



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

“Efecto de la limitación de nutrientes en la composición bioquímica de *Ettlia oleoabundans* y su potencial en la producción de compuestos de alto valor agregado”

TESIS DE MAESTRÍA

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales

(Orientación en Biotecnología)

P r e s e n t a

KARLA MARÍA COTA QUINTERO

La Paz, Baja California Sur, febrero de 2019.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 14:00 horas del día 18 del Mes de enero del 2019, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

“Efecto de la limitación de nutrientes en la composición bioquímica de *Ettlia oleoabundans* y su potencial en la producción de compuestos de alto valor agregado”

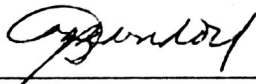
Presentada por el alumno:

Karla María Cota Quintero

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **BIOTECNOLOGÍA.**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

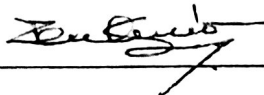
LA COMISIÓN REVISORA



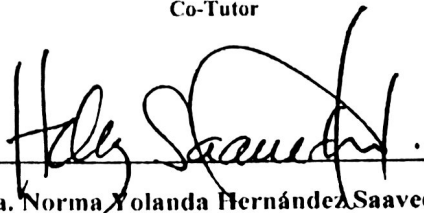
Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega
Director de Tesis



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro
Co-Director de Tesis



Dra. Tania Zenteno Savín
Co-Tutor



Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

Conformación de comités

Comité tutorial

Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega
Centro de Investigaciones Biologicas del Noroeste, S.C.
Co- Directora de Tesis.

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro.
Centro de Investigaciones Biologicas del Noroeste, S.C.
Co-Directora de Tesis.

Dra. Tania Zenteno Savín.
Centro de Investigaciones Biologicas del Noroeste, S.C.
Co-Tutora de Tesis

Comité revisor de tesis

Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega
Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro
Dra. Tania Zenteno Savín.

Jurado de examen

Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega
Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro
Dra. Tania Zenteno Savín.

Suplente

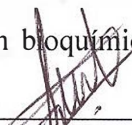
Dra. María de Lourdes Morquecho Escamilla

Resumen

Las microalgas son organismos fotosintéticos que producen compuestos de interés biotecnológico. *Ettlia oleoabundans* es una microalga oleaginosa que presenta un alto contenido de lípidos. Debido a su versatilidad metabólica, se considera candidata para la producción de biomasa rica en lípidos para la obtención de biocombustibles. El objetivo de este estudio fue evaluar los cambios en la composición bioquímica de *Ettlia oleoabundans* cultivada en limitación de nutrientes, para definir su potencial en la producción de compuestos de alto valor agregado. Los cultivos se realizaron en condiciones de laboratorio (temperatura 25°C; ciclo luz:oscuridad 12:12 h; intensidad luminosa 62 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$; aireación continua) con 6 réplicas por tratamiento, con 1.7 L de volumen final y 40% de inóculo) durante 5 días. Se utilizó como medio de cultivo agua de mar (35 UPS) estéril adicionada con el fertilizante agrícola Fertiplus®, en dos concentraciones de nitrógeno (882 μM , control; 20 μM , limitación de nutrientes). Se determinó el rendimiento cuántico efectivo *in situ* $\Phi(II)$, a través de la fluorescencia *in vivo* de la clorofila *a* del fotosistema II (FSII), el cual fue menor en limitación nutrientes comparado con el control, y se utilizó como indicador de estrés en el cultivo. Los resultados fueron: tasa de crecimiento (control: 0.2 d^{-1} vs 0.15 d^{-1}), rendimiento de la biomasa (control: 246.11 mg L^{-1} vs 103.56 mg L^{-1}) y productividad de la biomasa (control: 49.22 $\text{mgL}^{-1}\text{d}^{-1}$ vs 20.71 $\text{mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$). En cuanto a la composición bioquímica, en el tratamiento con limitación de nutrientes, se observó una disminución del contenido de proteínas (control: 27 \pm 0.84 vs 17 \pm 0.40%), de pigmentos como clorofila *a* (control: 1.6 \pm 0.4 $\mu\text{g mg}^{-1}$ vs 0.6 \pm 0.08 $\mu\text{g mg}^{-1}$), clorofila *b* (control: 0.73 \pm 0.20 $\mu\text{g mg}^{-1}$ vs 0.22 \pm 0.08 $\mu\text{g mg}^{-1}$) y carotenoides totales (control: 1.40 \pm 0.47 vs 0.50 \pm 0.10 $\mu\text{g mg}^{-1}$), todos expresados con respecto al peso seco. Se obtuvo un aumento en la concentración de carbohidratos (control: 15 \pm 1.55 vs 26 \pm 1.48%) y lípidos totales (control: 15.78 \pm 3.43 vs 28.43 \pm 0.17). El perfil de ácidos grasos totales estuvo constituido por ácidos grasos saturados (30.31 \pm 1.13 %), monoinsaturados (17.74 \pm 2.87%), biinsaturados (21.01 \pm 1.65%) y poliinsaturados (30.65 \pm 4.52%). Adicionalmente, se analizaron las fracciones correspondientes a lípidos neutros (NL), glicolípidos (AMPL) y fosfolípidos (PL), destacando un aumento de los ácidos grasos monoinsaturados en la fracción NL. Como indicadores de estrés oxidativo se cuantificaron la tasa de producción de radical superóxido (control: 0.071 \pm 0.020 vs 0.139 \pm 0.035 $\text{nmol mg}^{-1} \text{proteína min}^{-1}$) y TBARS (control: 1.12 \pm 0.31 vs 3.81 \pm 0.99 $\text{nmol mg}^{-1} \text{proteína}$). La actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) aumentó en limitación de nutrientes, en comparación con el control. La limitación de nutrientes en *E. oleoabundans* sugiere ventajas biotecnológicas ya que, además de favorecer el aumento de antioxidantes, incrementó la síntesis de carbohidratos y lípidos que pueden utilizarse en la producción de energías renovables, como bioetanol y biodiesel, respectivamente. Los resultados obtenidos contribuirán al área de conocimiento básico del comportamiento de esta especie para su aplicación biotecnológica.

Palabras clave: antioxidantes, biocombustibles, composición bioquímica, compuestos de alto valor agregado, productividad.



 Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega
 Vo. Bo. Director de tesis


 Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro
 Vo. Bo. Co-Director de tesis

Summary

Microalgae are photosynthetic organisms that produce compounds of biotechnological interest. *Ettlia oleoabundans* is an oleaginous microalgae that has a high lipid content. Due to its metabolic versatility, it is considered a candidate for the production of biomass rich in lipids to obtain biofuels. The objective of the study was to evaluate the changes in the biochemical composition of *Ettlia oleoabundans* cultivated in nutrient limitation, to define its potential in the production of high added value compounds. The cultures were carried out for 5 days under laboratory conditions (temperature 25 ° C; photoperiod 12: 12h light: dark; luminous intensity 62 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$; and continuous aeration), 6 replicates per treatment, 1.7 L volume final and 40% inoculum. Sterile seawater (35 UPS) was used as a culture medium added with fertilizer Fertiplus®, in two concentrations of nitrogen (882 μM , control; 20 μM , nutrient limitation). The *in situ* effective quantum yield Y(II) was determined by *in vivo* fluorescence of the chlorophyll *a* of photosystem II (PSII), which was lower in nutrients limitation compared to the control, and was used as an indicator of stress in the culture. The results were: growth rate (control: 0.2 d^{-1} vs 0.15 d^{-1}), biomass yield (control: 246.11 mg L^{-1} vs 103.56 mg L^{-1}) and biomass productivity (control: 49.22 $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ vs 20.71 $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$). In the treatment with nutrient limitation, a decrease in proteins (control: 27 \pm 0.84 vs 17 \pm 0.40% DW), in pigments such as chlorophyll *a* (control: 1.6 \pm 0.4 $\mu\text{g mg}^{-1}$ vs 0.6 \pm 0.08 $\mu\text{g mg}^{-1}$ DW), chlorophyll *b* (control: 0.73 \pm 0.20 $\mu\text{g mg}^{-1}$ vs 0.22 \pm 0.08 $\mu\text{g mg}^{-1}$ DW) and total carotenoids (control: 1.40 \pm 0.47 vs 0.50 \pm 0.10 $\mu\text{g mg}^{-1}$ DW) were observed. There were an increase in carbohydrates (control: 15 \pm 1.55 vs 26 \pm 1.48%) and total lipids (control: 15.78 \pm 3.43 vs 28.43 \pm 0.17%). The total fatty acids profile was composed by saturated (30.31 \pm 1.13%), monounsaturated (17.74 \pm 2.87%), biunsaturated (21.01 \pm 1.65%) and polyunsaturated (30.65 \pm 4.52%) fatty acids. Additionally, fractions corresponding to neutral lipids (NL), glycolipids (AMPL) and phospholipids (PL) were analyzed, highlighting an increase of monounsaturated fatty acids in the NL fraction. As indicators of stress and oxidative damage, were quantified the endogenous production rate of superoxide radical (O_2^{\cdot}) (control: 0.071 \pm 0.020 vs 0.139 \pm 0.035 $\text{nmol mg}^{-1} \text{protein min}^{-1}$) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (control: 1.12 \pm 0.31 vs 3.81 \pm 0.99 $\text{nmol mg}^{-1} \text{protein}$), respectively. The antioxidant activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) enzymes, increased in nutrient limitation, compared to control. The biochemical evaluation of lipids, carbohydrates and antioxidant enzymes were compared with the expression parameters and metabolic pathways of other work. The limitation of nutrients in *E. oleabundans* suggests biotechnological advances because it favored the increase of antioxidants, carbohydrates and lipids. Those compounds can be used in the production of renewable energies, such as bioethanol and biodiesel. The results obtained in this work will contribute in basic knowledge about the behavior of this specie for its biotechnological application.

Keywords: antioxidants, biochemical composition, biofuels, high added value, productivity.


 Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega
 Vo. Bo. Director de tesis


 Dra. Gracia Alejía Gómez Anduro
 Vo. Bo. Co-Director de tesis

Dedicatoria

*A mis padres María de Jesús y José David,
a mis Hermanos María y David y a mi
novio Miguel Ángel.*

Agradecimientos

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR), por permitirme realizar mis estudios de maestría, a la Dirección de Estudios de Posgrado, al Departamento de Control Escolar, al Departamento de Becas y Apoyo Estudiantil, a los Laboratorios de Biotecnología de Microalgas, Laboratorio de Estrés Oxidativo, Laboratorio de Alimento Vivo, Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Laboratorio de Biología Molecular, Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico y Laboratorio de Bioquímica Fisiológica, por todo su apoyo durante la realización de esta investigación y por permitirme formar parte de sus equipos de trabajo. De igual manera extendo mis agradecimientos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de manutención otorgada (608162) y a los proyectos CONACYT 31958B, PEI-CONACYT 216627 y CIBNOR 20231.

A mi comité tutorial, Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega, Dra. Gracia Gómez Anduro y Dra. Tania Zenteno Savín, muchas gracias por todos sus consejos, su guía, su apoyo incondicional en todo momento, por su orientación y paciencia que fueron invaluable y esenciales para la realización de este proyecto. Quiero resaltar que son investigadoras de gran calidad humana que alientan a sus estudiantes a seguir sus objetivos y fomentan la aplicación de la ciencia. Gracias por brindarme su amistad.

