

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y**  
**AMBIENTALES**  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**



**TÍTULO DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

**EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE**  
**NITRÓGENO Y EL FOTOPERÍODO EN EL CRECIMIENTO Y**  
**PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS DE MICROALGAS PROVENIENTES DEL LAGO**  
**YAHUARCOCHA**

**PLAN DE TRABAJO DE TITULACIÓN PARA OBTENER EL TÍTULO DE**  
**INGENIERO/A EN INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTOR/A:**

**RONNY FABIÁN AMAGUAY GÓMEZ**

**DIRECTOR:**

**ING. CARLA SANDOVAL GUANO. MSc**

**Ibarra – Ecuador**

**2022**



FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y  
AMBIENTALES

CERTIFICACIÓN TRIBUNAL TUTOR TRABAJO DE  
TITULACIÓN

Ibarra, 16 junio del 2022

Para los fines consiguientes, una vez revisado el documento en formato digital el trabajo de titulación: "EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO Y EL FOTOPERÍODO EN EL CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS DE MICROALGAS PROVENIENTES DEL LAGO YAHUARCOCHA", de autoría del señor Ronny Fabian Aranguez Gómez estudiante de la Carrera de INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA el tribunal tutor CERTIFICAMOS que el autor o autores ha procedido a incorporar en su trabajo de titulación las observaciones y sugerencias realizadas por este tribunal.

Atentamente,

TRIBUNAL TUTOR

MSc. Carla Sandoval  
DIRECTOR TRABAJO TITULACIÓN

FIRMA

MSc. Santiago Zarate  
MIEMBRO TRIBUNAL TUTOR TRABAJO DE TITULACIÓN

SANTIAGO  
ZARATE

MSc. Andrey Chelapanga  
MIEMBRO TRIBUNAL TUTOR TRABAJO DE TITULACIÓN

ANDREY CHELAPANGA  
CHELAPANGA

**RECTOR INSTITUCIONAL**

Construye el desarrollo educativo, científico, tecnológico, innovador y cultural de la región norte del país. Fomenta profesiones exitosas, humanistas y éticas comprometidas con el cambio social.

# UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE



FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

## CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR

Por medio del presente yo Ing. Carla Sandoval MSc, certifico que el Sr. Ronny Amaguay, portador de la cedula de ciudadanía Nro. 0954510160. Ha trabajado en el desarrollo del trabajo de titulación **"EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO Y EL FOTOPERÍODO EN EL CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS DE MICROALGAS PROVENIENTES DEL LAGO YAHUARCOCHA"**, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología, para lo cual doy mi aprobación del trabajo final.

Es todo en cuanto puedo certificar en honor a la verdad

Atentamente:

Ing. Carla Sandoval MSc.  
**DIRECTOR DE TESIS**

# BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

## AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

### 1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	0954510160		
APELLIDOS Y NOMBRES:	Amaguay Gómez Ronny Fabian		
DIRECCIÓN:	Av. 17 de julio 9-131		
EMAIL:	<a href="mailto:rfamaguayg@utn.edu.ec">rfamaguayg@utn.edu.ec</a>		
TELÉFONO FIJO:		TELÉFONO MÓVIL:	0981093383

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO Y EL FOTOPERÍODO EN EL CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS DE MICROALGAS PROVENIENTES DEL LAGO YAHUARCOCHA.
AUTOR (ES):	Amaguay Gómez RONny Fabian
FECHA: DD/MM/AAAA	16/06/2022
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
PROGRAMA:	<input checked="" type="checkbox"/> PREGRADO <input type="checkbox"/> POSGRADO
TÍTULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniero en Biotecnología
ASESOR /DIRECTOR:	MSc. CARLA SANDOVAL

### 2. CONSTANCIAS

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrollo, sin los derechos de autores terceros, por lo tanto, la obra es original y es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 22 días del mes de junio del 2022

EL AUTOR:



(Firma)

Nombre: Ronny Fabián Amaguay Gómez

## **AGRADECIMIENTO**

En primer lugar, agradezco a Dios, mi madre, mi padre y mi familia por estar conmigo en cada etapa de mi vida. A mis docentes que han sido un pilar fundamental en mi formación como profesional, en especial a mi tutora Ing. Carla Sandoval quien me guio en mi trabajo de investigación.

Agradezco de igual forma a la familia que me dio la vida, mis amigos y colegas Daniela, María, Gisella, Marahía, Angela, Estefanny, Sharon, Steven y Javier, que estuvieron conmigo en los buenos y malos momentos.

Finalmente, quisiera agradecer a la familia Garzón Pasquel que me acogieron como un miembro más de su familia y me ayudaron cuando más lo necesite.

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a mi madre Gioconda Gómez, quien me enseña día tras día que un tropezón no es caída y que si te caes te levantas y luchas cada vez más fuerte para cumplir tus metas. A mi padre, que desde el cielo me cuida y protege, a mi señorita Lolita quien fue una segunda madre para mí y me inculco la noble profesión del ser docente. Por último, dedico esta investigación a mi familia y amigos.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	v
<b>DEDICATORIA</b> .....	vi
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	vii
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	x
<b>CAPÍTULO I</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1 Antecedentes</b> .....	1
<b>1.2 Planteamiento del problema</b> .....	3
<b>1.3 Justificación</b> .....	5
<b>1.4 Pregunta directriz</b> .....	6
<b>1.5 Objetivos</b> .....	6
1.5.1 Objetivo general.....	6
1.5.2 Objetivos específicos .....	6
<b>CAPÍTULO II</b> .....	7
<b>2 MARCO TEÓRICO</b> .....	7
<b>2.1 Microalgas</b> .....	7
<b>2.2 Chlamydomonas</b> .....	7
<b>2.3 Medios de cultivo</b> .....	8
<b>2.4 Luz</b> .....	8
<b>2.5 Temperatura</b> .....	9
<b>2.6 Métodos de cosecha</b> .....	10
2.6.1 Floculación .....	10
2.6.2 Sedimentación por gravedad.....	11
2.6.3 Centrifugación .....	11
<b>2.7 Producción de Metabolitos</b> .....	12
2.7.1 Lípidos .....	12
<b>2.8 Factores que afectan la producción de lípidos</b> .....	12
2.8.1 Fotoperíodo.....	12
2.8.2 Salinidad .....	13
2.8.3 Concentración/fuente de nitrógeno.....	13
<b>2.9 Extracción de lípidos</b> .....	14
2.9.1 Métodos de extracción.....	14
2.9.2 Cuantificación de lípidos .....	15

<b>CAPÍTULO III</b> .....	16
<b>3 METODOLOGÍA</b> .....	16
<b>3.1 Producción de biomasa</b> .....	<b>16</b>
3.1.1 Lugar de estudio .....	16
3.1.2 Mantenimiento de la cepa .....	16
3.1.3 Preparación del inóculo. ....	16
3.1.4 Diseño de Fotobiorreactor .....	17
3.1.5 Cultivo de microalgas bajo diferentes concentraciones de nitrógeno. ....	18
3.1.6 Medición de la densidad óptica mediante espectrofotometría.....	20
3.1.7 Medición de la concentración celular por cámara de Neubauer.....	21
<b>3.2 Cosecha de biomasa</b> .....	<b>22</b>
3.2.1 Floculación .....	22
3.2.2 Sedimentación.....	24
3.2.3 Centrifugación .....	24
<b>3.3 Producción de lípidos</b> .....	<b>25</b>
3.3.1 Fotoperíodo.....	25
3.3.2 Contenido lipídico .....	25
<b>3.4 Análisis estadístico</b> .....	<b>26</b>
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	<b>27</b>
<b>4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>27</b>
<b>4.1 Concentración óptima de nitrógeno.</b> .....	<b>27</b>
4.1.1 Cinética de crecimiento .....	27
<b>4.2 Métodos de Cosecha</b> .....	<b>32</b>
4.2.1 Eficiencia .....	32
<b>4.3 Perfil lipídico</b> .....	<b>34</b>
<b>CAPÍTULO V</b> .....	<b>38</b>
<b>5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	<b>38</b>
<b>5.1 Conclusiones</b> .....	<b>38</b>
<b>5.2 Recomendaciones</b> .....	<b>38</b>
REFERENCIAS .....	40
ANEXOS.....	55



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Microalga <i>Chlamydomona</i> .....	8
<b>Figura 2</b> Ubicación geográfica del área de estudio.....	16
<b>Figura 3</b> Esquema de fotobiorreactor.....	18
<b>Figura 4</b> Biorreactores empleados en los ensayos de cinética de crecimiento.....	20
<b>Figura 5</b> Conteo celular por cámara de Neubauer .....	21
<b>Figura 6</b> Cosecha de biomasa microalgal.....	22
<b>Figura 7</b> Preparación de solución flocculante de cáscara de huevo.....	23
<b>Figura 8</b> Cosecha de biomasa por centrifugación.....	25
<b>Figura 9</b> Cinética de crecimiento de <i>Chlamydomona agloiformis</i> .....	28
<b>Figura 10</b> Gráfica de correlación del número de células vs densidad óptica .....	28
<b>Figura 11</b> Determinación de la mejor concentración de nitrógeno evaluado por densidad óptica y conteo celular.....	30
<b>Figura 12</b> Eficiencia de cosechado de <i>Chlamydomona agloiformis</i> medido por densidad óptica y numero de células.....	32
<b>Figura 13.</b> Lípidos totales de <i>C. agloiformis</i> aplicando diferentes fotoperíodos.....	34
<b>Figura 14</b> Perfil lipídico de <i>C. agloiformis</i> aplicando diferentes fotoperíodos.....	36

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Comparación de los distintos métodos de recolección y deshidratación de microalgas. ....	10
<b>Tabla 2</b> Composición química de cada medio de cultivo .....	19

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1</b> Supuestos de normalidad.....	55
<b>Anexo 2.</b> Supuestos de homogeneidad.....	56
<b>Anexo 3.</b> Prueba HSD Tukey para cinetica de crecimiento .....	57
<b>Anexo 4.</b> Prueba HSD Tukey para eficiencia de cosecha .....	58
<b>Anexo 5.</b> Perfil lipídico por diferentes fotoperíodos.....	59

## RESUMEN

La biotecnología de algas en las últimas décadas ha crecido considerablemente, encaminándose en diferentes campos de la industria, con diversificadas aplicaciones tales como biorremediación, suplementos alimenticios, controladores biológicos, biocombustibles, entre otros. Las microalgas pueden proporcionar una gran cantidad de productos de valor agregado, como lípidos. Estos se usan en la producción de biodiesel, compuestos bioactivos para cosméticos, nutracéuticos, fármacos, remediación de aguas residuales y alimentos de biomasa para ganado. Sin embargo, estos no se encuentran en grandes cantidades; varios estudios han sugerido que la mayoría de las especies experimentan una mejora en la acumulación y transformación de lípidos en condiciones de estrés. La productividad de lípidos depende tanto del contenido de lípidos en la célula como del número de células en el medio, es por esto por lo que se debe elegir un medio de cultivo adecuado para un óptimo crecimiento. En el presente trabajo de investigación se evaluó la influencia de la concentración de nitrógeno y el fotoperíodo en el crecimiento y producción de lípidos en *Chlamydomonas agloiformis*. Las concentraciones de nitrógeno usadas fueron 1.53 g/L N total (MS modificado), fertilizante 0.092 g/L N total (T1), fertilizante +  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.138 g/L N total (T2), fertilizante +  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.184 g/L N total (T3). Además, se evaluaron varios métodos de cosecha los cuales fueron centrifugación, floculación y sedimentación por gravedad, esto para obtener una mayor concentración de biomasa, finalmente se sometió a la célula a diferentes fotoperíodos para incrementar el contenido lipídico. La concentración de nitrógeno óptima para el crecimiento celular de *Chlamydomonas agloiformis* fue de 1.53 g/L N total para el medio MS con un  $\mu=0.34 \pm 0.02 \text{ d}^{-1}$ , una absorbancia de 0.93 y una concentración celular de  $14.1 \times 10^6 \text{ células mL}^{-1}$ . Además, se determinó una correlación entre densidad óptica y concentración celular, variables analizadas en la cinética de crecimiento. El método de cosecha con una mayor eficiencia fue centrifugación con un valor del  $99 \pm 1 \%$ . En cuanto al contenido de lípidos en *Chlamydomonas agloiformis*, el fotoperíodo que produjo mayor concentración fue 24:00h luz/oscuridad con 6.01%, mientras que el fotoperíodo con mayor diversidad de lípidos fue 12:12 h luz/oscuridad, con diferentes ácidos grasos tales como: ácido palmítico (C16), ácido esteárico (C18), ácido linoléico (C18:2n6 cis  $\omega$ 6), ácido Cis 10-Heptadecanoico (C17:1), ácido erúxico (C22:1n9  $\omega$ 9).

**Palabras claves:** Microalgas, fotobiorreactor, lípidos, nitrógeno, fotoperíodos.

## ABSTRACT

Algae biotechnology in the last decades has grown considerably, moving into different fields of industry, with diversified applications such as bioremediation, food supplements, biological controllers, biofuels. Microalgae can provide a large number of value-added products, such as lipids. They are used in the production of biodiesel, bioactive compounds for cosmetics, nutraceuticals, pharmaceuticals, wastewater remediation and biomass feed for livestock. Microalgae can provide a large number of value-added products, such as lipids. However, these are not found in large quantities; several studies have suggested that most species experience an improvement in lipid accumulation and transformation under stressful conditions. Lipid productivity depends on both the lipid content in the cell and the number of cells in the medium, which is why a suitable culture medium must be chosen for optimal growth. In the present research work, the influence of nitrogen concentration and photoperiod on growth and lipid production in *Chlamydomonas agloiformis* was evaluated. The nitrogen concentrations used were (1.53 g/L N total) MS modified, (fertilizer 0.092 g/L N total) T1, (fertilizer + NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0.138 g/L N total) T2, (fertilizer + NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0.184 g/L N total) T3. In addition, several harvesting methods were evaluated which were centrifugation, flocculation and gravity sedimentation, this to obtain a higher concentration of biomass, finally subjected the cell to different photoperiods to increase the lipid content. The optimal nitrogen concentration for cell growth of *Chlamydomonas agloiformis* was 1.53 g/L N total for the MS medium with a  $\mu=0.34 \pm 0.02$  d<sup>-1</sup>, and an absorbance of 0.93 and a cell concentration of  $14.1 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup>. In addition, a correlation between optical density and cell concentration was determined, variables analyzed in the growth kinetics. The harvesting method with the highest efficiency was centrifugation with a value of  $99 \pm 1\%$ . Regarding the lipid content in *Chlamydomonas agloiformis*, the photoperiod with the highest concentration was 24:00h light/dark with 6.01%, while the photoperiod with the highest lipid diversity was 12:12 h light/dark, with different fatty acids such as: palmitic acid (C16), stearic acid (C18), linoleic acid (C18:2n6 cis  $\omega$ 6), Cis 10-Heptadecanoic acid (C17:1), erucic acid (C22:1n9  $\omega$ 9).

**Key words:** Microalgae, photobioreactor, lipids, nitrogen, photoperiods.

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes

Durante las últimas tres décadas, la biotecnología de algas ha crecido constantemente en una industria global, con un campo diversificado de aplicaciones tales como biorremediación, suplementos alimenticios, controladores biológicos, biocombustibles, etc. (Hallmann, 2007). Utilizando microalgas, se ofrecen soluciones innovadoras para satisfacer la creciente demanda de compuestos bioactivos, alimentos y materias primas con bajo consumo de recursos (Lakatos y Strieth, 2017). Estos microorganismos tienen un alto contenido de lípidos (20 a 50%), proteínas (35 a 60%), pigmentos (8 a 12%), hidratos de carbono (5 a 23%), y otros constituyentes bioactivos tales como pigmentos, biopolímeros, oligoelementos etc. (Banerjee et al., 2016; Bermudez, 2018; Koutra et al., 2018). Debido al contenido de estas biomoléculas en la célula microalgal, en los últimos años ha incrementado el interés de los investigadores por estudiar las microalgas (Kim et al. 2016).

La mayoría de investigaciones se basan en la producción de biodiesel, compuestos bioactivos para cosméticos y nutraceuticos, remediación de aguas residuales y alimentos de biomasa para ganado (Odjadjare et al., 2015). La investigación de microalgas como fuente de materia prima para la fabricación de biodiesel ha tomado gran interés, debido a su mayor eficiencia fotosintética, producción de biomasa y velocidad de crecimiento en comparación con otros cultivos energéticos como canola, soja y palma africana (Mubarak et al., 2015). También pueden acumular hasta un 80% de contenido de lípidos donde existen principalmente triacilglicerol (ATG), que se pueden usar como materia prima para la conversión de biodiesel (Ma et al., 2016).

Entre las microalgas más investigadas para la producción de biodiesel se encuentran *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis oculata*, debido a su alto contenido de ATG (Dixon y Wilken, 2018). De igual forma, otras microalgas estudiadas son las pertenecientes al género *Chlamydomonas*, ya que se ha demostrado que bajo condiciones mixotróficas de cultivo pueden acumular una cantidad significativa de ATG del mismo modo que otras microalgas oleaginosas (Takeuchi y Benning, 2019). Además de la producción de biodiesel existen otras formas de combustibles como el bioetanol y el

biometano (Tang et al., 2020). Estudios recientes han demostrado que al cultivar a *Chlamydomonas reinhardtii* en biodigestores, se ha obtenido una óptima producción de bioetanol (Banerjee et al., 2021; Tasic et al., 2021). De la misma forma otras microalgas como *Chlorella* sp, *Dunaliella* sp, *Scenedesmus* sp, y *Spirulina* sp han sido consideradas candidatas para la producción de estas fuentes de energía (Dixon y Wilken, 2018).

Además de los ATG, las microalgas tienen ácidos grasos libres que no se convierten en biodiesel, como son los esteroides y los pigmentos, es decir que, aunque algunas microalgas producen un alto contenido de lípidos, no siempre corresponden con una alta producción de biodiesel (Alessandro y Antoniosi, 2016). Existen diferentes tipos de ácidos grasos, entre los que se encuentran los ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados (PUFA), estos últimos son sustancias bioactivas importantes, que consisten en dos familias principales: series  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 (Deacon et al., 2017). Sobre la base de la composición de ácidos grasos, la biomasa de algas puede utilizarse también como aditivos para alimentos, piensos o en aplicaciones farmacéuticas (Vítová et al., 2015).

Las principales especies utilizadas para la obtención de los PUFA son microalgas marinas tales como *Schizochytrium* sp y *Nannochloropsis* sp, sin embargo existen algunas especies de agua dulce que se utilizan para la producción de omega 3 ( $\omega$ -3) y omega 6 ( $\omega$ -6) como lo son *Scenedesmus* sp, *Chlorella* sp y *Chlorococcum* sp (Ferreira et al., 2019). Las especies de microalgas de agua dulce se usan para la obtención de PUFA debido a que, contienen algunos ácidos grasos como ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico C16:0, ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2) y ácido linolénico (C18:3) en la composición de la biomasa (Tejeda et al., 2015). Entre las microalgas de agua dulce más estudiadas se encuentra el género *Desmodesmus*, debido al alto contenido de ácidos grasos, donde resaltan los  $\omega$ -3 (Ferreira et al., 2019).

En la actualidad para aumentar la concentración de lípidos en la célula se utilizan diferentes metodologías entre las que se encuentran la privación de nutrientes como nitrógeno y fósforo, cambios de temperatura, pH, intensidad de luz y fotoperíodos (Kumar et al., 2019). Del cual, el más efectivo es la privación de nitrógeno, esto se ha demostrado en diferentes estudios con distintas especies microalgales como *Neochloris oleoabundans*, *Auxenochlorella pyrenoidosa*, *Dunaliella tertiolecta* y *Desmodesmus* sp (Minhas et al., 2016; Nagappan y Kumar, 2021).

## 1.2 Planteamiento del problema

En Ecuador, hay más de 1500 especies de algas identificadas pertenecientes a las divisiones: Chlorophyta, Cyanophyta, Euglenophyta, Bacillariophyta, Ochrophyta y Dinophyta (Guamán y González, 2016). De estas, 106 están presentes en áreas lacustres (lagos) por encima de los 3500 metros sobre el nivel del mar (Ortiz et al., 2017). Entre las zonas con mayor prevalencia de lagos en el país se encuentra la provincia de Imbabura, la que cuenta con centros volcánicos, lagunas y cascadas (Saelens, 2015). Los lagos con mayor relevancia son: Yahuarcocha, Cuicocha, Mojanda, Puruhanta y el lago San Pablo, con una biodiversidad característica que incluye aves acuáticas, peces endémicos, macroinvertebrados bentónicos, fitoplancton, etc ( Guevara et al., 2012; Navarrete y Zambrano, 2013; Steinitz et al., 2020).

Yahuarcocha es uno de los lagos más importantes, debido a su diversidad ecológica, en donde se encuentra una gran cantidad de fitoplancton, como microalgas y cianobacterias (Saelens, 2015). Estos microorganismos son los principales productores de ecosistemas marinos, además de ser los primeros en responder frente a alteraciones en el ecosistema, como las causadas por organismos oportunistas, debido a que son la base de la cadena trófica acuática ( Raven, 1981; Lemley et al., 2016). Es por esta razón que las microalgas son usadas como controladores biológicos para determinar el estado trófico de ambientes acuáticos (Terneus et al., 2020)

Además de su importancia ecológica, estos microorganismos se caracterizan por la producción de metabolitos como, péptidos, ácidos grasos, antioxidantes, toxinas, esteroides y carotenoides, entre otros (Ramírez et al., 2015; Mondal et al., 2017; Vuppaladadiyam et al., 2018; Saini et al., 2020). Entre los metabolitos de mayor importancia en la industria se encuentran los lípidos, ya que pueden ser usados como biocombustibles, cosméticos, nutraceúticos, alimento, surfactantes, fármacos, etc ( Tao, 2007; Ferreira et al., 2019).

