

Estudio comparativo de dos medios de cultivo de la microalga *Nannochloropsis oculata*

Angélica Evelin Delgadillo-López ^{1,*}, Elizabeth González-Escamilla ¹ y Javier Guipzot-Ibarra ²

¹ Ingeniería en Energía, Universidad Politécnica Metropolitana de Hidalgo, Tolcayuca, Hidalgo, México

² Ingeniería en Energía, Universidad Politécnica de Monclova-Frontera, Frontera, Coahuila de Zaragoza, México

* Autor de correspondencia: adelgadillo@upmh.edu.mx

Energías Renovables (Biomasa). Ponencia Virtual.

Recibido: 14 de agosto de 2023

Aceptado: 5 de octubre de 2023

Publicado: 23 de noviembre de 2023

Resumen: Se presenta el estudio comparativo entre dos medios de cultivo de la microalga *Nannochloropsis oculata*, con el objetivo de determinar cuál es la alternativa más viable para el mantenimiento de cepas y la generación de inóculos para volúmenes mayores de producción. Se encontró que el uso del medio Yashima, presenta mejores resultados en cuanto a la tasa de crecimiento en la fase exponencial, a la capacidad de carga y al máximo rendimiento, en comparación con el medio de cultivo Guillard F/2, lo que indica que, el uso de fertilizantes agrícolas puede ser una opción factible y económica para la generación de biomasa, misma que podría ser aprovechada, posteriormente, en la producción de bioenergéticos.

Palabras clave: *Nannochloropsis oculata*; microalga; cultivo; Guillard F/2; Yashima

Cultivation of microalgae *Nannochloropsis oculata* for the production of energy-valuable compounds

Abstract: The comparative study between two culture media of the microalga *Nannochloropsis oculata* is presented, with the objective of determining which is the most viable alternative for the maintenance of strains and the generation of inoculums for larger production volumes. It was found that the use of the Yashima medium presents better results in terms of the growth rate in the exponential phase, the load capacity and the maximum yield, in comparison with the Guillard F/2 culture medium, which indicates that, the use of agricultural fertilizers can be a feasible and economical option for the generation of biomass and its subsequent transformation into biodiesel.

Keywords: *Nannochloropsis oculata*; microalgae; cultivation; Guillard F/2; Yashima

Introducción

De acuerdo a Jiménez-Escobedo & Castillo-Calderón (2021), la generación de energía es un gran desafío para el crecimiento económico, ya que proviene principalmente de combustibles fósiles de naturaleza agotable, situación preocupante por el creciente consumo y precios elevados. Por lo que, la búsqueda de combustibles alternativos y de bajo impacto ambiental es cada vez más importante para el desarrollo regional, estatal y nacional, generando interés en la utilización de energías renovables como los biocombustibles (Acosta & Chaparro-Giraldo, 2009).

El uso de microalgas para la obtención de biodiésel representa una técnica viable gracias a su alto contenido lipídico y a su perfil de ácidos grasos, aunque hace falta el desarrollo de tecnologías que disminuyan el costo de producción (Castillo *et al.*, 2017).

Hernández-Pérez & Labbé (2014), indican que la elección del tipo de sistema de cultivo es importante, y debe realizarse en base a factores biológicos, técnicos, ambientales y económicos, dentro de los que se encuentran:

- a) Luz. La intensidad lumínica es uno de los principales parámetros a considerar en un cultivo (Contreras-Flores *et al.*, 2003). En ausencia de limitación por nutrientes, la fotosíntesis se incrementa con el aumento de la intensidad lumínica, hasta alcanzar la máxima tasa de crecimiento específica para cada especie en el punto de saturación por luz (Park *et al.*, 2011). Pasado este punto, se alcanza el punto de fotoinhibición, con resultados perjudiciales para la misma célula e incluso la muerte, implicando pérdida de eficiencia fotosintética y productividad del cultivo (Contreras-Flores *et al.*, 2003; Richmond, 2004; Martínez, 2008; Park *et al.*, 2011).

