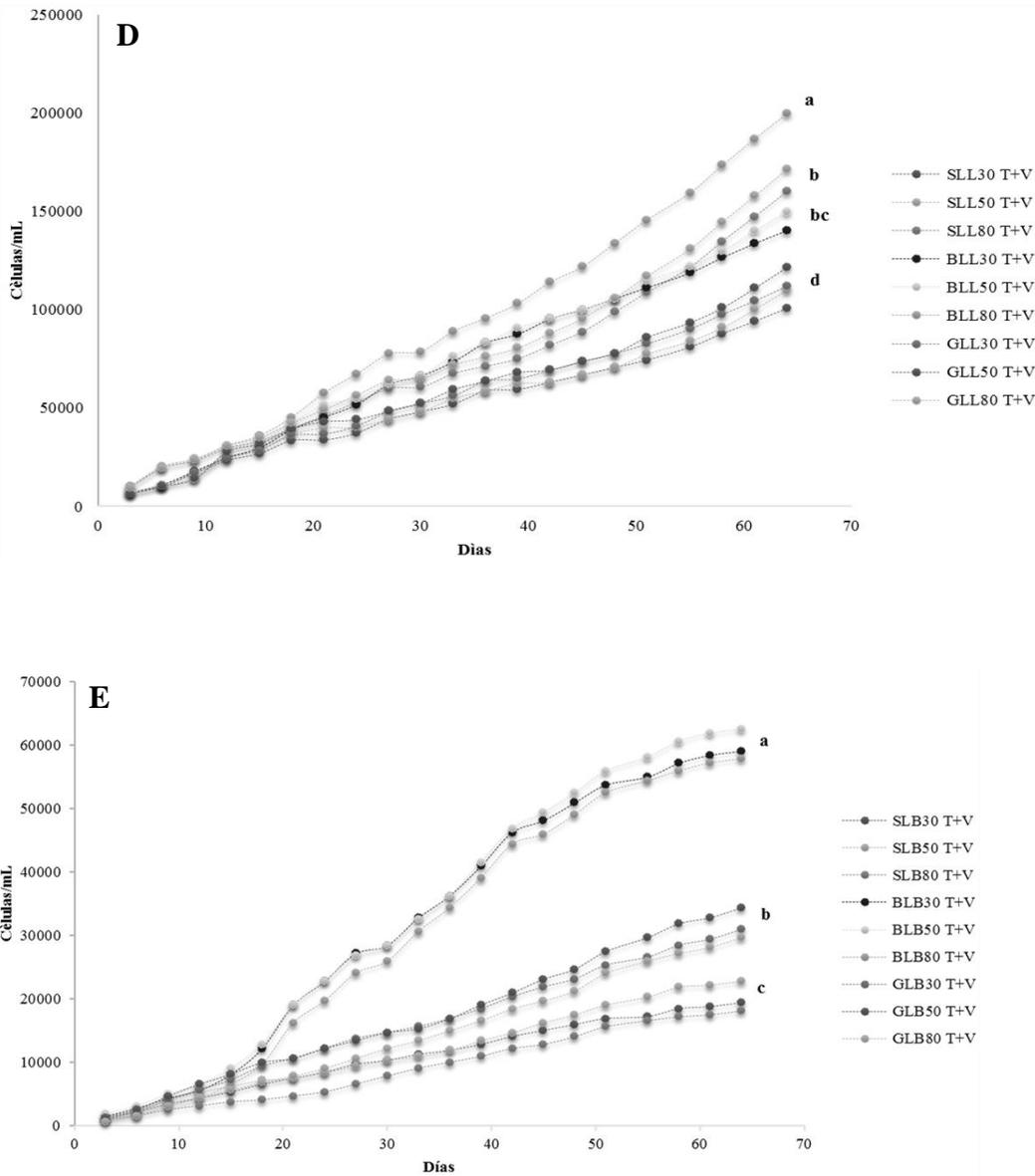


FIGURE 1



**Figura 13.** Evaluación de la cinética de crecimiento de *Verrucodesmus verrucosus* (A), Morfotipo T (T) y la mezcla entre los morfotipos (T+V) en condiciones de crecimiento mixotrófico. GUI: Guillard; SUO: Suoeka; BG: BG11; LIX 30: Lixiviado al 30%; LIX 50: Lixiviado al 50%; LIX 80: Lixiviado al 80%. LB: Lixiviado de biodigestor; LL: Lixiviado de lombricomposta; Los promedios de tres repeticiones ( $\pm$  error estándar) por cada punto, superíndice común no difieren significativamente a  $P < 0.05$

En un tercer ensayo se evaluó la cinética de crecimiento de la interacción existente entre los medios de cultivos sintéticos utilizados en el presente estudio enriquecido con lixiviados a concentraciones de 30, 50 y 80%, los resultados obtenidos revelan que la mejor interacción se generó entre el medio sintético Guillard enriquecido con el lixiviado a 30% quien demostró una densidad celular máxima de  $3.95 \times 10^4$  células/ml con un número de generación de 4.85 y una velocidad específica de crecimiento de 0.94 generaciones/día y la mezcla entre el medio Guillard enriquecido con el lixiviado al 50% con una densidad

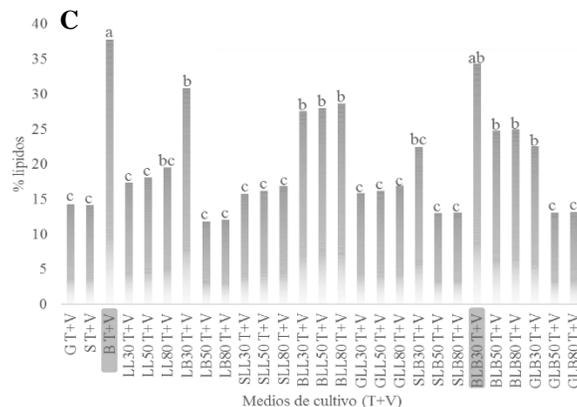
celular máxima de  $4.20 \times 10^4$  células/ml con un número de generación de 5.11 y una velocidad específica de crecimiento de 1.25 generaciones/día respectivamente superando a las otras mezclas entre lixiviados y medios sintéticos (Tabla 11).

**Tabla 11.** Parámetros cinéticos de crecimiento de *Verrucodesmus verrucosus* (V), Morfotipo T (T) y la mezcla entre los morfotipos (T+V) en condiciones de crecimiento mixotrófico en lixiviado del biodigestor (LB) y lixiviado de lombricomposta (LL) al 30%; 50% y 80% en diferentes medios de cultivo en condiciones heterotrófica.