Diferentes microalgas verdes han sido estudiadas para la producción de metabolitos como lípidos, debido al alto contenido de estos, incluidas *Dunaliella salina* (Chen et al., 2015); *Botryococcus braunii* (Tasić et al., 2016); *Tetraselmis suecica* (Kim et al., 2016); *Chlorella* sp (Kiran et al., 2016); *Nannochloropsis* sp ( Ma et al., 2016); *Chlamydomonas reinhardtii*, y *Scenedesmus* sp (Rocha et al., 2017). De estos microorganismos destacan las especies del género *Chlamydomona* debido a que se



adaptan rápidamente a los cambios ambientales, por lo que son fácilmente cultivados en condiciones de laboratorio (Salomé y Merchant, 2019).

Por otro lado, cabe recalcar que la síntesis de biomasa y la biosíntesis de lípidos compiten por la asimilación fotosintética del carbono inorgánico, y se requiere un cambio metabólico fundamental para pasar de la producción de biomasa al metabolismo de almacenamiento de energía (Fields et al., 2014). Es por esto que el contenido de lípidos producidos a partir de la biomasa microalgal en condiciones óptimas de cultivo, es insuficiente para satisfacer las necesidades a nivel industrial (Sun et al., 2018). De igual forma Fields et al., (2014) expresa que la biosíntesis de lípidos puede ser estimulados por la inducción de estrés. Entre los métodos de estrés más utilizados para aumentar el contenido de lípidos en la célula están, cambios de temperatura, la intensidad de iluminación, estrés por nutrientes, la relación del ciclo de luz/oscuridad y la tasa de aireación (Tejeda et al., 2015; Shin et al., 2018)

El método más empleado para un aumento del contenido de lípidos es la limitación de nutrientes, como el nitrógeno, el cual cambia el metabolismo de la célula hacia la producción de aceites, he incluso se puede alcanzar una productividad de hasta el 80% de lípidos con respecto al contenido microalgal (Goncalves et al., 2016). Entre los organismos que reaccionan positivamente al estrés por nitrógeno, generando un aumento de lípidos se encuentra el género *Chlamydomona* (Fields et al., 2014).

A pesar de ser uno de los métodos más económicos para mejorar el contenido lipídico de la biomasa, su impacto puede llegar a ser limitado si no existe una alta concentración de biomasa previa, debido a que dicho aumento disminuye la productividad de biomasa (Hernández y Labbé, 2014; Morales et al., 2021). Esto se genera porque la célula necesita prolongar su tiempo de vida ante condiciones adversas, por lo que el metabolismo celular se centra en la producción de biomoléculas de reserva energética y no en el aumento de la concentración de celular (Valledor et al., 2014). Es por esto que a pesar que la concentración lipídica por célula aumenta considerablemente, la densidad de biomasa sufre un efecto negativo.

En estudios realizados en *C. oleofaciens* y *C. vulgaris* el contenido de lípidos por célula aumento considerablemente, mientras que la densidad microalgal disminuyó de 4.3 a 2 g L<sup>-1</sup> y la productividad lipídica de 127 ± 19 a 86 ± 8 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (Adams et al., 2013), de la misma forma en *Chlorella sp* la concentración celular disminuyó de 1.66 a 0.48 g

$L^{-1}$  y la productividad lipídica de 21.3 a 11.3  $mg L^{-1} d^{-1}$  (Zhu et al., 2016). Es por esta razón que a pesar de que el estrés por nitrógeno aumenta la concentración lipídica por célula no sería una estrategia adecuada para la producción de lípidos a gran escala (Mujtaba et al., 2012). Por otro lado, Adams et al., (2013) expresa que para reducir costos de producción y sea viable la obtención de lípidos a partir de microalgas se necesita una alta densidad de biomasa y un alto contenido de lípidos. A pesar de haber numerosas investigaciones en estrés por nutrientes, existen escasos trabajos relacionados con otros métodos de producción de lípidos (Mubarak et al., 2015).

### 1.3 Justificación

Plantas como la caña de azúcar, remolacha azucarera, mandioca, soja, canola y palma aceitera, actualmente se utilizan para la producción de lípidos a nivel comercial (Alessandro y Antoniosi, 2016). Sin embargo, debido a la creciente demanda de materia prima como fuente de alimento, junto con la disponibilidad limitada de tierra cultivable para el cultivo de materia prima comestible y no comestible, hace que la producción de lípidos sea insostenible a largo plazo (Mubarak et al., 2015).

Una alternativa viable de reemplazo para estas especies vegetales es el cultivo de microalgas, debido a su alto contenido de lípidos que oscila entre el 20 y el 50% del peso seco de la célula y en determinadas condiciones hasta el 80% (Sun et al., 2018). Muchas algas acumulan cantidades sustanciales de ácidos grasos de cadena larga (LC-PUFA) en forma de triacilgliceroles (TAG), como omega-3 ( $\omega$ -3): ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) y omega-6 ( $\omega$ -6): ácido linoleico (LA), ácido  $\gamma$  linolénico (GLA) y ácido araquidónico (AA) (Â. P. Matos, 2017). Estos ácidos muestran efectos positivos sobre la salud humana, tales como prevención de enfermedades cardíacas, la actividad antiinflamatoria, el desarrollo del cerebro y la salud de la visión (Ma et al., 2016).

Los ácidos grasos que se encuentran en mayor proporción en células vegetales son el ácido palmítico (C16) con 29 a 44% y el ácido esteárico (C18) con 68% del contenido lipídico, los cultivos de microalgas poseen la misma composición de ácidos grasos y pueden alcanzar rendimientos de producción similares en menor área ( Ramli et al., 2008; Acuña et al., 2014; Montoya et al., 2014; Huang et al., 2016). Por ejemplo, un cultivo de palma aceitera necesita alrededor del 24% del área total del cultivo en comparación a las

microalgas que solo necesitan de 1 al 3% del cultivo total para la producción de aceites (Leong et al., 2018).

La capacidad de productividad de lípidos en microalgas varía de una especie a otra (Basil et al., 2014). El metabolismo de las microalgas depende de las condiciones externas, por lo tanto, los cambios leves en el entorno externo o en las condiciones de cultivo estimulan la producción de varios metabolitos comercialmente importantes (Kumar et al., 2019). Para aumentar la producción de lípidos en microalgas se han generado diversas alternativas, entre estas se encuentra la modificación del fotoperíodo, que además genera cambios importantes en el crecimiento (Villa et al., 2014). Por otro lado, los medios de cultivo usados en laboratorio son de alto valor económico por lo que, actualmente se busca implementar alternativas como el uso de fertilizantes nitrogenados, debido a su bajo costo y a que se ha demostrado que la célula puede tener un óptimo crecimiento (Huang et al., 2014; Nayak et al., 2016; Panta et al., 2016; Silva et al., 2019). Es por esto que en el presente trabajo se busca incrementar la concentración de lípidos y biomasa microalgal de *Chlamydomonas agloiformis* empleando diferentes fotoperíodos y un medio de cultivo rentable alterando las concentraciones de nitrógeno.

#### **1.4 Pregunta directriz**

¿Las diferentes concentraciones de nitrógeno y fotoperíodos mejoran la producción de lípidos y el crecimiento de microalgas provenientes del lago Yahuarcocha?

#### **1.5 Objetivos**

##### **1.5.1 Objetivo general.**

Evaluar la influencia de la concentración de nitrógeno y el fotoperíodo en el crecimiento y producción de lípidos de microalgas provenientes del lago Yahuarcocha.

##### **1.5.2 Objetivos específicos**

- Establecer la concentración de nitrógeno óptima en el medio de cultivo para el escalamiento de microalgas.
- Obtener un protocolo para la cosecha de biomasa de microalgas.
- Comparar el contenido lipídico de las microalgas estudiadas bajo diferentes fotoperíodos.

## CAPÍTULO II

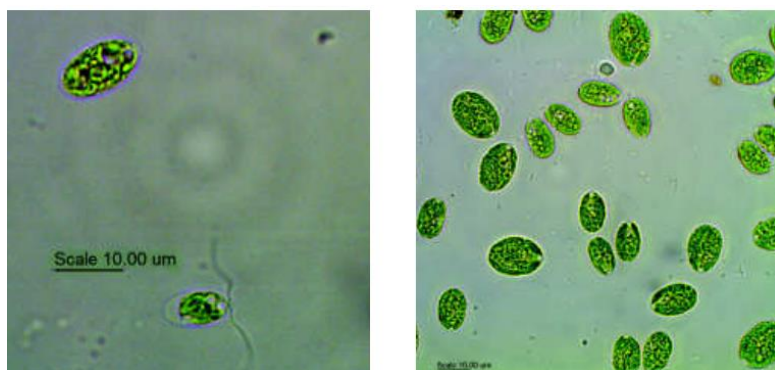
### 2 MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Microalgas

Las microalgas son organismos microscópicos cuyos hábitats se encuentran en diferentes cuerpos de agua como, ríos, lagos y mares (Posten y Feng, 2016). Estos microorganismos son considerados fotosintéticos debido a que generan O<sub>2</sub> a partir de fotosíntesis y lo liberan en la atmósfera (Guermazi et al. 2014). Además, son de gran importancia para la conversión de energía, y como indicador de la calidad de agua debido a que indica el nivel de eutrofización (Xu et al., 2020). Por otro lado, son capaces de vivir en condiciones adversas gracias a su estructura unicelular y pluricelular, su capacidad para tolerar los cambios en el ambiente, y a su rápido crecimiento (Odjadjare et al., 2015). Estos microorganismos pueden vivir en medios autótrofos, es decir, que solo requieren CO<sub>2</sub>, luz solar y componentes inorgánicos para su desarrollo, o heterótrofos que requieren, al mismo tiempo, compuestos orgánicos y otros nutrientes (Tan et al., 2018). Estos organismos comprenden protistas, eucariotas, cianobacterias procariotas y algas azul-verdes, (Martinez et al. 2014).

#### 2.2 Chlamydomonas

Las algas verdes del género *Chlamydomonas* son organismos unicelulares móviles flageladas (Figura 1) (Scholz y Villalobos, 2014). Entre sus hábitats están las superficies de suelos húmedos, agua dulce y marina, además que se pueden encontrar en aguas residuales, debido a su capacidad de tolerancia a la contaminación (Salomé y Merchant, 2019) *Chlamydomona reinhardtii* es considerado el organismo modelo de microalgas, esto debido a que tiene un crecimiento haploide, por lo que expresa inmediatamente los fenotipos mutantes, permitiendo así el estudio de los genes, además de que tiene un crecimiento rápido y la capacidad de crecer en la oscuridad cuando se encuentra en acetato (Cross y Umen, 2015; Sasso et al., 2018). Es por esto que se ha estudiado en la genómica, proteómica, metabolómica y producción de bioproductos (Nakanishi et al., 2014).



**Figura 1.** Microalga Chlamydomona. Tomado de Guamán y González, (2016).

### **2.3 Medios de cultivo.**

Las investigaciones sobre el cultivo de microalgas reciben gran importancia dada su amplia aplicación biotecnológica y comercial (Vera et al., 2014). Requieren diferentes factores para su crecimiento, dentro de los cuales se encuentran los requerimientos físico-químicos y los nutritivos (Prieto et al., 2005). Un medio de cultivo básico para microalgas contiene carbono, nitrógeno, fósforo, calcio, potasio, magnesio, microelementos y vitaminas (Carvalho et al. 2019). Las algas se pueden cultivar en modo autótrofo o heterótrofo usando varias fuentes de carbono orgánico e inorgánico (Huy et al 2017).

Entre los nutrientes más importantes para el crecimiento de microalgas está: carbono inorgánico, nitrógeno inorgánico y fósforo (Jankowska et al., 2017). El nitrógeno es uno de los nutrientes más críticos para el crecimiento de las algas, porque este nutriente es un precursor en todas las proteínas estructurales y también funcionales como enzimas, péptidos, clorofilas, moléculas de transferencia de energía y materiales genéticos en las células de las algas (Mahdiah et al., 2019). Existen diferentes fuentes de nitrógeno entre estas esta, amonio, nitrato, levadura, peptonas y urea (Minhas et al., 2016). El amonio tiene una asimilación energética más favorable que el nitrato, pero a pesar de esto existen problemas de toxicidad asociados con un alto nivel de amonio (Lari et al., 2016)

### **2.4 Luz**

La luz es uno de los parámetros más importantes que afectan el crecimiento de algas, además, la intensidad de la luz y el fotoperíodo juegan un papel significativo en su crecimiento y distribución, pero los requisitos varían mucho según la especie, las condiciones y la densidad del cultivo de algas (Basil et al., 2014). La importancia de esta radica en el papel que realiza al inicio de la fotosíntesis (Vuppaladadiyam et al., 2018).

Las intensidades de luz de 100 a 200  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  se utilizan comúnmente para la producción de microalgas (Minhas et al., 2016). Sin embargo, las diferentes especies de microalgas requieren longitudes de onda de luz distintas, por lo que antes de iniciar el cultivo de microalgas se debe investigar cada caso individual para elegir el mejor parámetro operativo (Jankowska et al., 2017).

Además, es necesaria para la producción de moléculas de ATP y NADPH, utilizadas en la fotosíntesis y en moléculas necesarias para el crecimiento, por otro lado altas intensidades de luz pueden generar fotoinhibición (Metsoviti et al., 2020). Esto ocurre porque el exceso de fotones puede dañar al fotosistema II (Carvalho et al., 2011). Esta alteración se da debido a que el fotosistema II es el encargado de captar la energía lumínica en la primera etapa de la fotosíntesis, para después ser utilizado en la fotólisis del  $\text{H}_2\text{O}$  (Kawakami y Shen, 2018). Para poder reparar dicho daño las células microalgales necesitan de un fotoperíodo (luz/ oscuridad) adecuado, ya que estos microorganismos son capaces de reparar el daño fotoinducido durante la oscuridad (Gonçalves et al., 2014).

El fotoperíodo tiene efecto sobre los ciclos de vida y actividades metabólicas de las microalgas tanto en cultivo como en la naturaleza (Villa et al., 2014). Las microalgas necesitan un fotoperíodo adecuado para una fotosíntesis eficiente, se necesita luz para que una fase fotoquímica produzca (ATP) trifosfato de adenosina, NADP-oxidasa y también se necesite sintetizar las fases bioquímicas que son moléculas necesarias para el crecimiento (Kendirlioglu et al., 2015). La progresión del ciclo celular está regulada por un reloj circadiano, de modo que el tamaño de la célula aumenta durante los períodos de luz y la división celular se produce en períodos oscuros (Kato et al., 2019). La división celular puede ocurrir tanto en la fase oscura como en la fase iluminada; aunque el fotoperíodo varía de un organismo a otro (Aishvarya et al., 2015)

## **2.5 Temperatura**

La temperatura se relaciona directamente con las respuestas celulares, fisiológicas y morfológicas de los cultivos de microalgas, incluida la fijación de carbono, las temperaturas altas favorecen la absorción y fijación del  $\text{CO}_2$  (Vuppaladadiyam et al., 2018). Normalmente, la mayor tasa de crecimiento de las microalgas se logra aumentando la temperatura a su nivel óptimo que es entre 18 y 30 ° C (Jankowska et al., 2017).

## 2.6 Métodos de cosecha.

Separar las algas del agua sigue siendo un obstáculo importante para el procesamiento a escala industrial, en parte debido al pequeño tamaño de las células de algas, con algas eucariotas unicelulares típicamente de 3 a 30  $\mu\text{m}$  y cianobacterias tan pequeñas como 0.2–2  $\mu\text{m}$ , además, los cultivos relativamente diluidos de 200 a 600 mg/L son comunes y requieren que se procesen grandes volúmenes de agua, por esto se ha estimado que la recuperación contribuirá del 20 al 30% del costo total de producción de biomasa (Christenson y Sims, 2011). Los procesos intensivos en energía, como la centrifugación, son posibles para productos de alto valor, pero son demasiado costosos para las aplicaciones de biocombustibles, además, se pueden aplicar otros métodos como el uso extensivo de floculantes químicos para ayudar en el proceso de cosecha, pero solo podrían ser rentables cuando la cantidad requerida es pequeña (Lian et al., 2018).

Para aumentar la concentración de sólidos de la suspensión de microalgas y reducir el volumen a procesar, se deben aplicar métodos de espesamiento, ya que la reducción de volumen contribuye a ahorros considerables a lo largo de los procesos posteriores; típicamente, los procesos de espesamiento consisten en coagulación / floculación (tanto química como biológica), sedimentación por gravedad, flotación o un enfoque eléctrico para estos (Barros et al. 2015). En la Tabla 1 se puede comparar los diferentes métodos de recolección usados en la biomasa microalgal.

**Tabla 1**

*Comparación de los distintos métodos de recolección y deshidratación de microalgas.*

Método de recolección	Concentración de sólidos (%)	Tasa de recuperación de biomasa (%)	Consumo de energía (kWh / m <sup>3</sup> )
Centrifugación	10- 20	> 90	1.43
Filtración / cribado	5-18	20-87	1.22
Floculación	< 6	50-90	0.15
Sedimentación	0.5-3	10-50	0.10

Fuente: Najjary Abu ( 2020)

### 2.6.1 Floculación

La floculación de algas se atribuye típicamente a la formación de precipitados combinada con la neutralización de la carga, estos mecanismos implican una dependencia

de factores como la dosis de floculante, la salinidad y el pH (Wyatt et al., 2012). Se han investigado varios métodos para inducir la floculación, hoy en día se aplica ampliamente la adición de productos químicos para contrarrestar la carga superficial de las algas; los compuestos estudiados son sales metálicas multivalentes inorgánicas y polímeros / polielectrolitos orgánicos (Barros et al., 2015). las sales inorgánicas generalmente están en forma de aluminio y sales férricas, como sulfato de aluminio ( $Al_2(SO_4)_3$ , alumbre), sulfato férrico ( $Fe_2(SO_4)_3$ ) y cloruro férrico ( $FeCl_3$ ). (Sanyano et al., 2013; Roy y Mohanty, 2020). Existen también compuestos orgánicos que se han utilizado en microalgas de agua dulce y salobres, como por ejemplo polímeros catiónicos como los copolímeros de poliacrilamida, residuos de cáscara de huevo, quitosano y almidón catiónico (Sanyano et al., 2013; Choi, 2015).

### **2.6.2 Sedimentación por gravedad**

La sedimentación por gravedad es uno de los métodos más usados en la industria, a pesar del carácter rudimentario del proceso, funciona para varios tipos de microalgas y es altamente eficiente en energía, por lo tanto, cuando el producto final tiene un valor extremadamente bajo; como los biocombustibles, se debe seleccionar esta técnica para la recolección de microalgas (Barros et al., 2015). En la sedimentación, las fuerzas gravitacionales hacen que las partículas líquidas o sólidas se separen de un líquido de diferente densidad (Milledge y Heaven, 2013). El éxito de la eliminación de sólidos mediante el asentamiento por gravedad depende en gran medida de la densidad de las partículas de microalgas (Shah et al., 2014)

### **2.6.3 Centrifugación**

Es uno de los métodos más utilizados a momento de la cosecha de biomasa, esto debido a que el método es rápido y evita el uso de disolventes químicos para la separación, lo que elimina el riesgo de contaminación química (Hoe et al., 2019). Las centrífugas pueden recolectar la gran mayoría de microalgas, incluso son eficientes como un proceso de separación de un solo paso, mientras que otros requieren una suspensión de algas preconcentrada (Barros et al., 2015). Sin embargo, este método es ineficaz en cultivos de algas para metabolitos de alto valor debido a las necesidades energéticas intensivas y los altos requisitos de mantenimiento de los equipos (Zhang y Hu, 2012).



## **2.7 Producción de Metabolitos.**

Entre los metabolitos producidos por *Chlamydomona* se encuentran, carotenoides, ácidos grasos, esteroides, aminoácidos similares a las micosporinas, ficobilinas, pectinas y compuestos halogenados ( Khanh et al., 2019; Mekkawi et al., 2019). Se ha demostrado que *C. reinhardtii* posee una composición de 48% proteínas; 17% carbohidratos y 21% lípidos (Trivedi et al., 2015).

### **2.7.1 Lípidos**

Se pueden clasificar en polares y neutros, los primeros incluyen a los fosfolípidos y glicolípidos, mientras que los segundos incluyen acilglicéridos (tri, di y monoglicéridos) y ácidos grasos libres (Alessandro y Antoniosi, 2016). Los últimos se pueden clasificar como saturados, monoinsaturados con 14-20 carbonos y se utilizan para producir biodiesel y poliinsaturados (PUFA) con más de 20 átomos de carbono se usan como complementos alimenticios saludables, especialmente los omega-3, ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido eicosapentaenoico (EPA) (Ruiz et al., 2014; Sun et al., 2018). Los ácidos grasos principales en *Chlamydomonas* son los siguientes  $\omega$ -3, ácido hexadecatrienoico (16:3), 16:4, ácido alfa-linolénico (18:3) y ácido estearidónico (18:4) (Li et al., 2015). Los contenidos de ácidos grasos de las microalgas están influenciados por las condiciones ambientales y de cultivo seleccionadas para su crecimiento (Ganapathi et al., 2015).