A los técnicos de laboratorio Dra. Laura Carreón Palau, I.B.Q. Orlando Lugo Lugo por el asesoramiento técnico, por compartir conmigo sus conocimientos, su paciencia y atención. Al M. en C. Mario Arce, M. en C. Julio Hernández y al Dr. Mario Rojas por brindarme todo su conocimiento en un área nueva para mí. Les agradezco todo el tiempo que dedicaron para guiarme y enseñarme nuevas técnicas y por brindarme consejos que fueron de gran utilidad para el desarrollo de este proyecto. A los miembros del Laboratorio de Alimento Vivo, Gabriel González, Adriana Greene, Marte Félix y Julián Garzón que me apoyaron con los cultivos de microalgas. A los M. en C. Norma Ochoa y Roberto Hernández, por permitirme trabajar en sus laboratorios. A mis compañeros de laboratorio Fredy Hernández, Héctor Garza y Carolina Garciglia, por su paciencia y por compartirme toda su experiencia. A Brenda Portuguez, Karen Rodríguez y Daniela Bárcenas por estar siempre dispuestas a aportar sus conocimientos, brindarme su apoyo incondicional y por convertir los días más

pesados en momentos divertidos, que me llenaron de anécdotas e inolvidables momentos. Especialmente gracias a ti Dani, porque me has acompañado desde el inicio de esta aventura, me has asesorado en todo momento y me has brindado tu amistad.

A mis compañeros de maestría, en particular a Judith Aviña, Mariana Múzquiz y Erika Alamillo que me brindaron su amistad y que han compartido conmigo sus consejos, momentos de estrés y de felicidad, dentro y fuera de las clases que compartimos.

Y especialmente, a mis padres María de Jesús Quintero y José David Cota, por todo el amor que me dan, por su apoyo infinito, por sus palabras de aliento en momentos difíciles, por buscar la manera de ayudarme a conseguir mis objetivos y sentirlos siempre cerca a pesar no estar en la misma ciudad. A mis hermanos María y David, por ser mi ejemplo de perseverancia, de amor y vocación, y por estar dispuestos a apoyarme siempre que lo necesite. A mi familia, Silvia, Sabrina y Silvana por alentarme a concluir mis propósitos. A mi compañero de vida, Miguel Ángel Herrera, por todo el amor, cariño y apoyo que me has dado, por creer en mi e impulsarme siempre a cumplir mis metas.

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 <i>Ettlia oleoabundans</i> y su potencial biotecnológico	3
2.2 Función de los nutrientes en el crecimiento microalga	5
2.3 Medios de cultivo.....	9
2.4 Factores que influyen en la composición bioquímica microalgal	10
2.5 Fotosíntesis en microalgas y fluorescencia <i>in vivo</i> de la clorofila <i>a</i>	12
2.5.1 El método de pulso de saturación.....	15
2.5.2. Medida de la fluorescencia <i>in vivo</i> de la clorofila <i>a</i>	17
2.6 Especies reactivas de oxígeno (ERO) y estrés oxidativo.....	18
2.6.1 ¿Cómo se forman las ERO?	19
2.7 Efecto de los radicales libres.....	21
2.7.1 Oxidación de lípidos.....	21
2.7.2 Oxidación de proteínas	22
2.7.3 Oxidación de ácidos nucleicos	22
2.8 Compuestos antioxidantes.....	22
2.8.1 Clasificación y funciones de los compuestos antioxidantes.....	23
3. JUSTIFICACIÓN	26
4. HIPÓTESIS	27
5. OBJETIVOS	28
5.1 Objetivo general	28
5.2 Objetivos particulares.....	28
6. MATERIAL Y MÉTODOS	29

6.1 Material biológico y condiciones de cultivo	29
6.2 Curva de crecimiento	30
6.3 Rendimiento cuántico efectivo <i>in situ</i> Y(II).....	32
6.4 Superóxido dismutasa (SOD) (E.C. 1.15.1.1).....	32
6.5 Catalasa (CAT) (E.C. 1.11.1.6).....	34
6.6 Glutación peroxidasa (GPx) (EC 1.11.1.9).....	34
6.7 Determinación de la producción de radical superóxido (O ₂ ^{•-}).....	35
6.8 Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	36
6.9 Cuantificación de la capacidad antioxidante total.....	36
6.10 Cuantificación de proteínas totales	37
6.11 Cuantificación de carbohidratos.....	38
6.12 Extracción y cuantificación de lípidos totales.....	40
6.13 Cuantificación de ácidos grasos	41
6.14 Separación y cuantificación de ácidos grasos de las fracciones lipídicas	42
6.15 Cuantificación de pigmentos.....	43
6.16. Análisis estadísticos	45
7. RESULTADOS	46
7.1 Curva de crecimiento	46
7.2 Rendimiento cuántico efectivo <i>in situ</i> Y(II).....	48
7.3 Actividad de las enzimas antioxidantes	49
7.3.1 Superóxido dismutasa (SOD) (E.C. 1.15.1.1)	49
7.3.2 Catalasa (CAT) (E.C. 1.11.1.6).....	49
7.3.3 Glutación peroxidasa (GPx) (EC 1.11.1.9)	49
7.4 Tasa de producción endógena de radical superóxido.....	51
7.5 Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	51
7.6 Capacidad antioxidante total	52
7.7 Proteínas totales	53
7.8. Carbohidratos totales.....	53
7.9 Lípidos totales	54
7.10 Cuantificación de ácidos grasos	54
7. 11 Cuantificación de ácidos grasos en las fracciones lipídicas.....	57

7.12 Pigmentos.....	65
8. DISCUSIÓN	67
8.1 Crecimiento y productividad de la biomasa.....	67
8.2 Rendimiento cuántico efectivo <i>in situ</i> Y(II).....	68
8.3 Indicadores de estrés y daño oxidativo	71
8.4 Enzimas antioxidantes.....	72
8.5 Proteínas y carbohidratos totales.....	75
8.6 Lípidos totales	78
8.6.1 Cultivo en dos fases.....	80
8.7 Ácidos grasos	81
8.8 Pigmentos.....	83
8.9 Análisis de las rutas metabólicas en <i>Ettlia oleoabundans</i> en limitación de nutrientes con potencial en la producción de compuestos de alto valor agregado.	87
9. CONCLUSIONES	90
10. LITERATURA CITADA	92

Lista de figuras

Figura 1. Fotografías microscópicas de <i>Ettlia oleoabundans</i> . A) Objetivo 40X. B) Objetivo 100X.....	4
Figura 2. Metabolismo del nitrógeno en microalgas (Syrett, 1987).	6
Figura 3. Visión general del proceso fotosintético. La luz absorbida en forma de energía es usada fotoquímicamente durante las reacciones luminosas. El exceso de energía que no entra a formar parte de la vía fotoquímica, es reemitida como calor o fluorescencia. Para medir la fluorescencia como proceso involucrado en la fotosíntesis, se hace uso del fluorómetro de amplitud modulada (PAM). (Tomada de Gil-Jerez, 2015).....	13
Figura 4. El método del pulso de saturación. Bajo luz de medición (ML) se cuantifica el nivel mínimo de fluorescencia (F_0). Después de aplicar el pulso de luz de saturación (SP), se alcanza la fluorescencia máxima (F_m). A continuación, la muestra se ilumina con luz actínica (AL) y una serie de pulsos de saturación para alcanzar el estado estable (F') y la fluorescencia máxima (F_m'). Finalmente, la luz actínica se cambia a la fluorescencia mínima después de la iluminación (F_0'). (Tomada de Gil-Jerez, 2015).	16
Figura 5. Sistemas enzimáticos antioxidantes. (a) El anión $O_2^{\bullet-}$ formado puede ser dismutado a H_2O_2 por la enzima superóxido dismutasa (SOD). (b) El H_2O_2 es eliminado por la catalasa (CAT); (c) en presencia de glutatión reducido (GSH) por la glutatión peroxidasa (GPX); (d) por el ciclo ascorbato-glutatión mediante la ascorbato peroxidasa (APX). En los dos últimos casos, el GSH se genera vía glutatión reductasa (GR) (Tomado de Romero-Cruz, 2017)...	19
Figura 6. Fundamento para la determinación de SOD. El sistema xantina/xantina oxidasa produce el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$). El $O_2^{\bullet-}$ entra en contacto con el nitroazul de tetrazolio (NBT), lo reduce y genera formazán, cuyo cambio puede ser detectado por espectrofotometría cuando la SOD inhibe la reducción del NBT.	33
Figura 7. Curva de calibración de proteínas totales elaborada con albúmina de suero bovino. (Tomada de Arredondo-Vega <i>et al.</i> , 2017).....	38
Figura 8. Curva de calibración de carbohidratos elaborada con glucosa anhidra. (Tomada de Arredondo-Vega <i>et al.</i> , 2017).	40
Figura 9. Curva de crecimiento de <i>Ettlia oleoabundans</i> cultivada en agua de mar enriquecida con Fertiplus® (tratamiento control, 882 μ M de nitrógeno). Cada punto representa el valor promedio de seis réplicas independientes, las barras de dispersión indican desviación estándar, $p < 0.05$	46

Figura 10. Curva de crecimiento de *Ettlia oleoabundans* cultivada en agua de mar enriquecida con Fertiplus® (tratamiento en limitación de nutrientes, 20 µM de nitrógeno). Cada punto representa el valor promedio de seis réplicas independientes, las barras de dispersión indican desviación estándar, $p < 0.05$47

Figura 11. Rendimiento cuántico efectivo *in situ* Y(II) de *Ettlia oleoabundans* cultivada en el fertilizante agrícola Fertiplus®, en condiciones control y en limitación de nutrientes. Las barras representan el promedio de seis réplicas independientes \pm intervalo de confianza. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0.05$ (t-Student).....48

Figura 12. Comparativo de la expresión global de genes (tomada de De Jaeger *et al.*, 2018) y la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) en *Ettlia oleoabundans*. Los valores son expresados en unidades (U) de enzima por mg^{-1} proteína. Abreviaciones: FPKM: Fragmentos por kilobase de millones de fragmentos mapeados; SN+: Agua de mar sin limitación de nitrógeno (De Jaeger *et al.*, 2018); SN-: Agua de mar con limitación de nitrógeno (De Jaeger *et al.*, 2018); C: Control agua de mar sin limitación de nutrientes (ésta tesis); T: Tratamiento agua de mar con limitación de nutrientes (ésta tesis). APX Ascorbato peroxidasa; MDHA monodehydroascorbato; MDHAR monodehydroascorbato reductasa; DHA dehydroascorbato; DHAR dehydroascorbato reductasa; GSH glutatión reducido; GSSG glutatión oxidado; GSHR glutatión reductasa; Glu glutamato; Cys cisteína; Gly glicina; γ -GCSTT γ -glutamilcisteína sintetasa; γ -Glu-Cys γ -glutamilcisteína; GSHSTT glutatión sintetasa; GSH-S-T glutatión S-transferasa; PCST fitoquelatina sintetasa. Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0.05$ (Prueba de Wilcoxon para SOD y GPx y t-student para CAT).....50