Medio de cultivo	Densidad celular final en la fase exponencial (células/ml x10 <sup>4</sup> )	Densidad celular inicio en la fase exponencial (células/ml)	Velocidad de crecimiento (generaciones/día)	Tiempo de duplicación (día)	Número de generación
GUI-LIX30	1146 ± 0.08 <sup>b</sup>	*3.95 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.94 ± 0.01 <sup>a</sup>	5.23 ± 0.02 <sup>ab</sup>	4.85 ± 0.04 <sup>ab</sup>
GUI-LIX50	1458 ± 0.12 <sup>b</sup>	4.20 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.25 ± 0.07 <sup>a</sup>	5.55 ± 0.01 <sup>ab</sup>	5.11 ± 0.02 <sup>a</sup>
GUI-LIX80	1146 ± 0.01 <sup>b</sup>	3.98 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.05 ± 0.02 <sup>a</sup>	4.45 ± 0.01 <sup>bc</sup>	4.12 ± 0.01 <sup>b</sup>
SUO-LIX30	937 ± 0.02 <sup>c</sup>	1.76 ± 0.10 <sup>c</sup>	0.83 ± 0.10 <sup>b</sup>	3.68 ± 0.05 <sup>d</sup>	3.39 ± 0.07 <sup>c</sup>
SUO-LIX50	1250 ± 0.01 <sup>b</sup>	2.01 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.95 ± 0.01 <sup>a</sup>	4.21 ± 0.10 <sup>bc</sup>	3.88 ± 0.10 <sup>bc</sup>
SUO-LIX80	937 ± 0.04 <sup>c</sup>	1.79 ± 0.11 <sup>c</sup>	1.06 ± 0.11 <sup>a</sup>	4.65 ± 0.11 <sup>ab</sup>	4.30 ± 0.01 <sup>b</sup>
BG-LIX30	2500 ± 0.17 <sup>b</sup>	2.45 ± 0.12 <sup>b</sup>	0.77 ± 0.10 <sup>b</sup>	3.41 ± 0.01 <sup>d</sup>	3.14 ± 0.10 <sup>c</sup>
BG-LIX50	2812 ± 0.01 <sup>a</sup>	2.70 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.99 ± 0.01 <sup>a</sup>	4.38 ± 0.06 <sup>bc</sup>	4.04 ± 0.02 <sup>b</sup>
BG-LIX80	2500 ± 0.13 <sup>b</sup>	2.48 ± 0.07 <sup>b</sup>	1.01 ± 0.01 <sup>a</sup>	4.47 ± 0.11 <sup>bc</sup>	4.12 ± 0.11 <sup>b</sup>
<i>Lixiviado del biodigestor / Morfotipo T</i>					
GLB30 T	1550 ± 0.10 <sup>a</sup>	1.78 ± 0.12 <sup>cd</sup>	0.03 ± 0.12 <sup>c</sup>	17.88 ± 0.06 <sup>e</sup>	3.52 ± 0.07 <sup>b</sup>
GLB50T	1562 ± 0.11 <sup>a</sup>	2.09 ± 0.02 <sup>d</sup>	0.04 ± 0.08 <sup>b</sup>	16.82 ± 0.01 <sup>d</sup>	3.74 ± 0.01 <sup>b</sup>
GLB80T	1562 ± 0.09 <sup>a</sup>	2.12 ± 0.06 <sup>d</sup>	0.04 ± 0.04 <sup>b</sup>	16.73 ± 0.03 <sup>d</sup>	3.76 ± 0.04 <sup>b</sup>
SLB30 T	1500 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.25 ± 0.00 <sup>e</sup>	0.03 ± 0.11 <sup>c</sup>	20.59 ± 0.06 <sup>a</sup>	3.05 ± 0.05 <sup>c</sup>
SLB50 T	1500 ± 0.11 <sup>a</sup>	1.56 ± 0.12 <sup>c</sup>	0.03 ± 0.10 <sup>c</sup>	18.63 ± 0.12 <sup>b</sup>	3.38 ± 0.11 <sup>b</sup>
SLB80 T	1500 ± 0.16 <sup>a</sup>	1.59 ± 0.07 <sup>c</sup>	0.03 ± 0.04 <sup>c</sup>	18.47 ± 0.01 <sup>b</sup>	3.40 ± 0.08 <sup>b</sup>
BLB30 T	1500 ± 0.09 <sup>a</sup>	3.96 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.05 ± 0.02 <sup>a</sup>	13.33 ± 0.03 <sup>e</sup>	4.72 ± 0.04 <sup>a</sup>
BLB50 T	1550 ± 0.08 <sup>a</sup>	4.28 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.05 ± 0.03 <sup>a</sup>	13.15 ± 0.06 <sup>e</sup>	4.78 ± 0.11 <sup>a</sup>
BLB80 T	1550 ± 0.02 <sup>a</sup>	4.31 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.05 ± 0.01 <sup>a</sup>	13.12 ± 0.05 <sup>e</sup>	4.79 ± 0.10 <sup>a</sup>
<i>Lixiviado de lombricomposta /Morfotipo T</i>					
GLL30 T	1875 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.93 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.03 ± 0.12 <sup>b</sup>	18.69 ± 0.01 <sup>b</sup>	3.36 ± 0.06 <sup>b</sup>
GLL50 T	1700 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.81 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.03 ± 0.14 <sup>b</sup>	18.45 ± 0.08 <sup>b</sup>	3.41 ± 0.11 <sup>b</sup>
GLL80 T	1875 ± 0.11 <sup>a</sup>	1.96 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.03 ± 0.10 <sup>b</sup>	18.57 ± 0.08 <sup>ab</sup>	3.39 ± 0.12 <sup>b</sup>
SLL30 T	1550 ± 0.07 <sup>b</sup>	1.40 ± 0.06 <sup>c</sup>	0.03 ± 0.07 <sup>b</sup>	19.80 ± 0.04 <sup>a</sup>	3.18 ± 0.11 <sup>b</sup>
SLL50 T	1500 ± 0.02 <sup>b</sup>	1.28 ± 0.07 <sup>c</sup>	0.03 ± 0.09 <sup>b</sup>	20.35 ± 0.02 <sup>a</sup>	3.09 ± 0.09 <sup>b</sup>
SLL80 T	1500 ± 0.08 <sup>b</sup>	1.43 ± 0.09 <sup>c</sup>	0.03 ± 0.07 <sup>b</sup>	19.32 ± 0.00 <sup>a</sup>	3.26 ± 0.04 <sup>b</sup>
BLL30 T	1560 ± 0.04 <sup>b</sup>	4.12 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.05 ± 0.05 <sup>a</sup>	13.33 ± 0.11 <sup>c</sup>	4.72 ± 0.03 <sup>a</sup>
BLL50 T	1550 ± 0.01 <sup>b</sup>	4.00 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.05 ± 0.04 <sup>a</sup>	13.43 ± 0.14 <sup>c</sup>	4.68 ± 0.01 <sup>a</sup>
BLL80 T	1560 ± 0.03 <sup>b</sup>	4.15 ± 0.14 <sup>a</sup>	0.05 ± 0.08 <sup>a</sup>	13.30 ± 0.09 <sup>c</sup>	4.73 ± 0.06 <sup>a</sup>

\* Media de tres repeticiones. \*\* Los promedios (± error estándar) dentro de cada columna sin superíndice común difieren significativamente a P < 0.05. GUI: Guillard; SUO: Suoeka; BG: BG11; LIX 30: Lixiviado al 30%; LIX 50: Lixiviado al 50%; LIX 80: Lixiviado al 80%.





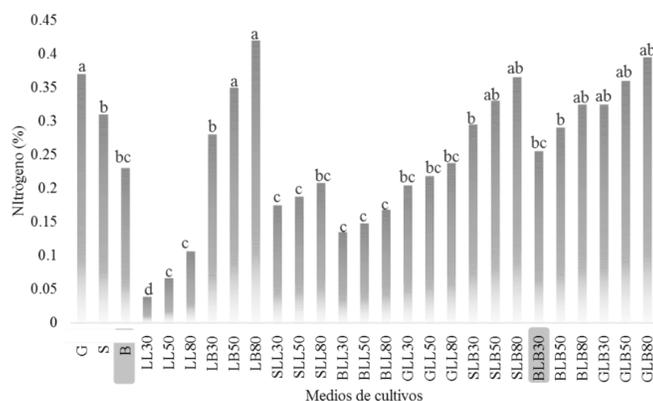
**Figura 14.** Cuantificación del contenido de lípido en la biomada microalgal de *Verrucodesmus verrucosus* (V), Morfotipo T (T) y la mezcla entre los morfotipos (T+V) en condiciones de crecimiento mixotrófico en lixiviado del biodigestor (LB) y lixiviado de lombricomposta (LL), así como una condición autotrófica. Los promedios ( $\pm$  error estándar) de tres repeticiones por cada columna sin superíndice común difieren significativamente a  $P < 0.05$ . GUI: Guillard; SUO: Suoeka; BG: BG11; LIX 30: Lixiviado al 30%; LIX 50: Lixiviado al 50%; LIX 80: Lixiviado al 80%.

La figura 14 demuestra que la condición autotrófica permitió la mayor acumulación de lípidos tal como lo reportó Purkayastha et al. (2017) quienes analizaron varios medios autótrofos, el medio basal de Bold (BBM), el medio criptófito de Wright (WC), el medio de closterium (C) y el medio de color verde azul (BG11). Sin embargo, se demostró que el medio BG11 era el más eficiente para la producción de lípidos de *C. Elipsoidea* con una concentración de 24.1%. Por otro lado, la evaluación con el morfotipo (T) permitió la acumulación del 30% de lípidos (Figura 29B), sin embargo, al realizar la mezcla de estos morfotipos se demuestra una mayor eficiencia en la producción de lípidos hasta de un 39.87% (Figura 14C).

## 10. Evaluación de la relación lípido-nitrógeno

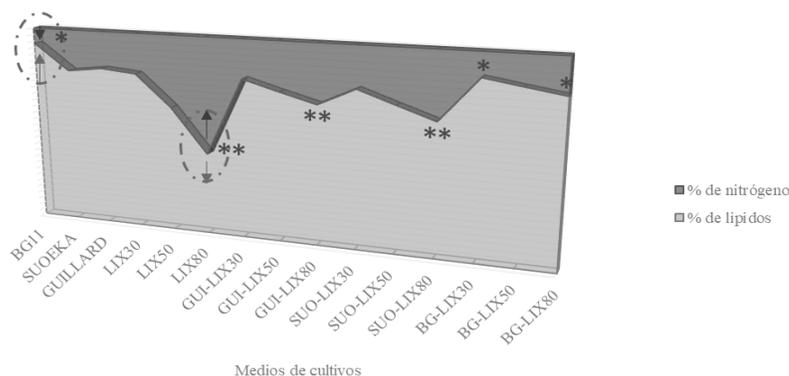
Actualmente se sabe que el nitrógeno es también un factor crítico para regular el contenido de lípidos de las microalgas (Loera & Olguín, 2010). Debido a lo antes expuesto se evaluó la concentración de nitrógeno en los diferentes medios de cultivo, por lo que se identificaron diferencias estadísticas significativas ubicando la concentración más alta de nitrógeno (0.42%) en el medio de cultivo enriquecido con el 80% de lixiviado, seguida del medio Guillard con un 0.37% de nitrógeno, es importante mencionar que los medios enriquecidos con el lixiviado al 80% demostraron un incremento significativo de nitrógeno en los medios, sin embargo el medio BG11 demostró la concentración más baja de nitrógeno con un 0.23% (Figura 15).

Este comportamiento fue comprobado por Ho et al. (2012) y Ho et al. (2013) al corroborar que al ser el nitrógeno un factor limitante del medio de cultivo la acumulación de los niveles de lípidos aumenta en más del 40%.



**Figura 15.** Evaluación de la relación lípidos-nitrógeno en la biomasa microalgal de *V. verrucosus* evaluadas en condiciones mixotrófica: lixiviado del biodigestor (LB) y lixiviado de lombricomposta (LL) así como bajo una condición autotrófica. Los promedios ( $\pm$  error estándar) de tres repeticiones por cada columna sin superíndice común difieren significativamente a  $P < 0.05$ . GUI: Guillard; SUO: Sueoka; BG: BG11; LIX 30: Lixiviado al 30%; LIX 50: Lixiviado al 50%; LIX 80: Lixiviado al 80%.

Para identificar la relación existente entre el contenido de nitrógeno y el de lípidos en la biomasa microalgal se realizó un análisis de correlación entre ambas variables, por lo que se observa que a menor concentración de nitrógeno se reporta mayor acumulación de lípidos, tal es el caso del medio de cultivo BG11 con una concentración de nitrógeno de 0.23% y un contenido de lípidos del 24.30%. Así también se identifica que a mayor concentración de nitrógeno menor acumulación de lípidos, tal como se demuestra en el medio enriquecido con lixiviado al 80% que contiene una concentración de nitrógeno de 0.42% con una acumulación de lípidos del 5.54% (Figura 16).



**Figura 16.** Análisis de interacción lípidos-nitrógeno en la biomasa microalgal de *V. verrucosus* evaluadas en condiciones mixotrófica y autotrófica. Los promedios ( $\pm$  error estándar) de tres repeticiones por cada columna sin superíndice común difieren significativamente ( $P < 0.05$ ). GUI: Guillard; SUO: Sueoka; BG: BG11; LIX 30: Lixiviado al 30%; LIX 50: Lixiviado al 50%; LIX 80: Lixiviado al 80%.

