

Artículo original

## Influencia del nitrógeno en el crecimiento de *Ankistrodesmus* sp. (alga verde)

[Influence of nitrogen on the growth of *Ankistrodesmus* sp. (green algae)]

Kosseth Marianella Bardales Grández<sup>\*1</sup>, Frank Romel León Vargas<sup>1</sup>, Maritza Grández Ruiz<sup>1</sup>, Cleto Jara Herrera<sup>2</sup>

1. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. Facultad de Ingeniería Química. Av. Grau 1072, Iquitos, Loreto, Perú. Correos electrónicos: koma2326@hotmail.com (K. M. Bardales \* Autora para correspondencia), frarolevar@hotmail.com (F. R. León), maritza.grandez@hotmail.com (M. Grández).

2. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Av. Grau 1072, Iquitos, Perú. Correo electrónico: cletotojara@gmail.com (C. Jara).

### Resumen

---

Conocer el comportamiento de la fisiología celular de las microalgas es importante porque el crecimiento y composición bioquímica de las mismas puede estar influenciada por la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo. Se describió la influencia de nitrógeno en el perfil de crecimiento de *Ankistrodesmus* sp., que se ha muestreado en la cuenca del río Itaya, Loreto (Amazonía peruana), fue cultivada en medio BG-11 con y sin nitrógeno a pH 7,5 bajo condiciones de aireación, con fotoperiodo de 12 horas con luz y 12 horas sin luz, a 25 °C, con una intensidad de luz de 100  $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , por triplicado en diecinueve días; se registraron lecturas iniciales e intercaladas durante el tiempo de evaluación con un espectrofotómetro UV/visible Nanodrop. Los resultados indicaron que no existió diferencias estadísticas significativas entre el grupo control y el tratamiento con un p valor de 0,203 y un 95% de confianza, según la prueba t-student, debido a que el registro de crecimiento de densidad óptica fue similar entre el control y tratamiento. Por lo tanto, es necesario investigar los efectos de los demás parámetros que afectan el cultivo y por ende el crecimiento de esta microalga para establecer condiciones óptimas de crecimiento para esta especie.

**Palabras clave:** Biomasa, Densidad óptica, Microalga, Selenastraceae.

### Abstract

Knowing the behavior of the cellular physiology of microalgae is important because their growth and biochemical composition can be influenced by the concentration of nitrogen in the culture medium. We have described the influence of nitrogen on the growth profile of *Ankistrodesmus* sp. This Amazonian microalgal species was cultivated in BG-11 medium with and without nitrogen at pH 7,5 under aerated conditions. The photoperiod used was 12 hours on and 12 hours off at 25 ° C, with a light intensity of 100  $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  and tripled in nineteen days; Initial and interspersed readings were recorded during the evaluation time with a Nanodrop UV / visible spectrophotometer. The results indicated according to the t-student test that there were no statistically significant differences between the control group and the treatment with a p value of 0,203 and 95% confidence, because the optical density growth record was similar between the control and treatment. Therefore, it is necessary to investigate the effects of the other parameters that affect the culture and thus the growth of this microalgae to establish optimal growth conditions for this species.

**Keywords:** Biomass, Microalgae, Optical density, Selenastraceae.

## INTRODUCCIÓN

Las microalgas son principalmente organismos acuáticos, microscópicos, fotosintéticos, capaces de utilizar nutrientes como el dióxido de carbono, el agua y la energía solar para producir biomasa, son liberadores de oxígeno con una célula simple que no tiene raíces, tallos u hojas, crecen rápidamente y pueden duplicar su biomasa dentro de las 24 horas. En los sistemas acuáticos naturales, las microalgas actúan como pequeños dispositivos de aireación que producen oxígeno para otras bacterias y sirven como sumideros de dióxido de carbono porque fijan este gas (Jia y Yuan, 2016). Las microalgas requieren para su crecimiento agua, luz, dióxido de carbono y sales minerales como nitrógeno, fósforo, potasio entre otros, por ello el medio de cultivo es una disolución acuosa que transporta los nutrientes que necesitan las microalgas para su desarrollo (Hernández y Labbé, 2014).

Los principales estímulos químicos para las microalgas son la deficiencia de nutrientes (nitrógeno, fósforo, azufre y silicio), la salinidad y el pH del medio de cultivo; los estímulos físicos son la temperatura y la intensidad luminosa (Sims y Christenson, 2011). Los principales factores que afectan el cultivo de las microalgas, y por consiguiente su crecimiento, son: las condiciones ambientales (luz, temperatura, pH, aporte de nutrientes como: nitrógeno, fósforo, salinidad y agitación), especies de microalgas y forma del recipiente de cultivo. Asimismo, estos parámetros afectan la actividad fotosintética, productividad de biomasa, composición fisiológica y bioquímica de las microalgas. Por lo tanto, son factores claves para controlar el curso de los procesos fisiológicos e inducir alteraciones en la composición bioquímica de las microalgas (Parmar et al., 2011). Algunos autores, por ejemplo, han trabajado en el cultivo de especies de *Spirulina* variando las condiciones de cultivo, con la finalidad de encontrar las condiciones óptimas que permitan maximizar la producción de biomasa o algún metabolito en particular (Markou, 2012).