Figura 13. Tasa de producción endógena de radical superóxido (O_2^{\bullet}) en *Ettlia oleoabundans* en el tratamiento control y limitación de nutrientes. Los valores están expresados en nmol mg^{-1} proteína min^{-1} . Las barras representan el promedio \pm intervalo de confianza. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0.05$ (t-student).51

Figura 14. Contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en *Ettlia oleoabundans* en el tratamiento control y limitación de nutrientes. Valores expresados en nmol mg^{-1} proteína. Las barras representan el promedio \pm intervalo de confianza. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0.05$ (t-student).52

Figura 15. Capacidad antioxidante total de *Ettlia oleoabundans* expresada en µM en el tratamiento control y limitación de nutrientes. Las barras representan el promedio \pm intervalo de confianza. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0.05$ (t-student).....53

Figura 16. Contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos totales en *Ettlia oleoabundans* en el tratamiento control y limitación de nutrientes. Los valores son expresados en porcentaje

(%) con respecto al peso seco. Las barras representan el promedio \pm intervalo de confianza. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0.05$ (Prueba de Wilcoxon).....54

Figura 17. Grupo de ácidos grasos en *Ettlia oleoabundans* en el tratamiento control y limitación de nutrientes. AGS= ácidos grasos saturados. AGMI= ácidos grasos monoinsaturados. AGBI= ácidos grasos biinsaturados. AGPI = ácidos grasos poliinsaturados. Los valores son expresados en porcentaje relativo al total de ácidos grasos. Las barras representan el promedio \pm intervalo de confianza. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0.05$ (t-student).....56

Figura 18. Grupo de ácidos grasos de la fracción de lípidos neutros (NL) de *Ettlia oleoabundans* en el tratamiento control y limitación de nutrientes. AGS= ácidos grasos saturados. AGMI= ácidos grasos monoinsaturados. AGBI= ácidos grasos biinsaturados. AGPI = ácidos grasos poliinsaturados. Los valores son expresados en porcentaje relativo al total de ácidos grasos. Las barras representan el promedio \pm intervalo de confianza. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0.05$ (t-student).59

Figura 19. Grupo de ácidos grasos de la fracción de lípidos afines a la acetona (AMPL) de *Ettlia oleoabundans* en el tratamiento control y limitación de nutrientes. AGS= ácidos grasos saturados. AGMI= ácidos grasos monoinsaturados. AGBI= ácidos grasos biinsaturados. AGPI = ácidos grasos poliinsaturados. Los valores son expresados en porcentaje relativo al total de ácidos grasos. Las barras representan el promedio \pm intervalo de confianza. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0.05$ (t-student).62

Figura 20. Grupo de ácidos grasos de la fracción de lípidos polares (PL) de *Ettlia oleoabundans* en el tratamiento control y limitación de nutrientes. AGS= ácidos grasos saturados. AGMI= ácidos grasos monoinsaturados. AGBI= ácidos grasos biinsaturados. AGPI = ácidos grasos poliinsaturados. Los valores son expresados en porcentaje relativo al total de ácidos grasos. Las barras representan el promedio \pm intervalo de confianza. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0.05$ (t-student).64

Figura 21. Pigmentos de *Ettlia oleoabundans* en el tratamiento control y en limitación de nutrientes. Los valores son expresados en $\mu\text{g mL}^{-1}$. Las barras representan el promedio \pm intervalo de confianza. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0.05$ (t-student).....66

Figura 22. Comparativo de la expresión global de genes (tomada de De Jaeger *et al.*, 2018) en las rutas metabólicas de azúcares y glicerol en *E. oleoabundans*. Los valores son expresados en % de peso seco. Abreviaciones: SN+: Agua de mar sin limitación de nitrógeno (De Jaeger *et al.*, 2018); SN-: Agua de mar con limitación de nitrógeno (De Jaeger *et al.*, 2018); C: Control agua de mar sin limitación de nutrientes (ésta tesis); T: Tratamiento agua de mar con limitación de nutrientes (ésta tesis). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0.05$89

Lista de tablas

Tabla I. Clasificación taxonómica de <i>Ettlia oleoabundans</i> (Guiry y Guiry, 2018).....	4
Tabla II. Concentración final de nutrientes en el medio de cultivo utilizado en el tratamiento control, limitación de nutrientes y medio F/2.	30
Tabla III. Condiciones de operación del HPLC para la determinación de pigmentos.	44
Tabla IV. Características del gradiente de solventes.	45
Tabla V. Rendimiento y productividad de biomasa de <i>Ettlia oleoabundans</i> en el tratamiento control y en limitación de nutrientes.....	47
Tabla VI. Perfil de ácidos grasos de <i>Ettlia oleoabundans</i>	57
Tabla VII. Perfil de ácidos grasos en la fracción de lípidos neutros (NL) de <i>Ettlia oleoabundans</i>	60
Tabla VIII. Perfil de ácidos grasos en la fracción de lípidos afines a la acetona (AMPL) de <i>Ettlia oleoabundans</i>	63
Tabla IX. Perfil de ácidos grasos en la fracción de lípidos polares (PL) de <i>Ettlia oleoabundans</i>	65
Tabla X. Concentración de pigmentos en <i>Ettlia oleoabundans</i>	66

1. INTRODUCCIÓN

La producción sostenible y renovable de energía y alimentos para una población mundial creciente es un desafío permanente en la investigación actual que debe abordarse con urgencia, debido a la dependencia del mundo de los combustibles fósiles limitados y al aumento del nivel de vida de las economías emergentes. Se ha planteado el estudio de plataformas de energía renovable basadas en cultivos agrícolas oleaginosos, como aceite de palma, maíz y soya. Aunque estos cultivos se consideran renovables y de base biológica, aumentan la competencia por los alimentos, el agua dulce, la cantidad de tierra cultivable disponible y el resultado de la deforestación para crear plantaciones. Una alternativa es el uso de tierras que no son aptas para la agricultura tradicional, como tierras salobres o muy secas, como los desiertos. Las microalgas se han considerado como un recurso prometedor para ser empleado en la alimentación en comparación con los cultivos tradicionales para la producción de aceite (De Jager *et al.*, 2018).

Las microalgas son un grupo de organismos fotosintéticos unicelulares fotoautotróficos; poseen una elevada capacidad de adaptación por lo que su distribución ecológica es muy amplia, ya que se les encuentra en cualquier hábitat (Ikarán, 2011). Pueden producir altas cantidades de lípidos neutros, triacilglicerol (TAG), cuando se exponen a condiciones de crecimiento desfavorables, como la deficiencia de nitrógeno u otros nutrientes. Los TAG se pueden convertir en biodiesel por metilación, lo que resulta en un combustible que puede reemplazar a los combustibles derivados del petróleo (Chisti, 2007). Las moléculas de TAG también se pueden usar directamente en la industria de alimentos y piensos como un reemplazo sostenible del aceite vegetal. El uso de especies de microalgas marinas y/o tolerantes a la salinidad para producir TAG, provee la ventaja de reducir el consumo de agua dulce (De Jager *et al.*, 2018). Adicionalmente, en la biorrefinería de microalgas, se utilizan las fracciones no lipídicas para la extracción de otros metabolitos que puedan ser ofertados como compuestos de alto valor agregado (Chew, 2017). Ejemplos de éstos, son pigmentos, proteínas, polisacáridos, vitaminas y antioxidantes, que tienen aplicaciones en las industrias tales como cosmética, nutricional y farmacéutica.

Ettlia oleoabundans es una microalga oleaginosa que se puede cultivar tanto en agua dulce como en agua de mar (Arredondo-Vega *et al.*, 1995). La producción de TAG generalmente incluye una fase de crecimiento de biomasa en condiciones “óptimas” de nutrientes seguida de una fase en condiciones de estrés (variaciones en el pH, intensidad luminosa, ciclos de luz: oscuridad, salinidad y nitrógeno).

Las microalgas han recibido mucho interés como materia prima para la obtención de biocombustibles; sin embargo, hasta el momento, ello no es económicamente viable debido al costo que implica la cosecha de la biomasa. Además, el precio del medio de cultivo es un componente significativo del total en la producción microalgal, por lo que en la actualidad, se buscan alternativas de enriquecimiento, como el uso de fertilizantes agrícolas así como de aguas residuales. En este trabajo, se seleccionó como modelo de estudio a la microalga oleaginosa *E. oleoabundans*, utilizando como medio de cultivo alternativo, el fertilizante agrícola comercial (Fertiplus®) en agua de mar, y se evaluó el efecto de la limitación de nutrientes (nitrógeno) en la producción de compuestos de alto valor agregado.

2. ANTECEDENTES

2.1 *Ettlia oleoabundans* y su potencial biotecnológico

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos unicelulares que se han utilizado como complemento alimenticio natural, como colorante alimentario, en procesos biotecnológicos y en la producción de compuestos de alto valor agregado, tales como los ácidos grasos altamente insaturados de la familia omega 3 (ω 3): ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA), y de la familia omega 6 (ω 6): ácido araquidónico (ARA); pigmentos (clorofilas, carotenoides, ficobiliproteínas), polisacáridos (sulfatados), antioxidantes enzimáticos, superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxidasa (POX), glutatión peroxidasa (GPx), vitaminas (A, E, C) (Borowitzka, 1998; Pulz y Gross, 2004; Spolaore *et al.*, 2006). Diversos trabajos con microalgas de ambientes dulceacuícolas, marinos y salobres han demostrado que, cultivadas en condiciones de estrés, como deficiencia de nitrógeno, alta intensidad luminosa, entre otros, acumulan de 30 a 50% de TAG con respecto a su peso seco (Chisti 2007; Garibay *et al.*, 2013; Gushina y Harwood 2006; Hu *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008; Pruvost *et al.*, 2009; Scott *et al.*, 2011;).

Neochloris oleoabundans Chantanachat y Bold (sinónimo taxonómico de *Ettlia oleoabundans*) es un miembro unicelular de Neochloridaceae (Chlorophyta; Deason *et al.*, 1991). *Neochloris* fue clasificado por Starr (1955) en Chlorococcaceae (Tabla I). Deason *et al.* (1991) sugirieron la reclasificación como *Ettlia oleoabundans* (Fig. 1). Sin embargo, en los artículos publicados posteriormente, siguieron utilizando el nombre de *Neochloris oleoabundans*. Garibay *et al.* (2017) verificaron la identificación de la cepa *Neochloris oleoabundans* (UTEX 1185) usando el marcador proteico (ADN ribosomal 18S), reclasificándola como *E. oleoabundans*.

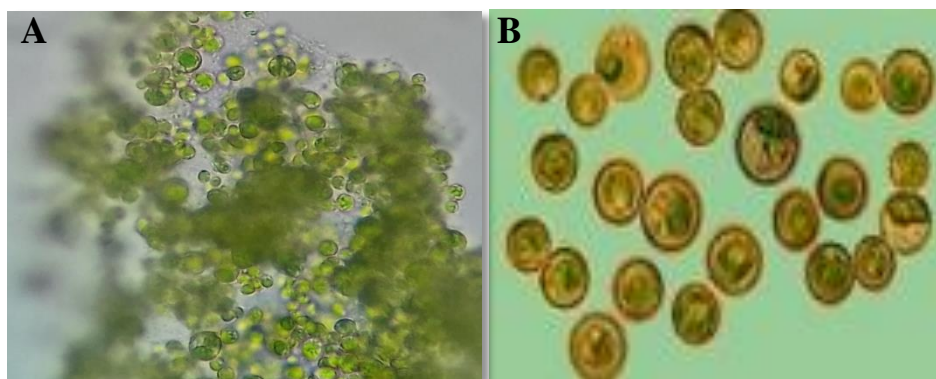


Figura 1. Fotografías microscópicas de *Ettlia oleoabundans*. A) Objetivo 40X. B) Objetivo 100X.