Los cultivos microalgales exteriores suelen sufrir fotoinhibición en las principales horas del día debido a la alta intensidad lumínica (Martínez, 2008). Bajo ciertas condiciones, los cultivos con mayor densidad celular (> 3 g/L) son capaces de utilizar la luz incidente con mayor eficiencia en comparación con cultivos convencionales diluidos (Contreras-Flores *et al.*, 2003). Esto se debe al autosombreado, donde las células más cercanas a la superficie dan sombra a las capas inferiores, con células más alejadas de la superficie (Contreras-Flores *et al.*, 2003; Markou & Georgakakis 2011; Park *et al.*, 2011). Un sistema de mezcla eficiente permitirá un acceso periódico de todas las células a la luz, de lo contrario, será perjudicial puesto que la intensidad lumínica decrece con el aumento de la turbidez (Contreras-Flores *et al.*, 2003; Markou & Georgakakis, 2011). En sistemas HRAP (High Rate Algal Ponds), el mecanismo de paletas provee una eficiente mezcla vertical permitiendo una exposición intermitente de las células a la luz (Park *et al.*, 2011).

- b) Temperatura. La producción algal aumenta proporcionalmente con la temperatura hasta alcanzar la temperatura óptima de cada especie. Por encima de esta, aumenta la respiración y la fotorrespiración reduce la productividad global. La temperatura óptima varía entre las especies, pero en general está entre 28° y 35°C (Park *et al.*, 2011). En un sistema de cultivo cerrado, la temperatura se puede controlar por varios mecanismos, tales como rociadores de agua, inmersión del colector solar en piscinas, reactor dentro de un invernadero, entre otros (Martínez, 2008). Por el contrario, en un sistema de cultivo abierto es muy difícil de controlar, aunque se pueden realizar ciertas acciones simples para disminuir el efecto, como cubrir los estanques con plásticos transparentes (Borowitzka, 1999; Martínez, 2008, Park *et al.*, 2011).
- c) pH y CO_2 . El pH (potencial de Hidrógeno) del cultivo está influenciado por varios factores como la productividad algal, la respiración, la alcalinidad y composición iónica del medio de cultivo, la actividad microbiana autotrófica y heterotrófica y la eficiencia del sistema de adición de CO_2 (dióxido de carbono) (Martínez, 2008; Park *et al.*, 2011).

Como en los otros parámetros, cada especie necesita un rango determinado de pH que permita un crecimiento óptimo (Martínez, 2008), siendo $\text{pH}=8$ el más indicado para especies dulceacuícolas (Park *et al.*, 2011). Por encima o debajo de éste, presentan un descenso en la productividad, que no solo afecta el crecimiento algal, sino también la capacidad de remover el nitrógeno en sistemas de tratamientos de aguas (Park *et al.*, 2011).

El pH puede controlarse con un sistema automatizado de inyección de CO_2 , o incluso, con adición de ácido o base permitiendo, además, suministrar CO_2 necesario para cultivos de alta productividad (Berenguel *et al.*, 2004; Martínez, 2008; Sialve *et al.*, 2009). Las necesidades de CO_2 pueden ser considerables, por lo que los costos asociados pueden ser también elevados para un cultivo comercial (Sialve *et al.*, 2009; Mendoza *et al.*, 2011; Acién *et al.*, 2012), de ahí la importancia de buscar una forma económica de mitigar estos costos (Abatzoglou & Boivin, 2009; Acién *et al.*, 2012). Así, se han realizado variados estudios sobre las capacidades de diferentes microalgas para la fijación de CO_2 desde diversas fuentes gaseosas (Mann *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010, Ho *et al.*, 2011), considerándose altamente eficientes en este proceso (Ho *et al.*, 2012). De esta manera, se ha sugerido la creación de cultivos comerciales para trabajar en conjunto con fuentes generadoras de CO_2 , como cogeneradores (Ho *et al.*, 2011, 2012; Infante *et al.*, 2012). También han sido utilizadas en la depuración de biogás a partir de digestión anaerobia, limpiando el gas resultante de CO_2 y H_2S (sulfuro de hidrógeno) y elevando su capacidad calorífica (Mann *et al.*, 2009; Sialve *et al.*, 2009; Doušková *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2011; Rawat *et al.*, 2011; Kao *et al.*, 2012), aunque la literatura sobre la técnica aún es escasa (Abatzoglou & Boivin, 2009).