La proporción correcta de nitrógeno y fósforo es fundamental para la división celular activa porque tanto el nitrógeno como el fósforo son esenciales para la síntesis de las estructuras celulares y el crecimiento de las microalgas (Toquin et al., 2012). Asimismo, Daneshvar et al. (2020) revelaron que las técnicas de cosecha de la microalga de agua dulce, *Scenedesmus quadricauda* y los medios de cultivo (Bold's Basal Medium, BBM) son dos factores que afectan directamente la calidad y cantidad de biomasa. Del mismo modo la optimización del medio de cultivo es una estrategia que puede mejorar el crecimiento de microalgas (Zhang et al., 2016).

El nitrógeno es un nutriente importante para la producción de biomasa de microalgas. Puede tener gran influencia en su crecimiento, pero depende de la cantidad, la disponibilidad y el tipo de fuente de nitrógeno (Li et al., 2018).

En varias investigaciones (Cobos et al., 2016b; Ördög et al., 2012; Renuka et al., 2017 y Wang et al., 2018) concluyeron que condiciones de deficiencia de nitrógeno afectaron el crecimiento de especies microalgas reduciendo la proliferación celular. Sin embargo, estas diferencias pueden ser específicas de la especie microalgal (Wang et al., 2018) y Cobos et al. (2014) sugiere que cada especie de microalga responde de manera diferente a las condiciones de cultivo, además la curva de crecimiento depende del tiempo de cultivo y de la adición de nutrientes al medio.

La microalga del género *Ankistrodesmus* pertenece a la familia Selenastraceae (Yoon et al., 2020; Mori et al., 2018 y Da Silva et al., 2017). La especie amazónica *Ankistrodesmus* sp. fue identificada en ambientes acuáticos del área de concesión para Conservación de la Universidad Científica del Perú, en la Cuenca Alta del río Itaya, ubicada al sur este de la ciudad de Iquitos, localizada entre los ríos Amazonas, Marañón y Nanay, Perú (Cobos et al., 2014; Cobos et al., 2012).

Por lo tanto, es importante y necesario el cultivo de *Ankistrodesmus* sp. en medio BG-11

con y sin nitrógeno para describir la influencia del nitrógeno en el crecimiento de esta especie así como conocer el comportamiento de la fisiología celular de esta especie en este medio de cultivo debido a que hay escasos estudios sobre esta microalga en este medio, ya que el crecimiento y composición bioquímica de las microalgas puede estar influenciada por la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo (Xin *et al.*, 2010) y concluir si es una buena estrategia para establecer condiciones óptimas de crecimiento de esta especie para una mayor producción de biomasa. Asimismo, los principales componentes de la biomasa son los lípidos, carbohidratos, proteínas y pigmentos (Zorn *et al.*, 2017) y sus proporciones cambian mucho con la alteración o control de las condiciones de cultivo (Ikarán *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016; Liao *et al.*, 2017; Vassilev y Vassileva, 2016; Zhai *et al.*, 2017). Además, desde una perspectiva industrial, económica y biotecnológica los cultivos de microalgas tienen un gran potencial, porque se pueden obtener varios productos valiosos de su biomasa, que van desde la nutrición animal y humana, los cosméticos y los productos farmacéuticos, a los biocombustibles como el biodiesel, biogás e hidrógeno (Zuliani *et al.*, 2016).

Por tal motivo la presente investigación tiene como objetivo describir la influencia del nitrógeno en el perfil de crecimiento de *Ankistrodesmus* sp., provenientes de la cuenca del río Itaya, Loreto, Perú.

## MATERIALES Y MÉTODO

### Área de estudio

La microalga amazónica *Ankistrodesmus* sp. fue identificada en ambientes acuáticos del área de concesión para Conservación de la Universidad Científica del Perú (UCP) en la Cuenca Alta del río Itaya, coordenadas: 03°43' S y 073°14' W (Cobos *et al.*, 2014), el cual está ubicado en la Provincia de Maynas, Departamento de Loreto, Perú. La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú, ubicada en la Av. José Abelardo Quiñones km 2,5, distrito San

Juan Bautista, provincia Maynas, departamento Loreto. La microalga *Ankistrodesmus* sp. fue proporcionada por el Banco de cepas de este laboratorio la cual se mantuvo en tubos de ensayo de 10 ml a 25 °C con una intensidad de luz de 100  $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  con un fotoperiodo de 12 h con luz y 12 h sin luz (oscuridad) en un agitador orbital a 200 rpm (Cobos *et al.*, 2016a) y se cultivaron en lote inicialmente en medio BG-11 a pH 7,5 después de la cosecha de biomasa húmeda se cultivaron en lote en medio BG-11 con y sin nitrógeno a pH 7,5. Los medios de cultivo BG-11, se esterilizaron en autoclave antes de su uso. La composición del medio BG-11 están detallados en Cobos *et al.* (2016a).