E. oleoabundans es una microalga esférica, uninucleada, contiene un cloroplasto en forma de copa con uno o más pirenoides (Deason *et al.*, 1991). Es un organismo edáfico, aislado de las dunas de Arabia Saudita (Chantanachat y Bold, 1962). Fue descrito como un organismo de agua dulce, y se cultiva comúnmente en los medios Bristol GR, o medios minerales similares (Bold, 1949; Lopes da Silva *et al.*, 2009). Es una microalga oleaginosa ya que contiene del 25-30% de lípidos totales con respecto al peso seco, y en condiciones de estrés como deficiencia de nitrógeno, puede acumular hasta el 56% (Garibay *et al.*, 2013). Es un organismo halotolerante, capaz de crecer en concentraciones de 35 g L^{-1} de NaCl, modificando su composición bioquímica con respecto al cultivo en agua dulce (Arredondo-Vega *et al.*, 1995).

Tabla I. Clasificación taxonómica de *Ettlia oleoabundans* (Guiry y Guiry, 2018).

DOMINIO: EUKARYOTA
Phylum: Chlorophyta
Clase: Chlorophyceae
Orden: Chlamydomonadales
Familia: Chlamydomonadales incertae sedis
Género: Ettlia
Especie: oleoabundans

2.2 Función de los nutrientes en el crecimiento microalga

Para el crecimiento óptimo de las microalgas, debe suministrarse a los cultivos nutrientes en cantidades adecuadas. Hay muchas variaciones en los requerimientos nutritivos (en cantidad) entre las distintas especies y dentro de cada especie varían en función de distintas condiciones ambientales, como luz, temperatura, pH. Si las condiciones permiten una tasa de crecimiento alta, los requerimientos nutritivos son mayores. El crecimiento microalgal y la incorporación de nutrientes no siguen una relación simple, siendo dependientes de factores como las concentraciones internas y externas, tasas de difusión y de las especies (Abalde *et al.*, 1995).

Los nutrientes inciden en la velocidad de crecimiento y en la composición bioquímica de las células en cultivo. Dependiendo de los requerimientos, se dividen en macronutrientes y micronutrientes. Los primeros son aquellos que forman parte de las moléculas estructurales de las microalgas, como carbono (C), nitrógeno (N), oxígeno (O), hidrógeno (H) y fósforo (P), además de calcio (Ca^{+2}), magnesio (Mg^{+2}) y potasio (K^{+}). Los micronutrientes son aquellos que se requieren en cantidades mínimas y forman parte de moléculas esenciales, como factores de crecimiento o enzimas, o son necesarios para la activación de éstas. Se necesitan los micronutrientes: hierro (Fe^{+3}), manganeso (Mn^{+2}), cobre (Cu^{+2}), molibdeno (Mo^{+2}) y cobalto (Co^{+2}), así como bajas concentraciones de vitaminas como la tiamina, biotina y B_{12} (Abalde *et al.*, 1995).

Debido a que casi el 50% de la biomasa microalgal se compone de C, el aire es fundamental para el crecimiento de la microalga, ya que contiene la fuente de C inorgánica en forma de CO_2 (0.038%), necesaria para la fotosíntesis (Le Quéré *et al.*, 2009). El C suministrado a un cultivo de microalgas puede proceder también de fuentes orgánicas (glucosa, fructosa, acetato, glicerol). El aporte de CO_2 mediante aireación facilita la mezcla del cultivo, impide la sedimentación celular, favorece la exposición de las células a la luz y a los nutrientes, y mejora el intercambio de gas entre el medio de cultivo y el aire. El C forma parte de la estructura de los carbohidratos que pueden ser estructurales y de reserva. Los primeros, se encuentran como componentes principales de las paredes celulares, y los segundos, se

acumulan principalmente en los cloroplastos, en condiciones de limitación de nutrientes o de saturación de luz (Geider y La Roche, 2002; León-Saiki, 2018).

Después del C, el N es cuantitativamente el elemento que tiene una mayor contribución a la materia seca de las células microalgales. El crecimiento de todos los organismos depende de la disponibilidad de nutrientes minerales, y ninguno es más importante que el N, que se requiere en grandes cantidades como un componente esencial de péptidos, proteínas, enzimas, clorofilas, moléculas de transferencia de energía, material genético y otros constituyentes celulares (Barsanti *et al.*, 2014).

La principal fuente de N en microalgas suele ser inorgánica, en forma de amonio (NH_4^+), nitratos (NO_3^-) y nitritos (NO_2^-) (Kaplan *et al.*, 1986); aunque a veces se utiliza una fuente orgánica como la urea (NH_2CONH_2). Cuando el N se incorpora en forma oxidada como NO_3^- o NO_2^- , debe ser reducido antes de que pueda incorporarse a moléculas orgánicas. La reducción de NO_3^- ocurre en dos pasos catalizados por las enzimas nitrato reductasa (NR) y nitrito reductasa (NiR). La mayoría de las microalgas son capaces de utilizar N en forma de NO_2^- (Fig. 2), aunque no es tan abundante en la naturaleza como las otras formas de N inorgánico. Además, el NO_2^- en altas concentraciones puede inhibir el crecimiento de las microalgas (Cresswell y Syrett, 1981; Morris, 1974).

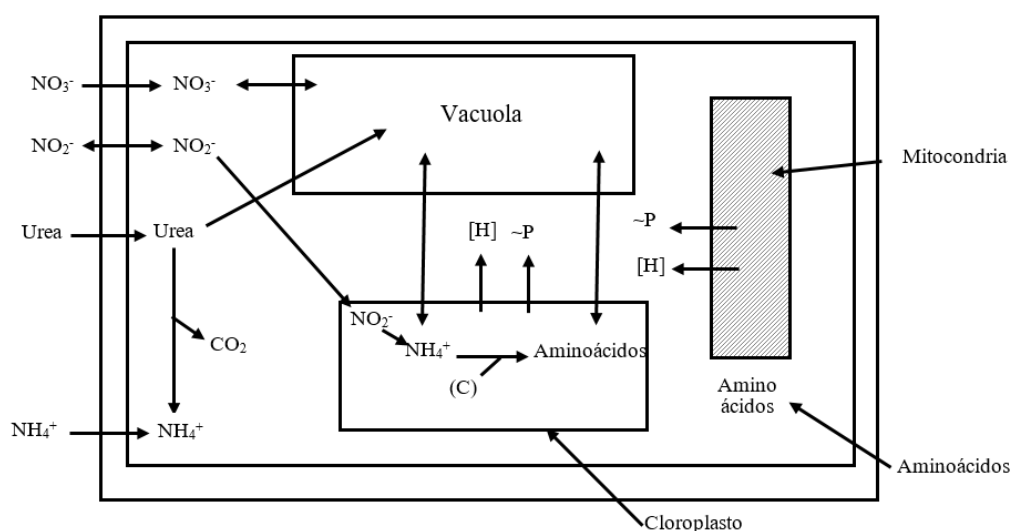


Figura 2. Metabolismo del nitrógeno en microalgas (Syrett, 1987).

El N es también un factor crítico para regular el contenido de lípidos de las microalgas (Park *et al.* 2011). La deficiencia de éste afecta no sólo a los rendimientos microalgales, sino que también cambia las vías anabólicas de la síntesis de proteínas hasta la acumulación de carbohidratos o lípidos (León-Saiki, 2018). Típicamente, las microalgas tienen un contenido lipídico aproximadamente del 20% (Park *et al.* 2011), pero cuando el N se convierte en el factor limitante del crecimiento, la acumulación de los niveles de lípidos aumenta (Garibay *et al.*, 2013; Ho *et al.*, 2012; Ho *et al.*, 2013; León-Saiki, 2018; Park *et al.*, 2011). Sin embargo, usando la limitación de N para estimular la acumulación de lípidos en las células de microalgas, se reduce la producción de biomasa microalgal, lo que sugiere que las dos condiciones, alto contenido en lípidos y alta productividad, pueden ser mutuamente excluyentes (Park *et al.* 2011). La deficiencia de N también influye directamente en la formación de aminoácidos, lo cual a su vez limita la traducción del ARNm (ácido ribonucleico mensajero) y por lo tanto, se reduce la síntesis de proteínas. Por otra parte, la eficiencia del fotosistema II (FSII) disminuye inicialmente como una consecuencia de la disipación térmica de la energía de excitación absorbida por el aparato fotosintético, derivando en una disminución de la tasa de fotosíntesis, lo cual a su vez lleva a una reducción en la tasa de respiración (Wehr, 2007). La tasa de crecimiento microalgal es una función de las reservas intracelulares del nutriente limitante; cuando está disponible, la abundancia del nutriente determina su tasa de asimilación y su almacenamiento intracelular (Paulín, 2011). Si hay producción continua de la microalga, la cantidad de reservas intracelulares contenidas en cada organismo disminuye. La reducción del nutriente limitante lleva a una disminución en la tasa de crecimiento hasta que alcanza su valor mínimo, momento en el cual no puede haber más crecimiento (fase estacionaria) (Lampert y Sommer, 2007).

El P es fundamental en muchos procesos celulares, tales como la formación de ácidos nucleicos y transferencia de energía (Grobelaar, 2004). Aunque el contenido de P de las microalgas es menor al 1%, su deficiencia en el medio de cultivo es una de las mayores limitaciones del crecimiento. El P también tiene un papel fundamental en la formación de las membranas celulares constituidas por fosfolípidos; además, se encuentra en los ácidos nucleicos, por lo que su presencia es necesaria en la reproducción y división celular (Butusov

y Jernelöv, 2013). Como fuente de P se utiliza principalmente el fosfato inorgánico. Su deficiencia provoca un descenso en la síntesis de ácidos nucleicos, ATP (adenosina trifosfato) y clorofila (Boney, 1989). El Mg^{+2} forma parte de la molécula de la clorofila y determinan la agregación de los ribosomas (Kaplan *et al.*, 1986).

Los micronutrientes son requeridos en bajas concentraciones y en exceso resultan tóxicos. El primero de ellos es el Fe^{+3} , necesario para todas las especies de microalgas. Es imprescindible para el metabolismo del N, fotosíntesis y síntesis de citocromos (Abalde *et al.*, 1995). El Fe^{+3} es un componente básico para los procesos biológicos de oxidación-reducción. Algunas funciones del Fe^{+3} resultan de su participación en la producción de clorofila y de una proteína del FSI, la ferredoxina, que participa en la formación del potencial reductor durante la fotosíntesis, por lo tanto, su ausencia tendrá efecto en el crecimiento de organismos autótrofos oxigénicos (Stewart, 1974).

El azufre (S), es un elemento presente principalmente en proteínas, como parte de la estructura de los aminoácidos cisteína y metionina, en cofactores y en otras estructuras químicas implicadas en funciones de diversa naturaleza, desde reacciones redox hasta funciones antioxidantes y de resistencia a metales (Gaur y Rai, 2001; Gross, 2000). El S se toma como sulfato (SO_4^{+2}) inorgánico y es fundamental para la división celular.