La adición de CO_2 ha demostrado mejorar la productividad en HRAPs a escala experimental en tratamiento de aguas residuales, aumentando la productividad incluso a más del doble (Mann *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2011). Se trata de hecho, de una práctica estándar en todos los sistemas para producción de algas comerciales (Martínez, 2008; Mendoza *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2011).

- d) Nutrientes. El nitrógeno es el nutriente más importante para las microalgas (después del carbono) y se incorpora como nitrato (NO_3^-) o como amonio (NH_4^+) (Grobelaar, 2004; Martínez, 2008; Abdel-Raouf *et al.*, 2012). Es también un factor crítico para regular el contenido de lípidos de las microalgas (Park *et al.*, 2011). Típicamente, las microalgas tienen un contenido lipídico aproximadamente del 20%, pero cuando el nitrógeno

se convierte en el factor limitante del crecimiento, la acumulación de los niveles de lípidos aumenta en más de 40% (Park *et al.*, 2011; Ho *et al.*, 2012; Ho *et al.*, 2013). Sin embargo, usando la limitación de nitrógeno para estimular la acumulación de lípidos en las células de algas, a menudo reduce la producción de algas, lo que sugiere que las dos condiciones, alto contenido en lípidos y alta productividad, pueden ser mutuamente excluyentes (Park *et al.*, 2011).

El fósforo es fundamental en muchos procesos celulares, tales como la formación de ácidos nucleicos y transferencia de energía (Grobbelaar, 2004). Aunque el contenido en fósforo de las microalgas es menor al 1%, su deficiencia en el medio de cultivo es una de las mayores limitaciones al crecimiento. En los medios de cultivo suele incorporarse en forma de fosfato monoácido (HPO_4^{2-}) o fosfato diácido (H_2PO_4^-) (Grobbelaar, 2004; Martínez, 2008).

Las microalgas son organismos fotosintéticos de elevado valor biotecnológico debido a que presentan gran variedad de aplicaciones como: la producción de proteínas para la alimentación animal y humana (Kim, 2015; Kiron *et al.*, 2012), su aprovechamiento para la generación de biocombustibles como el biodiésel y el bioetanol (Plata *et al.*, 2009), poseen capacidad biorremediante de aguas residuales (Matamoros *et al.*, 2016) y acumulan metabolitos de interés en diferentes áreas empresariales (farmacéutica, cosmética, entre otras), tales como los ácidos grasos poliinsaturados (por ejemplo, el ácido oleico, linoleico, linolénico, araquidónico (ARA), eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA), así como diferentes pigmentos, tales como las clorofilas y carotenoides (Orosa *et al.*, 2005; Ramírez, 2013; Córdoba-Castro *et al.*, 2015).

En particular, el género *Nannochloropsis* pertenece al reino Chromista y al filo Heterokontophyta, se caracteriza por ser una microalga unicelular, con formas subsféricas o cilíndricas que va de los 2 a los 4 μm , con cloroplastos que van del color amarillo al verde (Guiry *et al.*, 2013). Contiene clorofila a y otros pigmentos como astaxantina, zeaxantina y canthaxantina. Este género de microalgas agrupa a las especies que contienen la mayor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, de gran importancia en la nutrición de animales marinos, especialmente en el crecimiento y desarrollo de larvas de peces, moluscos y crustáceos (Sánchez-Torres *et al.*, 2008).

La microalga *Nannochloropsis oculata* se ha utilizado ampliamente como alimento para el rotífero *Brachionus plicatilis* Mueller, el cual transfiere eficientemente los ácidos grasos poliinsaturados algales a las larvas de peces marinos (Sánchez-Torres *et al.*, 2008). Además, es reconocida por su valor nutricional como una excelente fuente de proteínas, carbohidratos, lípidos y vitaminas. Esta especie contiene cantidades elevadas de ácidos: EPA, ARA y DHA. Adicionalmente, por su alto contenido de ácido palmítico (C16:0) y palmitoleico (C16:1n-7), es una muy buena fuente para producir biodiésel (Martínez-Macías *et al.*, 2017), por lo que, el objetivo del presente trabajo fue determinar las condiciones de cultivo de la cepa *Nannochloropsis oculata* para implementar un sistema en lote, con vistas a su aprovechamiento para la producción de bioenergéticos.