## **2.8 Factores que afectan la producción de lípidos**

La acumulación de lípidos en las microalgas generalmente ocurre cuando las microalgas se cultivan en condiciones de estrés (Yen et al., 2019). Factores como el estrés por nutrientes (nitrógeno, fósforo, hierro y sal); la temperatura, la intensidad de la luz, el fotoperíodo y el pH influyen directamente en el contenido de biomasa y lípidos de las microalgas (Singh et al., 2015). La luz es uno de los parámetros más importantes que afectan el crecimiento de algas, además, la intensidad de la luz y el fotoperíodo juegan un papel significativo en su crecimiento y distribución, pero los requisitos varían mucho según la especie, las condiciones y la densidad del cultivo de algas (Basil et al., 2014).

### **2.8.1 Fotoperíodo**

Se sabe que la composición celular se ve afectada por el ciclo claro / oscuro (Kato et al., 2019). La influencia del ciclo luz / oscuridad en la acumulación de lípidos se ha

caracterizado en algunas especies de microalgas, por Ej, *P. tricornutum* , la mayor producción del contenido de lípidos se lograron en 12 h: 12 h ciclos de luz / oscuridad en relación con una condición de iluminación continua de 24 h: 0 h luz / oscuridad, en *Nannochloropsis gaditana* , la concentración del contenido de lípidos fue mayor en un ciclo de 16 h: 8 h luz / oscuridad ( Matos, 2017; Sirisuk et al., 2018; Kato et al., 2019;). La acumulación de lípidos se da en períodos de luz, debido a que la célula almacena diferentes metabolitos para ser utilizados posteriormente en la división celular, que ocurre en períodos de oscuridad (Srirangan et al., 2015).

### **2.8.2 Salinidad**

La salinidad afecta la productividad de lípidos en microalgas, esto debido a que los medio salinos provocan estrés osmótico produciendo así una acumulación de lípidos en el interior de la célula (Minhas et al., 2016; Vuppaladadiyam et al., 2018). Este mecanismo inducirá la acumulación de lípidos debido a cambios en el metabolismo de los ácidos grasos (Hoe et al., 2019). En el alga de agua dulce *Scenedesmus* sp, se cree que el NaCl estimula una mayor producción de lípidos, sin embargo, el estrés por exceso de salinidad en el medio de cultivo inhibe la fotosíntesis, lo que reduce aún más la biomasa y la productividad neta de lípidos (Minhas et al., 2016).

### **2.8.3 Concentración/fuente de nitrógeno.**

Las limitaciones de nutrientes afectarán la capacidad fotosintética de las microalgas, pero la gravedad de dicha limitación en la división celular y la síntesis de lípidos es específica de la especie (Hoe et al., 2019). La falta de nitrógeno desencadena la degradación de compuestos ricos en N como proteínas, ADN, clorofila y la acumulación de compuestos de almacenamiento energético (Dogdu, 2019). La célula altera su metabolismo hacia la producción de almidón y ácidos grasos como triacilgliceroles (TAG) debido a un desequilibrio en el metabolismo (Winter, 2015). Estudios en *N. oceánica* han obtenido una concentración del 87% de ácidos grasos en condiciones moderadas de N (Wang et al., 2019). De igual forma, en *D. communis*, el contenido de lípidos aumentó a 97.73% al disminuir un 75% la concentración de N en el medio BG 11 (Akgül, 2020).

El aumento del contenido lipídico se debe a que en inanición de N se estimula la expresión de genes que codifican para enzimas que están involucradas en el metabolismo de lípidos (Francisco et al., 2019). Entre las diferentes vías metabólicas por las cuales se

producen lípidos por privación de N está el ciclo de glioxilato, hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana de los tilacoides por la enzima acil hidrolasa y la conversión de acil-CoA en TAG por la acción de la enzima diacilglicerolaciltransferasa (Yodsuwan et al., 2017).

Cabe recalcar que la fuente de nitrógeno también influye en la producción de lípidos por ejemplo la productividad de lípidos aumentó con el aumento de la concentración de nitrato en *Auxenochlorella pyrenoidosa* y *Scenedesmus* sp, pero se observó el patrón exactamente opuesto en *Auxenochlorella* sp y *C. vulgaris*, en los que la productividad de los lípidos fue mayor a concentraciones más bajas de nitrato (Minhas et al., 2016). Por otro lado, en *Tetraselmis tetrathele* el mayor contenido de lípidos se observó en NH<sub>4</sub>Cl (Farahin et al., 2021). A pesar que la literatura es escasa en cuanto a la influencia que tienen las diferentes fuentes de N en la producción de lípidos, esto se podría explicar debido a que el comportamiento de las microalgas puede variar dependiendo de la especie (Kim, Mujtaba, et al., 2016). El incremento de lípidos por amonio se da debido a que es tóxico en las células y la producción de lípidos se da como respuesta a dicho estrés (Yaakob et al., 2021). En cuanto a las concentraciones de nitrato, mientras menor sea la concentración mayor producción de lípidos, de igual manera debido al estrés que produce la disminución de N, aunque esto depende de cada especie (Minhas et al., 2016)

## **2.9 Extracción de lípidos**

Las microalgas se están investigando actualmente como posibles fuentes de nutrición y biodiesel, en ambas aplicaciones, el enfoque principal radica en los ácidos grasos producidos por las microalgas, por lo tanto, se necesitan métodos para determinar tanto la cantidad total como el tipo de ácidos grasos (Cavonius et al., 2014)

### **2.9.1 Métodos de extracción**

Los métodos de extracción de lípidos se pueden clasificar en mecánicos o basados en productos químicos, el primero utiliza equipos tales como ultrasonidos o máquinas de prensado; el segundo por lo contrario utiliza compuestos químicos, es decir, disolventes como hexano, etanol, metanol y cloroformo (Katiyar y Arora, 2020). Entre los métodos más usados de acuerdo con cada tipo de solvente tenemos Soxhlet (Cloroformo, metanol) Bligh-Dyer (Cloroformo, metanol, agua), McGill-Moffatt (acetona), Randall (n-hexano) y de Folch (Cloroformo, metanol) (Bonilla y Hoyos, 2018).

El método gravimétrico Bligh-Dyer desarrollado hace unos 50 años sigue siendo una de las técnicas más comunes que se utilizan hoy en día, aunque este procedimiento es simple, confiable y fácil de llevar a cabo, requiere mucho tiempo, grandes volúmenes de muestra y utiliza solventes tóxicos; no es práctico para analizar muchas muestras de una corrida de fermentación o detección de nuevas cepas ricas en aceite (Storms, Cameron, de la Hoz Siegler, y McCaffrey, 2014).

### **2.9.2 Cuantificación de lípidos**

La composición de lípidos de la biomasa de algas generalmente se cuantifica utilizando una amplia gama de técnicas, que implican extracción química seguida de determinación gravimétrica, espectrofotometría o espectroscopía de masas (Mayers et al., 2013). Los métodos convencionales para la determinación de lípidos implican extracción con solventes y determinación gravimétrica, la cuantificación adicional de lípidos neutros requiere la separación de extractos crudos y la cuantificación de las fracciones lipídicas por cromatografía de capa fina (TLC), HPLC, cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC / MS), o cromatografía líquida y espectrometría de masas (LC / MS) (Chen et al., 2011).

## CAPÍTULO III

### 3 METODOLOGÍA

#### 3.1 Producción de biomasa

##### 3.1.1 Lugar de estudio

La presente investigación se realizó en el laboratorio de biotecnología vegetal, ubicado en el campus San Vicente de Paul de la Universidad Técnica del Norte, Ibarra, Ecuador (Figura 2). La cepa estudiada fue *Chlamydomona agloeformis*, obtenida del cepario del laboratorio de biotecnología vegetal de la Universidad Técnica del Norte.

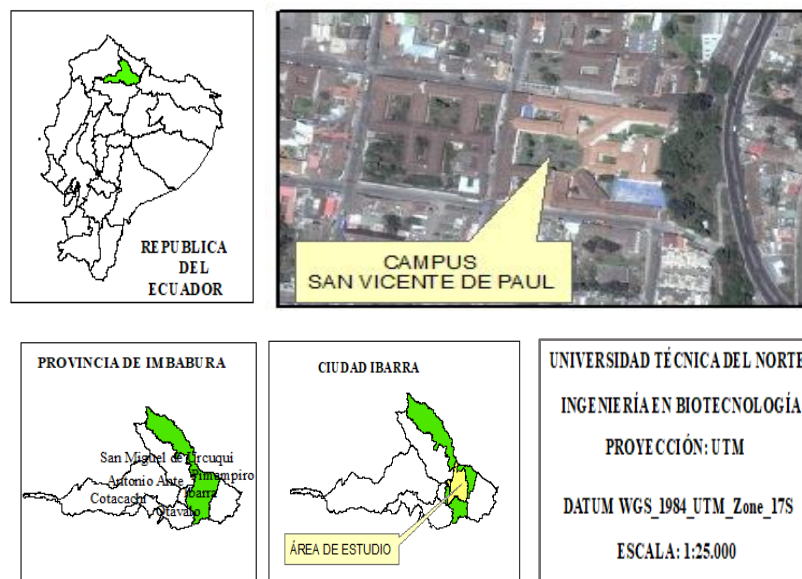


Figura 2. Ubicación geográfica del área de estudio

##### 3.1.2 Mantenimiento de la cepa

La microalga *Chlamydomona agloeformis* se conservó en cajas Petri utilizando un medio modificado Murashige Skoog (MS). Para la siembra se utilizó la técnica por estriado; una vez realizada la siembra se conservaron las cajas con un fotoperíodo de 16:8 h (luz/oscuridad) y temperatura de 25 °C (Singh et al., 2015; Manzoni et al., 2016). El mantenimiento de la cepa se realizó cada 20-30 días, dependiendo del crecimiento.

##### 3.1.3 Preparación del inóculo.

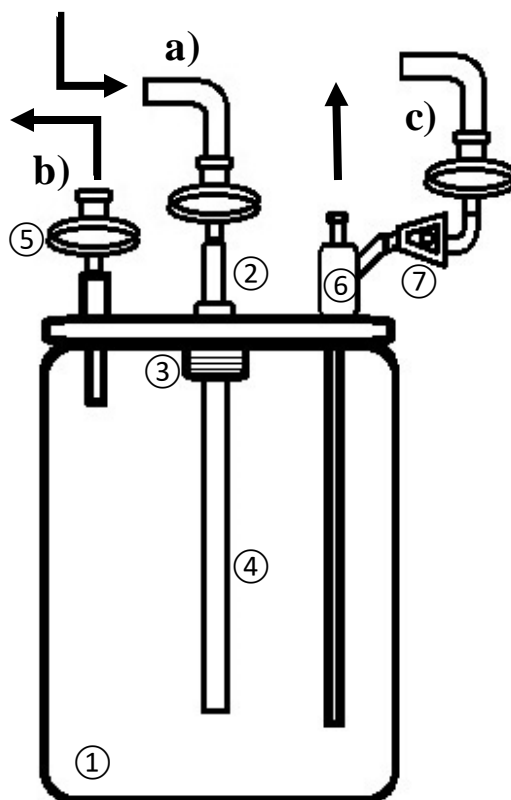
Para el inóculo se hizo un raspado de caja petri, posteriormente la biomasa obtenida se diluyó en medio MS modificado, para determinar la concentración celular del inóculo se midió la absorbancia a una dilución 1:10 (muestra/ agua destilada), dando una

absorbancia de 0.1 como concentración. A continuación, se cultivó en un biorreactor de 250 mL de capacidad, que contenía 135 mL de MS modificado y 15 mL de inóculo de microalga *C. agloiformis*. El fotoperíodo empleado fue de 16:8 h (luz/oscuridad) con un pH y temperatura inicial de 7 y 25°C respectivamente, por un período de siete días (Singh et al., 2015; Cobos et al., 2016; Manzoni et al. 2016).

### **3.1.4 Diseño de Fotobiorreactor**

Se emplearon fotobiorreactores por lote de 2 L. El prototipo constó de una entrada y una salida de aire; además, de un compartimento para la toma de muestra, tal como se observa en la Figura 3. La entrada de aire estuvo constituida por un racor metálico unido con un reductor pvc, el cual se encontraba en el interior del fotobiorreactor y constó de una manguera para que el aire se distribuya homogéneamente por todo el fotobiorreactor (Figura 3 a). Para el ingreso de aire estéril al medio, se utilizó un filtro micropore de membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  de poro, que se encontraba conectado con una manguera por ambos lados del filtro. El lado superior se conectaba con una bomba de aire con un flujo de 4 L  $\text{min}^{-1}$  y el lado inferior del filtro se acoplaba con el racor.

La salida de aire estuvo integrada por filtro micropore de membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  de poro que se conectaba con una manguera al fotobiorreactor (Figura 3 b). Por otro lado, para la toma de muestra se utilizaron los componentes de un equipo de venoclisis, como un conector en Y, y un regulador de flujo; este último impidió que el medio suba por la manguera, tal como se muestra en la (Figura 3.c). También se implementó al equipo de venoclisis un filtro para poder ingresar aire estéril y así regresar el medio de cultivo que se quede en la manguera después de la toma de muestra.



**Figura 3.** Esquema de fotobiorreactor. a) Entrada de aire. b) Salida de aire. c) Toma de muestra 1. Reactor de vidrio. 2. Racor. 3.Reductor pvc. 4. Manguera pvc. 5. Filtro micropore. 6. Conectores en Y. 7. Regulador de flujo

### 3.1.5 Cultivo de microalgas bajo diferentes concentraciones de nitrógeno.

Para determinar el medio de cultivo óptimo para el crecimiento microalgal, se utilizó el medio MS modificado como control y como tratamientos tres medios de cultivos en base de fertilizante comercial y nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ). La concentración de nitrógeno por cada tratamiento fue de 1.53 g/L N total MS modificado (control), fertilizante 0.092 g/L N total (T1), fertilizante +  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.138 g/L N total (T2), fertilizante +  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.184 g/L N total (T3). En la Tabla 2 se observa la composición química de cada tratamiento.

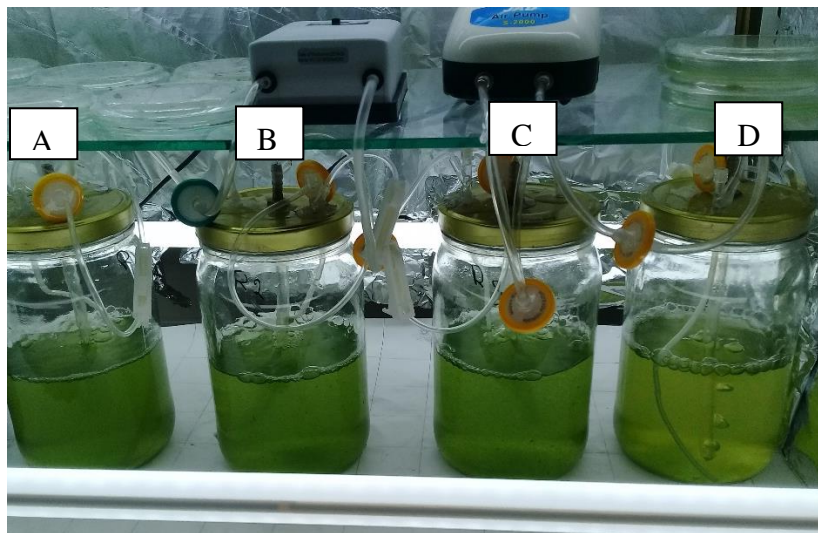
**Tabla 2***Composición química por cada medio de cultivo*

	MS (Control)		T1 Fertilizante		T2 Fertilizante + NH4NO3		T3 Fertilizante + NH4NO3				
	g/L	g/L N TOTAL	g/L	g/L N TOTAL	g/L	g/L N TOTAL	g/L	g/L N TOTAL			
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.65	<b>1,53</b>	urea	0.2	<b>0.092</b>	urea	0.2	<b>0.138</b>	urea	0.2	<b>0.184</b>
KNO <sub>3</sub>	6.9		P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.18		P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.18		P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.18	
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1.69x10 <sup>-02</sup>		K <sub>2</sub> O	0.16		K <sub>2</sub> O	0.16		K <sub>2</sub> O	0.16	
ZnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	8.60 x10 <sup>-03</sup>		B <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.01		B <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.01		B <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.01	
CuSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	2.50 x10 <sup>-04</sup>		Zn	0.01		Zn	0.01		Zn	0.01	
MgSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.37										
CaCl <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	0.44					NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.13		NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.27	
IK	8.30 x10 <sup>-04</sup>										
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2.50 x10 <sup>-05</sup>										
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.20 x10 <sup>-03</sup>										
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	2.50 x10 <sup>-04</sup>										
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.47										
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2.78 x10 <sup>-03</sup>										
Na <sub>2</sub> EDTA	3.73 x10 <sup>-02</sup>										
NaHCO <sub>3</sub>	0.3										



Se empleó un reactor de 2 L de capacidad, donde se prepararon cultivos de 1 L del cual 900 mL correspondía al medio de cultivo y 100 mL al inóculo a una concentración de  $1.36 \times 10^6$  células/mL. Este último se obtuvo previamente de biorreactores de 250 mL de volumen total. Las condiciones de cultivo fueron las siguientes: 25 °C, pH inicial 7 y un fotoperíodo 16:8 h (luz: oscuridad)

Se realizaron tres repeticiones por cada tratamiento incluido el control, dando un total de 12 biorreactores (Figura 4). Para determinar cuál fue el mejor tratamiento se realizó una cinética de crecimiento donde se midió la densidad celular por espectrofotometría y por conteo celular (número de células/ml). Además, se determinó las tasas específicas de crecimiento ( $\mu$ ) para cada tratamiento.



**Figura 4.** Biorreactores empleados en los ensayos de cinética de crecimiento. **A:** control, **B:** T1, **C:** T2; **D:** T3

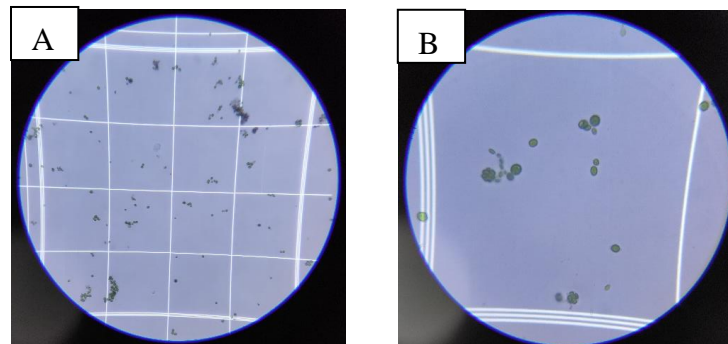
### 3.1.6 Medición de la densidad óptica mediante espectrofotometría.

El crecimiento de *C. agloiformis* se controló por medio de la densidad óptica (OD), utilizando un espectrofotómetro UV (Unicam UV / espectrómetro visible). Para la toma de muestra, previamente se agitó el fotobiorreactor para evitar la sedimentación de la biomasa, posteriormente se tomó 1 ml de muestra y se realizó una dilución de 1:10 (muestra/ agua destilada), como blanco se empleó agua destilada y se midió la densidad óptica a 750 nm. Se realizó la medición de la absorbancia cada tres horas, esta metodología se realizó por triplicado. Se construyó una curva de crecimiento

(Absorbancia vs Tiempo) usando el programa Microsoft Excel. Posteriormente se obtuvo la tasa específica de crecimiento correspondiente a la pendiente de la recta graficada.

### 3.1.7 Medición de la concentración celular por cámara de Neubauer.

El recuento celular se realizó por microscopía, utilizando una cámara de Neubauer (Improved Marienfeld) (Figura 5), y un microscopio óptico Olympus CX41, se realizó una dilución de 1:10 (muestra/ agua destilada) y se utilizó 10  $\mu\text{l}$  para el conteo (Yu et al., 2012).