La cantidad requerida de Ca^{+2} varía mucho entre especies y está relacionada con el tipo de pared celular que tenga la microalga. El cloro (Cl) es fundamental para la fotosíntesis. El Mn^{+2} y el Cu^{+2} forman parte de la cadena de transporte electrónico y son cofactores de enzimas. El Cu^{+2} causa peroxidación de lípidos a través de la formación de radicales libres por reacción redox de sus dos valencias (Cu^+ y Cu^{+2}) (Klotz *et al.*, 2003). Es un cofactor de sistemas enzimáticos antioxidantes (por ejemplo, SOD) y enzimas de la cadena de transporte de electrones (Ahmed *et al.*, 2003; Maage, 1994; Manduzio *et al.*, 2003; Muniz-Rossa *et al.*, 2002). El Mo^{+2} es necesario para la asimilación del N. El Co^{+2} se requiere en aquellas microalgas que sintetizan vitamina B₁₂, al igual que vitaminas en bajas concentraciones como la tiamina y la biotina (Abalde *et al.*, 1995).

La carencia de algún micronutriente puede provocar reducción en la concentración celular de los pigmentos fotosintéticos y de las proteínas en los cultivos de microalgas, dificultando así la fijación fotosintética de CO₂ (Ben-Amotz *et al.*, 1987; Cakmak *et al.*, 2012). Otros elementos también son necesarios para el cultivo de microalgas; tanto macronutrientes (K⁺, Na⁺, Fe⁺², Mg⁺², Ca⁺²) como micronutrientes o elementos traza (B⁺³, Cu⁺², Mn⁺², Mo⁺², Zn⁺², Se⁺²). Muchos de estos elementos traza son relevantes en reacciones enzimáticas y en la biosíntesis de compuestos necesarios para el metabolismo. Al igual que el P, estos micronutrientes muestran cierta afinidad por otros compuestos del medio y precipitan. Para evitar este problema, se añaden al medio agentes quelantes de metales, como el ácido etilen diamino tetraacético (EDTA).

2.3 Medios de cultivo

Uno de los obstáculos en la producción industrial de microalgas es la formulación y preparación de un medio de cultivo química y económicamente apropiado. Los medios de cultivo utilizados para las microalgas se pueden agrupar en tres categorías: medios completamente sintéticos, medios basados en aguas naturales enriquecidas con suplemento mineral y medio a base de la utilización de aguas residuales. Los medios de cultivo sintéticos pueden ser comerciales o prepararse en cada laboratorio a partir de sus componentes. El enriquecimiento del agua dulce o agua de mar natural con diferentes nutrientes químicos aumenta el crecimiento y las tasas de división de los cultivos microalgales. En el caso de especies marinas, se ha utilizado agua de mar artificial para cultivos masivos exteriores, aunque es prohibitivamente caro preparar los volúmenes requeridos para aplicaciones comerciales; por lo tanto, es preferible el agua de mar natural (Abalde *et al.*, 1995).

El precio del medio de cultivo es un componente significativo del costo total de la producción microalgal. Por esta razón se han desarrollado métodos de enriquecimiento simplificado, menos caros, particularmente para sistemas exteriores donde se cultivan grandes volúmenes de agua. El método más simple es añadir fertilizantes de nitrato/fosfato al agua, en una proporción de N:P entre 5:1 y 15:1 dependiendo de las especies microalgales cultivadas y de las condiciones locales (Geldenhays *et al.*, 1985). La adición de fertilizantes al agua de mar

es más beneficiosa para algunas especies microalgales que para otras. Por ejemplo, en ensayos comparativos Spectoroba *et al.* (1982) observaron que *Dunaliella salina* creció igualmente bien en medios simples enriquecidos que en formulaciones más complejas. Fábregas *et al.* (1987) reportaron que el agua de mar fertilizada no fue apropiada para el cultivo de *Tetraselmis*, pero al adicionar micronutrientes y extracto de suelo, aumentó el crecimiento celular. Estudios recientes utilizando agua de mar con los fertilizantes agrícolas Bayfolan® (Félix-Castro, 2016) y Fertiplus® (Portuguez-Solano *et al.*, 2018) mostraron tasas de crecimiento de 0.26 d^{-1} y 0.17 d^{-1} en *N. oleoabundans* y en *Nanofrusutulum shiloi*, respectivamente.

2.4 Factores que influyen en la composición bioquímica microalgal

Las condiciones de estrés ambiental en las microalgas favorecen la acumulación de compuestos de almacenamiento, como los lípidos y carbohidratos. En *E. oleoabundans*, se ha reportado que en pH elevados, estrés salino, así como la deficiencia de nitrógeno inducen altos contenidos de lípidos (hasta 80% de TAG), con un perfil de ácidos grasos constituidos principalmente por saturados y monoinsaturados de 14 a 20 carbonos, característica que se considera ideal para fines de producción de biodiesel (Garibay *et al.*, 2013).

En los últimos años se han reportado estudios relacionados con diferente tipo de estrés en *E. oleoabundans*. Popovich *et al.* (2012) evaluaron las condiciones óptimas, así como el estrés por deficiencia de nitrógeno en el cultivo de *E. oleoabundans*, enfocado hacia la síntesis sostenible de aceite como materia prima para la producción de biodiesel. En condiciones óptimas obtuvieron una tasa de crecimiento de $0.73 \text{ div día}^{-1}$ y rendimiento de la biomasa de 1.5 g L^{-1} . En estrés por deficiencia de nitrógeno, obtuvieron 26% de lípidos totales y una productividad de $56 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Los lípidos neutros se caracterizaron por un dominio de ácidos grasos monoinsaturados, que son adecuados para producción de biodiesel. En cuanto a las proteínas totales, hubo una disminución significativa de 30 a 24%, mientras que en los carbohidratos no se observaron diferencias significativas entre tratamientos.

Garibay *et al.* (2013) evaluaron el efecto de la limitación de nitrógeno sobre el crecimiento y composición bioquímica en *E. oleoabundans*. Las concentraciones probadas (0 a 1 mM de

NO_3^-), con incrementos de 0.2 mM de NO_3^- fueron suficientes para modificar significativamente la respuesta de la microalga. Hubo una reducción en la proliferación celular así como un aumento en la acumulación simultánea de dos compuestos de almacenamiento, lípidos y carbohidratos, constituido éste último por almidón.

Winter *et al.* (2017) cultivaron a la microalga *Neochloris oleoabundans* en un fotobiorreactor operado de forma continua e investigaron la influencia de la duración de horas luz sobre los ritmos circadianos y varios ciclos de luz:oscuridad (20:4, 16:8 y 12:12) con el objetivo de lograr la sincronización celular. La tasa de crecimiento máximo, el inicio de la síntesis de almidón y replicación del ADN (4 y 8 copias) se regularon por el ritmo circadiano. En cuanto a la duración del fotoperiodo, observaron cambios principalmente en el contenido de almidón, observando que a más horas de luz hubo mayor acumulación de almidón, el cual fue utilizado para la división celular. De lo anterior, concluyeron que es importante conocer el momento de la división celular y considerar el fotoperiodo para la sincronización celular. Este mecanismo se puede explorar para producir biomasa con una concentración deseada de proteínas, lípidos, carbohidratos o pigmentos.

De Jagger *et al.* (2018) secuenciaron el transcriptoma de *N. oleoabundans* en cuatro condiciones de cultivo: agua dulce y agua salina, en suficiencia y deficiencia de nitrógeno para dilucidar el mecanismo osmoregulador. Además, estudiaron la ruta metabólica de acumulación de lípidos e identificaron las vías responsables de la adaptación de la cepa para crecer en medio salino. Los resultados mostraron que la prolina y el ciclo de glutatión-ascorbato fueron los responsables de la regulación osmótica, ya que los genes involucrados en su biosíntesis se encontraron regulados positivamente. La acumulación de aceite en deficiencia de nitrógeno aumentó significativamente tanto en agua dulce (12.1%) como salina (10.3%). Estos hallazgos abren las posibilidades de estudiar el mecanismo de biosíntesis de osmolitos de interés biotecnológico en microalgas, y crear una plataforma de producción sostenible de compuestos de alto valor agregado.

León-Saiki (2018) analizó en la microalga dulceacuícola *Tetradismus obliquus* el papel que desempeña el almidón en el metabolismo de la cepa. Observó que tanto en condiciones de suficiencia como de limitación de nitrógeno, el almidón sirve como compuesto de

almacenamiento de energía diurna, que se puede utilizar durante el período de oscuridad para proporcionar energía y carbono.

2.5 Fotosíntesis en microalgas y fluorescencia *in vivo* de la clorofila *a*.

La fotosíntesis es el proceso por el cual las plantas, algas (macro y microalgas), cianobacterias y bacterias fotosintéticas convierten la energía luminosa en energía química. El proceso fotosintético se inicia cuando la luz es absorbida por los pigmentos fotosintéticos (clorofila *a*, *b* y carotenoides) de los complejos antena del aparato fotosintético. Parte de la energía absorbida es transferida como energía de excitación y atrapada por el centro de reacción en donde es utilizada para hacer trabajo químicamente útil, la otra parte de la energía es disipada como calor y en menor grado, reemitida como energía luminosa de baja energía (fluorescencia) (Fig. 3). Esta distribución de la energía en los tres procesos ocurre simultáneamente, de tal forma que el incremento en la eficiencia de uno de ellos, resultará en la disminución de los otros dos. Por lo tanto, a través de la medida del rendimiento de la fluorescencia de la clorofila *a*, se puede obtener información de la eficiencia fotoquímica y la disipación térmica de la energía absorbida (Maxwell y Johnson, 2000; Moreno *et al.*, 2008).

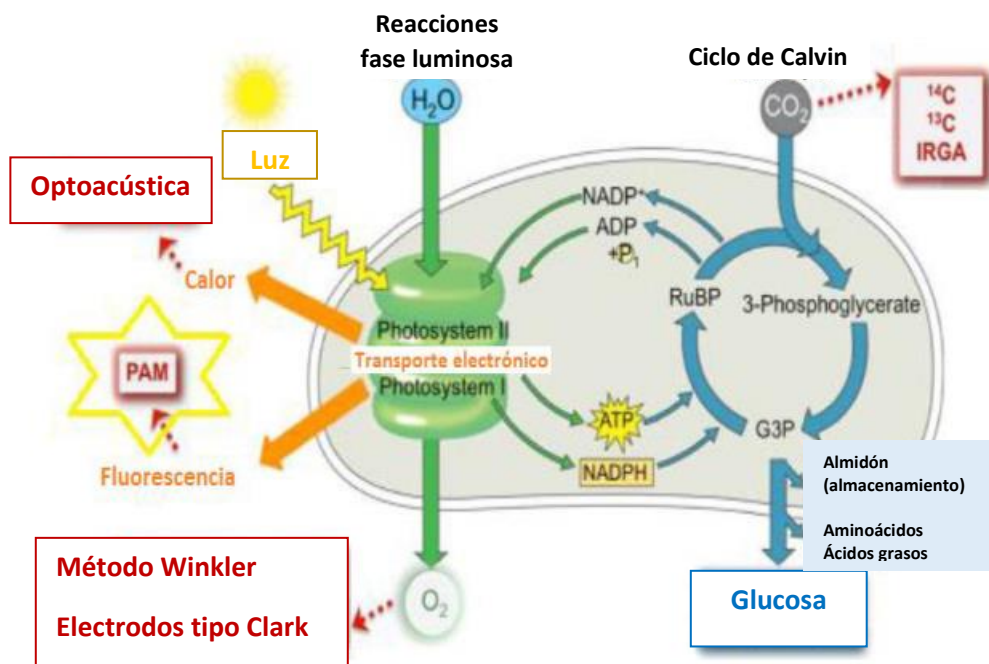


Figura 3. Visión general del proceso fotosintético. La luz absorbida en forma de energía es usada fotoquímicamente durante las reacciones luminosas. El exceso de energía que no entra a formar parte de la vía fotoquímica, es reemitida como calor o fluorescencia. Para medir la fluorescencia como proceso involucrado en la fotosíntesis, se hace uso del fluorómetro de amplitud modulada (PAM). (Tomada de Gil-Jerez, 2015).