Materiales y Métodos

Los cultivos se llevaron a cabo por triplicado en sistemas por lote alimentado, en matraces Erlenmeyer de 500 mL, por un periodo de 21 días, cuyas condiciones se describen a continuación:

- 1) Temperatura: $22\pm 1^\circ\text{C}$
- 2) pH: 7.0 a 8.5, ajustado a través de la adición de CO_2
- 3) Aireación y agitación: se realizó una aireación leve, no enriquecida con CO_2 , una vez al día, durante la fase inicial de crecimiento (2 días después de la inoculación), con ayuda de una bomba provista con un filtro de fibra. En el extremo de la manguera empleada para este fin, se implementó un filtro de algodón y carbón activado, para disminuir la carga bacteriana y la posibilidad de contaminación por partículas ajenas al cultivo. Cuando aumentó la concentración celular, se incrementó el flujo de aire a 17 L/h, para asegurar la suspensión de la microalga en el medio de cultivo, una dispersión efectiva de los nutrientes y la mejora de la disponibilidad de luz para las células.
- 4) Iluminación: artificial provista por lámparas fluorescentes tipo “cool-white” de 40 W, las 24 horas del día.

Se realizaron dos ensayos diferentes, cuyos medios de cultivos fueron:

Ensayo 1: Se empleó una solución salina al 20% (preparada con agua destilada), enriquecida con solución Guillard F/2, misma que se filtró y esterilizó por autoclavado a 120°C y 15 lb/in² de presión durante 15 minutos. Composición final por litro: 75 mg/L KNO₃, 5.65 mg/L NaH₂PO₄·2H₂O, 4.360 mg/L EDTA·Na₂, 3.150 mg/L FeCl₃·6H₂O, 0.010 mg/L CuSO₄·5H₂O, 0.022 mg/L ZnSO₄·7H₂O, 0.010 mg/L CoCl₂·6H₂O, 0.180 mg/L MnCl₂·4H₂O, 0.006 mg/L Na₂MoO₄·2H₂O, 2 µg/L cianocobalamina cristalina (B12), 0.100 mg/L tiamina (B1) y 0.001 mg/L biotina.

Ensayo 2: Se utilizó una solución salina al 20% (preparada con agua destilada), enriquecida con solución Yashima, la cual fue filtrada y esterilizada por autoclavado. Composición final por litro: 100 mg sulfato de amonio para agricultura 21%, 15 mg superfosfato de calcio para la agricultura 21%, 15 mg urea para la agricultura 21%, 30-50 µg Clewat 32. La solución Clewat 32 se usó como fuente de micro-nutrientes y está compuesta por: 3.85 g/L FeCl₂, 1.66 g/L ZnCl₂, 7.75 g/L MnCl₂, 0.17 g/L CoCl₂, 0.07 g/L CuSO₄, 6.32 g/L (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 24.70 g/L H₃BO₃, 0.05 g/L EDTA·Na₂.

Al finalizar, la biomasa se separó por centrifugación. Se determinó la densidad celular (cel/mL), con una cámara de Neubauer. La productividad de la biomasa (g/L/d), se estimó mediante la cuantificación de la concentración de clorofila a (mg/mL).

Resultados y Discusión

Las microalgas se reproducen principalmente por división celular, presentando un crecimiento rápido cuando se inoculan en un medio de cultivo no limitante y se mantienen en condiciones ambientales adecuadas (Arredondo & Voltolina, 2007).

En general, las condiciones ambientales cambian con la edad del cultivo, por lo cual también se modifica la velocidad de crecimiento poblacional. Esto permite reconocer diferentes fases de crecimiento, que sirven para describir la forma en la cual cambia la concentración celular o de biomasa. En una curva de crecimiento, como la que se presenta en la Figura 1, se pueden reconocer las diferentes fases (Arredondo & Voltolina, 2007).