### Cultivos iniciales de la microalga *Ankistrodesmus* sp.

Inicialmente la suspensión microalgal de *Ankistrodesmus* sp. se mantuvo en tubos de ensayo de 10 ml a 25 °C con una intensidad de luz de 100  $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  con un fotoperiodo de 12 h con luz y 12 h sin luz (oscuridad) en un agitador orbital a 200 rpm. Conforme se incrementó la densidad celular de los cultivos se transfirieron a matraces de 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 ml hasta llegar a volúmenes de 5 L en aireación, agitación manual, con fotoperiodo de 12 h con luz y 12 h sin luz a 25 °C (Cobos *et al.*, 2016a). El cultivo de 10 L de esta especie se realizó en 12 semanas. Además, se realizaron monitoreos a los cultivos mediante observaciones al microscopio de luz invertida cada vez que se añadió medio BG- 11.

### Cosecha de biomasa húmeda de la microalga *Ankistrodesmus* sp.

La cosecha de la microalga *Ankistrodesmus* sp. para la obtención de biomasa húmeda, se realizó mediante centrifugación de 10 L de cultivo de esta especie. Para ello, se distribuyó 200 ml del cultivo en cuatro tubos de plástico Falcón de 50 ml y se centrifugó a 4500 rpm x 10 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante e inmediatamente se añadió más cultivo en los mismos tubos, se volvió a centrifugar bajo las condiciones indicadas. Estos procedimientos se repitieron hasta obtener toda la biomasa microalgal húmeda de los 10 L de cultivo. A esta biomasa

húmeda obtenida se lavó con suero fisiológico (NaCl), por cada 35 ml de biomasa húmeda se añadió 15 ml de este suero y se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones. Se obtuvieron en total 90 ml de biomasa húmeda.

### **Cultivos de la microalga *Ankistrodesmus* sp. en medio BG-11 con y sin nitrógeno**

Los 90 ml de biomasa húmeda obtenida de esta especie fue distribuida en seis partes iguales (15 ml) en matraces de 1000 ml, de los cuales tres matraces contenían previamente 900 ml de medio BG11 con nitrógeno (es decir que el medio de cultivo BG-11 está con todas las sales correspondientes a la composición de este medio, entre ellas las sales que contienen nitrógeno) que fueron los controles positivos (medio completo) y tres matraces contenían previamente 900 ml de medio BG11 sin nitrógeno que fueron los tratamientos o grupos experimentales (medio incompleto), realizándose ensayos por triplicado. Estos cultivos se sometieron a flujo de aire constante con fotoperiodo 12 h con luz y 12 h sin luz, a 25 °C con una intensidad de luz de 100  $\mu\text{mol foton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Figura 1).

### **Procedimiento de registros del crecimiento de la microalga *Ankistrodesmus* sp. con un espectrofotómetro UV/visible Nanodrop 2000 C**

Los registros de crecimiento de esta especie se realizaron mediante lecturas iniciales e intercaladas con un espectrofotómetro UV/visible Nanodrop 2000 C por un periodo de diecinueve días. Se midió la absorbancia (densidad óptica) para una muestra de cultivo de 3  $\mu\text{l}$ . Este sistema retiene la muestra entre dos fibras ópticas gracias a la tensión superficial (Cobos *et al.*, 2016a). El procedimiento constó de los siguientes pasos: 1) En el software que controla el espectrofotómetro se seleccionó la opción de lectura de células a 680 nm (longitud de onda que absorben las clorofilas). 2) Se realizó la lectura basal (blanqueo) poniendo 3  $\mu\text{l}$  del medio de cultivo BG-11 en el sensor. 3) Se leyó el mismo volumen del cultivo microalgal. El flujograma del procedimiento del perfil de crecimiento realizado se muestra en la Figura 2.

### **Análisis estadístico**

Los datos registrados fueron tabulados en hojas de cálculo de Microsoft Excel 2016, se determinó el promedio, desviación estándar y para elaborar la curva de crecimiento se empleó este programa, luego los datos se sometieron a prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov (Tabla 1), se realizó la prueba t-student para conocer si existen diferencias estadísticas significativas entre el grupo control y el tratamiento en el perfil de crecimiento al 95% de intervalo de confianza (valor de  $p < 0,05$ ) en el programa estadístico IBM SPSS Statistics versión 22 (Tabla 2).