El análisis de la emisión de fluorescencia de la clorofila *a* del FSII del aparato fotosintético de organismos fotoautótrofos (plantas terrestres, acuáticas y algas), sirve para caracterizar los efectos de diferentes tipos de estrés ambiental (temperatura, sequía, alta intensidad luminosa, salinidad, deficiencia de nutrientes), así como de diversos contaminantes del agua y aire. Este análisis no invasivo o destructivo, rápido y sensible, puede ser aplicado *in situ* e *in vivo* o a cloroplastos aislados.

Mecanismo: En los complejos antena, la energía de un fotón absorbido se suma a la energía de la molécula de pigmento que la absorbe, quedando ésta en un estado excitado inestable, con marcada tendencia a ceder este exceso de energía, denominado energía de excitación o excitón, y volver al estado fundamental de energía mínima.

La des-excitación se efectúa por tres rutas, a) pérdida de energía como calor, b) como transferencia de energía a otras moléculas cercanas, y c) liberación de energía radiante como fotón visible de menor energía (fluorescencia) que la que causó la formación del estado excitado.

La energía transferida entre las clorofilas de las antenas y canalizada al centro de reacción de las clorofilas hace que en éstas un electrón pase del estado basal a un estado excitado. Cuando la molécula de clorofila excitada pierde un electrón, se produce la separación de carga eléctrica dentro del centro de reacción (quedando la clorofila *a* oxidada (Chl a^+) y una molécula de feofitina aceptora del electrón reducida (Pheo⁻, por su abreviatura en inglés). Esto se conoce como evento fotoquímico primario y utiliza alrededor del 97% de los fotones absorbidos, mientras que el 2.5% son transformados a calor y 0.5% son reemitidos como luz fluorescente roja. Si no ocurre la separación de carga, 95-97% de la energía luminosa absorbida se libera como calor y 2.5-5% como fluorescencia. En las plantas, las moléculas de clorofila *a* asociadas a los FSII y FSI son las responsables de la emisión de la fluorescencia; sin embargo, a temperatura de ambiente (25°C), la contribución del FSI a la emisión total es mínima, en comparación con el FSII (Moreno *et al.*, 2008).

Las características cinéticas de la reacción de la fluorescencia emitida están determinadas por: a) la intensidad luminosa de excitación, b) la concentración de pigmentos que absorben la luz, c) la transferencia de la energía de excitación, d) la naturaleza y orientación de los pigmentos fluorescentes, e) el estado redox de aceptores y donadores del FSII, f) el apilamiento de los tilacoides y g) la translocación de protones. En condiciones naturales, *in vivo*, la emisión de fluorescencia de los sistemas fotosintéticos cambia continuamente siguiendo su adaptación a los cambios ambientales. Diversos factores físicos o químicos de estrés ambiental, como temperatura extrema, sequía, cambios en la intensidad luminosa, salinidad, deficiencias nutricionales, presencia de metales pesados, detergentes, herbicidas y ozono, afectan las funciones del FSII de manera directa o indirecta, lo cual modifica la emisión de la fluorescencia. Por ello, los cambios en la emisión de la fluorescencia pueden utilizarse para revelar los mecanismos de respuesta, así como la cuantificación de respuestas al estrés e identificación de ciertos contaminantes y sus fuentes (Moreno *et al.*, 2008).

2.5.1 El método de pulso de saturación

Los fluorómetros de pulso de amplitud modulada (PAM, por sus abreviaciones en inglés) se utilizan ampliamente para medir la fluorescencia de clorofila *a* del FSII mediante el método de pulso de saturación. En estos instrumentos, la luz de medición se modula, se enciende y apaga a alta frecuencia, y el detector sólo detecta la fluorescencia excitada por esta luz de medición. El método del pulso de saturación (Fig. 4) implica el análisis de los componentes de extinción fotoquímicos y no fotoquímicos. Se basa en el estado redox de los centros de reacción. En la oscuridad, los centros de reacción están "abiertos", lo que indica que el primer aceptor de electrones, la quinona A (QA) está oxidada y por lo tanto, los centros de reacción son capaces de realizar una reducción fotoquímica de QA. La exposición a la luz de medición (no actínica) de una célula adaptada a la oscuridad, garantiza que QA permanezca completamente oxidada y da como resultado un nivel mínimo de fluorescencia (F_0) (Gil-Jerez, 2013). Después de aplicar un pulso de luz saturante, la QA se reducirá al máximo, de modo que la extinción fotoquímica se reduce a cero y la extinción no fotoquímica es insignificante; por lo tanto, se alcanza el nivel máximo de fluorescencia (F_m). La diferencia entre F_0 y F_m se conoce como fluorescencia variable (F_v).

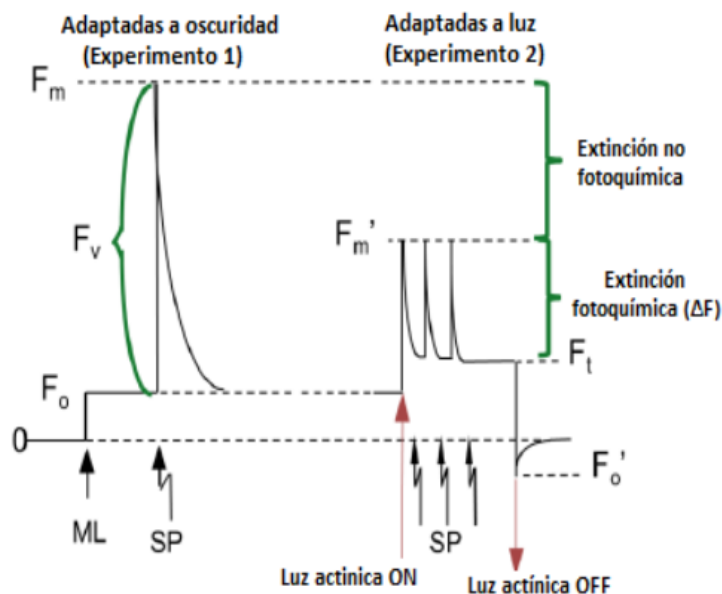


Figura 4. El método del pulso de saturación. Bajo luz de medición (ML) se cuantifica el nivel mínimo de fluorescencia (F_0). Después de aplicar el pulso de luz de saturación (SP), se alcanza la fluorescencia máxima (F_m). A continuación, la muestra se ilumina con luz actínica (AL) y una serie de pulsos de saturación para alcanzar el estado estable (F') y la fluorescencia máxima (F_m'). Finalmente, la luz actínica se cambia a la fluorescencia mínima después de la iluminación (F_0'). (Tomada de Gil-Jerez, 2015).

Los centros de reacción de las células adaptadas a la luz tienen QA reducido y se denominan "cerrados". En condiciones de luz, se induce la extinción no fotoquímica (NPQ) que está inversamente relacionada con la extinción fotoquímica y se considera una válvula de seguridad que protege a los centros de reacción del FSII del daño por irradiación excesiva (Masojídek *et al.*, 2013). Cuando QA está reducido, hay un nivel mínimo de fluorescencia, denominado F' (el apóstrofe (') es indicativo de valores medidos en células adaptadas a la luz), y la NPQ reduce el rendimiento de fluorescencia. Por lo tanto, después de un pulso de luz de saturación, el valor máximo de fluorescencia alcanzable será menor (F_m'). En la oscuridad, se puede estimar el rendimiento cuántico del FSII, mediante la normalización de la fluorescencia variable, hasta el rendimiento máximo de fluorescencia (F_v/F_m). En condiciones de luz, no se logra la máxima eficiencia, pero el rendimiento cuántico efectivo

Y(II) se puede calcular como $\Delta F/F_m'$ (Cosgrove y Borowitzka, 2010). El método para determinar Y(II) se conoce como análisis del pulso de saturación.

2.5.2 Medida de la fluorescencia *in vivo* de la clorofila *a*

La determinación de la fotosíntesis en microalgas presenta dificultades debido a diversos mecanismos de foto-aclimatación y a sistemas complejos de regulación (MacIntyre *et al.*, 2002). En el cultivo masivo de microalgas, como en los fotobiorreactores cerrados y sistemas de cultivo abierto, aumentan las dificultades para determinar el rendimiento fotosintético, debido a la alta absorción de luz, concentración celular y heterogeneidad (variaciones espacio-temporales) en los sistemas de cultivo (Masojíddek *et al.*, 2011). El desarrollo de metodologías no intrusivas ha llevado a mediciones rápidas y sensibles de los cambios en el estado fisiológico de las plantas acuáticas sometidas a estrés lumínico (Suggett *et al.*, 2011). La medida de la fluorescencia de la clorofila *a* por pulsos de amplitud modulada (PAM) del FSII se desarrolló principalmente para evaluar reacciones primarias fotosintéticas en estudios de fisiología vegetal de plantas superiores (Baker y Oxborough, 2004; Schreiber *et al.*, 1986).

La fluorescencia *in vivo* de la clorofila *a* se mide con fluorómetros. Los instrumentos disponibles de pulso de amplitud modulada (PAM) presentan diferentes características espectrales de medición y luz actínica, sensibilidad, así como otras características técnicas. En algunos fluorómetros, la excitación modulada de la fluorescencia se produce mediante un LED azul (emisión de longitud de onda máxima: 445 nm) en dos frecuencias de modulación (5 y 100 Hz). La luz actínica es proporcionada por el mismo LED de potencia que se utiliza para la luz modulada, al igual que los pulsos de saturación. El flujo máximo de fotones durante los pulsos de saturación es de $10,000 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 1 mm de distancia de la punta de la guía. La guía de luz está hecha de fibra de plástico y tiene 40 cm x 1.5 mm (largo x diámetro) (Figuroa *et al.*, 2013).

2.6 Especies reactivas de oxígeno (ERO) y estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como una alteración del equilibrio entre las especies pro-oxidantes y las antioxidantes, a favor de las primeras (Sies, 1986). Es un estrés de tipo bioquímico, derivado de la propia acción del metabolismo (Mano, 2002).