**Figura 5.** Conteo celular por cámara de Neubauer. A) cuadrante de 4 x4 cuadrículas. B) cuadrícula del cuadrante.

La concentración celular se determinó mediante la siguiente ecuación propuesta por Arredondo et al (2017).

$$C = N \times 10^4 \times dil \quad \text{(Ecuación 1)}$$

En donde:

C= cél mL<sup>-1</sup>

N= promedio de células en 4 mm<sup>2</sup> (0.4  $\mu\text{L}$ )

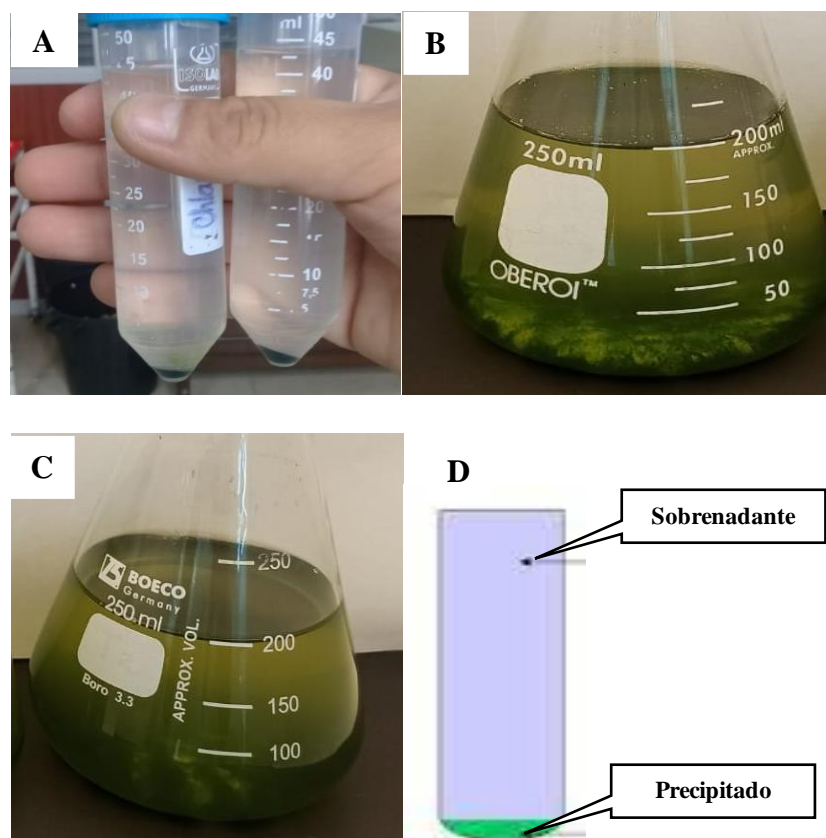
10<sup>4</sup>= factor de conversión de 0.1  $\mu\text{L}$  a 1 mL

Dil= factor de dilución (cuando se consideró necesario diluir la muestra)

Con los datos obtenidos se realizó la gráfica de cinética de crecimiento (número de células vs Tiempo) usando el programa Microsoft Excel. Posteriormente se obtuvo la tasa específica de crecimiento correspondiente a la pendiente de la recta de la gráfica.

### 3.2 Cosecha de biomasa

Para determinar cuál es la mejor técnica de cosecha se realizó un experimento utilizando los siguientes métodos: centrifugación (control), floculación (tratamiento 1) y sedimentación por gravedad (tratamiento 2) (Figura 6). Todos los experimentos se realizaron por triplicado y las variables medidas fueron densidad óptica y número de células. Al final de la experimentación con los tres métodos de cosechado se logró obtener dos fases, donde la primera corresponde al sobrenadante (medio de cultivo) y la segunda fase corresponde al precipitado (biomasa microalgal) como se observa en la Figura 6 D.

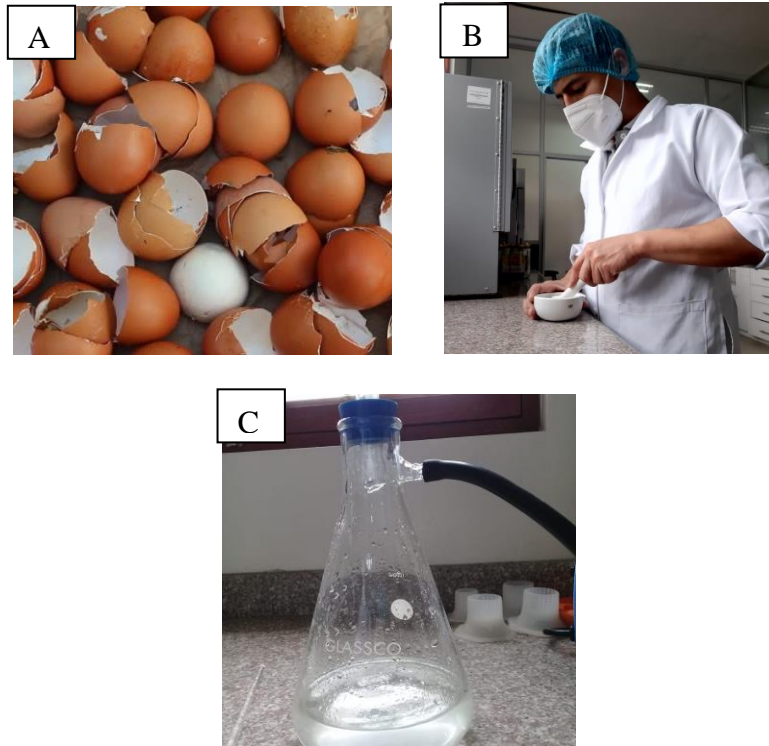


**Figura 6** Cosecha de biomasa microalgal A) Centrifugación, B) Floculación, C) Sedimentación por gravedad. D) sobrenadante y precipitado

#### 3.2.1 Floculación

Se utilizó como floculante natural cáscaras de huevo, estas se lavaron con agua destilada y secaron a 35°C (Figura 7 A). Posteriormente, se trituraron y se mezclaron 100 mg de cáscara con 10 mL de una solución de ácido clorhídrico 0.1M (Figura 7 B). A continuación, se diluyó la solución en 100 mL de agua destilada (Choi, 2015, 2017;

Suparmaniam et al., 2019; Roy y Mohanty, 2020). Por último, la solución se filtró usando una bomba al vacío Rocker 410, como se muestra en la Figura 7 C.



**Figura 7.** Preparación de solución flocculante de cáscara de huevo. A) secado. B) trituración. C) Filtración.

Después de preparar la solución de cáscara de huevo se usó 40 mL de esta y se mezcló con 200 mL de medio de cultivo con microalgas en matraces de 250 mL y se homogenizó con un agitador magnético Isotemp a 150 rpm durante 35 minutos. Se tomó 1 mL de muestra del medio con microalgas cada 30 min por un período de 5 horas (Choi, 2015).

Para determinar la densidad óptica se hizo una dilución de 1:10 a la muestra y se evaluó absorbancia mediante un espectrofotómetro UV (Unicam UV / espectrómetro visible) a 750 nm. (Griffiths et al., 2012; Zhu et al., 2018). Por otro lado, la concentración celular se determinó realizando conteo celular utilizando cámara de Neubauer, para conocer el número de células se usó la Ecuación 1. Los valores obtenidos a partir de estas dos variables se transformaron a porcentaje para establecer la concentración de biomasa cosechada, para esto se sacó la eficiencia de cosecha (recuperación de biomasa) a partir de la ecuación propuesta por Zhu et al., (2018).

$$H\% = 100\% \times (OD_o - OD_i)/OD_o \quad \text{(Ecuación 2)}$$

En donde:

H% =es la eficiencia de cosecha

$OD_0$  = se definen como los valores del cultivo inicial antes de la cosecha

$OD_i$  = se definen como los valores del sobrenadante.

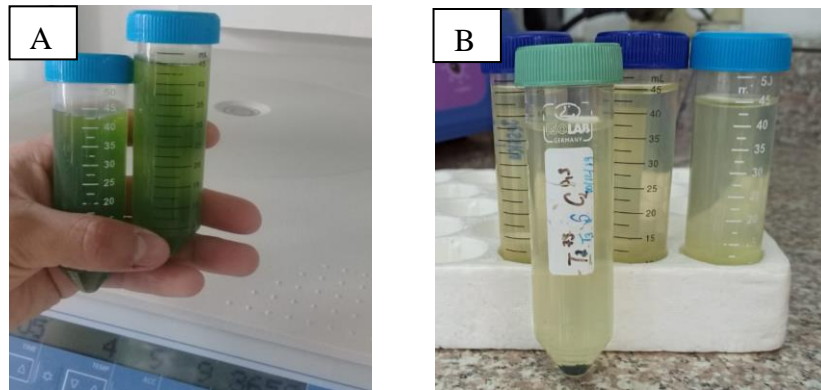
### **3.2.2 Sedimentación**

Este método se realizó a temperatura ambiente (25°C), en vasos de precipitación de 250 mL, con 200 mL de suspensión de algas, dejando reposar un tiempo de 5 h, tomando una muestra de 1 mL cada 30 minutos (Chatsungnoen y Chisti, 2016). Las variables evaluadas fueron densidad óptica y concentración celular, la metodología empleada para estas fue la misma explicada en el apartado 3.5.1 de este documento. Por otro lado, para establecer la concentración de biomasa cosechada se transformaron los datos obtenidos por estas dos variables a porcentajes, empleando la (Ecuación 2).

### **3.2.3 Centrifugación**

Para el cosechado de biomasa, se utilizó una centrífuga (Sorvall™ ST 16) con una velocidad de rotación de 5000 rpm durante 5 min, 45 mL del medio de cultivo con microalgas fue transferido a tubos falcon de 50 mL (Figura 8) (Syafaini et al., 2017). Después de realizar la centrifugación, se pudo observar una separación de fases en el tubo, donde la primera fase fue el medio de cultivo (sobrenadante) y la segunda fase fue la biomasa microalgal (precipitado). Se tomó una muestra de 1 mL del sobrenadante para determinar la eficiencia del método.

Las variables evaluadas fueron densidad óptica y concentración celular, la metodología aplicada para medir estas dos variables fueron las mismas aplicadas en el apartado 3.5.1 de este documento. De igual forma, los valores obtenidos a partir de estas dos variables se transformaron a porcentaje para establecer la concentración de biomasa cosechada, para esto se sacó la eficiencia de cosecha (recuperación de biomasa), empleando la (Ecuación 2). Por otro lado, cabe mencionar que las muestras se tomaron antes de la centrifugación y después de esta, debido a la rapidez de la técnica, no se pudo tomar cada 30 min como en los otros métodos de cosecha.



**Figura 8.** Cosecha de biomasa por centrifugación. A) muestras a procesar. B) centrifugación de muestras

### 3.3 Producción de lípidos

#### 3.3.1 Fotoperíodo

Para determinar si existe un cambio en la concentración de lípidos de la célula, se sometió a diferentes fotoperíodos a *Chlamydomonas agloiformis*. Los fotoperíodos empleados fueron: 16:8 h (luz/ oscuridad) como control, 12:12 h y 24:00 h (luz/ oscuridad) como tratamientos, con una intensidad de luz de  $48 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Matos, Gandin, Siegel, y Sant'Anna, 2017). El tiempo de cultivo empleado fue de 7 días, debido a que la producción de lípidos se incrementa en la fase estacionaria tardía del crecimiento celular (Deshmukh et al., 2019) .

#### 3.3.2 Contenido lipídico

Para determinar el contenido lipídico se analizó una muestra de 15 g por cada tratamiento. Los análisis fueron realizados en los laboratorios de alimentos OSP de la Universidad Central del Ecuador. Para la extracción de lípidos (grasa cruda) se empleó el método oficial 991.36 de la AOAC modificado. La fórmula utilizada para determinar el porcentaje de grasa por muestra fue:

$$\text{grasa \%} = \frac{(B - C) \times 100}{A}$$

En donde:

A = peso en gramos de muestra,

B = peso en gramos del vaso de extracción después de secado, y

C = peso en gramos del vaso de extracción antes de la extracción

El análisis del perfil lipídico se realizó en los laboratorios de alimentos OSP de la Universidad Central del Ecuador. La metodología utilizada fue una cromatografía de gases usando un cromatógrafo de gases IEAL 5.5-05. Para poder realizar este procedimiento se tuvo que trans-esterificar los ácidos grasos presentes en la muestra. La trans-esterificación consistió en la transformación de ácidos grasos en alquil ésteres y glicerol (Castellar et al., 2016). Esta transesterificación se realiza debido a que el cromatógrafo de gases puede identificar ácidos grasos solo como alquil esterres (Tobón et al., 2002). Para determinar el porcentaje de ácidos grasos presentes en la muestra se evaluó el área de cada uno de los picos del cromatógrafo (Arredondo et al., 2017).

### **3.4 Análisis estadístico**

El diseño experimental empleado fue, diseño de parcelas divididas (DPD), para determinar si existió diferencia significativa en los tratamientos se realizó un análisis de la varianza (ANOVA). Todos los datos cumplieron con los supuestos de estadística paramétrica, normalidad, homogeneidad de varianzas, e independencia. Para normalizar los datos de conteo, obtenidos en los experimentos de la cinética de crecimiento se realizó una transformación raíz cuadrada; además, se realizó una correlación de las variables absorbancia y conteo celular. El supuesto de normalidad fue evaluado mediante la prueba de Kolmogórov-Smirnov (Anexo 1), la primera prueba se tomó en cuenta para los análisis de cinética de crecimiento y la segunda para los métodos de cosecha, esto se realizó así por el tamaño de los datos. El supuesto de homogeneidad se evaluó por la prueba de Levene (Anexo 2) y para determinar cuál fue el mejor tratamiento en los experimentos, se utilizó pruebas de significancia Tukey (5%). El programa estadístico utilizado fue IBM SPSS statics 22.0

## CAPÍTULO IV

### 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

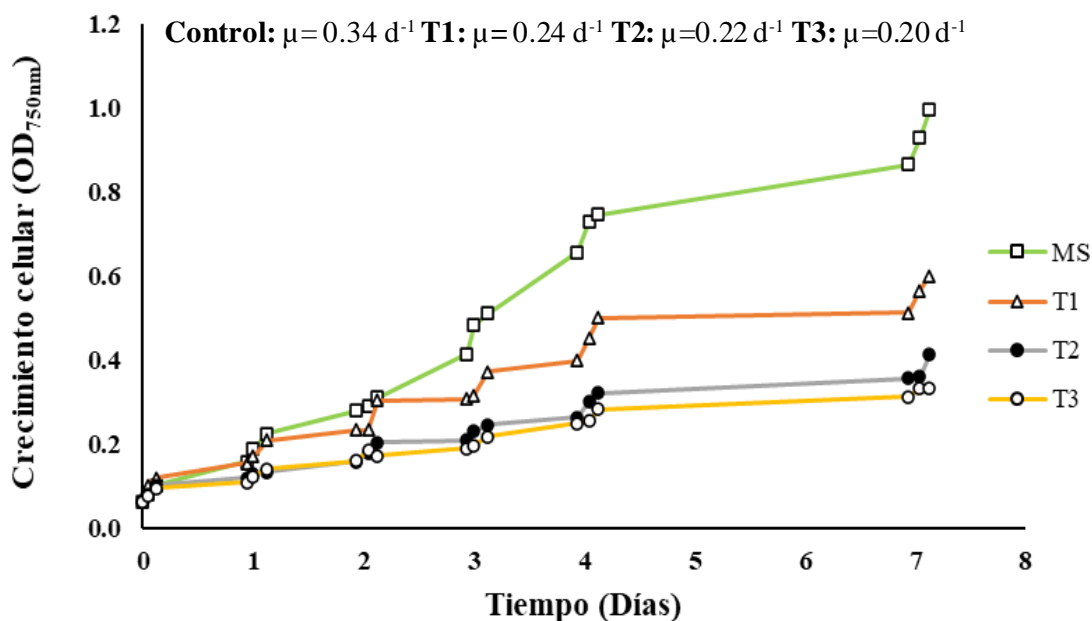
En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en esta investigación. Las variables analizadas fueron: cinética de crecimiento, eficiencia de cosecha y perfil lipídico. Además, se determinan los mejores tratamientos para cada una de las variables, tomando en cuenta los análisis estadísticos.

#### 4.1 Concentración óptima de nitrógeno.

##### 4.1.1 Cinética de crecimiento

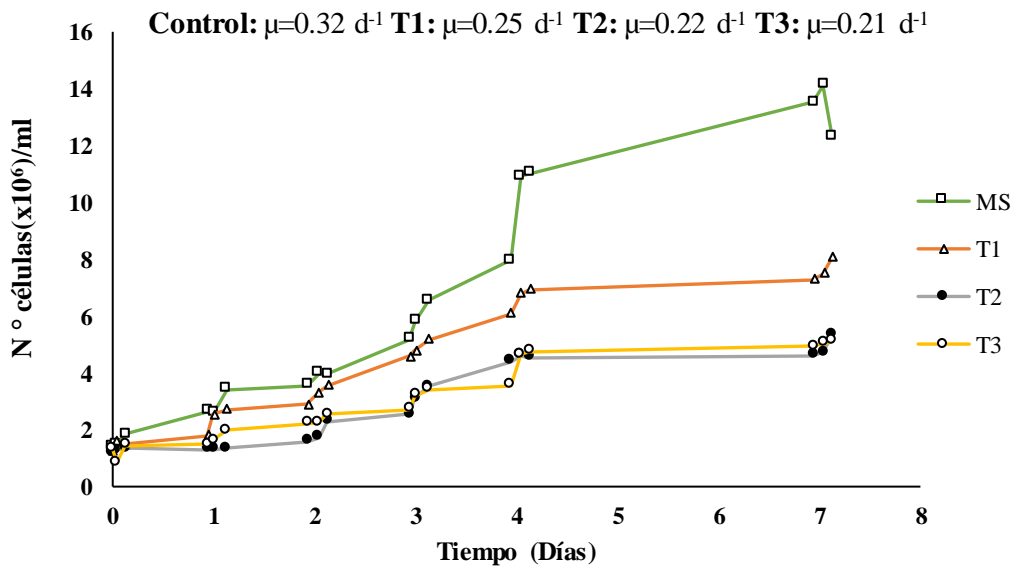
En la Figura 9 se muestran las cinéticas de crecimiento obtenidas por las variables densidad óptica y concentración celular. La fase exponencial duró 4 días, posteriormente a esto la célula ingresó a la fase estacionaria. Los resultados obtenidos fueron: OD= 0.93 a una concentración de  $14.1 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  para el control MS, T1 con un OD= 0.55 a  $7.2 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ , T2 un OD= 0.37 a una concentración de  $5.1 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ , y finalmente para el T3 OD= 0.32 a una concentración de  $4.8 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  como se observa en la Figura 9.

A)



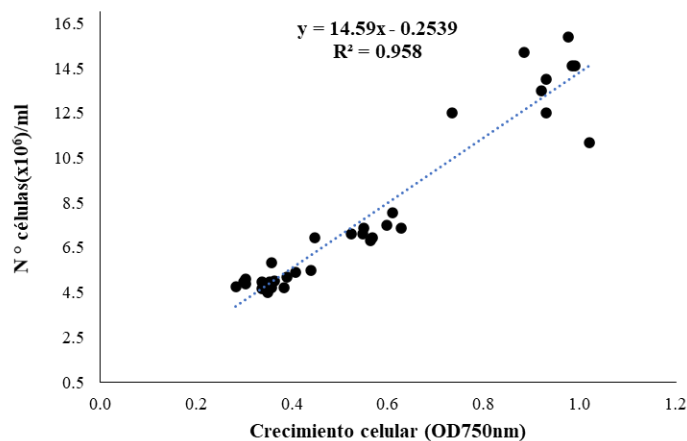


B)



**Figura 9** Cinética de crecimiento de *Chlamydomonas agloeiformis* para cada uno de los tratamientos, evaluada por (A) Densidad óptica(absorbancia); (B) Número de células.

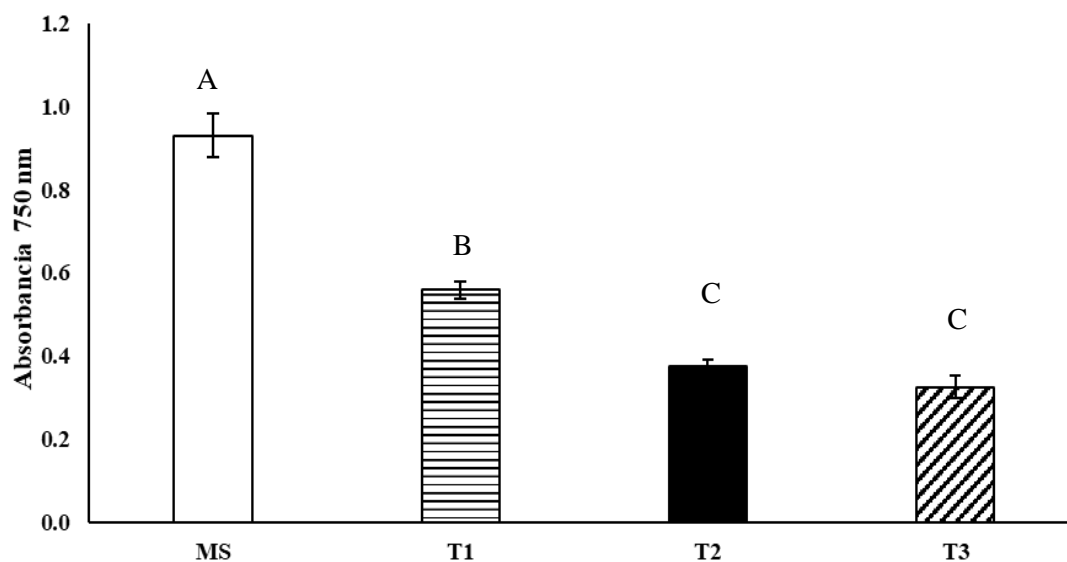
Se realizó un análisis de correlación entre las variables densidad óptica y conteo celular, obteniendo un  $R^2=0.958$ ,  $p<0.001$ , como se observa en la Figura 10, indicando que en las dos metodologías se obtienen cinéticas similares. Los resultados obtenidos en esta investigación concuerda con lo descrito por Griffiths et al., (2011); Gomez et al., (2017) y Lu et al., (2017) quienes obtuvieron con *C. vulgaris*, *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oculata* una correlación entre la densidad óptica y el número de células de  $R^2=0.99$  al evaluar su crecimiento. Esto podría deberse a que a una mayor concentración celular existe un incremento en la absorción de luz (absorbancia).(Camacho y Torres, 2010).