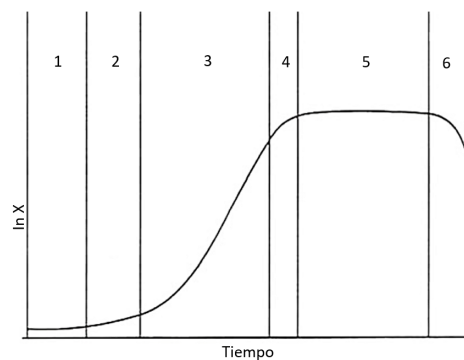


Figura 1. Curva de crecimiento típica, en la cual se muestran las diferentes fases, marcadas como: 1-fase de adaptación; 2-fase de aceleramiento; 3-fase exponencial; 4-fase de desaceleración del crecimiento; 5-fase estacionaria; y 6-fase de muerte (Fuente: Arredondo & Voltolina, 2007).

La duración de la fase de adaptación depende del estado de las células que conforman el inóculo, de las cuales también depende el éxito del cultivo, la tasa de crecimiento poblacional es cero. En la fase de aceleramiento se incrementa la síntesis de componentes celulares estructurales, que lleva al incremento del peso individual y a la división celular, por lo que la tasa de crecimiento aumenta. En la fase exponencial, la velocidad de crecimiento o de multiplicación celular es la máxima y, ante la ausencia de factores limitantes, la tasa de crecimiento se mantiene constante. En la fase de desaceleración se hace evidente el efecto de alguno de los factores que limitan el crecimiento y en consecuencia el número de divisiones celulares disminuye, por lo que la tasa de crecimiento decrece; en este punto, la composición bioquímica de las microalgas cambia con respecto a la fase de aceleración, es decir, decrece la síntesis de proteínas y se incrementa la síntesis de productos de reserva como carbohidratos y lípidos. Durante la fase estacionaria, las condiciones del cultivo son limitantes, las tasas de crecimiento y de mortalidad se equilibran y el número de células, peso seco total y orgánico, así como la composición bioquímica, permanecen relativamente constantes. En la última

fase, la fase de muerte, la limitación de nutrientes, sumada al incremento de desechos metabólicos y a la proliferación de bacterias, ocasiona la muerte o lisis celular, por lo que la mortalidad es superior al crecimiento, la concentración celular disminuye, se registra una disminución de la biomasa y la tasa de crecimiento es negativa (Arredondo & Voltolina, 2007).

Con el objetivo de estimar el efecto de los medios de cultivo empleados, en la dinámica del crecimiento poblacional, se calculó la relación N:P para ambos ensayos, considerando la composición química de los medios Guillard F/2 y Yashima (Tablas 1 y 2). Se encontraron razones de 20:1 para ambos casos, las cuales se encuentran dentro del rango óptimo (16-24:1) para la especie de microalga estudiada (Corsini & Karydis, 1990; Darley, 1987).

Tabla 1. Composición molar de los macronutrientes en cada uno de los ensayos.

Ensayo	N(mM)	P(mM)	K(mM)	N:P
Guillard F/2	0.80	0.04	0.74	20:1
Yashima	2.00	0.10	-	20:1

Tabla 2. Composición química de los medios utilizados.

	Guillard F/2	Yashima
Macronutrientes		
N (mg/L)	11.2	28.00
P (mg/L)	1.24	3.10
K (mg/L)	28.86	-
Ca (mg/L)	-	4.02
Micronutrientes		
Fe (mg/L)	0.70	0.07
Mn (mg/L)	0.48	0.17
Zn (mg/L)	0.004	0.05
Cu (mg/L)	0.003	0.002
B (mg/L)	-	0.24
Na (mg/L)	1.38	-
Mg (mg/L)	-	-

En el medio de Yashima, el nitrógeno se encuentra en forma amoniacal y de urea; mientras que en el de Guillard F/2 se encuentra en forma de nitrato, principalmente.

Se determinó la tasa de crecimiento de la fase exponencial, empleando la Ecuación 1, donde $b = \mu_{exp}$ es la tasa de crecimiento exponencial y $a = \ln N(0)$ (Sánchez-Torres *et al.*, 2008).

$$\ln N(t) = a + bt \quad (1)$$

El crecimiento de las microalgas se modeló usando la Ecuación 2, en tiempo continuo (Roughgarden, 1998), donde $N(t)$ es la densidad celular en el tiempo t (células/mL), μ_{max} es la tasa máxima de crecimiento (1/día) y K es la capacidad de carga del cultivo (células/mL). La estimación de los parámetros μ_{max} y K para cada uno de los tratamientos se realizó mediante optimización numérica.

$$N(t) = \frac{K}{1 - \left(1 - \frac{K}{N_0}\right) e^{-\mu_{max}t}} \quad (2)$$

La Tabla 3, resume los parámetros estimados para ambos ensayos.