El funcionamiento de la cadena de transporte electrónico puede sufrir alteraciones como consecuencia de las condiciones ambientales o del estado de desarrollo, originándose especies reactivas de oxígeno (ERO). Las ERO son formas parcialmente reducidas del oxígeno (Sies, 1991) y su formación es un proceso normal, inevitable y constante en organismos que poseen un metabolismo energético basado en reacciones de oxidación-reducción (Mano, 2002). Cualquier alteración de las condiciones óptimas de cultivo incide de forma negativa en la fisiología del organismo y puede llegar a generar la producción de estrés oxidativo (Halliwell, 1987).

Las ERO difieren entre sí en las fuentes de las que proceden, los efectos que producen y su reactividad química. Se clasifican en radicales libres y especies no-radicales (Beckman *et al.*, 1993). Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado, que tienden a tomar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica, por lo que son altamente reactivos (Halliwell, 1993; Gutteridge *et al.*, 1982). Una vez que el radical libre ha conseguido el electrón que necesita para aparear su electrón libre, la molécula estable que le ha cedido el electrón se convierte en radical libre (por quedar con un electrón desapareado), iniciándose así una reacción en cadena (Mayo, 1986). Existen numerosas ERO (Fig. 5), entre las que podemos encontrar radicales libres, como el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y el radical hidroxilo (HO^{\bullet}) (Edreva, 2005); o formas no radicales, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el oxígeno singulete (1O_2) (Brivida *et al.*, 1997).

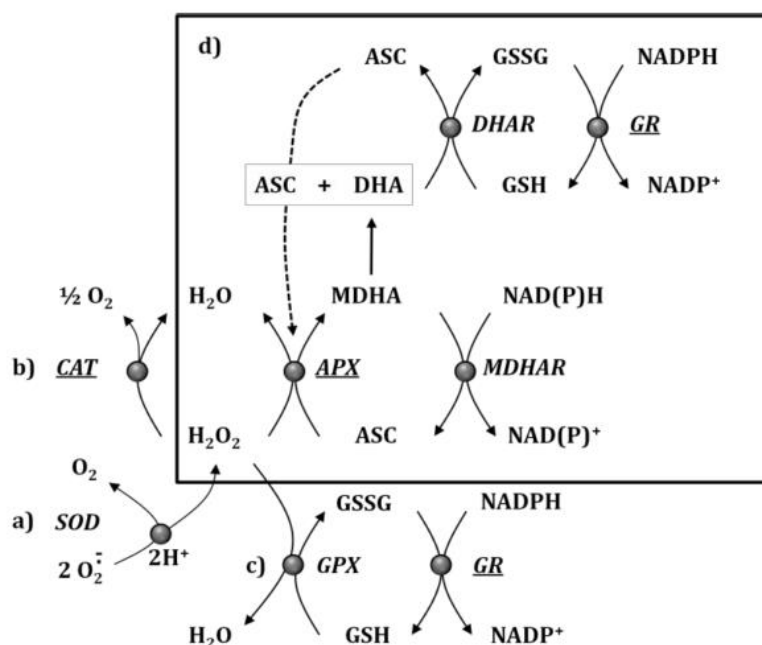


Figura 5. Sistemas enzimáticos antioxidantes. (a) El anión $O_2^{\bullet -}$ formado puede ser dismutado a H_2O_2 por la enzima superóxido dismutasa (SOD). (b) El H_2O_2 es eliminado por la catalasa (CAT); (c) en presencia de glutatión reducido (GSH) por la glutatión peroxidasa (GPX); (d) por el ciclo ascorbato-glutación mediante la ascorbato peroxidasa (APX). En los dos últimos casos, el GSH se genera vía glutatión reductasa (GR) (Tomado de Romero-Cruz, 2017).

2.6.1 ¿Cómo se forman las ERO?

Las ERO son continuamente producidas en plantas y microalgas por distintas rutas metabólicas (como la fotosíntesis o la respiración) con distinta localización subcelular, siendo los cloroplastos, las mitocondrias y los peroxisomas, los orgánulos donde se genera la mayor producción (Shahid *et al.*, 2014). Bajo condiciones normales de crecimiento la producción de ERO en la célula es baja ($240 \mu M s^{-1}$ de $O_2^{\bullet -}$ y $0.5 \mu M s^{-1}$ de H_2O_2), mientras que en condiciones de estrés los valores se incrementan notablemente ($720 \mu M s^{-1}$ de $O_2^{\bullet -}$ y $5-15 \mu M s^{-1}$ de H_2O_2) (Mittler, 2002).

Cuando la intensidad luminosa es alta, el aparato fotosintético absorbe más energía lumínica que la que suele utilizarse en reacciones metabólicas normales. Como consecuencia, la cadena de transporte electrónico del aparato fotosintético transfiere los electrones al O_2 ,

produciendo el H_2O_2 . El exceso de este compuesto propicia la formación de radicales HO^\bullet , oxidantes fuertes de ácidos orgánicos que pueden iniciar la formación en cadena de nuevos radicales altamente tóxicos para las células. Adicionalmente, la inhibición del transporte electrónico de la cadena fotosintética puede favorecer la transferencia de energía desde la clorofila *a* excitada por la luz hacia el O_2 , formándose el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$), el cual es altamente tóxico para las células debido a su reactividad. Por otra parte, en la cadena de transporte mitocondrial, los principales generadores de ERO son el complejo I y el complejo III, donde el 2% del O_2 consumido en la cadena se utiliza para la producción de H_2O_2 (Mittler, 2002).

La especie más reactiva es el radical HO^\bullet , un poderoso oxidante que puede dañar la mayoría de los compuestos orgánicos (Czapski, 1984). Por su parte, el anión $\text{O}_2^{\bullet-}$ inactiva ciertas enzimas con centros de Fe-S debido a su tolerancia a ser electrostáticamente atraído al átomo de Fe de estos centros catalíticos (Flint *et al.*, 1993). El H_2O_2 , aunque es menos reactivo que el $\text{O}_2^{\bullet-}$ y el HO^\bullet , desempeña el papel más importante en la señalización de los cambios estresantes debido a su elevada estabilidad y largo tiempo de vida media (Hung *et al.*, 2005). Esta especie puede oxidar las cadenas laterales de los aminoácidos e inducir la introducción de grupos carbonilos (Stadtman y Levine, 2003) y, al igual que el $\text{O}_2^{\bullet-}$, puede provocar cambios irreversibles oxidando directamente enzimas con grupos Fe-S, destruyendo la función enzimática (Flint *et al.*, 1993; Gardner y Fridovich, 1991). El H_2O_2 participa en la degradación oxidativa de proteínas, especialmente con la presencia de cofactores metálicos, tales como el hierro. En estos casos, el metal reacciona con el H_2O_2 a través de la reacción de Fenton para formar un radical HO^\bullet , (Elstner *et al.*, 1988), que rápidamente oxida un residuo aminoacídico, ya sea en el mismo sitio de unión al catión o en una región cercana al mismo.



Además de la reacción de Fenton, la generación de HO• también puede producirse en los organismos por la reacción de Haber-Weiss, en la cual, en presencia de O₂•⁻ y H₂O₂ se generan más HO•.



Algunas ERO desempeñan funciones importantes a nivel fisiológico, como en el crecimiento y el ciclo celular, la muerte celular programada, la respuesta a estrés abiótico y la defensa frente a patógenos (Foyer y Noctor, 2005; Fujita *et al.*, 2006; Mittler *et al.*, 2004). Las ERO también pueden dar lugar a reacciones de oxidación, provocando daños en diversos componentes celulares, como lípidos (Moran *et al.*, 1994; Munné-Bosch y Alegre, 2002), proteínas (Berlett y Stadtman, 1997), ácidos nucleicos (Sies, 1993), carbohidratos, ADN y otras macromoléculas (Hariyadi y Parkin, 1993; O’Kane *et al.*, 1996).

2.7 Efecto de los radicales libres

2.7.1 Oxidación de lípidos

Una molécula reactiva como el HO• ataca a los ácidos grasos constituyentes de TAG o fosfoacilgliceroles. La interacción del radical libre va dirigida a un doble enlace del carbono adyacente, ocasionando un rompimiento homolítico al sustraer un hidrógeno, que al unirse al radical, forma una molécula de agua, mientras que el ácido graso presenta un radical libre (electrón) en el carbono afectado por el hidroxilo (Paraskevaidis *et al.*, 2005). Una vez que a un fosfolípido se le arrebató un electrón, éste busca estabilizar su estructura química y toma el electrón de la molécula cercana, generándose así una reacción en cadena. A esto se le conoce como lipoperoxidación; los productos de la lipoperoxidación son aldehídos, cetonas, ésteres, alcoholes. Este proceso repetitivo conduce a perder las propiedades fisicoquímicas de la membrana celular y pueden culminar con la muerte de la célula (Paraskevaidis *et al.*, 2005).

2.7.2 Oxidación de proteínas

Todas las cadenas laterales de los aminoácidos que forman parte de las proteínas son susceptibles de ser atacadas por el HO[•], aunque algunas son más vulnerables que otras, como es el caso de las cadenas laterales de la tirosina, la fenilalanina, el triptófano, la histidina, la metionina y la cisteína (Halliwell y Gutteridge, 2015). En consecuencia, la exposición de proteínas a sistemas generadores de radicales libres conduce a modificaciones en la estructura terciaria, que pueden acompañarse de una fragmentación química, un incremento en la susceptibilidad al ataque proteolítico y a la pérdida de la función biológica (Boix y Pico, 2000).

2.7.3 Oxidación de ácidos nucleicos

El efecto de las ERO en los ácidos nucleicos provoca modificaciones o deleciones de las bases de la molécula de ADN, un efecto similar al observado en proteínas. Aunque parece existir una baja posibilidad de reacciones en cadena, el daño puede ser significativo, aun cuando sea muy limitado en extensión y localización (Halliwell y Guteridge, 2015). La interacción de radicales libres con el ADN causa cambios conformacionales, alteración de bases, ruptura de una cadena o de la doble cadena y pérdida de nucleótidos, ocasionando que el sistema de reparación presente una mutación antes de la replicación. Estos conducen a la producción de genes mutados y por ende, de proteínas disfuncionales (Halliwell y Guteridge, 2015). Las modificaciones de las bases se deben en gran parte, a los metales de transición, principalmente al ion ferroso (Fe⁺²) que se encuentra unido al ADN, y que en presencia de H₂O₂ genera HO[•], el cual modifica las bases del ADN. El HO[•] puede tener como blanco tanto a purinas como pirimidinas, además de generar rupturas en las cadenas de ADN (Rodríguez, *et al.*, 2001).

2.8 Compuestos antioxidantes

Las células han desarrollado mecanismos que las protegen del efecto nocivo de los radicales libres, a través de un complejo sistema de defensa sustituido por los agentes antioxidantes

(Halliwell y Gutteridge, 2015). Cuando se incrementa la producción de radicales libres, se activan mecanismos antioxidantes para controlar y estabilizar el ambiente redox intra o extracelular (Mátes, 2000). Los antioxidantes se definen como aquellas sustancias que en bajas concentraciones, retardan o previenen la oxidación. Al interactuar con el radical libre, el antioxidante cede un electrón y se oxida. Los antioxidantes que se encuentran naturalmente en el organismo y en ciertos alimentos pueden bloquear parte de este daño debido a que estabilizan a estos radicales libres (Pietta, 2000).