Los datos obtenidos en el presente trabajo concuerdan con los establecidos por Cobos-Ruíz et al. (2016) quienes evaluaron la producción de lípidos totales en cinco especies de microalgas inducidas por la ausencia de nitrógeno. Las microalgas empleadas fueron *Ankistrodesmus sp.*, *Ankistrodesmus nannosele*, *Chlorella sp.*, *Scenedesmus sp.* y *Scenedesmus quadricauda*. Los resultados indicaron que las especies con mayor producción de lípidos totales fueron *Ankistrodesmus sp.* (263,6 mg/g biomasa seca), *A. nannosele* (316 mg/g biomasa seca) y *Scenedesmus sp.* (243,3 mg/g biomasa seca) al ser cultivadas en medios sin nitrógeno.

Después de identificar al medio BG11 como el más eficiente para la producción de lípidos (Figura 15 y Figura 16) se observó en la figura 26 que no fue el mejor para la producción de biomasa microalgal pues es superado por el medio Guillard, estos resultados concuerdan con lo reportado por Ho et al. (2011) y Radakovits et al. (2012) quienes concluyen que limitar las concentraciones de nitrógeno permite estimular la acumulación de lípidos en las células de algas, sin embargo impacta en la reducción de la biomasa de algas, lo que sugiere que las 2 condiciones, alto contenido en lípidos y alta productividad, pueden ser mutuamente excluyentes.

### 11. Diseño y evaluación de un fotobiorreactor

Para la evaluación de la producción de biomasa microalgal a escala semi industrial se construyó un fotobiorreactor tubular con dimensiones de 37cm de longitud y 10.37cm de diámetro interno, con un volumen de 3L, evaluando las condiciones de Luz, medio de cultivo y ciclos: luz, tal como se aprecia en la figura 17.

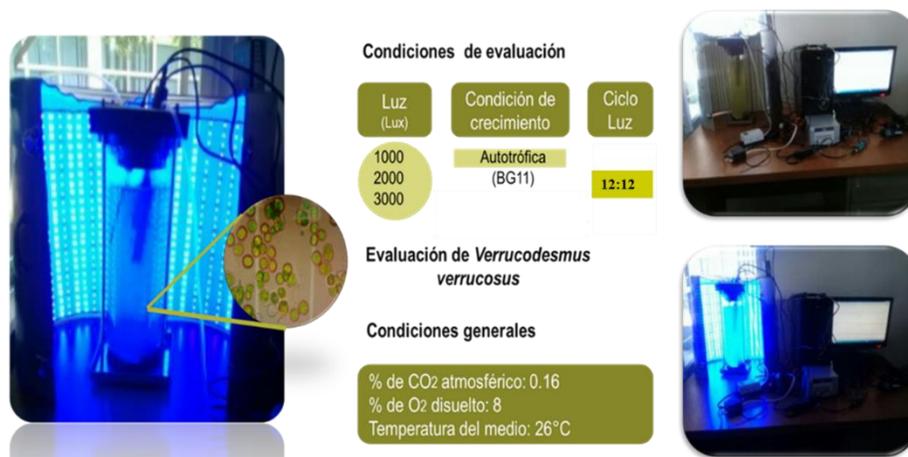
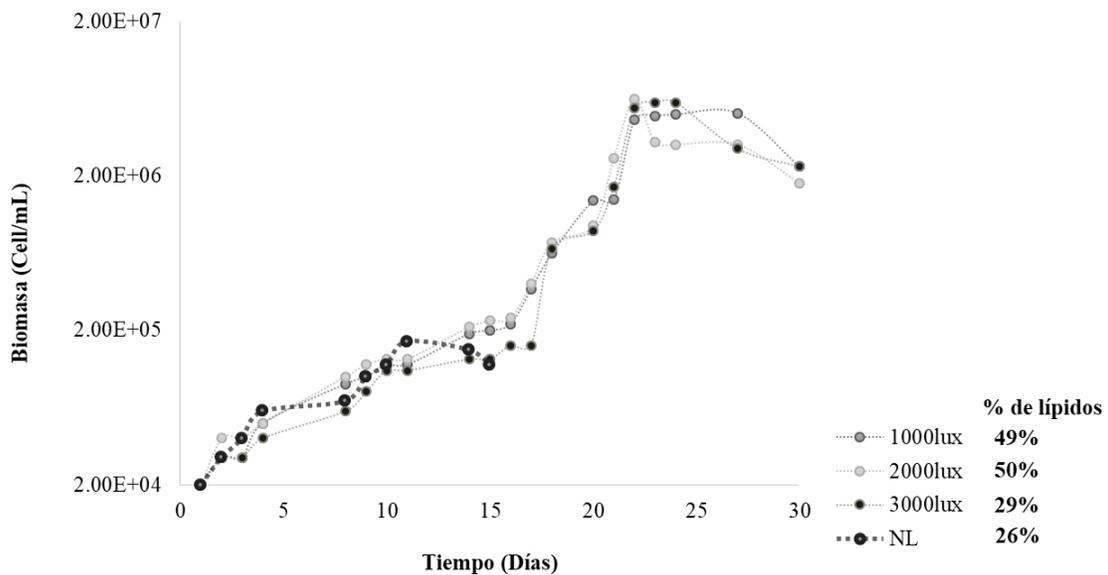


Figura 17. Diseño de un fotobiorreactor

### Evaluación de las condiciones de crecimiento de la biomasa microalgal en un fotobiorreactor

Se evaluaron 4 tratamientos por duplicado con diferencia en la intensidad de luz (1000, 2000, 3000 Lux y ambiente), por lo que se observa un incremento significativo en la biomasa microalgal después de 30 días de evaluación, sin embargo en la figura 18 se observa una adaptación de *V. verrucosus* al medio de cultivo en un periodo de 8 días alcanzando una etapa exponencial en un periodo de 22 días, demostrando mejor producción de biomasa ( $6.3 \times 10^6$  células) en el fotobiorreactor a 2000 lux superando la producción de biomasa microalgal a nivel de matraz ( $5.0 \times 10^4$  células).



**Figura 18.** Evaluación de la cinética de crecimiento de *V. Verrucosus* en condiciones de crecimiento autotrófico en un fotobiorreactor de 3.L. Los promedios de dos repeticiones ( $\pm$  error estándar) por cada punto, superíndice común no difieren significativamente ( $P < 0.05$ ).

Este comportamiento también fue corroborado por Vo et al. (2018), quienes concluyen que el rendimiento de biomasa es de 5 a 20 veces más alto en producción cuando el desarrollo de la microalga se escala a un fotobiorreactor, así también se corrobora que el hecho de incrementar la luz para mejorar la biomasa no es una opción, tal efecto fue demostrado por Fathurrahman et al. (2013) al mencionar que las microalgas poseen un umbral de conversión eficiente de la luz disponible para la biomasa.

## 12. Producción de ácidos grasos de la biomasa microalgal a nivel de producción en un fotobiorreactor para la generación de biodiesel

Después de la producción de biomasa microalgal en los 4 niveles de luz se identificó un incremento en la producción de lípidos totales hasta de un 50% por parte del tratamiento del fotobiorreactor iluminado a 2000 Lux, a diferencia de la producción de lípidos a nivel de matraz que sólo se alcanzó un 24% (Figura 18).

Por otro lado, se realizó el análisis de ácidos grasos de los lípidos generados por la biomasa microalgal del mejor tratamiento (2000 Lux), por lo que se observa el siguiente cromatograma, identificando al ácido palmítico como el ácido graso más abundante hasta en un 34.90% (Figura 19).

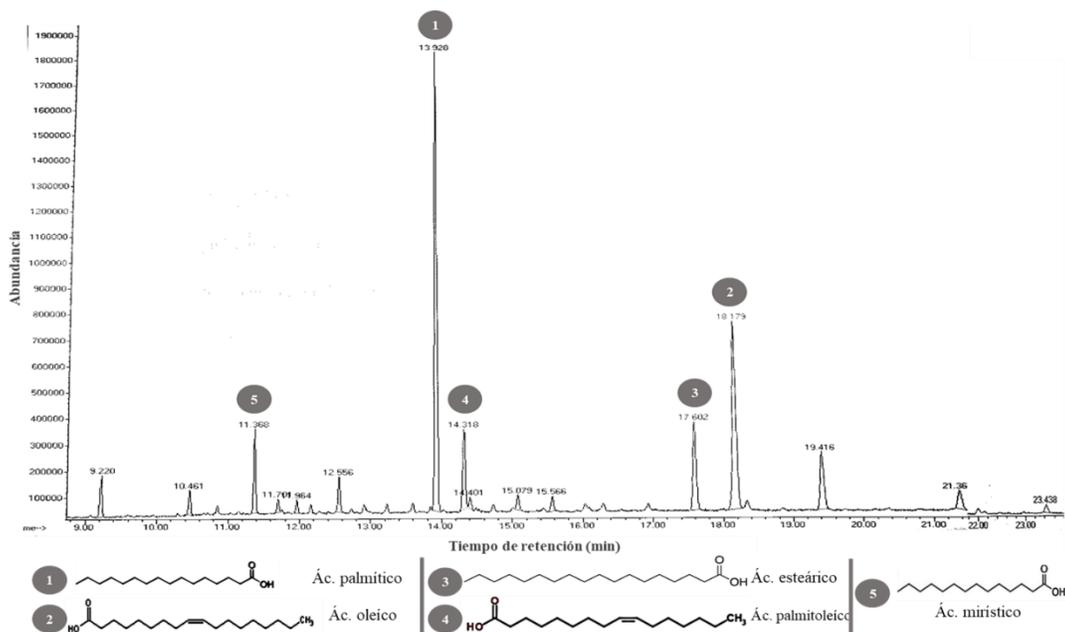


Figura 19. Cromatograma del perfil de ácidos grasos contenido en la biomasa microalgal de *V. verrucosus*

De acuerdo a la tabla 12 se puede apreciar que abundan los ácidos grasos saturados responsables de la característica sólida del lípido generado por la biomasa microalgal.