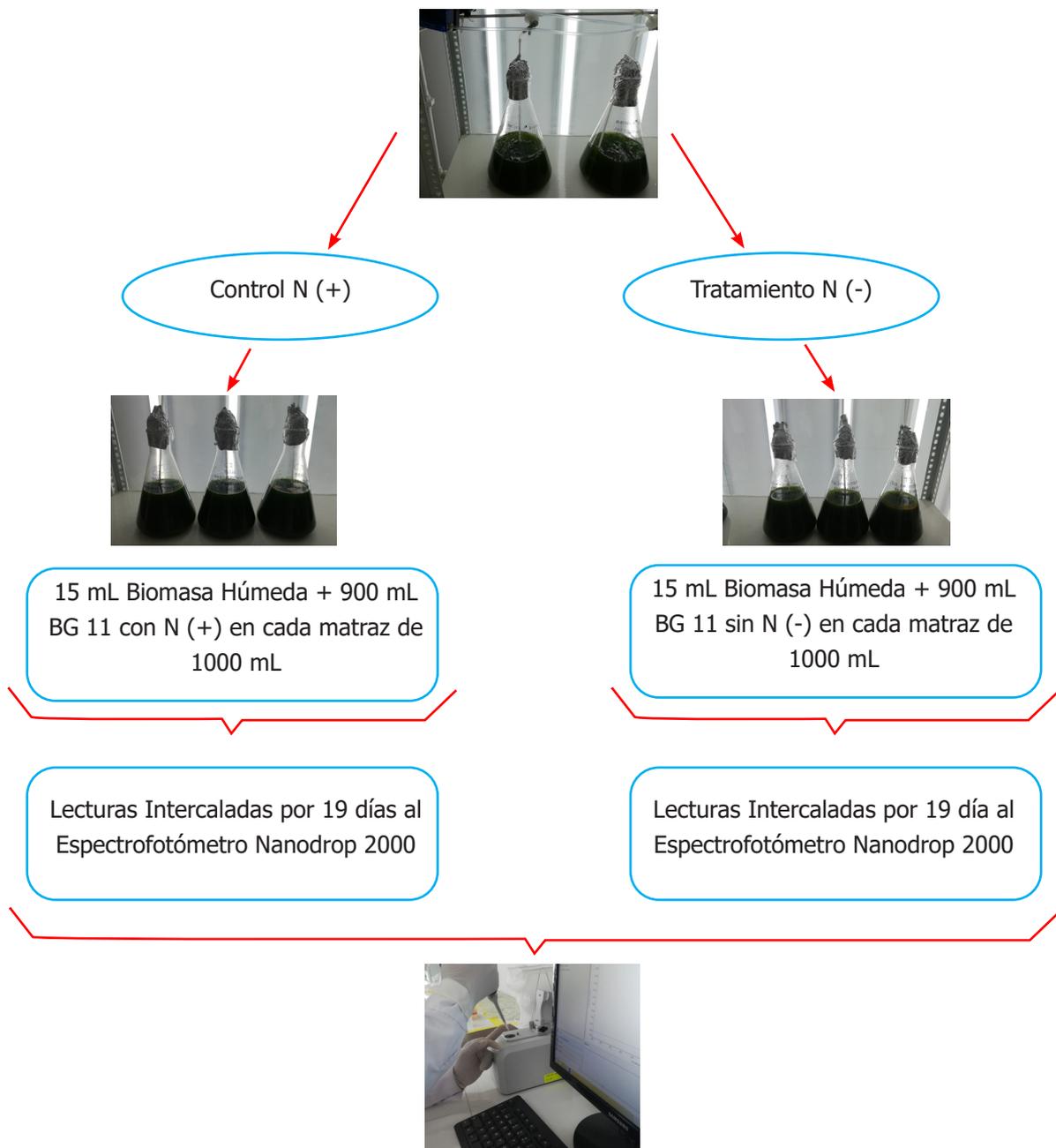
## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

La distribución de perfil de crecimiento de *Ankistrodesmus* sp. en medio BG-11 con y sin nitrógeno fue normal de acuerdo a la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov (Tabla 1) y con la prueba t-student se evidenció que no existió diferencias estadísticas significativas entre el grupo control (medio BG-11 con nitrógeno) y el tratamiento (medio BG-11 sin nitrógeno) debido a que el p valor obtenido ( $p = 0,203$ ) fue mayor a 0,05 con un 95% de nivel de confianza (Tabla 2). Sin embargo, a pesar de presentar un comportamiento similar entre control y tratamiento se pudo diferenciar fases de crecimiento de esta especie sobre todo en el tratamiento debido a la ausencia de nitrógeno. En la Figura 3 se presentan los valores promedios de densidad óptica obtenidos de *Ankistrodesmus* sp. en medio BG-11 con y sin nitrógeno en un periodo de evaluación de diecinueve días.