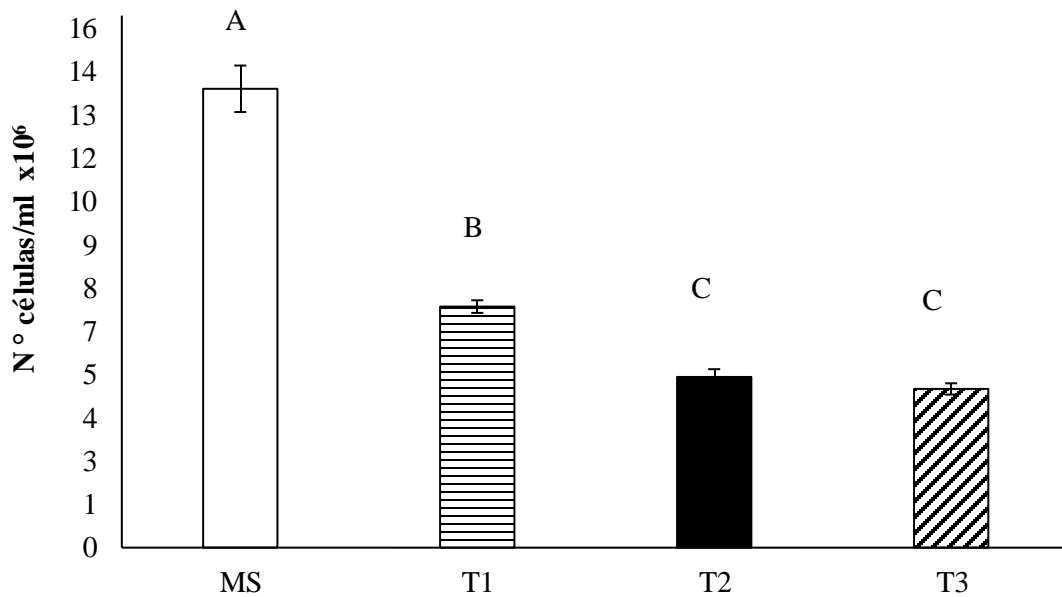
**Figura 10** Gráfica de correlación del número de células vs densidad óptica

Al comparar los resultados, indicaron diferencias significativas entre los tratamientos como se observa en la Figura 11 y el Anexo 3. Donde el medio de cultivo MS mostro un mayor crecimiento celular con un  $\mu = 0.34 \pm 0.02 \text{ d}^{-1}$ , absorbancia de 0.93 y una concentración de  $14.1 \times 10^6 \text{ células mL}^{-1}$  al usar 1.53 g/L de nitrógeno total. Resultados similares se dieron en investigaciones realizadas por Panta et al., (2016), Ram, (2019) y Aguiar et al., (2020) en donde utilizando 1.5 g/L de nitrógeno total se obtuvieron concentraciones de  $17 \pm 3 \times 10^6 \text{ células mL}^{-1}$ . Takeuchi y Benning, (2019) expresan que para un eficiente crecimiento y división celular en *Chlamydomonas* y otro tipo de microalgas, verdes se requiere una suficiente cantidad de nutrientes en el medio de cultivo, en especial nitrógeno. La asimilación de nitrógeno en la célula se da mediante la ruta del ciclo glutamina sintetasa-glutamato sintasa (GS-GOGAT), esta ruta es importante ya que en ella el nitrógeno se incorpora en esqueletos de carbono esenciales en el crecimiento celular, tales como aminoácidos, empleados en la síntesis de proteínas (Flores, 1999; Figueroa, 2004; Iriarte et al., 2007; Calatrava, 2018). Entre estas proteínas se encuentran las quinasas dependientes de ciclina (CDK) que son enzimas claves para el crecimiento y la división celular (Zachleder & Vítová, 2016; Li et al., 2019). Por esta razón al existir una baja concentración de nitrógeno total de 0.092, 0.138 y 0.184 g/L para los tratamientos T1, T2 y T3 no hubo un óptimo crecimiento celular.

A)



**B)**



**Figura 11.** Determinación de la mejor concentración de nitrógeno evaluado por A) densidad óptica y B) conteo celular. **A y B:** existe diferencias significativas. **C** no existen diferencias de tratamientos. Densidad óptica ( $F= 262.94$ ;  $gl= 3, 30$ ;  $p < 0.001$ ) y el conteo celular ( $F= 337,071$ ;  $gl= 3, 30$ ;  $p < 0.001$ )

Por otro lado, Gour et al., (2018) expresa que el crecimiento celular no solamente se ve influenciado por la concentración de nitrógeno sino también por las fuentes de nitrógeno que se empleen. Entre las más comunes están nitratos ( $\text{NO}_3$ ), amonio ( $\text{NH}_4$ ) nitritos, ( $\text{NO}_2$ ) urea ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ ) etc. (López et al., 2015). En ecosistemas acuáticos la forma de nitrógeno más abundante es nitrato, y en menor proporción la urea (Hellebust y Ahmad, 1988; Kumar y Bera, 2020).

Calatrava, (2018), Zhang et al., (2019) y Batista et al., (2019) sostienen que el género *Chlamydomona* tiene un óptimo crecimiento en presencia de nitratos y urea como fuente de nitrógeno. En esta investigación las fuentes de nitrógeno utilizadas fueron nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ ) para el medio MS, urea ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ ) para el tratamiento T1, urea y nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) para los tratamientos T2 y T3; de los cuales el mejor fue  $\text{KNO}_3$ . Esto podría explicarse gracias a la participación de diversas moléculas como proteínas de transporte NRT2 y NAR1 que permiten el ingreso de  $\text{NO}_3$  a la célula y enzimas como nitrato reductasa que permiten su asimilación (Raven, 1981; Chen y Wang, 2020).

Asimismo, Panta et al., (2016) y Silva et al., (2019) sostienen que fertilizantes foliares que contienen urea como fuente de nitrógeno son una alternativa para el

crecimiento celular de diferentes microalgas como *C. reinhardtii*, *Chaetoceros gracilis* y *Isochrysis galbana*. De igual forma, en un estudio realizado en *Hyaloraphidium contortum* y en *Chlorella vulgaris* al utilizar fertilizantes nitrogenados como medio de cultivo se obtuvieron densidades celulares de  $21 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  (Brito et al., 2011). Sin embargo, en esta investigación a pesar de que se utilizó urea como fuente de nitrógeno en los tratamientos T1, T2 y T3 se alcanzaron concentraciones de  $7.2 \times 10^6$ ;  $5.1 \times 10^6$  y  $4.8 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ , valores inferiores al control MS. Silva, (2016) expresa que la utilización de fertilizantes como medio de cultivo solo es viable cuando existe la presencia de microelementos en la composición de mismo. Entre los micronutrientes más importantes están el zinc, cobre, cobalto, manganeso, cadmio, hierro y molibdeno, de los cuales los dos últimos juegan un papel crucial para la asimilación del nitrógeno (Rueter y Petersen, 1987; Quigg, 2016; Usman y Azmuddin, 2018).

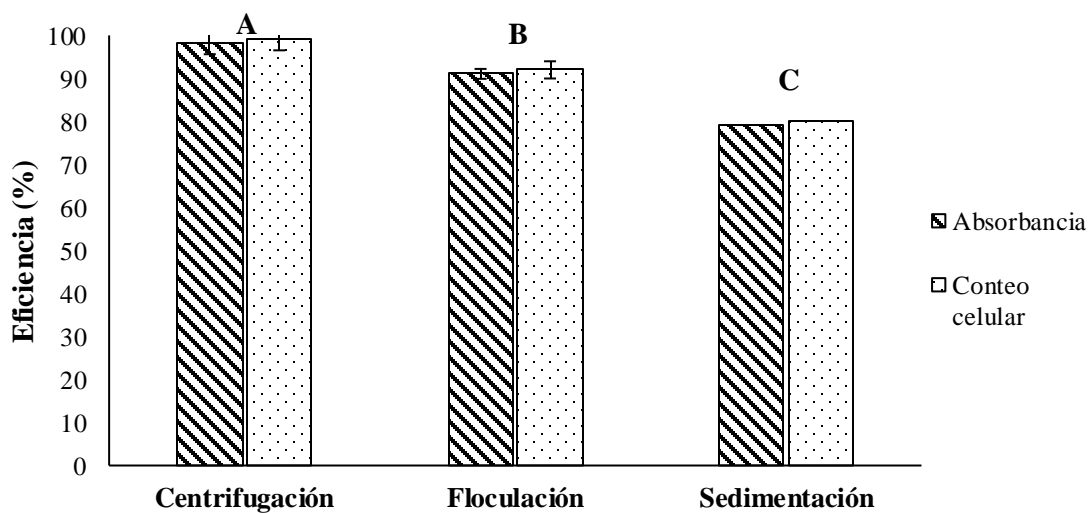
En un estudio realizado por Tao et al., (2020) y Xu, (2015) se establece que usando 1mg/L de hierro y 0.1 mg/L de molibdeno existe una óptima asimilación de nitrógeno. En el presente trabajo se incorporó 0,56 mg/L de hierro y 0,1 mg/L de molibdeno, para el medio MS. Los tratamientos T1, T2 y T3 no contaron con la presencia de estos microelementos, esto podría explicar por qué no hubo un óptimo crecimiento celular. La importancia del hierro y molibdeno radica en que actúan como cofactores de enzimas asimiladoras de nitrógeno como por ejemplo la nitrato y nitrito reductasa (Presta et al., 2015; Dror y Stern, 2018; Fox y Zimba, 2018).

Por otro lado, en comparación al tratamiento T1, los tratamientos T2 y T3 tuvieron una cinética de crecimiento inferior, a pesar de que existía la misma concentración de fertilizante. Esto podría explicarse debido a que en los tratamientos T2 y T3 también se añadió 0.13 y 0.27 g/L de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  respectivamente. Kim, Mujtaba, et al., (2016) expresan que la sobresaturación de amonio puede causar una disminución en el pH al liberar iones de  $\text{H}^+$ , lo que inhibe el crecimiento celular e incluso provocar lisis celular. De acuerdo con lo reportado por Yaakob et al., (2021) la célula solo soporta un máximo de concentración de 0.0018 g/L de amonio para un crecimiento adecuado. Esto podría explicar porque en los cultivos que se añadió  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  no hubo un óptimo crecimiento celular, además, en pruebas piloto al utilizar concentraciones mayores de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , los cultivos morían a las 24 horas de inocularlos.

## 4.2 Métodos de Cosecha

### 4.2.1 Eficiencia

Las células de *C. agloeformis* presentaron distintos comportamientos ante los diferentes métodos de cosecha. Para el control se obtuvo una eficiencia del 99%, sin presencia de células suspendidas en el sobrenadante, y en un tiempo mínimo de 5 min en comparación a los demás tratamientos. Por otro lado, los tratamientos por floculación y sedimentación por gravedad presentaron una eficiencia del 92% y 80%, con mayor presencia de turbidez. Para determinar cuál fue el mejor método de cosecha se realizó una prueba Tukey (Anexo 4), dando como mejor método el de centrifugación, como se muestra en la Figura 12



**Figura 12.** Eficiencia de cosechado de *Chlamydomona agloeformis* medido por densidad óptica (absorbancia) y conteo celular. **A, B y C:** existe diferencias significativas. Densidad óptica ( $F= 57,08$ ;  $gl= 2, 22$ ;  $p < 0.001$ ) y el conteo celular ( $F= 62,26$ ;  $gl= 2, 22$ ;  $p < 0.001$ )

Los resultados obtenidos para el método de centrifugación podría explicarse debido a que se utiliza una fuerza centrífuga para separar la biomasa celular utilizando la diferencia de densidad del medio que lo rodea (Najjar y Abu, 2020). Así, las partículas de menor densidad quedarán suspendidas mientras que las de mayor densidad precipitarán (Dassey y Theegala, 2013). De igual forma, Alam et al., (2017) establece que para que exista una máxima eficiencia de cosecha debe existir una velocidad adecuada, debido a que puede ocurrir daño celular a fuerzas de centrifugación altas, provocando así la liberación de diferentes metabolitos celulares, lo que induce a la flotación de las células rotas y no a la precipitación. En la presente investigación se utilizó una velocidad de 5000 rpm obteniendo una eficiencia máxima del 99%. Por otro lado, un estudio realizado en

*Chlorella* sp , *Coelastrella* sp y *Chlamydomonas* sp mediante centrifugación dio una eficiencia de cosecha de 98, 96 y 90 % a 7000 rpm (Syafaini et al., 2017). La velocidad óptima para el cosechado por centrifugación varía entre 5000 a 7 000 rpm (Syafaini et al., 2017). La variación en las revoluciones por minuto se debe a que a mayor tamaño de la célula se requiere una mayor velocidad de rotación y un mayor requerimiento de energía, para poder alcanzar un óptima eficiencia de cosecha ( Dassey y Theegala, 2013; Zhu et al., 2018; Liber et al., 2020).

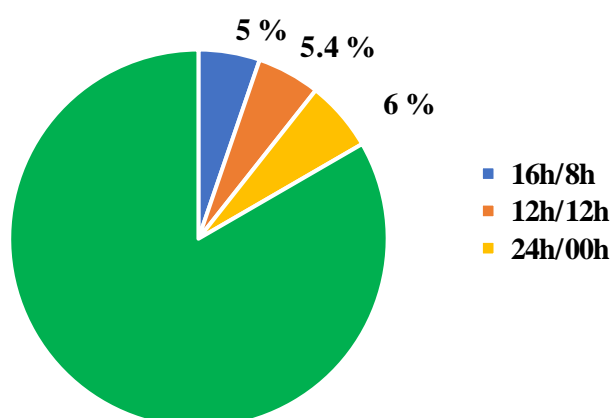
Por otro lado, Singh y Patidar, (2018) establecen que entre las técnicas más usadas esta la floculación, esto debido a su alta eficiencia y su bajo costo. En esta investigación se obtuvo una eficiencia del 92 % utilizando cáscara de huevo como floculante orgánico. Resultados similares se obtuvieron en estudios obtenidos por Choi, (2017) y Suparmaniam et al., (2020) en *Chlorella vulgaris* con una eficiencia del 94%. La utilización de este floculante orgánico favorece la floculación de células microalgales cargadas negativamente, debido a que su principal componente es el calcio en forma de carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ), permitiendo la absorción y desestabilización de la célula (Roy y Mohanty, 2020).

En este sentido, Ozkan y Berberoglu, (2013) establecen que la carga de la célula puede verse alterada por varios factores entre estos el pH debido a que los diferentes grupos funcionales presentes en la superficie de la célula tales como hidroxilo (-OH), carboxilo (-COOH) y amina (-NH<sub>2</sub>), pueden protonarse o desprotonarse en función del pH generando así una carga positiva o negativa. En el presente estudio hubo un pH de 7.63. al momento de cosechar la biomasa. Monteiro et al., (2012) explica que a un pH bajo la célula se carga positivamente mientras que a un pH alto se carga negativamente. La carga negativa de una célula se da principalmente al desprotonar el grupo funcional carboxílico (-COOH) (Pugazhendhi et al., 2019). Para que pueda haber una desprotonación del grupo carboxílico tiene que existir un pH superior a 4, ya que a un pH bajo existe un exceso de  $\text{H}_3\text{O}^+$  e  $\text{H}^+$  en el medio por lo que no se puede donar los protones (Monteiro et al., 2012; Wallerstein et al., 2015; Sui et al., 2016; Bilal et al., 2018). De igual forma, Cui et al., (2014) establece que a un pH 9 se obtiene la máxima carga negativa en la célula, esto podría explicar porque en esta investigación a pesar de haber obtenido una alta eficiencia de cosecha por floculación (cáscara de huevo) no supero al método de centrifugación.

Por otro lado, el tratamiento con menor eficiencia en este estudio fue sedimentación por gravedad dando una eficiencia del 80%. Los resultados obtenidos superan a los expuestos por Tan et al.,( 2019) en *Scenedesmus dimorphus* y por Chatsungnoen y Chisti, (2016) en *C vulgaris* con una eficiencia del 40 y 30 % respectivamente. Según Shah et al., (2014) los factores que influyen en la eficiencia de sedimentación son la densidad celular, el tamaño de la célula y la velocidad de sedimentación. En un estudio realizado *Coelastrrella sp* con un tamaño de 8.2  $\mu\text{m}$  se obtuvo una eficiencia del 60%, (Gojkovic et al., 2020). Asimismo, Vieira y Greque de Morais, (2013) establecen que una alta eficiencia solo puede ser posible en células con un tamaño mayor a 70  $\mu\text{m}$ . De acuerdo con la literatura el género *Chlamydomona* posee un tamaño de 10-30  $\mu\text{m}$  (Syafaini et al., 2017). Esto podría explicar porque en el presente trabajo el método de sedimentación no superó la eficiencia de los demás métodos. De igual forma, este método consume mucho tiempo debido a la baja densidad celular por lo que no sería un método rentable ya que la biomasa podría tener daño (Tan et al., 2019).

### 4.3 Perfil lipídico

Los resultados obtenidos para la concentración de lípidos totales en *C. agloeformis* se observan en la Figura 13 y en el Anexo 5. El contenido de lípidos presentes en la célula, para el fotoperíodo 16:8h luz/oscuridad fue del 5%, para el fotoperíodo 12:12h luz/oscuridad fue de 5.4% y finalmente el fotoperíodo que tuvo una concentración mayor fue el de 24:0h luz/oscuridad con un 6%.



**Figura 13.** Lípidos totales de *C. agloeformis* aplicando diferentes fotoperíodos

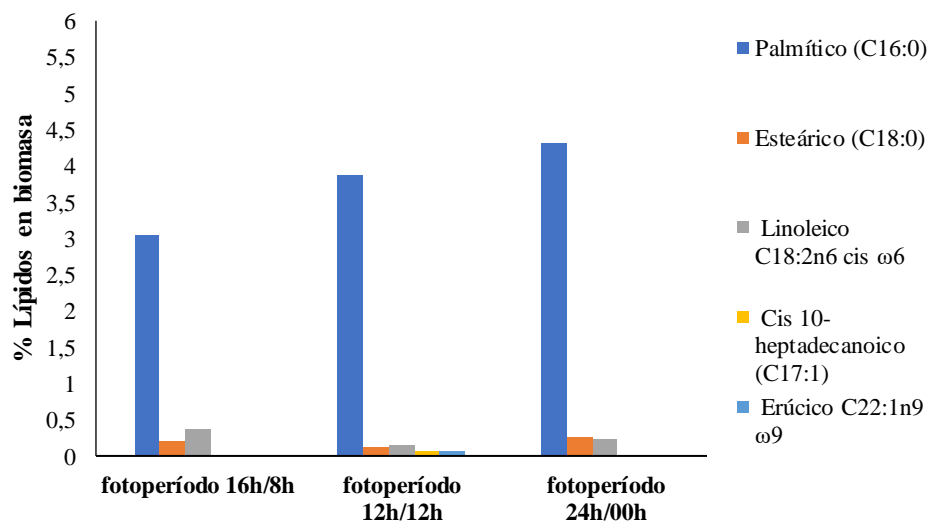
Resultados similares a este estudio se obtuvo en *N. gaditana* y en *Scenedesmus obliquus* con una concentración máxima de lípidos totales del 7.7 y 8% empleando un fotoperíodo de 24:00h luz/ oscuridad (Matos et al., 2017). Esto podría deberse a que diferentes ciclos de luz/oscuridad (fotoperíodos) influyen en la producción de lípidos de la célula microalgal, alterando su composición normal, ya que la síntesis de lípidos está relacionada con la fotosíntesis y esta a su vez se ve influenciada por los períodos de luz (Wahidin et al., 2013; Kato et al., 2019). Dicha relación se da porque se utilizan productos como NADPH y ATP provenientes de la fotosíntesis para la elaboración de acetil-CoA, que es la molécula que inicia con la síntesis de ácidos grasos en el citoplasma de la célula (Linares et al., 2012; Shene et al., 2018; Smith y Gilmour, 2018; Kato et al., 2019).

No obstante, a pesar de que hubo un ligero incremento de lípidos al aplicar diferentes fotoperíodos en la presente investigación, los resultados obtenidos no fueron los esperados. Esto se podría explicar ya que al someter a estrés al género *Chlamydomona*, estas tienden a producir en mayor cantidad carbohidratos como fuentes de reserva energética (Kato et al., 2019). Un ejemplo de esto se dio en un estudio realizado en *Chlamydomona malina* donde la concentración de carbohidratos fue del 50% ( Morales et al., 2020)

Por otro lado, Matos et al., (2017) establece que la producción de lípidos depende de la especie, por ejemplo, estudios realizados en la especie *Nannochloropsis* sp mostraron una máxima concentración de lípidos del 31.1% en un fotoperíodo de 18:6 h luz/oscuridad (Wahidin et al., 2013); en *Verrucodesmus verrucosus* un 50.42% empleando un fotoperíodo 12:12h luz/oscuridad (Vélez et al., 2021);y en *P. tricorutum* a 12: 12h luz/oscuridad se obtuvo un 41.9% de lípidos totales (Sirisuk et al., 2018).