**Tabla 12.** Perfil de ácidos grasos proveniente de la biomasa microalgal de *V. verrucosus* sometida al tratamiento en fotobiorreactor a 1000 Lux.

N.	Compuestos	Fórmula química	Carga masa (m/z) <sup>2</sup>	RT <sup>1</sup> (min)	Porcentaje de abundancia (%)	Ácido graso
1	Ácido mirístico	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	228,36	11.36	5.03	Saturado
2	Ácido palmítico	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	256,43	13.92	34.90	Saturado
3	Ácido palmitoleico	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	254,41	14.31	7.07	Monoinsaturado
4	Ácido esteárico	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	284,48	17.60	9.31	Saturado
5	Ácido oleico	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	282,47	18.17	22.81	Monoinsaturado

RT: Tiempos de retención

También en el presente trabajo se menciona que la concentración máxima fue de ácido palmítico, ácido graso saturado con un 34.90% de presencia, como lo demostraron Nayak y Mohanty (2016), quienes mencionaron que la microalga *Scenedesmus sp.* contenía un alto porcentaje de ácidos grasos saturados del 46.2% al 49.5%, demostrando que el ácido palmítico es la concentración más alta en *Scenedesmus sp.*, microalga que corresponde a la misma familia de *V. verrucosus*.

El éster metil del ácido graso altamente saturado (FAME) indicó que son una fuente de biodiesel con una mayor estabilidad a la oxidación (Nascimento et al. 2013).

## X. CONCLUSIÓN

- ❖ El medio de cultivo Guillard, presentó las mejores condiciones para el crecimiento de *V. verrucosus*, comparado con los medios BG11, Sueoka (condición autotrófica) y lixiviado (condición mixotrófica).
- ❖ El medio de cultivo BG11 permitió la mayor acumulación de lípidos en *V. verrucosus* con un 24.3% en un periodo de 60 días y un fotoperíodo 12:12 a nivel de laboratorio.
- ❖ El medio de cultivo BG11 permitió la mayor acumulación de lípidos en *V. verrucosus* con un 50% en un periodo de 15 días y un fotoperíodo 12:12 a 2000 lux en un fotobiorreactor tubular.
- ❖ La concentración adecuada de nitrógeno en un medio de cultivo para la producción de *V. verrucosus* con finalidad lipídica deberá ser de 0.23%.
- ❖ La concentración máxima de ácidos grasos en la biomasa microalgal de *V. verrucosus* fue de ácido palmítico, ácido graso saturado, con un 34.90%.

## XI. REFERENCIAS

1. Abarca, N., Jahn, R., Zimmermann, J. & Enke, N. (2014). Does the cosmopolitan diatom *Gomphonema parvulum* (Kützing) Kützing have a biogeography?. *PLoS ONE* 9(1): 1-18, e86885.
2. Aboal, M., Alvarez Cobelas, M., Cambra, J. & Ector, L. (2003). Floristic list of non-marine diatoms (Bacillariophyceae) of Iberian Peninsula, Balearic Islands and Canary Islands. Updated taxonomy and bibliography. *Diatom Monographs* 4: 1-639.
3. Aljuboori, A. H. R., Uemura, Y., & Thanh, N. T. (2016). Flocculation and mechanism of self-flocculating lipid producer microalga *Scenedesmus quadricauda* for biomass harvesting. *Biomass and Bioenergy*, 93, 38-42.
4. Ambrosio, R., Ortiz-Márquez, J. C. F., & Curatti, L. (2017). Metabolic engineering of a diazotrophic bacterium improves ammonium release and biofertilization of plants and microalgae. *Metabolic Engineering*.
5. Andersen, R. A., & Kawachi, M. (2005). Traditional microalgae isolation techniques. *Algal culturing techniques*, 83, 90-101.
6. Araujo, G. S., Matos, L. J., Fernandes, J. O., Cartaxo, S. J., Gonçalves, L. R., Fernandes, F. A., & Farias, W. R. (2013). Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), 95-98.
7. Aliev, A. M., & Abdulgatov, I. M. (2016). The study of microalgae *Nannochloropsis salina* fatty acid composition of the extracts using different techniques. SCF vs conventional extraction. *Journal of Molecular Liquids*.
8. AOAC. 2000. Official Methods of Analysis. 16th ed. Official Method 928.08. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA.
9. Baroukh, C. et al., 2015b. Mathematical modeling of unicellular microalgae and cyanobacteria metabolism for biofuel production. *Current opinion in biotechnology*, 33, pp.198–205.
10. Bilanovic, D., Holland, M., Starosvetsky, J., & Armon, R. (2016). Co-cultivation of microalgae and nitrifiers for higher biomass production and better carbon capture. *Bioresource Technology*, 220, 282-288.
11. Biller, P., & Ross, A. B. (2014). Pyrolysis GC-MS as a novel analysis technique to determine the biochemical composition of microalgae. *Algal Research*, 6, 91-97.
12. Blokker, P., Schouten, S., van den Ende, H., de Leeuw, J. W., Hatcher, P. G., & Damsté, J. S. S. (1998). Chemical structure of algaenans from the fresh water algae *Tetraedron minimum*, *Scenedesmus communis* and *Pediastrum boryanum*. *Organic Geochemistry*, 29(5), 1453-1468.
13. Borges, L., Caldas, S., D'Oca, M. G. M., & Abreu, P. C. (2016). Effect of harvesting processes on the lipid yield and fatty acid profile of the marine microalga *Nannochloropsis oculata*. *Aquaculture Reports*, 4, 164-168.
14. Bogen, C., Klassen, V., Wichmann, J., La Russa, M., Doebbe, A., Grundmann, M., ... & Mussgnug, J. H. (2013). Identification of *Monoraphidium contortum* as a promising species for liquid biofuel production. *Bioresource technology*, 133, 622-626.
15. Bonnefond, H., Moelants, N., Talec, A., Bernard, O., & Sciandra, A. (2016). Concomitant effects of light and temperature diel variations on the growth rate and lipid production of *Dunaliella salina*. *Algal Research*, 14, 72-78.
16. Boyd, P. W., Rynearson, T. A., Armstrong, E. A., Fu, F., Hayashi, K., Hu, Z., ... & Passow, U. (2013). Marine phytoplankton temperature versus growth responses from polar to tropical waters—outcome of a scientific community-wide study. *PLoS One*, 8(5), e63091.
17. Brennan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(2), 557-577.
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, 217-226.
19. Buchheim, M., Buchheim, J., Carlson, T., Braband, A., Hepperle, D., Krienitz, L., Wolf, M. & Hegewald, E. (2005). Phylogeny of the Hydrodictyaceae (Chlorophyceae): inferences from rDNA data. *Journal of Phycology* 41: 1039-1054.
20. Cardoso, S. J., Roland, F., Loverde-Oliveira, S. M., & de Moraes Huszar, V. L. (2012). Phytoplankton abundance, biomass and diversity within and between Pantanal wetland habitats. *Limnologica-Ecology and Management of Inland Waters*, 42(3), 235-241.
21. Cambra Sánchez, J., Álvarez Cobelas, M. & Aboal Sanjurjo, M. (1998). Lista florística y bibliográfica de los clorófitos (Chlorophyta) de la Península Ibérica, Islas Baleares e Islas Canarias. pp. 1-614. Burgos: Asociación Española de Limnología.
22. Cesarini, S., Haller, R. F., Diaz, P., & Nielsen, P. M. (2014). Combining phospholipases and a liquid lipase for one-step biodiesel production using crude oils. *Biotechnology for biofuels*, 7(1), 29.
23. Cely, P., Gascó, G., Paz-Ferreiro, J., & Méndez, A. (2015). Agronomic properties of biochars from different manure wastes. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 111, 173-182.
24. Chevenet, F., Brun, C., Bañuls, A. L., Jacq, B., & Christen, R. (2006). TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC bioinformatics*, 7(1), 439.
25. Chokshi, K., Pancha, I., Ghosh, A., & Mishra, S. (2016). Microalgal biomass generation by phycoremediation of dairy industry wastewater: An integrated approach towards sustainable biofuel production. *Bioresource Technology*, 221, 455-460.