El perfil de crecimiento de la especie *Ankistrodesmus* sp. en el tratamiento (sin nitrógeno) se inició con una densidad óptica (DO) de 0,386 tal como se indica en la Tabla 3. Al séptimo día de evaluación se observó la fase de adaptación con un valor de DO de 0,442; en esta fase el ligero incremento de la densidad óptica se debió a que las células de la microalga se estaban adaptando a las nuevas condiciones del medio (García-Romeral *et al.*, 2017). La fase exponencial se evidenció a los diecisiete días (DO =



**Figura 1.** Flujograma de cultivos de la microalga *Ankistrodesmus sp.*



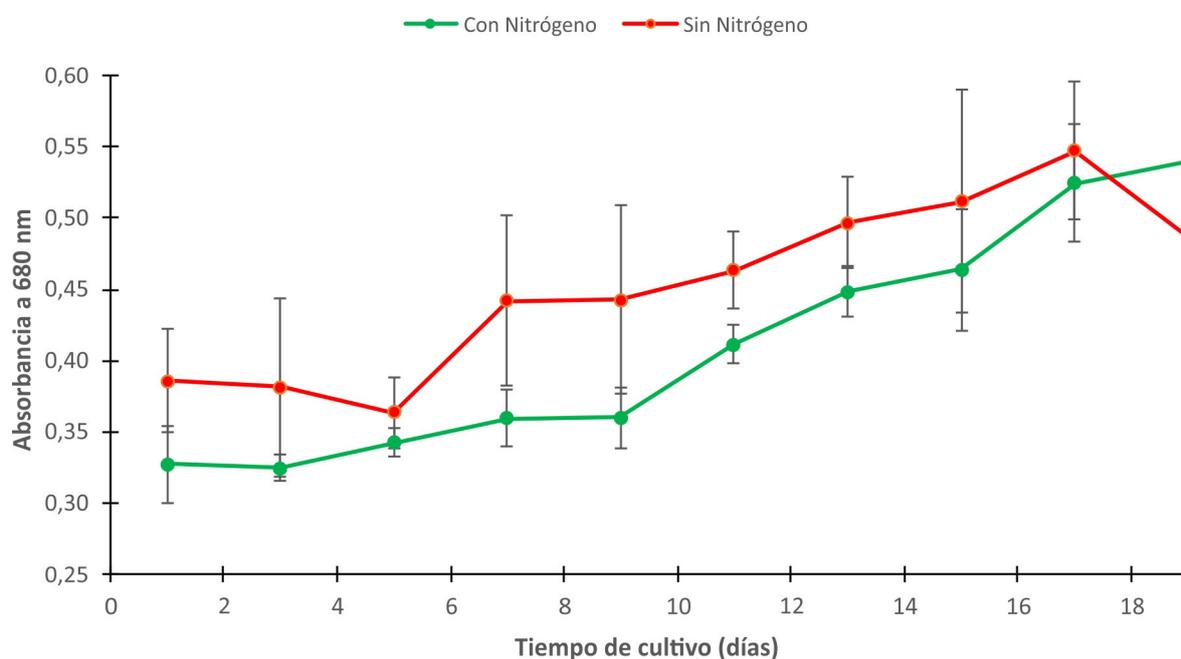
**Figura 2.** Flujograma del procedimiento del perfil de crecimiento de la especie *Ankistrodesmus sp.*

**Tabla 1.** Prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov de la densidad óptica a 680 nm.

Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
La distribución del perfil de crecimiento es normal con la media 0,431 y la desviación estándar 0,07.	Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra.	0,200 <sup>1,2</sup>	Conserve la hipótesis nula.

**Tabla 2.** Prueba t-studen de registros de densidad óptica del cultivo de *Ankistrodesmus* sp. en medio BG-11 con y sin nitrógeno.

Perfil de crecimiento	Prueba de muestras independientes									
	Prueba de Levene de Calidad de varianzas		Prueba t para igualdad de medias						95% de intervalo de confianza de la diferencia	
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior	
Se asumen varianzas iguales	1,375	0,256	-1,322	18,000	0,203	-0,042	0,032	-0,109	0,025	
No se asumen varianzas iguales			-1,322	16,781	0,204	-0,042	0,032	-0,109	0,025	

**Figura 3.** Curvas de crecimiento de densidad óptica de *Ankistrodesmus* sp. cultivada en medio BG.11 con y sin nitrógeno en 19 días de evaluación.

0,547) en esta fase la división celular se incrementó en función del tiempo, este incremento de la población existente se debió a que las células estuvieron asimilando los nutrientes en el medio y su proceso de reproducción asexual fue activo (García-Romeral *et al.*, 2017). A los diecinueve días se observó una pequeña fase de declinación relativa del crecimiento (DO = 0,487) en esta fase la división celular fue lenta cuando los nutrientes fueron consumidos y su carencia limitó su crecimiento (García-Romeral *et al.*, 2017) como se observa en el perfil de crecimiento de la Figura 3.

Asimismo, el perfil de crecimiento de la especie *Ankistrodesmus* sp. en el control (con nitrógeno) se inició con una densidad óptica de 0,328 tal como se indica en la Tabla 3. Al quinto día de la evaluación experimental se observó la fase de adaptación con un valor de densidad óptica de 0,342; en esta fase el ligero incremento de la densidad óptica se debió a que las células de *Ankistrodesmus* sp. se estaban adaptando a las nuevas condiciones del medio según como lo afirma García-Romeral *et al.*, 2017. A los diecinueve días se observó un incremento exponencial hasta un valor de densidad óptica de 0,539; en esta fase la división celular se incrementó en función del tiempo, el incremento

de la población existente se debió a que las células están asimilando los nutrientes del medio y su proceso de reproducción asexual fue activo (García-Romeral *et al.*, 2017), como se observa en el perfil de crecimiento de la Figura 3.