Del mismo modo, Minhas et al., (2016) manifiesta que la presencia de luz afecta no solo la concentración lipídica sino también su composición. En el género *Chlamydomona* los principales ácidos grasos encontrados son los ácidos palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0) (Nguyen et al., 2013; Li et al., 2019). Los fotoperíodos empleados en esta investigación dieron los siguientes ácidos grasos: para el tratamiento 16:8h y 24:0h (luz/oscuridad) se obtuvieron los ácidos palmítico, esteárico y linoleico; en cuanto al fotoperíodo 12:12h (luz/oscuridad) los ácidos palmítico, esteárico, linoleico, cis-10 heptadecanoico y erúico, este último fotoperíodo dio una mayor diversidad en el perfil lipídico tal como se observa en la Figura 14.





**Figura 14.** Perfil lipídico de *C. agloeiformis* aplicando diferentes fotoperíodos

De la misma manera en otros estudios realizados en *Chaetoceros calcitrans*, *Chlorella* sp, *Scenedesmus obliquus* y *Amphora* sp se reportaron una alta variedad de ácidos grasos empleando un fotoperíodo 12:12h luz/oscuridad, incluidos los ácidos C17:1 y C22:1n9 ω9 (Guidetti et al., 2019). Seyfabadi et al., (2011) expresa que la presencia de estos MUFA se debe a que existe un período de oscuridad prolongado. La alteración de la composición de ácidos grasos podría explicarse por el hecho de que estos lípidos, al ser el principal componente de las membranas de los cloroplastos, juegan un papel clave en la formación del aparato fotosintético de las algas, por ende al existir menor duración del tiempo de luz, la célula tendría respuestas adaptativas y cambiaría el perfil de ácidos grasos (Khoeyi et al., 2012; Krzemińska et al., 2015)

Por otro lado, el ácido graso que tuvo mayor prevalencia en esta investigación fue el C16:0 con una concentración del 3.05%; 3.86% y 4.32% en los fotoperíodos 16:8h; 12:12 h y 24:0h luz/oscuridad. Esto podría deberse ya que en períodos de luz existe un aumento de ácidos grasos saturados (SFA) y un decrecimiento de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA) (Seyfabadi et al., 2011). Lo que incide en los resultados obtenidos en esta investigación, ya que existieron períodos de luz mayores a los de oscuridad. Además, en fotoperíodos con mayor tiempo de luz existe actividad enzimática de las β-Ketoacyl-ACP-sintetasa III (KASIII) que son enzimas implicadas en la producción del C16:0 (Wang et al., 2018). De la misma manera, Sirisuk et al., (2018) y Tietel et al., (2020). sostienen que el ácido palmítico es el precursor de otros ácidos grasos, como los PUFA, por lo que indica una alta concentración en la célula.

De igual forma, la producción de ácidos grasos no solamente se ve influenciada por la disponibilidad sino también por la intensidad de la luz (Wahidin et al., 2013). En esta investigación el fotoperíodo que produjo mayor diversidad de lípidos en la célula fue el de 12:12 h luz/oscuridad con una intensidad de luz de  $48 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , como se observa en la Figura 14 donde se obtuvieron diferentes ácidos grasos, incluidos los MUFA, C17:1 y el C22:1n9  $\omega$ 9. Aun así, estos resultados no superaron a los expuestos por Novoa, (en desarrollo) en *C agloeformis* donde se obtuvo los siguientes ácidos grasos: ácido mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), Cis 10- heptadecanoico (C17:1), esteárico (C18:0), oléico (C18:1 cis  $\omega$ 9), linoléico (C18:2 cis  $\omega$ 6) y erúcico (C22:1  $\omega$ 9) a una intensidad de luz de  $56 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Esto debido a que a una intensidad de luz adecuada la energía lumínica absorbida por los pigmentos de antena se convierte en ATP o NADPH, y esta energía química se almacena finalmente como almidón y/o lípidos mediante la fijación de CO<sub>2</sub> a través del ciclo de Calvin y la lipogénesis (Nzayisenga et al., 2020). De igual forma, al aumentar la intensidad de luz existe una alta actividad de enzimas involucradas en la biosíntesis de ácidos grasos, particularmente la acetil-CoA carboxilasa, la desaturasa, la proteína sintasa transportadora de acilo, la ATP/citrato liasa y la glucosa permeasa que actúan en la membrana de los cloroplastos (Gim et al., 2016)

## CAPÍTULO V

### 5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 Conclusiones

- El medio de cultivo óptimo para el escalamiento de *C. agloiformis* fue Murashige Skoog modificado, el cual tuvo una concentración de Nitrógeno de 1.53 g/L. Esto debido a que en los demás tratamientos las cantidades de nitrógeno fueron mínimas.
- Las concentraciones de nitrato de amonio empleadas (0.13 y 0.27 g/L) en los tratamientos T2 y T3 no fueron las óptimas para la célula, ya que tuvieron la menor cinética de crecimiento en comparación a las demás fuentes de nitrógeno.
- El mejor método de cosecha para la recolección de biomasa microalgal fue centrifugación, debido a que hubo una mayor tasa de eficiencia en comparación a los otros métodos.
- El mejor fotoperíodo para incrementar la concentración de lípidos totales fue 24:0 h luz/oscuridad, con una concentración del 6.01% de ácidos grasos, mientras que el fotoperíodo 12:12h luz/oscuridad produjo mayor diversidad de ácidos tales como los ácidos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), linoléico (C18:2n6 cis ω6), cis 10-heptadecanoico (C17:1) y erúcico (C22:1n9 ω9).
- El ácido graso con mayor concentración en los tres fotoperíodos fue el C16:0, debido a que es el precursor en la síntesis de otros ácidos grasos presentes en la célula.

#### 5.2 Recomendaciones

- Incrementar el número de variables a medir en los experimentos, para determinar la eficiencia en la productividad celular. Por ejemplo, la medición del peso seco permitiría determinar la cantidad g/L de biomasa generada.
- Evaluar diferentes modelos de biorreactores, para establecer las condiciones óptimas de crecimiento de *C. agloiformis*. Esto permitiría generar un protocolo de producción más adecuado en la especie, en términos de luz, temperatura, aprovechamiento de nutrientes etc.

- Aumentar variables en el protocolo de floculación, para incrementar el rendimiento de recolección de biomasa microalgal. Por ejemplo, aumento de la temperatura, pH y tiempo de agitación.
- Replicar los experimentos de cosechado, en otras especies microalgales. Esto debido a que la efectividad del método depende mucho de la morfología de la célula.
- Investigar otras fuentes de floculantes orgánicos que procedan de residuos orgánicos como el quitosano que proviene de cáscaras de camarón o el almidón catiónico que proviene de la papa o de la yuca, para poder aprovechar dichos residuos en la industria de microalgas.
- Incrementar la intensidad de luz por fotoperíodo para que un mejor resultado en el crecimiento y el contenido de lípidos de la célula.
- Realizar un análisis de carbohidratos para determinar si al someter a diferentes fotoperíodos se produce mayor cantidad de carbohidratos en lugar de lípidos. Esto debido a que la célula en situaciones de estrés puede sintetizar carbohidratos como almidón en lugar de lípidos.
- Evaluar diferentes técnicas de extracción de ácidos grasos, tales como sonicación, extracción con solventes químicos, shock osmótico, etc., para el potencial uso de ácido palmítico en la industria cosmética

## REFERENCIAS

- Adams, C., Godfrey, V., Wahlen, B., Seefeldt, L., & Bugbee, B. (2013). Understanding precision nitrogen stress to optimize the growth and lipid content tradeoff in oleaginous green microalgae. *Bioresource Technology*, *131*, 188–194. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.143>
- Aguiar, A., Moraes, L., Morais, M., & Vieira, J. (2020). Polyhydroxybutyrate production and increased macromolecule content in *Chlamydomonas reinhardtii* cultivated with xylose and reduced nitrogen levels. *International Journal of Biological Macromolecules*, *158*, 875–883. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.273>
- Aishvarya, V., Jena, J., Pradhan, N., Panda, P. K., & Sukla, L. B. (2015). Microalgae: Cultivation and Application. In L. Sukla, N. Pradhan, S. Panda, & B. Mishra (Eds.), *Environmental Microbial Biotechnology* (Vol. 45, pp. 289–311). Springer, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-19018-1>
- Akgül, F. (2020). Effects of nitrogen concentration on growth, biomass, and biochemical composition of *Desmodesmus communis* (E. Hegewald) E. Hegewald. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, *50*(1), 98–105. <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1697884>
- Alam, M., Wang, Z., & Yuan, Z. (2017). Prospects and challenges in algal biotechnology. *Prospects and Challenges in Algal Biotechnology*, 1–326. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-1950-0>
- Alessandro, E., & Antoniosi, N. (2016). Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *58*, 832–841. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.162>
- Arredondo, B. O., Voltolina, D., & Cordero, B. (2017). Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. In B. O. Arredondo, D. Voltolina, T. Zenteno, M. Arce, & G. Gómez (Eds.), *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal* (pp. 1–11).
- Arredondo, B., Voltolina, D., Savín, T., Montoya, M., & Gómez, G. (2017). *MÉTODOS Y HERRAMIENTAS ANALÍTICAS EN LA EVALUACION DE LA BIOMASA MICROALGAL*.
- Barros, A. I., Gonçalves, A. L., Simões, M., & Pires, J. C. M. (2015). Harvesting techniques applied to microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *41*, 1489–1500. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.09.037>
- Basil, G., Imran, P., Chahana, D., Kaumeel, C., Chetan, P., Tonmoy, G., & Sandhya, M. (2014). Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus* a potential strain for biofuel production. *BIORESOURCETECHNOLOGY*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.086>

- Batista, A., Rosa, R., Machado, M., Magalhães, A., Shalaguti, B., Gomes, P., Covell, L., Vaz, M., Araújo, W., & Nunes, A. (2019). Increased urea availability promotes adjustments in C/N metabolism and lipid content without impacting growth in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Metabolomics*, *15*(3), 0. <https://doi.org/10.1007/s11306-019-1496-3>
- Bermudez, J. J. (2018). Extração de lipídios da microalga *Scenedesmus* sp . Com diferentes mistura de solventes orgânicos Lipid extraction of the microalga *Scenedesmus* sp . with different mixture of organic solvents Extracción de lípidos de la microalga *Scenedesmus* sp . con difer. *Bioteología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, *16*(2), 88–98.
- Bonilla, J., & Hoyos, J. (2018). Method of oxidising mercaptans, thiophenic compounds and derivatives thereof in petrol, kerosene and diesel fractions. *Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria*, *19*(3), 24. [https://doi.org/10.21930/rcta.vol19\\_num2\\_art:684](https://doi.org/10.21930/rcta.vol19_num2_art:684)
- Brito, D., Milani, N., Guido, P., González, M., & Morán, R. (2011). Crecimiento de microalgas de agua dulce, en dos medios de cultivo Guillard y un fertilizante comercial Nitrofoska. *Ciencia*, *14*(4), 397–410.
- Calatrava, M. (2018). *Nitrogen Nutrition in Algae : Unraveling Pieces of the Nitrogen Assimilation Puzzle and its Regulation in the Model Alga Chlamydomonas reinhardtii*. Universidad de Córdoba.
- Camacho, L., & Torres, R. (2010). PARA LA DETERMINACIÓN DE BIOMASA BACTERIANA DE CEPAS *Pseudomonas putida* BIODEGRADADORAS DE FENOL. *Revista ION*, *23*. [https://www.researchgate.net/publication/335871095\\_Uso\\_de\\_Pseudomonas\\_aeruginosa\\_en\\_biorremediacion\\_revision](https://www.researchgate.net/publication/335871095_Uso_de_Pseudomonas_aeruginosa_en_biorremediacion_revision)
- Carvalho, A., Silva, S., Baptista, J., & Malcata, X. (2011). Light requirements in microalgal photobioreactors: An overview of biophotonic aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *89*(5), 1275–1288. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3047-8>
- Carvalho, J., Bittencourt, E., Assú, L., & Soccol, C. (2019). Chapter 2 - Culture media for mass production of microalgae. In *Biomass, Biofuels and Biochemicals* (Second Edi). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64192-2.00002-0>
- Cavonius, L. R., Carlsson, N. G., & Undeland, I. (2014). Quantification of total fatty acids in microalgae: Comparison of extraction and transesterification methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *406*(28), 7313–7322. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8155-3>
- Chatsungnoen, T., & Chisti, Y. (2016). Harvesting microalgae by flocculation-sedimentation. *Algal Research*, *13*, 271–283. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.12.009>
- Chen, W., Sommerfeld, M., & Hu, Q. (2011). Microwave-assisted Nile red method for in vivo quantification of neutral lipids in microalgae. *Bioresource Technology*, *102*(1), 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.076>

- Chen, Y., Tang, X., Kapoore, R., Xu, C., & Vaidyanathan, S. (2015). Influence of nutrient status on the accumulation of biomass and lipid in *Nannochloropsis salina* and *Dunaliella salina*. *Energy Conversion and Management*, *106*, 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2015.09.025>
- Choi, H. J. (2015). Effect of eggshells for the harvesting of microalgae species. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, *29*(4), 666–672. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1031177>
- Choi, H. J. (2017). Efficiency of methyl-esterified eggshell membrane biomaterials for intensified microalgae harvesting. *Environmental Engineering Research*, *22*(4), 356–362. <https://doi.org/10.4491/eer.2016.081>
- Christenson, L., & Sims, R. (2011). Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology Advances*, *29*(6), 686–702. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.015>
- Cross, F., & Umen, J. (2015). The *Chlamydomonas* cell cycle. *Plant Journal*, *82*(3), 370–392. <https://doi.org/10.1111/tpj.12795>
- Cui, Y., Yuan, W., & Cheng, J. (2014). Understanding pH and ionic strength effects on aluminum sulfate-induced microalgae flocculation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *173*(7), 1692–1702. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0957-4>
- D'Alessandro, E., & Antoniosi, N. (2016). Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *58*, 832–841. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.162>
- Dassey, A., & Theegala, C. (2013). Harvesting economics and strategies using centrifugation for cost effective separation of microalgae cells for biodiesel applications. *Bioresource Technology*, *128*, 241–245. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.061>
- Deacon, G., Kettle, C., Hayes, D., Dennis, C., & Tucci, J. (2017). Omega 3 polyunsaturated fatty acids and the treatment of depression. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *57*(1), 212–223. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.876959>
- Deshmukh, S., Kumar, R., & Bala, K. (2019). Microalgae biodiesel: A review on oil extraction, fatty acid composition, properties and effect on engine performance and emissions. *Fuel Processing Technology*, *191*(November 2018), 232–247. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2019.03.013>
- Dixon, C., & Wilken, L. (2018). Green microalgae biomolecule separations and recovery. In *Bioresources and Bioprocessing* (Vol. 5, Issue 1). Springer. <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0199-3>
- Dogdu, G. (2019). The impact of nitrogen starvation on the dynamics of lipid and biomass production in *Scenedesmus* sp. *Environmental Research and Technology*, *2*(3), 158–170. <https://doi.org/10.35208/ert.553536>

- Farahin, A., Natrah, I., Nagao, N., Yusoff, F., Shariff, M., Banerjee, S., Katayama, T., Nakakuni, M., Koyama, M., Nakasaki, K., & Toda, T. (2021). Tolerance of *Tetraselmis tetrahele* to High Ammonium Nitrogen and Its Effect on Growth Rate, Carotenoid, and Fatty Acids Productivity. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9(January). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.568776>
- Ferreira, G., Ríos Pinto, L., Maciel Filho, R., & Fregolente, L. (2019). A review on lipid production from microalgae: Association between cultivation using waste streams and fatty acid profiles. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 109(April), 448–466. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.04.052>
- Fields, M., Hise, A., Lohman, E., Bell, T., Gardner, R., Corredor, L., Moll, K., Peyton, B., Characklis, G., & Gerlach, R. (2014). Sources and resources: Importance of nutrients, resource allocation, and ecology in microalgal cultivation for lipid accumulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(11), 4805–4816. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5694-7>
- Francisco, E., Jacob, E., Rodrigues, K., & Teixeira, T. (2019). Nitrogen Starvation of Assessment in the Production of Single Cell Oils and Biodiesel Quality in Heterotrophic Cultures of Cyanobacteria *Phormidium autumnale*. *Journal of Advanced Chemical Engineering*, 09(01), 1–7. <https://doi.org/10.35248/2090-4568.19.9.192>
- Gim, G., Ryu, J., Kim, M., Kim, P., & Kim, S. (2016). Effects of carbon source and light intensity on the growth and total lipid production of three microalgae under different culture conditions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 43(5), 605–616. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1741-y>
- Gojkovic, Z., Shchukarev, A., Ramstedt, M., & Funk, C. (2020). Cryogenic X-ray photoelectron spectroscopy determines surface composition of algal cells and gives insights into their spontaneous sedimentation. *Algal Research*, 47(June 2019), 101836. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101836>
- Gomez, M., Romeral, J., Chirivella, J., & Serrano, Á. (2017). *Direct spectrophotometric method to determine cell density of Isochrysis galbana in serial batch cultures from a larger scale fed-batch culture in exponential phase*. 4632. <https://doi.org/10.3390/mol2net-03-04632>
- Gonçalves, A., Simões, M., & Pires, J. (2014). The effect of light supply on microalgal growth, CO<sub>2</sub> uptake and nutrient removal from wastewater. *Energy Conversion and Management*, 85, 530–536. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2014.05.085>
- Goncalves, E., Koh, J., Zhu, N., Yoo, M., Chen, S., Matsuo, T., Johnson, J., & Rathinasabapathi, B. (2016). Nitrogen starvation-induced accumulation of triacylglycerol in the green algae: Evidence for a role for ROC40, a transcription factor involved in circadian rhythm. *Plant Journal*, 85(6), 743–757. <https://doi.org/10.1111/tpj.13144>
- Gour, R. S., Bairagi, M., Garlapati, V. K., & Kant, A. (2018). Enhanced microalgal lipid production with media engineering of potassium nitrate as a nitrogen source.



*Bioengineered*, 9(1), 98–107. <https://doi.org/10.1080/21655979.2017.1316440>

- Griffiths, M., Garcin, C., van Hille, R., & Harrison, S. (2011). Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *Journal of Microbiological Methods*, 85(2), 119–123. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.02.005>
- Griffiths, M. J., van Hille, R. P., & Harrison, S. T. L. (2012). Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. *Journal of Applied Phycology*, 24(5), 989–1001. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9723-y>
- Guamán, C., & González, P. (2016). *Catálogo De Microalgas Y Cianobacterias de agua dulce del Ecuador* (L. Re de Guillén (ed.)). Quik print. <http://energia.org.ec/cie/wp-content/uploads/2017/09/Catlogo-de-Microalgas-y-Cianobacterias-del-Ecuador.pdf>
- Guermazi, W., Masmoudi, S., Boukhris, S., Ayadi, H., & Morant, A. (2014). Under low irradiation, the light regime modifies growth and metabolite production in various species of microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 26(6), 2283–2293. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0260-3>
- Guidetti, R., Fagundes, M. B., Manzoni, M., Casagrande, T., Ragagnin, C., Smanioto, J., Queiroz, L., Lopes, E., & Wagner, R. (2019). Scenedesmus obliquus metabolomics: effect of photoperiods and cell growth phases. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 42(5), 727–739. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02076-y>
- Hallmann, A. (2007). Algal Transgenics and Biotechnology. *Transgenic Plant Journal*, 1(1), 81–98.
- Hellebust, J., & Ahmad, I. (1988). Biological Oceanography Regulation of Nitrogen Assimilation in Green Microalgae. *Biological Oceanography*, 5581(October 2014), 241–255. <https://doi.org/10.1080/01965581.1988.10749529>
- Hoe, B., Chyuan, H., Yee, M., Chen, W., Ling, K., & Indra, T. (2019). Sustainability of direct biodiesel synthesis from microalgae biomass : A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 107(February), 59–74. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.02.012>
- Huang, Y., Zhang, D., Xue, S., Wang, M., & Cong, W. (2016). The Potential of Microalgae Lipids for Edible Oil Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 180(3), 438–451. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2108-6>
- Huy, M., Kumar, G., Kim, H., & Kim, S. (2017). Photoautotrophic cultivation of mixed microalgae consortia using various organic waste streams towards remediation and resource recovery Department of Environmental Engineering , Daegu University , Gyeongsan , Geoungbuk , Sustainable Environmental Process. *Bioresource Technology*, 1–28. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.108>
- Jankowska, E., Sahu, A., & Oleskowicz, P. (2017). Biogas from microalgae: Review on

microalgae's cultivation, harvesting and pretreatment for anaerobic digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 75(November 2016), 692–709. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.11.045>

Katiyar, R., & Arora, A. (2020). Health promoting functional lipids from microalgae pool: A review. *Algal Research*, 46(July 2019), 101800. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101800>

Kato, Y., Fujihara, Y., Vavricka, C. J., Chang, J. S., Hasunuma, T., & Kondo, A. (2019). Light/dark cycling causes delayed lipid accumulation and increased photoperiod-based biomass yield by altering metabolic flux in oleaginous *Chlamydomonas* sp. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1380-4>

Kawakami, K., & Shen, J. (2018). Purification of fully active and crystallizable photosystem II from thermophilic cyanobacteria. In *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 613). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2018.10.002>