Tabla 3. Parámetros estimados para el cultivo de *Nannochloropsis oculata* (límite de confianza al 95 %).

Ensayo	μ_{exp} (1/día)	μ_{max} (1/día)	K (10^5 células/mL)	MR (g/L)
Guillard F/2	0.91±0.12	0.89±0.05	244.72±21.14	1.32±0.39
Yashima	0.97±0.11	1.16±0.13	761.59±97.69	3.90±0.31

Se encontró que la mayor tasa de crecimiento en la fase exponencial fue obtenida en el ensayo con Yashima, esto derivado de que el amonio es consumido preferentemente, debido al menor costo energético que implica su consumo (Wheeler, 1983; Thompson *et al.*, 1989; Dortch *et al.*, 1991).

Existe evidencia de que en muchas microalgas el consumo de nitrato es reducido e incluso inhibido en presencia de amonio, debido a que las enzimas requeridas para la reducción del nitrato son desactivadas por el proceso de asimilación del amonio (McCarthy, 1981; Syrett, 1981).

En relación a la capacidad de carga, en el caso del ensayo con Yashima, este resultado fue superior, a pesar de que el medio Guillard F/2, tiene una buena relación N:P y está diseñado para satisfacer todos los requerimientos de la microalga, sin embargo, las concentraciones de dichos macronutrientes están por debajo que la del medio Yashima, esto ocasiona que, a largo plazo, no pueda soportar densidades celulares muy altas.

El máximo rendimiento (MR) del cultivo (Tabla 3), que representa la máxima cantidad de biomasa que puede extraerse por unidad de tiempo en estado estacionario, también se obtuvo para el ensayo con Yashima, mismo que se estimó mediante la Ecuación 3.

$$MR = \frac{\mu_{exp}K}{4} \quad (3)$$

Conclusiones

El crecimiento de *Nannochloropsis oculata* en los ensayos, comprueba que el uso de fertilizantes agrícolas (medio de cultivo Yashima) es una alternativa viable para el mantenimiento de cepas y la generación de inóculos para volúmenes mayores de producción, mismos que, por el tipo de ácidos grasos presentes en ellos, pueden ser utilizados con fines energéticos para la producción de biodiésel, debido a que la densidad celular obtenida es superior con respecto a la de Guillard F/2.

Agradecimientos y financiamiento: al Consejo de Ciencia, Tecnología e Innovación de Hidalgo (CITNOVA), a la Universidad Politécnica Metropolitana de Hidalgo y a la Universidad Politécnica de Monclova-Frontera, por el financiamiento para el desarrollo del proyecto.

Bibliografía

- Abatzoglou, N. & Boivin, S. (2009). A review of biogas purification processes. *Biofuels, Bioproducts & Biorefining*, 3, 42-71, <https://doi.org/10.1002/bbb.117>
- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A. & Ibraheem, I. B. M. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19, 257-275, <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005>
- Ación, F. G., Fernández, J. M., Magán, J. J. & Molina, E. (2012). Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. *Biotechnology Advances*, 30, 1344- 1353, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.02.005>
- Acosta, O. & Chaparro-Giraldo, A. (2009). Biocombustibles, Seguridad Alimentaria y Cultivos Transgénicos. *Revista de Salud Pública*, 11(2), 290-300, <https://www.redalyc.org/pdf/422/42217861013.pdf>
- Arredondo-Vega, B. O. & Voltolina, D. (2007). Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. CIBNOR. 81 pp.
- Berenguel, M., Rodríguez, F., Ación, F. G. & García, J. L. (2004). Model predictive control of pH in tubular photobioreactors. *Journal of Process Control*, 14, 377-387, <https://doi.org/10.1016/j.jprocont.2003.07.001>