Los resultados del presente estudio no son comparables con Cobos *et al.* (2016b) porque varían en relación a las condiciones de cultivo para la especie *Ankistrodesmus* sp. como: medio de cultivo y periodo de evaluación, quienes indicaron que se evidenció un mejor crecimiento de estas especies microalgales: *Ankistrodesmus* sp., *Ankistrodesmus nannoselene*, *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. y *Scenedesmus quadricauda*, en medios de cultivo CHU con nitrógeno y fue *Ankistrodesmus* sp., la especie que alcanzó mayor crecimiento microalgal en un periodo de evaluación de seis días. También no son comparables con Wang *et al.* (2018) porque se diferencian en relación a la especie microalgal y a las condiciones de cultivo como: medio de cultivo, parámetros de cultivo y tiempo de evaluación, quienes demostraron que condiciones de deficiencia de nitrógeno afectaron el crecimiento de las microalgas oleoginosas eustigmatófilas, en lo que respecta a su composición fisiológica y bioquímica. Sin embargo, concuerdan que estas diferencias pueden ser específicas de

**Tabla 3.** Perfil de crecimiento de la especie *Ankistrodesmus* sp. cultivada por triplicado en 19 días de evaluación.

Densidad óptica de la especie <i>Ankistrodesmus</i> sp.								
Tiempo de Cultivo (Días)	Control 1 (Con nitrógeno)	Control 2 (Con nitrógeno)	Control 3 (Con nitrógeno)	Promedio	Tratamiento 1 (Sin nitrógeno)	Tratamiento 2 (Sin nitrógeno)	Tratamiento 3 (Sin nitrógeno)	Promedio
1	0,304	0,357	0,322	0,328 ± 0,027	0,405	0,409	0,344	0,386 ± 0,036
3	0,318	0,321	0,335	0,325 ± 0,009	0,344	0,346	0,454	0,381 ± 0,063
5	0,341	0,353	0,333	0,342 ± 0,010	0,387	0,337	0,367	0,364 ± 0,025
7	0,375	0,366	0,337	0,359 ± 0,020	0,408	0,407	0,511	0,442 ± 0,060
9	0,382	0,339	0,359	0,360 ± 0,022	0,407	0,402	0,520	0,443 ± 0,067
11	0,427	0,406	0,401	0,411 ± 0,014	0,444	0,451	0,494	0,463 ± 0,027
13	0,446	0,432	0,467	0,448 ± 0,018	0,532	0,469	0,490	0,497 ± 0,032
15	0,500	0,474	0,417	0,464 ± 0,042	0,585	0,430	0,520	0,512 ± 0,078
17	0,541	0,555	0,478	0,525 ± 0,041	0,532	0,509	0,601	0,547 ± 0,048
19	0,577	0,487	0,554	0,539 ± 0,047	0,402	0,485	0,574	0,487 ± 0,086

la especie. Asimismo, discrepan con Renuka *et al.* (2017) quienes argumentaron que el cultivo de microalgas en condiciones de inanición de nitrógeno suele ir acompañada de la inhibición del crecimiento de microalgas.

Asimismo, concuerdan con Nahidian *et al.* (2018) en lo inferido sobre el medio de cultivo BG-11, quienes revelaron que la microalga de agua dulce *Haematococcus pluvialis* cultivadas en medio BG-11 presentó un ligero retraso en su crecimiento en comparación con las que fueron cultivadas en medio BBM. Del mismo modo, concuerdan con Cobos *et al.* (2014) quienes argumentaron que cada especie de microalga responde de manera diferente a las condiciones de cultivo, además la curva de crecimiento depende del tiempo de cultivo y de la adición de nutrientes al medio. Por lo tanto, ante condiciones de estrés fisiológico el comportamiento de las microalgas es variable entre las distintas especies (Shin *et al.*, 2018; Arias *et al.*, 2013).

Arredondo y Voltolina (2007) argumentaron que el crecimiento de un cultivo de microalgas está expresado como el incremento de biomasa, sea determinado por densidad óptica o peso seco. Por consiguiente, debido a que por lo general el contenido de metabolitos como: lípidos, carbohidratos, proteínas en la biomasa de las microalgas varía en dependencia de la especie y de las condiciones de cultivo (Lin *et al.*, 2018), se requiere estudiar cada caso por separado para establecer las mejores condiciones de cultivo que optimicen la producción de estos metabolitos. No obstante, hace falta el desarrollo de tecnologías que disminuyan el costo de producción de biomasa (Castillo *et al.*, 2017; Fernández *et al.*, 2012).