Kendirlioglu, G., Agirman, N., & Cetin, A. K. (2015). The effects of photoperiod on the growth, protein amount and pigment content of *Chlorella vulgaris*. *Turkish Journal of Science & Technology*, 10(2), 7–10. <http://dergipark.gov.tr/download/article-file/303673>

Khoeyi, Z., Seyfabadi, J., & Ramezanzpour, Z. (2012). Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris*. *Aquaculture International*, 20(1), 41–49. <https://doi.org/10.1007/s10499-011-9440-1>

Kim, D., Vijayan, D., Praveenkumar, R., Han, J., Lee, K., Park, J., Chang, W., Lee, J., & Oh, Y. (2016). Bioresource Technology Cell-wall disruption and lipid / astaxanthin extraction from microalgae : *Chlorella* and *Haematococcus*. *Bioresource Technology*, 199, 300–310. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.107>

Kim, G., Bae, J., & Lee, K. (2016). Nitrate repletion strategy for enhancing lipid production from marine microalga *Tetraselmis* sp. *Bioresource Technology*, 205, 274–279. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.045>

Kim, G., Mujtaba, G., & Lee, K. (2016). Effects of nitrogen sources on cell growth and biochemical composition of marine chlorophyte *tetraselmis* sp. For lipid production. *Algae*, 31(3), 257–266. <https://doi.org/10.4490/algae.2016.31.8.18>

Kiran, B., Pathak, K., Kumar, R., Deshmukh, D., & Rani, N. (2016). Influence of varying nitrogen levels on lipid accumulation in *Chlorella* sp. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 13(7), 1823–1832. <https://doi.org/10.1007/s13762-016-1021-4>

Krzemińska, I., Piasecka, A., Nosalewicz, A., Simionato, D., & Wawrzykowski, J. (2015). Alterations of the lipid content and fatty acid profile of *Chlorella protothecoides* under different light intensities. *Bioresource Technology*, 196, 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.043>

- Kumar, R., Deviram, G., Mathimani, T., Anh, P., & Pugazhendhi, A. (2019). Microalgae as rich source of polyunsaturated fatty acids. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *17*(December 2018), 583–588. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.01.017>
- Lakatos, M., & Strieth, D. (2017). Terrestrial Microalgae : Novel Concepts for Biotechnology and Applications. In *Progress in Botany* (Issue July 2018, pp. 269–312). Springer, Cham. <https://doi.org/10.1007/124>
- Lari, Z., Moradi, N., Ahmadzadeh, H., Abrishamchi, P., Moheimani, N. R., & Murry, M. A. (2016). Bioprocess engineering of microalgae to optimize lipid production through nutrient management. *Journal of Applied Phycology*, *28*(6), 3235–3250. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0884-6>
- Lemley, D., Adams, J., & Bate, G. (2016). A review of microalgae as indicators in South African estuaries. *South African Journal of Botany*, *107*, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.04.008>
- Leong, W. H., Lim, J. W., Lam, M. K., Uemura, Y., & Ho, Y. C. (2018). Third generation biofuels: A nutritional perspective in enhancing microbial lipid production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *91*(April 2017), 950–961. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.066>
- Li, N., Zhang, Y., Meng, H., Li, S., Wang, S., Xiao, Z., Chang, P., Zhang, X., Li, Q., Guo, L., Igarashi, Y., & Luo, F. (2019). Characterization of Fatty Acid Exporters involved in fatty acid transport for oil accumulation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology for Biofuels*, *12*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1332-4>
- Li, Y., Beisson, F., & Riekhof, W. (2015). Metabolism of acyl-lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Journal*, *82*(3), 504–522. <https://doi.org/10.1111/tpj.12787>
- Lian, J., Wijffels, R. H., Smidt, H., & Sipkema, D. (2018). The effect of the algal microbiome on industrial production of microalgae. *Microbial Biotechnology*, *11*(5), 806–818. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13296>
- Linares, L., Montiel, J., Millán, A., & Badillo, J. (2012). Production of biofuels obtained from microalgae. *Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable*, *8*(Especial 3b), 101–115. <https://www.redalyc.org/pdf/461/46125177011.pdf>
- López, E., González, R., Márquez, E., & Torres, W. (2015). Efecto de la concentración y fuentes de nitrógeno en la producción de proteínas de cultivos masivos de la microalga *Chaetoceros muelleri*. *Phyton*, *84*(2), 331–337.
- Lu, L., Yang, G., Zhu, B., & Pan, K. (2017). A comparative study on three quantitating methods of microalgal biomass. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, *46*(11), 2265–2272.
- Ma, X., Chen, T., Yang, B., Liu, J., & Chen, F. (2016). Lipid Production from *Nannochloropsis*. *Marine Drugs*, *3*, 2–18. <https://doi.org/10.3390/md14040061>

- Mahdieh, M., Shabani, S., & Amirjani, M. (2019). Characterization of the growth, total lipid and fatty acid profiles in microalga, *nannochloropsis oceanica* under different nitrogen sources. *Microbiology and Biotechnology Letters*, *47*(1), 11–19. <https://doi.org/10.4014/mbl.1801.01004>
- Martinez, M., Martinez, L. R., Lopez, J. A., & Porchas, A. (2014). Bioremediation of Aquaculture Effluents. In S. Das (Ed.), *Microbial Biodegradation and Bioremediation* (Issue 2, pp. 541–556). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800021-2.00024-8>
- Matos, Â., Gandin, M., Siegel, E. H., & Sant'Anna, E. (2017). Effects of different photoperiod and trophic conditions on biomass, protein and lipid production by the marine alga *Nannochloropsis gaditana* at optimal concentration of desalination concentrate. *Bioresource Technology*, *224*, 490–497. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.004>
- Matos, Â. P. (2017). The Impact of Microalgae in Food Science and Technology. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, *94*(11), 1333–1350. <https://doi.org/10.1007/s11746-017-3050-7>
- Mayers, J. J., Flynn, K. J., & Shields, R. J. (2013). Rapid determination of bulk microalgal biochemical composition by Fourier-Transform Infrared spectroscopy. *Bioresource Technology*, *148*, 215–220. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.133>
- Mekkawi, S., Hussein, H., Enin, S., & Ibiari, N. (2019). Assessment of stress conditions for carotenoids accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii* as added-value algal products. *Bulletin of the National Research Centre*, *43*(1). <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0169-8>
- Metsoviti, M., Papapolymerou, G., Karapanagiotidis, I., & Katsoulas, N. (2020). Effect of light intensity and quality on growth rate and composition of *Chlorella vulgaris*. *Plants*, *9*(1), 1–17. <https://doi.org/10.3390/plants9010031>
- Milledge, J. J., & Heaven, S. (2013). A review of the harvesting of micro-algae for biofuel production. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, *12*(2), 165–178. <https://doi.org/10.1007/s11157-012-9301-z>
- Minhas, A., Hodgson, P., Barrow, C., & Adholeya, A. (2016). A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids. *Frontiers in Microbiology*, *7*(MAY), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00546>
- Mondal, M., Goswami, S., Ghosh, A., Oinam, G., Tiwari, O.-N., Das, P., Gayen, K., Mandak, M.-K., & Halder, G.-N. (2017). Production of biodiesel from microalgae through biological carbon capture : a review. *3 Biotech*, *7*(2), 1–21. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0727-4>
- Monteiro, C., Castro, P., & Malcata, X. (2012). Metal uptake by microalgae: Underlying mechanisms and practical applications. *Biotechnology Progress*, *28*(2), 299–311. <https://doi.org/10.1002/btpr.1504>

- Morales, D., Schulze, P. S. C., Kiron, V., & Wijffels, R. H. (2020). Production of carbohydrates, lipids and polyunsaturated fatty acids (PUFA) by the polar marine microalga *Chlamydomonas malina* RCC2488. *Algal Research*, 50(July). <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102016>
- Morales, M., Aflalo, C., & Bernard, O. (2021). Microalgal lipids: A review of lipids potential and quantification for 95 phytoplankton species. *Biomass and Bioenergy*, 150(November 2020), 106108. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106108>
- Mubarak, M., Shaija, A., & Suchithra, T. (2015). Review article A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production. *ALGAL*, 7, 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.10.008>
- Mujtaba, G., Choi, W., Lee, C. G., & Lee, K. (2012). Lipid production by *Chlorella vulgaris* after a shift from nutrient-rich to nitrogen starvation conditions. *Bioresource Technology*, 123, 279–283. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.057>
- Nagappan, S., & Kumar, G. (2021). Investigation of four microalgae in nitrogen deficient synthetic wastewater for biorefinery based biofuel production. *Environmental Technology and Innovation*, 23, 101572. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101572>
- Najjar, Y., & Abu, A. (2020). Harvesting of microalgae by centrifugation for biodiesel production: A review. *Algal Research*, 51(August), 102046. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102046>
- Nakanishi, A., Aikawa, S., Ho, S. H., Chen, C. Y., Chang, J. S., Hasunuma, T., & Kondo, A. (2014). Development of lipid productivities under different CO<sub>2</sub> conditions of marine microalgae *Chlamydomonas* sp. JSC4. *Bioresource Technology*, 152, 247–252. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.009>
- Navarrete, J., & Zambrano, R. (2013). *Valoración económica de servicios ambientales del lago San Pablo, provincia de Imbabura y análisis de excenarios en el caso de conservación y pérdida del recurso natural en el período 2011-2012*. <http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/14623/1/CD-6793.pdf>
- Nayak, M., Thirunavoukkarasu, M., & Mohanty, R. C. (2016). Cultivation of freshwater microalga *Scenedesmus* sp. using a low-cost inorganic fertilizer for enhanced biomass and lipid yield. *Journal of General and Applied Microbiology*, 62(1), 7–13. <https://doi.org/10.2323/jgam.62.7>
- Novoa, J. (2019). *CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA Y MOLECULAR DE LAS ESPECIES DE MICROALGAS PRESENTES EN EL LAGO YAHUARCOCHA PARA SU POTENCIAL USO COMERCIAL*. Universidad Técnica del Norte.
- Nzayisenga, J., Farge, X., Groll, S., & Sellstedt, A. (2020). Effects of light intensity on growth and lipid production in microalgae grown in wastewater. *Biotechnology for Biofuels*, 13(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1646-x>
- Odjadjare, E., Mutanda, T., & Olaniran, A. (2015). *Potential biotechnological*

*application of microalgae : a critical review*. 8551(November).  
<https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1108956>

- Ortiz, J., Flores, F., Maldonado, S., Mihae, R., Naranjo, B., Muñoz, D., Manjunatha, B., Selvanayagam, M., & Rajeswari, B. (2017). Molecular characterization and antioxidant potential of Andean chlorophytes from Ecuador. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(5), 56–60. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2017.70510>
- Ozkan, A., & Berberoglu, H. (2013). Cell to substratum and cell to cell interactions of microalgae. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 112, 302–309. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.08.007>
- Panta, R., Macay, A., Moncayo, E., & Vélez, J. (2016). Crecimiento de las microalgas *Chaetoceros gracilis* e *Isochrysis galbana* con fertilizantes agrícolas, en laboratorio. *Revista de Las Agrocencias.*, 16, 44. [https://doi.org/10.33936/la\\_tecnica.v0i16.535](https://doi.org/10.33936/la_tecnica.v0i16.535)
- Posten, C., & Feng, S. (2016). *Microalgae Biotechnology* (S. Scheper, Hannover, & Germany (eds.)). Springer.
- Presta, L., Fondi, M., Emiliani, G., & Fani, R. (2015). Nitrogen Fixation, a Molybdenum-Requiring Process. In *Molybdenum Cofactors and Their role in the Evolution of Metabolic Pathways* (pp. 53–66). [https://doi.org/10.1007/978-94-017-9972-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-94-017-9972-0_5)
- Prieto, M., Mogollon, M., Castro, A., & Sierra, L. (2005). Efecto del medio y condiciones de cultivo en la productividad de tres diatomeas marinas con potencial acuícola. *MVZ-Córdoba*, 1, 544–554.
- Pugazhendhi, A., Shobana, S., Bakonyi, P., Nemestóthy, N., Xia, A., & Banu J, R. (2019). A review on chemical mechanism of microalgae flocculation via polymers. *Biotechnology Reports*, 21(2018), e00302. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00302>
- Quigg, A. (2016). The Physiology of Microalgae. *The Physiology of Microalgae*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2>
- Ram, S., Paliwal, C., & Mishra, S. (2019). Growth medium and nitrogen stress sparked biochemical and carotenogenic alterations in *Scenedesmus* sp. CCNM 1028. *Bioresource Technology Reports*, 7(March), 100194. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100194>
- Raven, J. A. (1981). Nutrient Transport in Microalgae. *Advances in Microbial Physiology*, 21(C), 47–226. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60356-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60356-2)
- Rocha, R., Machado, M., Gomes, M., Vinson, C. C., Leite, M., Richard, R., Bacellar, L., Araujo, W. L., Caldana, C., Martins, M., Williams, T., & Nunes, A. (2017). Exploring the metabolic and physiological diversity of native microalgal strains (Chlorophyta) isolated from tropical freshwater reservoirs. *Algal Research*, 28(October), 139–150. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.10.021>
- Roy, M., & Mohanty, K. (2020). Valorization of waste eggshell-derived bioflocculant

- for harvesting *T. obliquus*: Process optimization, kinetic studies and recyclability of the spent medium for circular bioeconomy. *Bioresource Technology*, 307(January), 123205. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123205>
- Rueter, J., & Petersen, R. (1987). Micronutrient effects on cyanobacterial growth and physiology. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 21(3), 435–445. <https://doi.org/10.1080/00288330.1987.9516239>
- Ruiz, N., Usher, S., Sayanova, O., Napier, J., & Haslam, R. (2014). Modifying the lipid content and composition of plant seeds: engineering the production of LC-PUFA. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(1), 143–154. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6217-2>
- Saelens, P. (2015). *Ecological functioning of a eutrophic, high-altitude shallow lake in Ecuador, Laguna Yahuarcocha* [K.U. Leuven, Kulak]. [http://scriptiebank.be/sites/default/files/webform/scriptie/Pauline\\_Saelens\\_THESIS\\_0.pdf](http://scriptiebank.be/sites/default/files/webform/scriptie/Pauline_Saelens_THESIS_0.pdf)
- Salomé, P., & Merchant, S. (2019). A series of fortunate events: Introducing chlamydomonas as a reference organism. *Plant Cell*, 31(8), 1682–1707. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00952>
- Sanyano, N., Chetpattananondh, P., & Chongkhong, S. (2013). Coagulation-flocculation of marine *Chlorella* sp. for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 147, 471–476. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.080>
- Sasso, S., Stibor, H., Mittag, M., & Grossman, A. (2018). The natural history of model organisms from molecular manipulation of domesticated chlamydomonas reinhardtii to survival in nature. *ELife*, 7, 1–14. <https://doi.org/10.7554/eLife.39233>
- Scholz, C., & Villalobos, N. (2014). Presencia del alga *Chlamydomonas vesterbottnica* (Chlamydomonadales: Chlamydomonadaceae) en los estanques de la planta de tratamiento de un relleno sanitario en Costa Rica. *UNED Research Journal*, 5(2), 185–187. <https://doi.org/10.22458/urj.v5i2.279>
- Seyfabadi, J., Ramezanzpour, Z., & Amini, Z. (2011). Protein, fatty acid, and pigment content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes. *Journal of Applied Phycology*, 23(4), 721–726. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9569-8>
- Shah, J. H., Deokar, A., Patel, K., Panchal, K., & Mehta, A. V. (2014). A Comprehensive Overview on Various Method of Harvesting Microalgae According to Indian Perspective. *International Conference on Multidisciplinary Research & Practice*, I(Vii), 313–317.
- Silva, A. (2016). Evaluación de fertilizantes agrícolas en la productividad de la microalga *Chlorella sorokiniana*. *Agronomía Mesoamericana*, 27(2), 265. <https://doi.org/10.15517/am.v27i2.24361>
- Silva, A., Campos, M., Villalobos, N., Touloupakis, E., & Torzillo, G. (2019). Growth and hydrogen production by three *Chlamydomonas* strains cultivated in a commercial fertilizer. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(20), 9849–

9855. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.11.209>

Singh, G., & Patidar, S. (2018). Microalgae harvesting techniques: A review. *Journal of Environmental Management*, 217, 499–508.  
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.010>

Singh, P., Guldhe, A., Kumari, S., Rawat, I., & Bux, F. (2015). Investigation of combined effect of nitrogen, phosphorus and iron on lipid productivity of microalgae *Ankistrodesmus falcatus* KJ671624 using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 94, 22–29.  
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.10.019>

Sirisuk, P., Ra, C., Jeong, G., & Kim, S. (2018). Effects of wavelength mixing ratio and photoperiod on microalgal biomass and lipid production in a two-phase culture system using LED illumination. In *Bioresource Technology* (Vol. 253).  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.020>

Srirangan, S., Sauer, M., Howard, B., Dvora, M., Dums, J., Backman, P., & Sederoff, H. (2015). Interaction of temperature and photoperiod increases growth and oil content in the marine microalgae *Dunaliella viridis*. *PLoS ONE*, 10(5), 1–32.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127562>

Sun, X. M., Ren, L. J., Zhao, Q. Y., Ji, X. J., & Huang, H. (2018). Microalgae for the production of lipid and carotenoids: A review with focus on stress regulation and adaptation. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 1–16.  
<https://doi.org/10.1186/s13068-018-1275-9>

Suparmaniam, U., Lam, M., Uemura, Y., & Shuit, S. H. (2019). Development of Bioflocculant from Chicken's Eggshell Membrane to Harvest *Chlorella vulgaris*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 268(1).  
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/268/1/012121>

Syafaini, A., Azis, N. M., Sobri, M., Haiza, N., & Yasin, M. (2017). Application of Different Techniques to Harvest Microalgae. *Transactions on Science and Technology*, 4(March 2019), 98–108.  
<http://transectscience.org/pdfs/vol4/no2/4x2x98x108.pdf>

Takeuchi, T., & Benning, C. (2019). Nitrogen-dependent coordination of cell cycle, quiescence and TAG accumulation in *Chlamydomonas*. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1635-0>

Tan, D., Zhang, H., Sun, S., Dong, F., Sun, H., & Li, B. (2019). Rapid flocculation-sedimentation of microalgae with organosilane-functionalized halloysite. *Applied Clay Science*, 177(May), 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2019.05.005>

Tan, X., Uemura, Y., Lim, J. W., Wong, C. Y., & Lee, K. T. (2018). Cultivation of microalgae for biodiesel production: A review on upstream and downstream processing. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 26(1), 17–30.  
<https://doi.org/10.1016/j.cjche.2017.08.010>

Tang, D. Y. Y., Yew, G. Y., Koyande, A. K., Chew, K. W., Vo, D. V., & Show, P. L.



- (2020). Green technology for the industrial production of biofuels and bioproducts from microalgae: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 18(6), 1967–1985. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01052-3>
- Tao, R., Bair, R., Lakaniemi, A., Van, E., & Rintala, J. (2020). Use of factorial experimental design to study the effects of iron and sulfur on growth of *Scenedesmus acuminatus* with different nitrogen sources. *Journal of Applied Phycology*, 32(1), 221–231. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01915-5>
- Tasic, M., Bonon, A. de J., Rocha Barbosa Schiavon, M. I., Colling Klein, B., Veljković, V., & Maciel Filho, R. (2021). Cultivation of *Chlamydomonas reinhardtii* in Anaerobically Digested Vinasse for Bioethanol Production. *Waste and Biomass Valorization*, 12(2), 857–865. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01034-0>
- Tasić, M., Rios, L., Klein, B., Veljković, V., & Filho, R. (2016). *Botryococcus braunii* for biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 64, 260–270. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.06.009>
- Tejeda, L., Henao, D., Alvear, M., & Castillo, C. R. (2015). Caracterización y perfil lipídico de aceites de microalgas. *Revista Facultad De Ingeniería*, 24(39), 43. <https://doi.org/10.19053/01211129.3550>
- Terneus, E., Vallejo, B., Gómez, M., & Larenas, C. (2020). Trophic status index of lentic systems from the diversity of aquatic plants from continental Ecuador (IMAE). *Caldasia*, 42(1), 115–128. <https://doi.org/10.15446/caldasia.v42n1.77638>
- Tietel, Z., Wikoff, W., Kind, T., Ma, Y., & Fiehn, O. (2020). Hyperosmotic stress in *Chlamydomonas* induces metabolomic changes in biosynthesis of complex lipids. *European Journal of Phycology*, 55(1), 11–29. <https://doi.org/10.1080/09670262.2019.1637547>
- Trivedi, J., Aila, M., Bangwal, D., Kaul, S., & Garg, M. (2015). Algae based biorefinery - How to make sense? *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 47, 295–307. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.03.052>
- Valledor, L., Furuhashi, T., Recuenco, L., Wienkoop, S., & Weckwerth, W. (2014). System-level network analysis of nitrogen starvation and recovery in *Chlamydomonas reinhardtii* reveals potential new targets for increased lipid accumulation. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13068-014-0171-1>
- Vélez, L., Hernández, H., Pérez, Y. D. C., Velázquez, S., Moreira, J., Berrones, R., & Sánchez, Y. (2021). Influence of light intensity and photoperiod on the photoautotrophic growth and lipid content of the microalgae *verrucodesmus verrucosus* in a photobioreactor. *Sustainability (Switzerland)*, 13(12). <https://doi.org/10.3390/su13126606>
- Vera, A., Martínez, M., Morillo, K., & Montes, S. (2014). Cultivo discontinuo de *Chlorella* sp . en medios enriquecidos con el exudado gomoso de *Acacia macracantha*. *BOLETÍN DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS*,

January 2004.