26. Clarens, A. F., Resurreccion, E. P., White, M. A., & Colosi, L. M. (2010). Environmental life cycle comparison of algae to other bioenergy feedstocks. *Environmental science & technology*, 44(5), 1813-1819.
27. Coleman, A. M., Abodeely, J. M., Skaggs, R. L., Moeglein, W. A., Newby, D. T., Venteris, E. R., & Wigmosta, M. S. (2014). An integrated assessment of location-dependent scaling for microalgae biofuel production facilities. *Algal Research*, 5, 79-94.
28. Craigie JS, eds. *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge: Cambridge University Press, 69–85.
29. Day, S.A., Wickham, R.P., Entwisle, T.J. & Tyler, P.A. (1995). Bibliographic check-list of non-marine algae in Australia. *Flora of Australia Supplementary Series 4*: i-vii, 1-276
30. Dawson, P.A. (1972). Observations on the structure of some forms of *Gomphonema parvulum* Kütz. 1. Morphology based on light microscopy and transmission and scanning electron microscopy. *British Phycological Journal* 7: 255-271, 38 figs.
31. De Godos, I., Arbib, Z., Lara, E., & Rogalla, F. (2016). Evaluation of High Rate Algae Ponds for treatment of anaerobically digested wastewater: Effect of CO<sub>2</sub> addition and modification of dilution rate. *Bioresource Technology*, 220, 253-261.
32. Demirbas, A. (2009). Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energy conversion and management*, 50(1), 14-34.
33. Dereeper, A., Audic, S., Claverie, J. M., & Blanc, G. (2010). BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis. *BMC evolutionary biology*, 10(1), 1.
34. Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., ... & Claverie, J. M. (2008). Phylogeny. fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic acids research*, 36(suppl 2), W465-W469.
35. Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 32(5), 1792-1797.
36. Elias, I., & Lagergren, J. (2007). Fast computation of distance estimators. *BMC bioinformatics*, 8(1), 1.
37. Fan, J., Andre, C. and Xu, C. (2011) A chloroplast pathway for the de novo biosynthesis of triacylglycerol in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett.* 585, 1985–1991.
38. Fawley, MW, Dean, ML, Dimmer, SK y Fawley, KP (2006). Evaluar el concepto morfoespecie en el Selenastraceae (Cloroficeas, Chlorophyta). *Journal of Phycology* 42: 142-154.
39. Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 783-791.
40. Frentzen, M., (1993) Acyltransferases and Triacylglycerols, in *Lipid Metabolism in Plants* (Moore, T.S. Jr, ed.), pp. 195–230. Boca Raton: CRC Press.
41. Freire-Nordi, C.S., Vieira, A.A.H. & Nascimento, O.R. (2003). Transport of spin-labelled molecules through the capsule of *Nephrocytium lunatum* (Chlorococcales) studied by electron paramagnetic resonance. *Phycologia* 42(5): 465-472.
42. Garnier, M., Carrier, G., Rogniaux, H., Nicolau, E., Bougaran, G., Saint-Jean, B., & Cadoret, J. P. (2014). Comparative proteomics reveals proteins impacted by nitrogen deprivation in wild-type and high lipid-accumulating mutant strains of *Tisochrysis lutea*. *Journal of proteomics*, 105, 107-120.
43. Garibay Hernández, A., Vázquez-Duhalt, R., Sánchez Saavedra, M. D., Serrano Carreón, L., & Martínez Jiménez, A. (2009). Biodiesel a partir de microalgas. *BioTecnología*, 13(3), 38-61.
44. Gascuel, O. (1997). BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Molecular biology and evolution*, 14(7), 685-695.
45. Gerber, L. N., Tester, J. W., Beal, C. M., Huntley, M. E., & Sills, D. L. (2016). Target cultivation and financing parameters for sustainable production of fuel and feed from microalgae. *Environmental science & technology*, 50(7), 3333-3341.
46. Geider, R.J., Osborne, B.A., Raven, J.A. (2004) Light dependence of growth and photosynthesis in *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae)1. *J. Phycol.* 21 609–619, <http://dx.doi.org/10.1111/j.0022-3646.1985.00609.x>.
47. Geider, R. I. C. H. A. R. D., & Osborne, B. A. (1989). Respiration and microalgal growth: a review of the quantitative relationship between dark respiration and growth. *New Phytologist*, 112(3), 327-341.
48. Geitler, L. (1932). Cyanophyceae. In: *Kryptogamen-Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz*. Ed. 2. (Rabenhorst, L. Eds) Vol. 14, pp. 673-1196, i-[vi]. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft.
49. Giroud, C., Gerber, A. and Eichenberger, W. (1988) Lipids of *Chlamydomonas reinhardtii*. Analysis of molecular species and intracellular site (s) of biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* 29, 587–595.
50. Graef, G., LaVallee, B. J., Tenopir, P., Tat, M., Schweiger, B., Kinney, A. J., ... & Clemente, T. E. (2009). A high-oleic-acid and low-palmitic-acid soybean: agronomic performance and evaluation as a feedstock for biodiesel. *Plant biotechnology journal*, 7(5), 411-421.
51. Griffiths, M. J., & Harrison, S. T. (2009). Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, 21(5), 493-507.
52. Greenwell, H. C., Laurens, L. M. L., Shields, R. J., Lovitt, R. W., & Flynn, K. J. (2009). Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *Journal of the Royal Society Interface*, rsif20090322
53. Goodson, C., Roth, R., Wang, Z. T., & Goodenough, U. (2011). Structural correlates of cytoplasmic and chloroplast lipid body synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* and stimulation of lipid body production with acetate boost. *Eukaryotic Cell*, 10(12), 1592-1606.

54. Grobbelaar, J. U., & Soeder, C. J. (1985). Respiration losses in planktonic green algae cultivated in raceway ponds. *Journal of Plankton Research*, 7(4), 497-506.
55. Guschina, I. A., & Harwood, J. L. (2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in lipid research*, 45(2), 160-186.
56. Guillard, R. R. L. (1973). Methods for microflagellates and nannoplakton. *Handbook of phycological methods-culture methods and growth measurements*. Cambridge Univ. Press, NY.
57. Guiry M.D. in Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2017. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 22 May 2017.
58. Guldhe, A., Singh, B., Ansari, F. A., Sharma, Y., & Bux, F. (2016). Extraction and Conversion of Microalgal Lipids. In *Algae Biotechnology* (pp. 91-110). Springer International Publishing.
59. Hadi, S. I., Santana, H., Brunale, P. P., Gomes, T. G., Oliveira, M. D., Matthiensen, A., ... & Brasil, B. S. (2016). DNA Barcoding Green Microalgae Isolated from Neotropical Inland Waters. *PloS one*, 11(2), e0149284.
60. Hajjgholizadeh, M., & Melesse, A. M. (2017). Assortment and spatiotemporal analysis of surface water quality using cluster and discriminant analyses. *CATENA*.
61. Han, F., Pei, H., Hu, W., Jiang, L., Cheng, J., & Zhang, L. (2016). Beneficial changes in biomass and lipid of microalgae *Anabaena variabilis* facing the ultrasonic stress environment. *Bioresource technology*, 209, 16-22.
62. Hamby, R. K., & Zimmer, E. A. (1992). Ribosomal RNA as a phylogenetic tool in plant systematics. In *Molecular systematics of plants* (pp. 50-91). Springer US.
63. Harris, G.P., 1986. *Phytoplankton Ecology: Structure, Function and Fluctuation*. Chapman and Hall, New York, NY, USA.
64. He, L., Wu, S. G., Wan, N., Reding, A. C., & Tang, Y. J. (2015). Simulating cyanobacterial phenotypes by integrating flux balance analysis, kinetics, and a light distribution function. *Microbial cell factories*, 14(1), 1.
65. Heinz, E., & Roughan, P. G. (1983). Similarities and differences in lipid metabolism of chloroplasts isolated from 18: 3 and 16: 3 plants. *Plant Physiology*, 72(2), 273-279.
66. Hindák, F. (1984). Studies on the chlorococcal algae (Chlorophyceae) III. *Biologické Práce* 30: 1-312.
67. Hindersin, S., Leupold, M., Kerner, M., & Hanelt, D. (2013). Irradiance optimization of outdoor microalgal cultures using solar tracked photobioreactors. *Bioprocess and biosystems engineering*, 36(3), 345-355.
68. Ho, S. H., Huang, S. W., Chen, C. Y., Hasunuma, T., Kondo, A., & Chang, J. S. (2013). Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E. *Bioresource Technology*, 135, 157-165.
69. Höök, M., & Tang, X. (2013). Depletion of fossil fuels and anthropogenic climate change—A review. *Energy Policy*, 52, 797-809.
70. Hong, M. E., Choi, Y. Y., & Sim, S. J. (2016). Effect of red cyst cell inoculation and iron (II) supplementation on autotrophic astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under outdoor summer conditions. *Journal of biotechnology*, 218, 25-33.
71. Hossain, A. B. M. S., Salleh, A., Boyce, A. N., Chowdhury, P., & Naquiuddin, M. (2008). Biodiesel fuel production from algae as renewable energy. *American journal of biochemistry and biotechnology*, 4(3), 250-254.
72. Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A., 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 54 (4), 621–639.
73. Hu, H. y Wei, Y. (2006). *Las algas de agua dulce de China*. . Sistemática, taxonomía y ecología. pp. [4 pls de 16 higos], [i-iv], i-xv, 1-1023. China: [www.sciencep.com](http://www.sciencep.com).
74. Huesemann, M. H., Van Wagenen, J., Miller, T., Chavis, A., Hobbs, S., & Crowe, B. (2013). A screening model to predict microalgae biomass growth in photobioreactors and raceway ponds. *Biotechnology and bioengineering*, 110(6), 1583-1594.
75. Islam, M. A., Magnusson, M., Brown, R. J., Ayoko, G. A., Nabi, M. N., & Heimann, K. (2013). Microalgal species selection for biodiesel production based on fuel properties derived from fatty acid profiles. *Energies*, 6(11), 5676-5702.
76. Janet, R., Stein, E., & Stein, J. R. (Eds.). (1973). *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge University Press.
77. Jazzar, S., Quesada-Medina, J., Olivares-Carrillo, P., Marzouki, M. N., Ación-Fernández, F. G., Fernández-Sevilla, J. M., ... & Smaali, I. (2015). A whole biodiesel conversion process combining isolation, cultivation and in situ supercritical methanol transesterification of native microalgae. *Bioresource technology*, 190, 281-288.
78. Jones, A. K., Rhodes, M. E., & Evans, S. C. (1973). The use of antibiotics to obtain axenic cultures of algae. *British Phycological Journal*, 8(2), 185-196.
79. John, DM (2011). Phylum Chlorophyta. Chaetophorales órdenes, Microsporales, ulotrichales. En: *La flora de algas de agua dulce de las Islas Británicas*. Una guía de identificación con el agua dulce y las algas terrestre. Segunda edición. (Juan, DM, Whitton, BA y Brook, AJ Eds), pp. 524-554. Cambridge: Cambridge University Press.
80. Juneja, A., Ruben Michael Ceballos, R.M., Mur, G.S., 2013. Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: a review. *Energies* 6, 4607–4630.
81. Kim, H. U., & Huang, A. H. (2004). Plastid lysophosphatidyl acyltransferase is essential for embryo development in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 134(3), 1206-1216.