## CONCLUSIÓN

No existe diferencias estadísticas significativas en el perfil de crecimiento de la microalga *Ankistrodesmus* sp. en condiciones de ausencia y presencia de nitrógeno. Sin embargo, se pudo diferenciar fases de crecimiento de esta especie sobre todo en el tratamiento debido a la ausen-

cia de nitrógeno.

## AGRADECIMIENTO

Agradecemos a la Universidad Científica del Perú (UCP) por permitirnos el acceso a sus instalaciones para el desarrollo de la presente investigación. A la Dra. Marianela Cobos Ruiz, por su valioso apoyo en el desarrollo de la presente investigación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arredondo, B y Voltolina, D. (2007) Métodos y técnicas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. 1<sup>era</sup> Edición. Editorial: La Paz, Baja California Sur, México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Arias, M., Martínez, A. y Cañizares, R. (2013) Producción de biodiesel a partir de microalgas: parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. *Acta Biológica Colombiana*, 18 (1), 43-68.
- Castillo, O., Torres, S., Núñez, C., Peña, V., Herrera, C. y Rodríguez, J. (2017) Producción de biodiésel a partir de microalgas: avances y perspectivas biotecnológicas. *Hidrobiológica*, 27 (3), 337-352.
- Cobos, M., Castro, J., Del Águila, J. y Soplín, H. (2012) Identificación de microalgas oleaginosas en el área de concesión para conservación cuenca alta del Río Itaya, Loreto-Perú. *Ciencia Amazónica (Iquitos)*, 2(2), 162-168.
- Cobos, M., Castro, J. y Cerdeira, L. (2014) Potencial biotecnológico para la producción sustentable de biodiesel de microalgas oleaginosas aisladas del Río Itaya, Loreto, Perú. *Ecología aplicada*, 13(2), 169-175.
- Cobos, M., Castro, J. y Vargas, G. (2016a) *Protocolo para el aislamiento, caracterización bioquímica y molecular de microalgas oleaginosas*. Primera edición. Iquitos. Universidad Científica del Perú.
- Cobos, M., Paredes, J. y Castro, J. (2016b) Inducción de la producción de lípidos totales en microalgas sometidas a estrés nutritivo. *Acta Biológica Colombiana*, 21(1),

- 17-26. <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v21n1.47439>
- Daneshvar, E., Zarrinmehr, M. J., Kousha, M. y Bhatnagar, A. (2020) Evaluación del desempeño de diferentes métodos de cosecha y medios de cultivo sobre la eficiencia de cosecha de la microalga y su perfil de ácidos grasos. *Fuel*, 280, 118592. 10.1016/j.fuel.2020.118592.
- Da Silva, T., Bock, C., Sant'Anna, C. L., Bagatini, I. L., Wodniok, S., & Vieira, A. A. H. (2017) Selenastraceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae): rbcL, 18S rDNA and ITS-2 secondary structure enlightens traditional taxonomy, with description of two new genera, *Messastrum* gen. nov. and *Curvastrum* gen. nov. *Fottea, Olomouc*, 17(1), 1-19.
- Fernández, L., Montiel, J., Millán, A. & Badillo, J. (2012) Production of biofuels obtained from microalgae. *Revista Ra Ximhai*, 8 (3), 101-115.
- García-Romeral, J., Pavía, M., García, T., Chirivella, J. y Serrano Aroca, Á. (2017) Principios de Biotecnología y Bioingeniería en el cultivo de microalgas: importancia, problemas tecnológicos, tipos y sistemas de cultivos, crecimiento, factores limitantes, selección, aislamiento, escalado y caracterización bioquímica. *Nereis*, 9, 115-130.
- Hernández, A. y Labbé, J. (2014) Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de biología Marina y Oceanografía*, 49(2), 157-173.
- Jia, H. & Yuan, Q. (2016) Removal of nitrogen from wastewater using microalgae and microalgae–bacteria consortia. *Cogent Environmental Science*, 2: 1275089 <http://dx.doi.org/10.1080/23311843.2016.1275089>.
- Ikanan, Z., Suárez-Alvarez, S., Urreta, I. & Castañón, S. (2015) The effect of nitrogen limitation on the physiology and metabolism of *Chlorella vulgaris* var L3. *Algal Research*, 10, 134-144. 10.1016/j.algal.2015.04.023.
- Liao, Q., Sun, Y., Huang, Y., Xia, A., Fu, Q., & Zhu, X. (2017) Simultaneous enhancement of *Chlorella vulgaris* growth and lipid accumulation through the synergy effect between light and nitrate in a planar waveguide flat-plate photobioreactor. *Bioreour Technol*, 243, 528-538. 10.1016/j.biortech.2017.06.091.
- Li, T., Xu, J., Gao, B., Xiang, W., Li, A. & Zhang, C. (2016) Morphology, growth, biochemical composition and photosynthetic performance of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae) under low and high nitrogen supplies. *Algal Research*, 16, 481-491. 10.1016/j.algal.2016.04.008.
- Li, X., Li, W., Zhai, J. y Wei, H. (2018) Efecto de la limitación de nitrógeno sobre la composición bioquímica y el rendimiento fotosintético para el cultivo mixotrófico alimentado por lotes de microalga *Spirulina platensis*. *Bioresour Technol*, 263, 555-561. 10.1016/j.biortech.2018.05.046.
- Lin, Y., Ge, J., Ling, H., Zhang, Y., Yan, X. & Ping, W. (2018) Isolation of a novel strain of *Monoraphidium* sp. and characterization of its potential for  $\alpha$ -linolenic acid and biodiesel production. *Bioresour Technol*, 267, 466-472.
- Markou, G. (2012) Alteration of the biomass composition of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* under various amounts of limited phosphorus. *Bioresour Technol*, 116, 533-535.
- Mori, C. C., Bagatini, I. L., da Silva, T. G., Parrish, C. C., & Vieira, A. A. H. (2018) Use of fatty acids in the chemotaxonomy of the family Selenastraceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae). *Phytochemistry*, 151, 9-16.
- Nahidian, B., Ghanati, F., Shahbazi, M. y Soltani, N. (2018) Efecto de los nutrientes sobre el crecimiento y las características fisiológicas de *Haematococcus pluvialis* TMU1 recientemente aislado. *Bioresour Technol*, 255, 229-237. 10.1016/j.biortech.2018.01.130.
- Ördög, V., Stirk, W. A., Bálint, P., Van Staden, J. & Lovász, C. (2012) Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella minutissima* cultures. *Journal of Applied Phycology*, 24 (4), 907-914.
- Parmar, A., Singh, N. K., Pandey, A., Gnansouhou, E. & Madamwar, D. (2011) Cyanobac-