- Borowitzka, M. A. (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*, 70, 313-332, [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00083-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00083-8)
- Castillo, O. S., Torres-Badajoz, S. G., Núñez-Colín, C. A., Peña-Caballero, V., Herrera-Méndez, C. H. & Rodríguez-Núñez, J. R. (2017). Producción de biodiésel a partir de microalgas: avances y perspectivas biotecnológicas. *Hidrobiológica*, 27(3), 337-352, https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-88972017000300337#B4
- Contreras-Flores, C., Peña-Castro, J., Flores-Cotera, L. & Cañizares-Villanueva, R. (2003). Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia*, 28(8), 450-456, http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442003000800004
- Córdoba-Castro, N. M., Acero-Reyes, N. L., Duque-Buitrago, L. F., Jiménez-Aguilar, L. J. & Serna-Jiménez, J. A. (2015). Obtención y caracterización de astaxantina de la microalga *Haematococcus pluvialis*. *UGCiencia*, 21, 73-82, <https://doi.org/10.18634/ugcj.21v.1i.426>
- Corsini, M. & Karydis, M. (1990). An algal medium based on fertilizers and its evaluation in mariculture. *Journal of Applied Phycology*, 2, 333-339, <https://doi.org/10.1007/BF02180923>
- Darley, W. (1987). *Biología de las Algas. Enfoque Fisiológico*. México, Editorial Limusa. 236 p.
- Dortch, Q., Clayton, J. R., Thoresen, S. S. & Ahmed, S. I. (1984). Species differences in accumulation of nitrogen pools in phytoplankton. *Mar. Biol.*, 81, 237-250, <https://doi.org/10.1007/BF00393218>
- Doušková, I., Kaštánek, F., Maléterová, Y., Kaštánek, P., Doucha, J. & Zachleder, V. (2010). Utilization of distillery stillage for energy generation and concurrent production of valuable microalgal biomass in the sequence: Biogas generation- microalgae-products. *Energy Conversion and Management*, 51, 606-611.
- Grobbelaar, J. U. (2004). Algal nutrition: mineral nutrition. In: Richmond A (ed). *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science, Iowa. 97-115.
- Guiry, M. D. (2013). *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. http://www.algaebase.org/search/genus/detail?genus_id=44568.
- Hernández-Pérez, A. & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de biología marina y oceanografía*, 49(2), 157-173, <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>
- Ho, S-H, Chen, C-Y & Chang, J-S. (2012). Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource Technology*, 113, 244-252, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.133>
- Ho, S-H, Chen, C-Y, Lee, D-J & Chang, J-S. (2011). Perspectives on microalgal CO₂-emission mitigation systems - A review. *Biotechnology Advances*, 29, 189-198, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.11.001>
- Ho, S-H, Huang, S-W, Chen, C-Y, Hasunuma, T, Kondo, A, Chang, J-S. (2013). Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E. *Bioresource Technology*, 135, 157-165, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.100>
- Infante, C., Angulo, E., Zárate, A., Florez, J. Z., Barrios, F. & Zapata, C. (2012). Propagación de la microalga *Chlorella* sp. En cultivo por lote: cinética del crecimiento celular. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 3(2), 159-164, <https://www.redalyc.org/pdf/3236/323627686016.pdf>
- Jiménez-Escobedo, M. & Castillo-Calderón, A. (2021). Biomasa microalgal con alto potencial para la producción de biocombustibles. *Scientia Agropecuaria*, 12(2), 265-282, <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.030>
- Kao, C-Y, Chiu, S-Y, Huang, T-T, Dai L., Hsu, L-K & Lin, C-S. (2012). Ability of a mutant strain of the microalga *Chlorella* sp. to capture carbon dioxide for biogas upgrading. *Applied Energy*, 93, 176-183, <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.12.082>
- Kim, S. K. (2015). *Handbook of marine microalgae: Biotechnology Advances*. Elsevier Inc.
- Kiron, V., Phromkunthong, W., Huntley, M., Archibald, I. & Scheemaker, G. D. (2012). Marine microalgae from biorefinery as a potential feed protein source for Atlantic salmon, common carp and whiteleg shrimp. *Aquaculture Nutrition*, 18, 521-531, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2011.00923.x>
- Mann, G., Schlegel, M., Schumann, R. & Sakalauskas, A. (2009). Biogas-conditioning with microalgae. *Agronomy Research*, 7(1), 33-38, <https://agronomy.emu.ee/vol071/p7104.pdf>
- Markou, G. & Georgakakis, D. (2011). Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Applied Energy*, 88, 3389-3401, <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.042>
- Martínez, L. (2008). Eliminación de CO₂ con microalgas autóctonas. Tesis Doctoral, Instituto de Recursos Naturales, Universidad de León, León, 226 pp.
- Martínez-Macías, M. R., Sánchez-Duarte, R. G., Meza-Escalante, E. R., Ulloa-Mercado, R. G. & Saldívar-Cabrales, J. (2017). Síntesis de lípidos de la microalga *Nannochloropsis oculata* para su uso potencial en la producción de biodiésel. *Rev. Int. Contam. Ambie*, 33, 85-91, <https://www.revistascca.unam.mx/rica/index.php/rica/article/view/RICA.2017.33.esp02.08/46690>
- Matamoras, V., Uggetti, E., García, J. & Bayona, J. M. (2016). Assessment of the mechanisms involved in the removal of emerging contaminants by microalgae from wastewater: a laboratory scale study. *Journal of Hazardous Materials*, 301, 197-205, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.08.050>
- McCarthy, J. J. (1981). The kinetics of nutrient utilization. In: T. Platt (ed.), *Physiological Bases of Phytoplankton Ecology*. Can. Bull. Fish. Aquat. Sci., 210: 211-233.
- Mendoza, H., De la Jara, A. & Portillo, E. (2011). Planta piloto de cultivo de microalgas: Desarrollo potencial de nuevas actividades económicas asociadas a la biotecnología en Canarias. Instituto Tecnológico de Canarias, Santa Cruz de Tenerife. 60 pp.
- Orosa, M., Franqueira, D., Cid, A. & Abalde, J. (2005). Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, 96(3), 373-378, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.04.006>
- Park, J., Craggs, R. & Shilton, A. (2011). Recycling algae to improve species control and harvest efficiency from a high rate algal pond. *Water Research*, 45, 6637-6649, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.09.042>
- Plata, V., Kafarov, V. & Moreno, N. (2009). Desarrollo de una metodología de transesterificación de aceite en la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas. *Prospect*, 7(2), 35-41, <https://www.redalyc.org/pdf/4962/496250976005.pdf>