82. Kim, H. U., Li, Y., & Huang, A. H. (2005). Ubiquitous and endoplasmic reticulum–located lysophosphatidyl acyltransferase, LPAT2, is essential for female but not male gametophyte development in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 17(4), 1073-1089.
83. Klamczynska, B, W.D. Mooney. (2017). Chapter 20 – Heterotrophic Microalgae: A Scalable and Sustainable Protein Source. *Sustainable Protein Sources*. 327–339. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802778-3.00020-2>.
84. Knoop, H. et al., 2013. Flux Balance Analysis of Cyanobacterial Metabolism: The Metabolic Network of Synechocystis sp. PCC 6803 C. V. Rao, ed. *PLoS Computational Biology*, 9(6), pp.1–15.
85. Komárek, J., & Marvan, P. (1992). Morphological differences in natural populations of the genus *Botryococcus* (Chlorophyceae). *Archiv für Protistenkunde*, 141(1-2), 65-100.
86. Konca, Y., Buyukkilic, B. S., Ayaşan, T., Kaliber, M., & Bozkurt, K. A. (2016). The effects of freezing and supplementation of molasses and inoculants on chemical and nutritional composition of sunflower silage. *Asian-Australasian journal of animal sciences*.
87. Korshikov, A.A. (1953). *Viznachnik prsnovodnihk vodorostey Ukrainsykoï RSR [Vyp] V. Pidklas Protokokovi (Protococcineae). Bakuol'ni (Vacuolales) ta Protokokovi (Protococcales) [The Freshwater Algae of the Ukrainian SSR. V. Sub-Class Protococcineae. Vacuolales and Protococcales]*. pp. 1-439. Kyjv [Kiev]: Akad. NAUK URSR.
88. Kumar, A., Guria, C., Chitres, G., Chakraborty, A., & Pathak, A. K. (2016). Modelling of microalgal growth and lipid production in *Dunaliella tertiolecta* using nitrogen-phosphorus-potassium fertilizer medium in sintered disk chromatographic glass bubble column. *Bioresource Technology*, 218, 1021-1036.
89. Korshikov, A.A. (1953). *Viznachnik prsnovodnihk vodorostey Ukrainsykoï RSR [Vyp] V. Pidklas Protokokovi (Protococcineae). Bakuol'ni (Vacuolales) ta Protokokovi (Protococcales) [The Freshwater Algae of the Ukrainian SSR. V. Sub-Class Protococcineae. Vacuolales and Protococcales]*. pp. 1-439. Kyjv [Kiev]: Akad. NAUK URSR.
90. Lacour, T. et al., 2012. Diel Variations of Carbohydrates and Neutral Lipids in Nitrogen-Sufficient and Nitrogen-Starved *Cyclostat* Cultures of *Isochrysis* Sp. *Journal of Phycology*, 48(4), pp.966–975.
91. Lange-Bertalot, H. (2001). *Navicula sensu stricto. 10 Genera separated from Navicula sensu lato. Frustulia. Diatoms of Europe: diatoms of the European inland waters and comparable habitats. Vol. 2 pp. 1-526, 140 pls. Ruggell: A.R.G. Gantner Verlag. K.G.*
92. Lee, J. Y., Yoo, C., Jun, S. Y., Ahn, C. Y., & Oh, H. M. (2010). Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource technology*, 101(1), S75-S77.
93. Lee, E., Cumberbatch, J., Wang, M., & Zhang, Q. (2017). Kinetic parameter estimation model for anaerobic co-digestion of waste activated sludge and microalgae. *Bioresource Technology*, 228, 9-17.
94. Legović, T., & Cruzado, A. (1997). A model of phytoplankton growth on multiple nutrients based on the Michaelis-Menten-Monod uptake, Droop's growth and Liebig's law. *Ecological Modelling*, 99(1), 19-31.
95. Li, Q. F., Trotter, N., & Powers, W. (2015). Feeding reduced crude protein diets with crystalline amino acids supplementation reduce air gas emissions from housing. *Journal of animal science*, 93(2), 721-730.
96. Liu, J., Chu, Y., Cao, X., Zhao, Y., Xie, H., & Xue, S. (2015). Rapid transesterification of micro-amount of lipids from microalgae via a micro-mixer reactor. *Biotechnology for biofuels*, 8(1), 229.
97. Li, Y., Naghdi, F. G., Garg, S., Adarme-Vega, T. C., Thurecht, K. J., Ghafor, W. A., ... & Schenk, P. M. (2014). A comparative study: the impact of different lipid extraction methods on current microalgal lipid research. *Microbial cell factories*, 13(1), 14.
98. Li, Y., Han, D., Sommerfeld, M., & Hu, Q. (2011). Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococum* sp.(Chlorophyceae) under nitrogen-limited conditions. *Bioresource Technology*, 102(1), 123-129.
99. Li, Y., Williams, D.M., Metzeltin, D., Kociolek, J.P. & Gong, Z. (2010). *Tibetiella pulchra* gen. nov. et sp. nov., a new freshwater epilithic diatom (Bacillariophyta) from River Nujiang in Tibet, China. *Journal of Phycology* 46(2): 325-330.
100. Lobban, C. S., Chapman, D. J., & Kremer, B. P. (1988). *Experimental phycology: a laboratory manual*. CUP Archive.
101. Mahadevan, R., Edwards, J.S. & Doyle, F.J., 2002. Dynamic flux balance analysis of diauxic growth in *Escherichia coli*. *Biophysical journal*, 83(3), pp.1331–1340.
102. Massjuk, N.P. & Lilitska, G.G. (2011). Volvocales. In: *Algae of Ukraine: diversity, nomenclature, taxonomy, ecology and geography. Volume 3: Chlorophyta*. (Tsarenko, P.M., Wasser, S.P. & Nevo, E. Eds), pp. 218-225. Ruggell: A.R.A. Gantner Verlag K.-G.
103. Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(1), 217-232.
104. Memon, A. A. S., Pathan, A. A., Kandhar, I. A., Mahar, R. B., & Balouch, A. (2016). *Microspora Floccosa*; A Potential Biofuel Producer. *Pak. J. Anal. Environ. Chem.* Vol. 17(1), 106-110.
105. Mendes, L. B. B., & Vermelho, A. B. (2013). Allelopathy as a potential strategy to improve microalgae cultivation. *Biotechnology for biofuels*, 6(1), 152.
106. Miao, X., & Wu, Q. (2004). High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. *Journal of biotechnology*, 110(1), 85-93.
107. Miao, X., Wu, Q., 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresour. Technol.* 97, 841–846.

108. Minhas, A. K., Hodgson, P., Barrow, C. J., Sashidhar, B., & Adholeya, A. (2016). The isolation and identification of new microalgal strains producing oil and carotenoid simultaneously with biofuel potential. *Bioresource technology*, 211, 556-565.
109. Moudříková, Š., Nedbal, L., Solovchenko, A., & Mojžeš, P. (2017). Raman microscopy shows that nitrogen-rich cellular inclusions in microalgae are microcrystalline guanine. *Algal Research*, 23, 216-222.
110. Moreno-Garcia, L., Adjallé, K., Barnabé, S., & Raghavan, G. S. V. (2017). Microalgae biomass production for a biorefinery system: Recent advances and the way towards sustainability. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 76, 493-506.
111. Mongrand, S., Bessoule, J. J., Cabantous, F., & Cassagne, C. (1998). The C16: 3\ C18: 3 fatty acid balance in photosynthetic tissues from 468 plant species. *Phytochemistry*, 49(4), 1049-1064.
112. Montagnes, D. J., & Franklin, M. (2001). Effect of temperature on diatom volume, growth rate, and carbon and nitrogen content: reconsidering some paradigms. *Limnology and Oceanography*, 46(8), 2008-2018.
113. Moreno-Garcia, L., Adjallé, K., Barnabé, S., & Raghavan, G. S. V. (2017). Microalgae biomass production for a biorefinery system: Recent advances and the way towards sustainability. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 76, 493-506.
114. Moestrup, Ø. (2002). Phylum Prasinophyta. In: *The Freshwater Algal Flora of the British Isles. An identification guide to freshwater and terrestrial algae.* (John, D.M., Whitton, B.A. & Brook, A.J. Eds), pp. 281-286. Cambridge: Cambridge University Press.
115. Mukherjee, C., Chowdhury, R., Sutradhar, T., Begam, M., Ghosh, S. M., Basak, S. K., & Ray, K. (2016). Parboiled rice effluent: A wastewater niche for microalgae and cyanobacteria with growth coupled to comprehensive remediation and phosphorus biofertilization. *Algal Research*, 19, 225-236.
116. Nascimento, I. A., Marques, S. S. I., Cabanelas, I. T. D., Pereira, S. A., Druzian, J. I., de Souza, C. O., ... & Nascimento, M. A. (2013). Screening microalgae strains for biodiesel production: lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria. *Bioenergy research*, 6(1), 1-13.
117. Nikkanen, L., Toivola, J., & Rintamäki, E. (2016). Crosstalk between chloroplast thioredoxin systems in regulation of photosynthesis. *Plant, cell & environment*.
118. O'fallon, J. V., Busboom, J. R., Nelson, M. L., & Gaskins, C. T. (2007). A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. *Journal of Animal Science*, 85(6), 1511-1521.
119. Ogbonna, J. C., & Tanaka, H. (1996). Night biomass loss and changes in biochemical composition of cells during light/dark cyclic culture of *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82(6), 558-564. ISO 690.
120. Ohlrogge, J., & Browse, J. (1995). Lipid biosynthesis. *The Plant Cell*, 7(7), 957.
121. O'Kelley, J.C. (1984). Nitrogen and gamete production in *Chlorococcum echinozygotum* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology* 20: 220-225, 5 figs, 2 tables.
122. Oncel, S., & Kose, A. (2014). Comparison of tubular and panel type photobioreactors for biohydrogen production utilizing *Chlamydomonas reinhardtii* considering mixing time and light intensity. *Bioresource technology*, 151, 265-270.
123. Orth, J., Thiele, I. & Palsson, B., 2010. What is flux balance analysis? *Nature biotechnology*, 28(3), pp.245–248.
124. Packer, A., Li, Y., Andersen, T., Hu, Q., Kuang, Y., & Sommerfeld, M. (2011). Growth and neutral lipid synthesis in green microalgae: a mathematical model. *Bioresource technology*, 102(1), 111-117.
125. Patel, V., Berthold, D., Puranik, P., & Gantar, M. (2015). Screening of cyanobacteria and microalgae for their ability to synthesize silver nanoparticles with antibacterial activity. *Biotechnology Reports*, 5, 112-119.
126. Peled-Zehavi, H., Avital, S., & Danon, A. (2010). Methods of redox signaling by plant thioredoxins. *Methods in Redox Signaling*, D. Das, ed (New Rochelle, NY: Mary Ann Liebert), 251-256.
127. Pancha, I., Chokshi, K., George, B., Ghosh, T., Paliwal, C., Maurya, R., & Mishra, S. (2014). Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresource technology*, 156, 146-154.
128. Perez-Garcia, O., Escalante, F. M., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water research*, 45(1), 11-36.
129. Pérez, L., Salgueiro, J. L., Maceiras, R., Cancela, Á., & Sánchez, Á. (2016). Study of influence of pH and salinity on combined flocculation of *Chaetoceros gracilis* microalgae. *Chemical Engineering Journal*, 286, 106-113.
130. Posten, C., & Schaub, G. (2009). Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels—a process view. *Journal of biotechnology*, 142(1), 64-69.
131. Prescott, G.W. (1962). *Algae of the Western Great Lakes area. With an illustrated key to the genera of desmids and freshwater diatoms. Revised [Second] edition.* pp. [i]-xiii, 1-977. Dubuque, Iowa: Wm. C. Brown Company Publishers 135 South Locust Street.
132. Quinn, J., De Winter, L., & Bradley, T. (2011). Microalgae bulk growth model with application to industrial scale systems. *Bioresource technology*, 102(8), 5083-5092.
133. Ramos, M. J., Fernández, C. M., Casas, A., Rodríguez, L., & Pérez, Á. (2009). Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresource technology*, 100(1), 261-268.
134. Ramaraj, R., Tsai, D. D. W., & Chen, P. H. (2015). Carbon dioxide fixation of freshwater microalgae growth on natural water medium. *Ecological Engineering*, 75, 86-92.