- Vieira, J., & Greque de Morais, M. (2013). An Open Pond System for Microalgal Cultivation. In *Biofuels from Algae*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59558-4.00001-2>
- Villa, A., Herazo, D., & Torregroza, A. (2014). EFFECT OF PHOTOPERIOD ON THE GROWTH OF DIATOM *Chaetoceros calcitrans* (C-CAL) IN STATIC CULTURES. *Rev Intropica*, 9, 111–117.
- Vítová, M., Bišová, K., Kawano, S., & Zachleder, V. (2015). Accumulation of energy reserves in algae: from cell cycles to biotechnological applications. *Biotechnology Advances*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.04.012>
- Vuppaladadiyam, A., Prinsen, P., Raheem, A., Luque, R., & Zhao, M. (2018). Microalgae cultivation and metabolites production: a comprehensive review. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. <https://doi.org/10.1002/bbb>
- Wahidin, S., Idris, A., & Muhamad, S. (2013). The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. *Bioresource Technology*, 129, 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.032>
- Wang, H., Zhang, Y., Zhou, W., Noppol, L., & Liu, T. (2018). Mechanism and enhancement of lipid accumulation in filamentous oleaginous microalgae *Tribonema minus* under heterotrophic condition 06 Biological Sciences 0601 Biochemistry and Cell Biology. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1329-z>
- Wang, X., Fosse, H., Li, K., Chauton, M., Vadstein, O., & Reitan, K. I. (2019). Influence of nitrogen limitation on lipid accumulation and EPA and DHA content in four marine microalgae for possible use in aquafeed. *Frontiers in Marine Science*, 6(MAR). <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00095>
- Winter, L. (2015). *Circadian rhythms in microalgae production* [Wageningen University]. <http://edepot.wur.nl/345221>
- Wyatt, N. B., Gloe, L. M., Brady, P. V., Hewson, J. C., Grillet, A. M., Hankins, M. G., & Pohl, P. I. (2012). Critical conditions for ferric chloride-induced flocculation of freshwater algae. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(2), 493–501. <https://doi.org/10.1002/bit.23319>
- Xu, Y. (2015). *Molybdenum and Iron Interactions as Micronutrients for Growth of a Freshwater Cyanobacterium, Microcystis Aeruginosa*. <https://ir.lib.uwo.ca/etdhttps://ir.lib.uwo.ca/etd/3293>
- Xu, Z., Jiang, Y., Ji, J., Forsberg, E., Li, Y., & He, S. (2020). Classification, identification, and growth stage estimation of microalgae based on transmission hyperspectral microscopic imaging and machine learning. *Optics Express*, 28(21), 30686. <https://doi.org/10.1364/oe.406036>
- Yaakob, M., Mohamed, R., Radin, S., Al, A., Ravishankar, G., & Ambati, R. (2021).

Influence of Nitrogen and Phosphorus on Microalgal Growth, Biomass, Lipid, and Fatty Acid Production: An Overview. *Cells*, 10(2), 393.  
<https://doi.org/10.3390/cells10020393>

- Yen, H., Hu, I., Chen, C., Nagarajan, D., & Chang, J. (2019). Design of photobioreactors for algal cultivation. In *Biomass, Biofuels and Biochemicals* (Second Edi, pp. 225–256). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64192-2.00010-X>
- Yodsuwan, N., Sawayama, S., & Sirisansaneeyakul, S. (2017). Effect of nitrogen concentration on growth, lipid production and fatty acid profiles of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Agriculture and Natural Resources*, 51(3), 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2017.02.004>
- Zachleder, V., & Vítová, M. (2016). The Physiology of Microalgae. In *The Physiology of Microalgae*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2>
- Zhang, J., & Hu, B. (2012). A novel method to harvest microalgae via co-culture of filamentous fungi to form cell pellets. *Bioresource Technology*, 114, 529–535. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.03.054>
- Zhang, Z., Tan, Y., Wang, W., Bai, W., Fan, J., Huang, J., Wan, M., & Li, Y. (2019). Efficient heterotrophic cultivation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Applied Phycology*, 31(3), 1545–1554. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1666-0>
- Zhu, J., Chen, W., Chen, H., Zhang, X., He, C., Rong, J., & Wang, Q. (2016). Improved productivity of neutral lipids in *Chlorella* sp. A2 by minimal nitrogen supply. *Frontiers in Microbiology*, 7(APR), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00557>
- Zhu, L., Li, Z., & Hiltunen, E. (2018). Microalgae *Chlorella vulgaris* biomass harvesting by natural flocculant: Effects on biomass sedimentation, spent medium recycling and lipid extraction. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1183-z>

## ANEXOS

### Anexo 1.

#### *Supuestos de normalidad*

##### *Supuestos de normalidad para cinética de crecimiento por absorbancia*

<b>Pruebas de normalidad</b>			
	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>		
	Estadístico	gl	Sig.
Residuo para Absorbancia	,112	36	,200*

a. Corrección de significación de Lilliefors

##### *Supuestos de normalidad para cinética de crecimiento por conteo celular*

<b>Pruebas de normalidad</b>			
	Kolmogorov-Smirnova		
	Estadístico	Gl	Sig.
Residuo para Raíz	0,115	36	,200*

a Corrección de significación de Lilliefors

##### *Supuestos de normalidad y homogeneidad para eficiencia de cosecha por absorbancia*

<b>Pruebas de normalidad</b>			
	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>		
	Estadístico	gl	Sig.
Residuo para eficiencia por absorbancia	,140	27	,185

a. Corrección de significación de Lilliefors

##### *Supuestos de normalidad para eficiencia de cosecha por conteo celular.*

<b>Pruebas de normalidad</b>			
	Kolmogorov-Smirnova		
	Estadístico	gl	Sig.
Residuo para eficiencia celular	,159	27	,076

a. Corrección de significación de Lilliefors

## Anexo 2.

### Supuestos de homogeneidad

*Supuestos de homogeneidad para cinética de crecimiento por absorbancia*

Prueba homogeneidad				
Variable dependiente:	Absorbancia			
Estadístico de Levene	F	df1	df2	Sig.
	2,277	11	24	,045

a. Diseño: Interceptación + Repetición + Reactor

*Supuestos de homogeneidad para cinética de crecimiento por conteo celular.*

Prueba homogeneidad				
Variable dependiente:	Raíz			
Estadístico de Levene	F	df1	df2	Sig.
	2,161	11	24	0,056

a. Diseño: Interceptación + Repetición + Reactor

*Supuestos de homogeneidad para eficiencia de cosecha por absorbancia*

Prueba homogeneidad				
Variable dependiente:	Eficiencia Absorbancia 750nm (%)			
Estadístico de Levene	F	df1	df2	Sig.
	1,041	8	18	,443

a. Diseño: Interceptación + cosecha + repetición

*Supuestos de homogeneidad para eficiencia de cosecha por conteo celular*

<b>Prueba homogeneidad</b>				
Variable dependiente:	Eficiencia celular (%)			
Estadístico de Levene	F	df1	df2	Sig.
	1,281	8	18	,313

a. Diseño: Interceptación + cosecha + repetición

**Anexo 3.**

**Prueba HSD Tukey**

*Prueba HSD Tukey para cinética de crecimiento por absorbancia*

<b>Absorbancia</b>				
HSD Tukey <sup>a,b</sup>				
Reactor	N	Subconjunto		
		1	2	3
T3	9	,3256		
T2	9	,3759		
T1	9		,5590	
MS	9			,9296
Sig.		,174	1,000	1,000

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 9,000.

b. Alfa = ,05.

**Prueba HSD Tukey**

*Prueba HSD Tukey para cinética de crecimiento por conteo celular*

<b>Raíz</b>				
HSD Tukey a,b				
Reactor	N	Subconjunto		
		1	2	3
T3	9	2184,931		
T2	9	2264,618		
T1	9		2691,348	
MS	9			3706,865
Sig.		0,462	1	1

a Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica 9,000.

b Alfa = ,05.

#### **Anexo 4.**

##### ***Prueba HSD Tukey***

##### *Prueba HSD Tukey para eficiencia de cosecha por absorbancia*

<b>Eficiencia Absorbancia 750nm (%)</b>				
HSD Tukey <sup>a,b</sup>				
Métodos de cosecha	N	Subconjunto		
		1	2	3
Sedimentación	9	76,333		
Floculación	9		93,222	
Centrifugación	9			98,222
Sig.		1,000	1,000	1,000

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 9,000.

b. Alfa = ,05.

##### ***Prueba HSD Tukey***

##### *Prueba HSD Tukey para eficiencia de cosecha por conteo celular*

<b>Eficiencia celular (%)</b>				
HSD Tukey <sup>a,b</sup>				
Métodos de cosecha	N	Subconjunto		
		1	2	3
Sedimentación	9	77,44		
Floculación	9		93,66	
Centrifugación	9			99,11
Sig.		1,00	1,00	1,00

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 9,000.

b. Alfa = ,05.

## Anexo 5.

### Resultados obtenidos del análisis de perfil lipídico de C agloeformis por diferentes fotoperíodos



UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
OFERTA DE SERVICIOS Y PRODUCTOS

LABORATORIO DE ALIMENTOS  
INFORME DE RESULTADOS

INF. LAB. ALI- 27892  
ORDEN DE TRABAJO No. 63727

SOLICITADO POR: <sup>3</sup>	AMAGUAY GOMEZ RONNY FABIAN
DIRECCIÓN DEL CLIENTE: <sup>3</sup>	17 DE JULIO 9-131 Y MIRAMONTES/ SAGRARIO/ IBARRA/ IMBABURA
MUESTRA DE: <sup>3</sup>	MICROALGAS
DESCRIPCIÓN: <sup>3</sup>	MICROALGAS MUESTRA 1 CHLAMYDOMONA A (16:8h)
LOTE: <sup>3</sup>	---
FECHA DE ELABORACIÓN: <sup>3</sup>	---
FECHA DE VENCIMIENTO: <sup>3</sup>	---
FECHA DE RECEPCIÓN:	27/07/2021
HORA DE RECEPCIÓN:	11:00
FECHA DE ANÁLISIS:	28/07/2021 AL 04/08/2021
FECHA DE ENTREGA DE RESULTADOS A LA SECRETARÍA:	05/08/2021
CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA	
COLOR:	Característico
OLOR:	Característico
ESTADO:	SÓLIDO
Contenido: 13 g	
OBSERVACIONES:	
Los resultados que constan en el presente informe se refieren a la muestra entregada por el cliente al OSP.	
MUESTREADO POR:	El Cliente

<sup>3</sup>: Datos proporcionados por el cliente y de su responsabilidad.

Dr. Geovany Garófalo  
RESPONSABLE AREA DE ALIMENTOS



1 / 2

R-GO-01-24

Dirección: Francisco Viteri s/n y Gilberto Gatto Sobral- Teléfonos: 2502-262 / 2502-456, ext. 15,18,21,31,33  
Teléfono: 3216740 - E-mail: fcq.osp@uce.edu.ec





**UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**OFERTA DE SERVICIOS Y PRODUCTOS**

**LABORATORIO DE ALIMENTOS**  
**INFORME DE RESULTADOS**

INF. LAB. ALI- 27892  
 ORDEN DE TRABAJO No. 63727

**PERFIL LIPÍDICO**

PARÁMETROS	UNIDAD	RESULTADO	METODO	
Grasa	%	5.25	MAL-03/ AOAC 991.36	
<b>*ACIDOS GRASOS</b>				
Acido Palmítico	C16:0	%	3.03	Cromatografía de Gases
Acido Estearico	C18:0	%	0.21	Cromatografía de Gases
Acido Linoleico (LA)	C18:2n6 cis w6	%	0.36	Cromatografía de Gases
Total ácidos grasos Saturados		%	3.26	Cromatografía de Gases
Total ácidos grasos Insaturados		%	0.36	Cromatografía de Gases
Total ácidos grasos Monoinsaturados		%	0.00	Cromatografía de Gases
Total ácidos grasos Poliinsaturados		%	0.36	Cromatografía de Gases
Total ácidos grasos TRANS		%	0.00	Cromatografía de Gases
Total ácidos grasos omega 3 y 6		%	0.36	Cromatografía de Gases
Total ácidos grasos		%	3.62	Cromatografía de Gases

**COMPUESTOS NO IDENTIFICADOS**

Nº	Tiempo de Retención (min)	Compuesto	AREA (%)	RESULTADO	METODO
1	23.673	NI	18.3	0.96	Cromatografía de Gases
2	24.130	NI	12.8	0.67	Cromatografía de Gases
TOTAL			31.10	1.63	Cromatografía de Gases

**Dr. Geovany Garófalo**  
**RESPONSABLE AREA DE ALIMENTOS**



1 2/2

R-GO-01-24

*Dirección: Francisco Viteri s/n y Gilberto Gatto Sobral- Teléfonos: 2502-262 / 2502-456, ext. 15,18,21,31,33  
 Teléfono: 3216740 - E-mail: fcq.osp@uce.edu.ec*



UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
OFERTA DE SERVICIOS Y PRODUCTOS

LABORATORIO DE ALIMENTOS  
INFORME DE RESULTADOS

INF. LAB. ALI- 27893  
ORDEN DE TRABAJO No. 63727

SOLICITADO POR: <sup>3</sup>	AMAGUAY GOMEZ RONNY FABIAN
DIRECCIÓN DEL CUENTE: <sup>3</sup>	17 DE JULIO 9-131 Y MIRAMONTES/ SAGRARIO/ IBARRA/ IMBABURA
MUESTRA DE: <sup>3</sup>	MICROALGAS
DESCRIPCIÓN: <sup>3</sup>	MICROALGAS MUESTRA 2 CHLAMYDOMONA A (12-12h)
LOTE: <sup>3</sup>	---
FECHA DE ELABORACIÓN: <sup>3</sup>	---
FECHA DE VENCIMIENTO: <sup>3</sup>	---
FECHA DE RECEPCIÓN:	27/07/2021
HORA DE RECEPCIÓN:	11:00
FECHA DE ANÁLISIS:	28/07/2021 AL 04/08/2021
FECHA DE ENTREGA DE RESULTADOS A LA SECRETARIA:	05/08/2021
CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA	
COLOR:	Característico
OLOR:	Característico
ESTADO:	SÓLIDO
Contenido: 13 g	
OBSERVACIONES:	
Los resultados que constan en el presente informe se refieren a la muestra entregada por el cliente al OSP.	
MUESTREADO POR:	El Cliente

<sup>3</sup>: Datos proporcionados por el cliente y de su responsabilidad.

Dr. Geovany Garófalo  
RESPONSABLE AREA DE ALIMENTOS



2 1/2

R-GO-01-24

Dirección: Francisco Viteri s/n y Gilberto Gatto Sobral- Teléfonos: 2502-262 / 2502-456, ext. 15,18,21,31,33  
Teléfono: 3216740 - E-mail: fcq.osp@uce.edu.ec



**UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**OFERTA DE SERVICIOS Y PRODUCTOS**

**LABORATORIO DE ALIMENTOS**  
**INFORME DE RESULTADOS**

INF. LAB. ALI- 27893  
 ORDEN DE TRABAJO No. 63727

**PERFIL LIPÍDICO**

PARÁMETROS	UNIDAD	RESULTADO	METODO
Grasa	%	5.39	MAL-03/ AOAC 991.36
<b>*ACIDOS GRASOS</b>			
Acido Palmítico	C16:0	% 3.86	Cromatografía de Gases
Ácido cis 10-Heptadecanoico	C17:1	% 0.08	Cromatografía de Gases
Acido Estearico	C18:0	% 0.13	Cromatografía de Gases
Acido Linoleico (LA)	C18:2n6 cis ω6	% 0.16	Cromatografía de Gases
Ácido erúico	C22:1n9 ω9	% 0.08	Cromatografía de Gases
Total ácidos grasos Saturados		% 4.00	Cromatografía de Gases
Total ácidos grasos Insaturados		% 0.32	Cromatografía de Gases
Total ácidos grasos Monoinsaturados		% 0.16	Cromatografía de Gases
Total ácidos grasos Poliinsaturados		% 0.16	Cromatografía de Gases
Total ácidos grasos TRANS		% 0.00	Cromatografía de Gases
Total ácidos grasos omega 3 y 6		% 0.16	Cromatografía de Gases
Total ácidos grasos		% 4.32	Cromatografía de Gases

**COMPUESTOS NO IDENTIFICADOS**

Nº	Tiempo de Retención (min)	Compuesto	AREA (%)	RESULTADO	METODO
1	24.142	NI	4.9	0.26	Cromatografía de Gases
2	28.860	NI	3.2	0.17	Cromatografía de Gases
3	33.707	NI	1.4	0.08	Cromatografía de Gases
4	48.540	NI	10.4	0.56	Cromatografía de Gases
TOTAL			19.90	1.07	Cromatografía de Gases

**Dr. Geovany Garófalo**  
**RESPONSABLE AREA DE ALIMENTOS**



2 2/2

R-GO-01-24

*Dirección: Francisco Viteri s/n y Gilberto Gatto Sobral- Teléfonos: 2502-262 / 2502-456, ext. 15,18,21,31,33  
 Teléfono: 3216740 - E-mail: fcq.osp@uce.edu.ec*



UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
OFERTA DE SERVICIOS Y PRODUCTOS

LABORATORIO DE ALIMENTOS  
INFORME DE RESULTADOS

INF. LAB. ALI- 27894  
ORDEN DE TRABAJO No. 63727

SOLICITADO POR: <sup>3</sup>	AMAGUAY GOMEZ RONNY FABIAN
DIRECCIÓN DEL CLIENTE: <sup>3</sup>	17 DE JULIO 9-131 Y MIRAMONTES/ SAGRARIO/ IBARRA/ IMBABURA
MUESTRA DE: <sup>3</sup>	MICROALGAS
DESCRIPCIÓN: <sup>3</sup>	MICROALGAS MUESTRA 3 CHLAMYDOMONA A (24:00h)
LOTE: <sup>3</sup>	---
FECHA DE ELABORACIÓN: <sup>3</sup>	---
FECHA DE VENCIMIENTO: <sup>3</sup>	---
FECHA DE RECEPCIÓN:	27/07/2021
HORA DE RECEPCIÓN:	11:00
FECHA DE ANÁLISIS:	28/07/2021 AL 04/08/2021
FECHA DE ENTREGA DE RESULTADOS A LA SECRETARIA:	05/08/2021
CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA	
COLOR:	Característico
OLOR:	Característico
ESTADO:	SÓLIDO
Contenido: 20 g	
OBSERVACIONES:	
Los resultados que constan en el presente informe se refieren a la muestra entregada por el cliente al OSP.	
MUESTREADO POR:	El Cliente

<sup>3</sup>: Datos proporcionados por el cliente y de su responsabilidad.

Dr. Geovany Garófalo  
RESPONSABLE AREA DE ALIMENTOS



3 1/2

R-GO-01-24

Dirección: Francisco Viteri s/n y Gilberto Gatto Sobral- Teléfonos: 2502-262 / 2502-456, ext. 15,18,21,31,33  
Teléfono: 3216740 - E-mail: [fcq.osp@uce.edu.ec](mailto:fcq.osp@uce.edu.ec)



UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
OFERTA DE SERVICIOS Y PRODUCTOS

LABORATORIO DE ALIMENTOS  
INFORME DE RESULTADOS

INF. LAB. ALI- 27894  
ORDEN DE TRABAJO No. 63727

PERFIL LIPÍDICO

PARÁMETROS	UNIDAD	RESULTADO	METODO	
Grasa	%	6.01	MAL-03/ AOAC 991.36	
<b>* ACIDOS GRASOS</b>				
Ácido Palmítico	C16:0	%	4.32	Cromatografía de Gases
Ácido Esteárico	C18:0	%	0.26	Cromatografía de Gases
Ácido Linoléico (LA)	C18:2n6 cis w6	%	0.22	Cromatografía de Gases
Total ácidos grasos Saturados		%	4.59	Cromatografía de Gases
Total ácidos grasos Insaturados		%	0.22	Cromatografía de Gases
Total ácidos grasos Monoinsaturados		%	0.00	Cromatografía de Gases
Total ácidos grasos Poliinsaturados		%	0.22	Cromatografía de Gases
Total ácidos grasos TRANS		%	0.00	Cromatografía de Gases
Total ácidos grasos omega 3 y 6		%	0.22	Cromatografía de Gases
Total ácidos grasos		%	4.81	Cromatografía de Gases

COMPUESTOS NO IDENTIFICADOS

Nº	Tiempo de Retención (min)	Compuesto	AREA (%)	RESULTADO	METODO
1	24.158	NI	6.0	0.36	Cromatografía de Gases
2	26.687	NI	2.3	0.14	Cromatografía de Gases
3	48.553	NI	11.8	0.71	Cromatografía de Gases
TOTAL			20.10	1.21	Cromatografía de Gases

Dr. Geovany Garófalo  
RESPONSABLE AREA DE ALIMENTOS



3 2/2

R-GO-01-24

Dirección: Francisco Viteri s/n y Gilberto Gatto Sobral- Teléfonos: 2502-262 / 2502-456, ext. 15,18,21,31,33  
Teléfono: 3216740 - E-mail: fq.osp@uce.edu.ec