- Ramírez, D. M. (2013). Evaluación del crecimiento y producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis* en un fotobiorreactor tipo airlift. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Química y Ambiental. Bogotá, Colombia.
- Rawat, I., Ranjith-Kumar, R., Mutanda, T. & Bux, F. (2011). Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, 88, 3411-3424, <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.11.025>
- Richmond, A. (2004). Biological principles of mass cultivation. Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology, 125-177.
- Roughgarden, J. (1998). Primer of ecological theory. New Jersey, EUA. Editorial Prentice-Hall. 456 p.
- Sánchez-Torres, H., Juscamaita-Morales, J., Vargas-Cárdenas, J. & Oliveros-Ramos, R. (2008). Producción de la microalga *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd en medios enriquecidos con ensilado biológico de pescado. *Ecología Aplicada*, 7(1-2), 149-158, http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-22162008000100018
- Sialve, B., Bernet, N. & Bernard, O. (2009). Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology Advances*, 27(4), 409-416, <https://inria.hal.science/hal-00854465/document>
- Syrett, P.J. (1981). Nitrogen metabolism of microalgae. In: T. Platt (ed.), *Physiological Bases of Phytoplankton Ecology*. Can. Bull. Fish. Aquat. Sci., 210: 182-204.
- Thompson, P. A., Levasseur, E. L. & Harrison, P. J. (1989). Light-limited growth on ammonium vs. nitrate: What is the advantage for marine phytoplankton? *Limnol. Oceanogr.*, 34(6), 1014-1024, <https://doi.org/10.4319/lo.1989.34.6.1014>
- Wang, L., Li, Y., Chen, P., Min, M., Chen, Y., Zhu, J. & Ruan, R. R. (2010). Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella* sp. *Bioresource Technology*, 101, 2623-2628, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.062>
- Wheeler, P.A. (1983). Phytoplankton nitrogen metabolism. E.J. Carpenter and D.G. Capone (eds.), *Nitrogen in the Marine Environment*. Academic Press, New York, pp. 309-346.