135. Razzak, S. A., Ali, S. A. M., & Hossain, M. M. (2017). Biological CO<sub>2</sub> fixation with production of microalgae in wastewater—A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 76, 379-390.
136. Richmond, A. (2004). Biological principles of mass cultivation. *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*, 125-177.
137. Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M., & Stanier, R. Y. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Microbiology*, 111(1), 1-61.
138. Rosales Loaiza, N. L., Bermúdez, J. L., Moronta, R., & Morales, E. D. Gallinaza: un residual avícola como fuente alternativa de nutrientes para producción de biomasa microalgal. *Revista Colombiana de Biotecnología*; Vol. 9, núm. 1 (2007); 41-48 1909-8758 0123-3475.
139. Roughan, P. G., & Slack, C. R. (1982). Cellular organization of glycerolipid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology*, 33(1), 97-132.
140. Ryther, J. H., & Guillard, R. R. L. (1962). Studies of marine planktonic diatoms: III. Some effects of temperature on respiration of five species. *Canadian Journal of Microbiology*, 8(4), 447-453.
141. Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.
142. Schenk, P. M., Thomas-Hall, S. R., Stephens, E., Marx, U. C., Mussgnug, J. H., Posten, C., ... & Hankamer, B. (2008). Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy research*, 1(1), 20-43.
143. Shamim, M. I. A., DIJKSTRA, F. A., ABUYUSUF, M., & HOSSAIN, A. I. (2015). Synergistic effects of biochar and NPK Fertilizer on soybean yield in an alkaline soil. *Pedosphere*, 25(5), 713-719.
144. Sheath, R. G., & Wehr, J. D. (Eds.). (2003). *Freshwater algae of North America: ecology and classification*. Academic Press.
145. Shurtz, B. K., Wood, B., & Quinn, J. C. (2017). Nutrient resource requirements for large-scale microalgae biofuel production: Multi-pathway evaluation. *Sustainable Energy Technologies and Assessments*, 19, 51-58.
146. Stemmler, K., Massimi, R., & Kirkwood, A. E. (2016). Growth and fatty acid characterization of microalgae isolated from municipal waste-treatment systems and the potential role of algal-associated bacteria in feedstock production. *PeerJ*, 4, e1780.
147. Soreanu, G., Tomaszewicz, M., Fernandez-Lopez, M., Valverde, J. L., Zuwała, J., & Sanchez-Silva, L. (2017). CO<sub>2</sub> gasification process performance for energetic valorization of microalgae. *Energy*, 119, 37-43.
148. Taher, H., Al-Zuhair, S., Al-Marzouqi, A., Haik, Y., & Farid, M. (2015). Growth of microalgae using CO<sub>2</sub> enriched air for biodiesel production in supercritical CO<sub>2</sub>. *Renewable Energy*, 82, 61-70.
149. Taleb, A., Kandilian, R., Touchard, R., Montalescot, V., Rinaldi, T., Taha, S., ... & Pruvost, J. (2016). Screening of freshwater and seawater microalgae strains in fully controlled photobioreactors for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 218, 480-490.
150. Tan, F., Wang, Z., Zhouyang, S., Li, H., Xie, Y., Wang, Y., ... & Li, Q. (2016). Nitrogen and phosphorus removal coupled with carbohydrate production by five microalgae cultures cultivated in biogas slurry. *Bioresource Technology*, 221, 385-393.
151. Tevatia, R., Demirel, Y., & Blum, P. (2012). Kinetic modeling of photoautotrophic growth and neutral lipid accumulation in terms of ammonium concentration in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bioresource technology*, 119, 419-424.
152. Tran, N. A. T., Padula, M. P., Evenhuis, C. R., Commault, A. S., Ralph, P. J., & Tamburic, B. (2016). Proteomic and biophysical analyses reveal a metabolic shift in nitrogen deprived *Nannochloropsis oculata*. *Algal Research*, 19, 1-11.
153. TMECC, 2002. *Test Methods for the Examination of Composting and Compost*. Composting Council, US, Bethesda, MD.
154. Thompson, G.A., 1996. Lipids and membrane function in green algae. *Biochim. Biophys. Acta* 1302, 17–45.
155. Torzillo, G., Vonshak, A., 2004. In: *Environmental stress physiology*. In: Richmond, A. (Ed.), *Handbook of Microalgal Culture*. Blackwell Publishers, Oxford, pp. 57–82.
156. Tsarenko, PM & John, DM (2011). Phylum Chlorophyta. Sphaeropleales fin. En: *La flora de algas de agua dulce de las Islas Británicas. Una guía de identificación con el agua dulce y las algas terrestre*. Segunda edición. (Juan, DM, Whitton, BA y Brook, AJ Eds), pp. 419-498. Cambridge: Cambridge University Press.
157. Tsarenko, P.M. (2011). Sphaeropleales. In: *Algae of Ukraine: diversity, nomenclature, taxonomy, ecology and geography. Volume 3: Chlorophyta*. (Tsarenko, P.M., Wasser, S.P. & Nevo, E. Eds), pp. 280-355. Ruggell: A.R.A. Gantner Verlag K.-G
158. Tsarenko, P.M. (2011). Sphaeropleales. In: *Algae of Ukraine: diversity, nomenclature, taxonomy, ecology and geography. Volume 3: Chlorophyta*. (Tsarenko, P.M., Wasser, S.P. & Nevo, E. Eds), pp. 280-355. Ruggell: A.R.A. Gantner Verlag K.-G.
159. Vargas, G., Donoso-Bravo, A., Vergara, C., & Ruiz-Filippi, G. (2016). Assessment of microalgae and nitrifiers activity in a consortium in a continuous operation and the effect of oxygen depletion. *Electronic Journal of Biotechnology*, 23, 63-68.
160. Venteris, E. R., Skaggs, R. L., Coleman, A. M., & Wigmosta, M. S. (2013). A GIS cost model to assess the availability of freshwater, seawater, and saline groundwater for algal biofuel production in the United States. *Environmental science & technology*, 47(9), 4840-4849.