- teria and microalgae: a positive prospect for biofuels. *Bioresource Technology*, 102, 10163-10172.
- Renuka, N., Guldhe, A., Singh, P., Ansari, F., Rawat, I. & Bux, F. (2017) Evaluating the potential of cytokinins for biomass and lipid enhancement in microalga *Acutodesmus obliquus* under nitrogen stress. *Energy Conversion and Management*, 140, 14-23.
- Sims, R. & Christenson, L. (2011) Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels and subproducts. *Biotechnology Advances*, 29(6), 686-702.
- Shin, Y., Choi, H., Choi, J., Lee, J., Sung, Y. & Sim, S. (2018) Multilateral approach on enhancing economic viability of lipid production from microalgae: A review. *Bioresource Technology*, 258, 335-344.
- Tocquin, P., Fratamico, A. & Franck, F. (2012) Screening for a low-cost *Haematococcus pluvialis* medium reveals an unexpected impact of a low N/P ratio on vegetative growth. *Journal of Applied Phycology*, 24, 365-373.
- Vassilev, S. V. & Vassileva, C. G. (2016) Composition, properties and challenges of algae biomass for biofuel application: An overview. *Fuel*, 181, 1-33. 10.1016/j.fuel.2016.04.106.
- Wang, F., Gao, B., Huang, L., Su, M., Dai, C. & Zhang, C. (2018) Evaluation of oleaginous eustigmatophycean microalgae as potential biorefinery feedstock for the production of palmitoleic acid and biodiesel. *Bioresource Technology*, 270, 30-37.
- Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G. & Ying-xue, S. (2010) Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalgae *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*, 101: 5494-5500.
- Yoon, S. R., Kim, D. H., & Lee, O. M. (2020) Newly recorded chlorophytes, *Monoraphidium subclavatum*, *Deuterostichococcus epilithicus*, and *Pseudostichococcus monallantoides* in Korea. *Journal of Species Research*, 9(3), 181-190.]
- Zhai, J., Li, X., Li, W., Rahaman, Md. H., Zhao, Y., Wei, B. & Wei, H. (2017) Optimization of biomass production and nutrients removal by *Spirulina platensis* from municipal wastewater. *Ecological Engineering*, 108, 83-92. 10.1016/j.ecoleng.2017.07.023.
- Zhang, Z., Wang, B., Hu, Q., Sommerfeld, M., Li, Y. & Han, D. (2016) A new paradigm for producing astaxanthin from the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 113, 2088-2099.
- Zorn, G. A. Pedro, M. S. Amaral, C. C. A. Loures & M. B. Silva. (2017) Evaluación de factores implicados en la extracción de lípido de microalga *Chlorella minutissima* biomasa por medio de solventes. Brasil. *HOLOS*, Año 33, Vol. 02 DOI: 10.15628/holos.2017.5655.
- Zuliani, L; Frison, N; Jelic, A; Fatone, F; Bolzonella, D; Ballottari, M. (2016) Microalgae Cultivation on Anaerobic Digestate of Municipal Wastewater, Sewage Sludge and Agro-Waste. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10), 1692.

### **Conflicto de interés**

Los autores declaramos no tener ningún conflicto de interés.