161. Venteris, E. R., Skaggs, R. L., Wigmosta, M. S., & Coleman, A. M. (2014). A national-scale comparison of resource and nutrient demands for algae-based biofuel production by lipid extraction and hydrothermal liquefaction. *biomass and bioenergy*, 64, 276-290.
162. Wang, B., Zhang, Z., Hu, Q., Sommerfeld, M., Lu, Y., & Han, D. (2014). Cellular capacities for high-light acclimation and changing lipid profiles across life cycle stages of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *PLoS one*, 9(9), e106679.
163. Wehr, J. D., Sheath, R. G., & Kociolek, J. P. (Eds.). (2015). *Freshwater algae of North America: ecology and classification*. Elsevier.
164. White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.
165. Whitton, B. A. (1973). *Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods. Phycologia*, 18(4), 439-440.
166. Whitton, B.A. (2011). Cyanobacteria (Cyanophyta). In: *The freshwater algal flora of the British Isles. An identification guide to freshwater and terrestrial algae. Second edition.* (John, D.M., Whitton, B.A. & Brook, A.J. Eds), pp. 31-158. Cambridge: Cambridge University Press.
167. Wigmosta, M. S., Coleman, A. M., Skaggs, R. J., Huesemann, M. H., & Lane, L. J. (2011). National microalgae biofuel production potential and resource demand. *Water Resources Research*, 47(3).
168. Winck, F. V., Melo, D. O. P., & Barrios, A. F. G. (2013). Carbon acquisition and accumulation in microalgae *Chlamydomonas*: Insights from “omics” approaches. *Journal of proteomics*, 94, 207-218.
169. Wu, M., Alston, R.E. & Mabry, T.J. (1970). On the mechanism of the inhibition of growth by xylulose in *Chlorococcum echinogyotum*. *Journal of Phycology* 6: 57-61, 3 figs, 3 tables.
170. Yang, Z., Cheng, J., Yang, W., Zhou, J., & Cen, K. (2016). Developing a water-circulating column photobioreactor for microalgal growth with low energy consumption. *Bioresource Technology*, 221, 492-497.
171. Yen, H. W., Hu, I. C., Chen, C. Y., Ho, S. H., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2013). Microalgae-based biorefinery—from biofuels to natural products. *Bioresource technology*, 135, 166-174.
172. Yuan, S., Zhou, X., Chen, R., & Song, B. (2014). Study on modelling microalgae growth in nitrogen-limited culture system for estimating biomass productivity. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 34, 525-535.
173. Yuan, S., Zhou, X., Chen, R., & Song, B. (2014). Study on modelling microalgae growth in nitrogen-limited culture system for estimating biomass productivity. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 34, 525-535.
174. Yu, B., Wakao, S., Fan, J., & Benning, C. (2004). Loss of plastidic lysophosphatidic acid acyltransferase causes embryolethality in *Arabidopsis*. *Plant and cell physiology*, 45(5), 503-510.
175. Yu, W. L., Ansari, W., Schoepp, N. G., Hannon, M. J., Mayfield, S. P., & Burkart, M. D. (2011). Modifications of the metabolic pathways of lipid and triacylglycerol production in microalgae. *Microbial cell factories*, 10(1), 91.
176. Zhao, R., Cao, Y., Xu, H., Lv, L., Qiao, D. & Cao, Y. (2011). Analysis of expressed sequence tags from the green alga *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *Journal of Phycology* 47(6): 1454-1460.
177. Zhang, X.Q., Dubacq, J.-P. & Alfsen, A. (1993). Biochemical and cytological evidence for the stimulation of clathrin-coated pit (vesicle) formation by exogenous folic acid in *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *Journal of Phycology* 29: 203 - 209, 4 figs
178. Zijffers, J. W. F., Schippers, K. J., Zheng, K., Janssen, M., Tramper, J., & Wijffels, R. H. (2010). Maximum photosynthetic yield of green microalgae in photobioreactors. *Marine biotechnology*, 12(6), 708-718.
179. Adesanya, V. O., Davey, M. P., Scott, S. A., & Smith, A. G. (2014). Kinetic modelling of growth and storage molecule production in microalgae under mixotrophic and autotrophic conditions. *Bioresource technology*, 157, 293-304.
180. Araujo, G. S., Matos, L. J., Gonçalves, L. R., Fernandes, F. A., & Farias, W. R. (2011). Bioprospecting for oil producing microalgal strains: evaluation of oil and biomass production for ten microalgal strains. *Bioresource technology*, 102(8), 5248-5250.
181. Barclay, W., & Apt, K. (2013). Strategies for bioprospecting microalgae for potential commercial applications. *Handbook of Microalgal Culture : Applied Phycology and Biotechnology*, Second Edition, 69-79.
182. Barros, A., Guerra, L. T., Simões, M., Santos, E., Fonseca, D., Silva, J., ... & Navvalho, J. (2017). Mass balance analysis of carbon and nitrogen in industrial scale mixotrophic microalgae cultures. *Algal Research*, 21, 35-41.
183. 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, 217-226.
184. Chen, C. Y., Ho, S. H., Liu, C. C., & Chang, J. S. (2017). Enhancing lutein production with *Chlorella sorokiniana* Mb-1 by optimizing acetate and nitrate concentrations under mixotrophic growth. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*.
185. Chinnasamy, S., Bhatnagar, A., Hunt, R. W., & Das, K. C. (2010). Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Bioresource technology*, 101(9), 3097-3105.
186. Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, 25(3), 294-306.
187. Cho, H. U., Kim, Y. M., & Park, J. M. (2017). Enhanced microalgal biomass and lipid production from a consortium of indigenous microalgae and bacteria present in municipal wastewater under gradually mixotrophic culture conditions. *Bioresource technology*, 228, 290-297.
188. Cobos Ruiz, M., Paredes Rodríguez, J. D., & Castro Gómez, J. C. (2016). Inducción de la producción de lípidos totales en microalgas sometidas a estrés nutritivo. *Acta Biológica Colombiana*, 21(1), 17-26.

189. Draaisma, R. B., Wijffels, R. H., Slegers, P. E., Brentner, L. B., Roy, A., & Barbosa, M. J. (2013). Food commodities from microalgae. *Current opinion in biotechnology*, 24(2), 169-177.
190. Garibay-Hernández, A., Vázquez-Duhalt, R., Sánchez Saavedra, M. D., Serrano Carreón, L., & Martínez Jiménez, A. (2009). Biodiesel a partir de microalgas. *BioTecnología*, 13(3), 38-61.
191. Giannelli, L., Scoma, A., & Torzillo, G. (2009). Interplay between light intensity, chlorophyll concentration and culture mixing on the hydrogen production in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cultures grown in laboratory photobioreactors. *Biotechnology and bioengineering*, 104(1), 76-90.
192. Grobbelaar, J. U. (2004). Algal Nutrition—Mineral Nutrition. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*, 95-115.
193. Hegewald, E., Bock, C., & Krienitz, L. (2013). A phylogenetic study on Scenedesmaceae with the description of a new species of *Pectinodesmus* and the new genera *Verrucodesmus* and *Chodatodesmus* (Chlorophyta, Chlorophyceae). *Fottea*, 13(2), 14.
194. Ho, S. H., Chen, C. Y., & Chang, J. S. (2012). Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO<sub>2</sub> fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource technology*, 113, 244-252.
195. Ho, S. H., Huang, S. W., Chen, C. Y., Hasunuma, T., Kondo, A., & Chang, J. S. (2013). Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E. *Bioresource Technology*, 135, 157-165.
196. Ho, S. H., Chen, C. Y., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2011). Perspectives on microalgal CO<sub>2</sub>-emission mitigation systems—a review. *Biotechnology advances*, 29(2), 189-198.
197. Knud-Hansen, C. F., & Clair, D. (1998). *Pond fertilization: ecological approach and practical application* (p. 112). Corvallis, Oregon: Pond Dynamics/Aquaculture Collaborative Research Support Program, Oregon State University.
198. Lin, T. S., & Wu, J. Y. (2015). Effect of carbon sources on growth and lipid accumulation of newly isolated microalgae cultured under mixotrophic condition. *Bioresource technology*, 184, 100-107.
199. López-Mendoza, Z., Tavera, R., & Novelo, E. (2015). El fitoplancton de un canal de Xochimilco y la importancia de estudiar ecosistemas acuáticos urbanos. *TIP*, 18(1), 13-28.
200. Loera-Quezada, M. M., & Olguín, E. J. (2010). Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel: retos y oportunidades. *Rev. Latinoam. Biotecnol. Amb. Algal*, 1(1), 91-116.
201. Markou, G., & Georgakakis, D. (2011). Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agroindustrial wastes and wastewaters: a review. *Applied Energy*, 88(10), 3389-3401.
202. Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(1), 217-232.
203. Ortiz-Moreno, M. L., Cortés-Castillo, C. E., Sánchez-Villarraga, J., Padilla, J., & Otero-Paternina, A. M. (2012). Evaluating microalgae *Chlorella sorokiniana* growth in different culture mediums in autotrophic and mixotrophic conditions. *ORINOQUIA*, 16(1), 11-20.
204. Park, J. B. K., Craggs, R. J., & Shilton, A. N. (2011). Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource technology*, 102(1), 35-42.
205. Paranjape, K., Leite, G. B., & Hallenbeck, P. C. (2016). Strain variation in microalgal lipid production during mixotrophic growth with glycerol. *Bioresource technology*, 204, 80-88.
206. Perez-Garcia, O., Escalante, F. M., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water research*, 45(1), 11-36.
207. Posten, C. (2009). Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Engineering in Life Sciences*, 9(3), 165-177.
208. Purkayastha, J., Bora, A., Gogoi, H. K., & Singh, L. (2017). Growth of high oil yielding green alga *Chlorella ellipsoidea* in diverse autotrophic media, effect on its constituents. *Algal Research*, 21, 81-88.
209. Rawat, I., Kumar, R. R., Mutanda, T., & Bux, F. (2011). Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, 88(10), 3411-3424.
210. Radakovits, R., Jinkerson, R. E., Fuerstenberg, S. I., Tae, H., Settlage, R. E., Boore, J. L., & Posewitz, M. C. (2012). Draft genome sequence and genetic transformation of the oleaginous alga *Nannochloropsis gaditana*. *Nature communications*, 3, 686.
211. Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., & Tredici, M. R. (2009). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and bioengineering*, 102(1), 100-112.
212. Silkina, A., Zacharof, M. P., Hery, G., Nouvel, T., & Lovitt, R. W. (2017). Formulation and utilisation of spent anaerobic digestate fluids for the growth and product formation of single cell algal cultures in heterotrophic and autotrophic conditions. *Bioresource Technology*.
213. Steinrück, P., Erga, S. R., Mjøs, S. A., Kleivdal, H., & Prestegard, S. K. (2017). Bioprospecting North Atlantic microalgae with fast growth and high polyunsaturated fatty acid (PUFA) content for microalgae-based technologies. *Algal Research*.
214. Tomaselli, L., & Richmond, A. (2004). *Handbook of microalgal culture : Biotechnology and Applied phycology*. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*.

215. Umdu, E. S., Tuncer, M., & Seker, E. (2009). Transesterification of *Nannochloropsis oculata* microalga's lipid to biodiesel on Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> supported CaO and MgO catalysts. *Bioresource Technology*, 100(11), 2828-2831.
216. Velea, S., Oancea, F., & Fischer, F. (2017). \* National Institute for Research & Development in Chemistry and Petrochemistry, Bucharest, Romania, University of Agronomic Sciences and Veterinary Medicine, Bucharest, Romania, {University of Applied Sciences Western Switzerland, Sion, Switzerland. *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts*, 45.
217. Venglovsky, J., Martinez, J., & Placha, I. (2006). Hygienic and ecological risks connected with utilization of animal manures and biosolids in agriculture. *Livestock Science*, 102(3), 197-203.
218. Wang, H., Zhou, W., Shao, H., & Liu, T. (2017). A comparative analysis of biomass and lipid content in five *Tribonema* sp. strains at autotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultivation. *Algal Research*, 24, 284-289.
219. Wu, J. Y., Lay, C. H., Chen, C. C., & Wu, S. Y. (2017). Lipid accumulating microalgae cultivation in textile wastewater: Environmental parameters optimization. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*.
220. Xu, H., Miao, X., & Wu, Q. (2006). High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of biotechnology*, 126(4), 499-507.
221. Zhan, J., Rong, J., & Wang, Q. (2017). Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(12), 8505-8517