2.8.1 Clasificación y funciones de los compuestos antioxidantes

Los antioxidantes pueden clasificarse con base en:

1.- Su fuente de obtención (García-Bacallao *et al.*, 2001).

Enzimáticos, son los que se producen mediante mecanismos enzimáticos del organismo (SOD, CAT, POX). Algunas de estas enzimas necesitan cofactores metálicos como Se^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} o Mg^{+2} para poder realizar la función de protección celular.

No enzimáticos, son aquellos que se introducen a través de la dieta y se depositan en las membranas celulares impidiendo la lipoperoxidación, ejemplos, vitaminas E y C, carotenoides, flavonoides, entre otros.

2.- Su forma de actuar (Velázquez-Paniagua *et al.*, 2004).

Antioxidantes primarios, éstos previenen la formación de nuevos radicales libres, convirtiéndolos en moléculas menos perjudiciales antes de que puedan reaccionar, o evitando la formación de radicales libres a partir de otras moléculas. Ejemplos de ellos son las enzimas SOD, CAT y GPx. Las SODs son metaloproteínas que catalizan la dismutación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 y O_2 (McCord y Fridovich, 1988). Dependiendo del metal de transición encontrado en su sitio activo, las SODs pueden ser categorizadas en Cu/Zn-SOD, Mn-SOD y la Fe-SOD. La primera se encuentra principalmente en el citosol y en el cloroplasto de células eucariontes y en algunas especies de bacterias; la Mn-SOD se localiza en la mitocondria de eucariontes y en procariontes, y la Fe-SOD, en procariontes (Raha y Robinson, 2000). Las CAT son

enzimas que catalizan la conversión de H_2O_2 en H_2O y O_2 . Requieren de cofactores hierro (Fe^{+2}) o magnesio (Mg^{+2}). Esta proteína se encuentra en los peroxisomas de la mayoría de las células eucariontes (Chelikani *et al.*, 2004).

Antioxidantes secundarios, capturan a los radicales libres evitando la reacción en cadena. Pueden estar asociados a membrana como la vitamina E, carotenoides, ficobiliproteínas; dispersos en el citoplasma, como los aminoácidos tipo micosporinas, o unidos a compuestos reductores solubles en agua, como el GSH y la vitamina C (Carletti *et al.*, 2003; Mittler, 2002; Noctor y Foyer, 1998).

Entre los antioxidantes no enzimáticos están los carotenoides que son tetrapenos constituidos por unidades múltiples de isopreno con un anillo de ciclohexano sustituido e insaturado en cada uno de los extremos. Existen dos tipos de carotenoides, aquellos que no contienen oxígeno en sus anillos terminales, y las xantofilas que si los tienen (Rodríguez- Amaya, 1999). Los carotenoides son pigmentos liposolubles naturales sintetizados por las plantas, microalgas y cianobacterias (Bauemfeind, 1972). Por su instauración son sensibles al oxígeno, metales, ácidos, peróxidos, calor, luz y a las enzimas lipoxigenasas (Begoña *et al.*, 2001). Los carotenoides son supresores de ERO y a bajas concentraciones pueden proteger a los lípidos de la oxidación (Grill y Tuteja, 2010). Desempeñan un papel importante en el ensamblaje de los complejos captadores de luz y tiene una función indispensable, ya que protegen al aparato fotosintético del daño fotooxidativo (Rao y Rao, 2007; Taíz y Zeige, 2006).

Hernández-Uribe (2016) evaluó la respuesta de la cianobacteria *Spirulina (Arthrospira) máxima* cultivada en condiciones de estrés por radiación UV y en deficiencia de nitrógeno. Observó que hubo una disminución en la producción endógena de $\text{O}_2^{\bullet-}$, en la capacidad antioxidante total, carotenoides totales, lípidos totales y ácidos grasos, así como un aumento en la lipoperoxidación y actividad enzimática (SOD, CAT, POX).

Otros estudios han reportado la implicación de SODs en procesos protectores en cianobacterias; por ejemplo, en la mutante “sodB” de la cianobacteria *Synechococcus* PCC 7942, que se alteró la síntesis de Fe-SOD, se observó que fue más sensible al oxígeno y la

luz, que la cepa silvestre. Del resultado anterior, se sugirió un papel protector de esta SOD contra el daño a los fotosistemas (Herbert *et al.*, 1992). En *Anabaena* PCC 7120, la Mn-SOD estuvo involucrada en la aclimatación de la cepa a luz alta (Zhao *et al.*, 2007). En ese estudio, se obtuvo un mutante del gen que codifica para esta SOD. Esta mutante resultó la más sensible a la fotoinhibición que la cepa silvestre, ya que la actividad del FSI y FSII bajo luz elevada fue más débil en comparación con la cepa silvestre. Debido a que la actividad de la enzima nitrogenasa de esta mutante de SOD bajo estrés fue más débil que el tipo silvestre, se concluyó que se requiere Mn-SOD para la protección de la nitrogenasa contra ERO (Zhao *et al.*, 2007).

3. JUSTIFICACIÓN

Las microalgas son organismos que por su versatilidad metabólica frente a diferentes retos ambientales (como la limitación de nutrientes), son consideradas potenciales fuentes de compuestos de alto valor agregado. Los antioxidantes, pigmentos, lípidos y ácidos grasos son algunos ejemplos de estos metabolitos, cuyas aplicaciones biotecnológicas abarcan los campos de investigación básica, industria acuícola, alimentaria, cosmeceútica, entre otras. Sin embargo, la obtención de estas moléculas a partir de microalgas aún no es económicamente redituable a gran escala. Por lo tanto, es necesario establecer estrategias de cultivo, para su escalamiento, incremento de la producción de biomasa y la disminución de costos de producción.

4. HIPÓTESIS

Dado que los nutrientes están involucrados en la síntesis de moléculas esenciales en las microalgas, se espera que el cultivo en limitación de éstos, produzca cambios en su composición bioquímica, disminuyendo el contenido de compuestos nitrogenados y de la eficiencia fotosintética. Además de aumentar el de antioxidantes y desviar el metabolismo a rutas dirigidas a la producción de compuestos de reserva como lípidos y carbohidratos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar los cambios en la composición bioquímica de *Ettla oleoabundans* cultivada en limitación de nutrientes, para definir su potencial en la producción de compuestos de alto valor agregado.

5.2 Objetivos particulares

1. Determinar el crecimiento y producción de biomasa de *E. oleoabundans*, cultivada en condiciones control y en limitación de nutrientes.
2. Determinar el rendimiento cuántico efectivo *in situ* del cultivo de *E. oleoabundans*, en condiciones control y en limitación de nutrientes.
3. Evaluar la actividad de los antioxidantes enzimáticos (SOD, CAT y GPx), la producción endógena del radical superóxido, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico y capacidad antioxidante total de *E. oleoabundans*, cultivada en condiciones control y en limitación de nutrientes.
4. Evaluar los cambios en la composición bioquímica de *E. oleoabundans* cultivada en condiciones control y limitación de nutrientes, mediante la cuantificación de proteínas, carbohidratos y lípidos totales, el perfil de ácidos grasos y pigmentos.
5. Identificar las rutas metabólicas en *E. oleoabundans* para definir su potencial en la producción de compuestos de alto valor agregado.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Material biológico y condiciones de cultivo

La cepa de *E. oleoabundans* fue adquirida en la UTEX Algae Collection (LB1185) y se mantiene en el cepario del CIBNOR en medio F/2 de Guillard y Ryther (1962) a 20°C, fotoperiodo luz:oscuridad de 12:12h y una intensidad luminosa de 1.852 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En el presente estudio, la microalga se cultivó durante cinco días en condiciones de laboratorio a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, ciclo luz:oscuridad 12:12 h, intensidad luminosa 62 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$, y aireación continua. Se utilizó el fertilizante agrícola Fertiplus® como medio de cultivo en dos concentraciones. En el tratamiento control se igualó la concentración de nitrógeno del Fertiplus® a la del medio F/2 (882 μM , Guillard y Ryther, 1962). Para el tratamiento en limitación, la concentración de nitrógeno fue de 20 μM . En la tabla II se muestran las concentraciones de los nutrientes que contiene el Fertiplus® al ser diluido para cada tratamiento (control y limitación) y del medio de cultivo F/2 (Guillard y Ryther, 1962) que se utiliza en el Cepario del CIBNOR para el mantenimiento de esta microalga. El experimento se realizó con seis réplicas por tratamiento (n=6), con volumen final de 1.7 L y 40% de inóculo.

Tabla II. Concentración final de nutrientes en el medio de cultivo utilizado en el tratamiento control, limitación de nutrientes y medio F/2.

Compuesto	Fertiplus[®] Control (μM)	Fertiplus[®] Limitación (μM)	F/2* (μM)
Nitrógeno total	882.35	20	882.35
P₂O₅	98.15	2.22	36.23
K₂O	253.45	5.74	-
B	0.31	0.0071	-
Cu	0.03	0.0006	0.04
Fe	0.18	0.0041	11.64
Zn	0.05	0.0012	0.08
S	69.33	1.57	40.08
Ca	8.05	0.18	-
Mn	2.32	0.05	0.9
Mg^{***}	59.11	53.24	53.1
Vitaminas, Mo,	-	-	Trazas
Co			0.05

*Medio F/2 de Guillard y Ryther, (1962). ** Concentración de Mg en el medio considerando el aporte de Mg reportado para agua de mar (Turekian, 1968).

6.2 Curva de crecimiento

Para cada tratamiento (control y limitación), se realizaron curvas de crecimiento por recuento celular con la cámara de Neubauer. Se tomaron diariamente alícuotas de 10 mL de cultivo por cada réplica, bajo condiciones de esterilidad. Conocidas las curvas de crecimiento de ambos tratamientos, se seleccionó el tiempo en el cual el cultivo alcanzó el máximo crecimiento de la fase exponencial (cinco días para ambos). Para el tratamiento en limitación de nutrientes, se cultivó a la microalga en condiciones control, y a los cinco días (previamente determinados), se cosechó la biomasa por centrifugación ($629 \times g$, a 10°C , 5 min) (Heraeus Megafuge 16R). La biomasa se lavó dos veces con agua de mar estéril (35 UPS) para eliminar

los remanentes del medio de cultivo. La biomasa lavada, se resembró en el medio preparado con agua de mar estéril enriquecida con Fertiplus® (20 µM) y se sometió a estrés por limitación de nutrientes. La biomasa de ambos tratamientos, se cosechó por centrifugación a 629 x g, a 10°C, 5 min (Heraeus Megafuge 16R). Una parte de la biomasa se liofilizó (LABCONCO Free Zone 1) y otra se conservó fresca y se almacenó a -80°C hasta su procesamiento. Con los datos obtenidos de la cosecha total de la biomasa (peso de la biomasa fresca y liofilizada) se calculó la productividad (mg L⁻¹ d⁻¹) y el rendimiento (mg L⁻¹) de la biomasa del cultivo. La tasa de crecimiento (µ) y tiempo de generación (Tg) se calcularon de acuerdo a las ecuaciones definidas por Guillard (1973).

Tasa de crecimiento:

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{T_2 - T_1} \quad (1)$$

Donde:

X: concentración de la biomasa (cel mL⁻¹)

T: tiempo en días

Tiempo de generación:

$$Tg = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (2)$$

Donde:

ln 2 = 0.693

µ: tasa de crecimiento (d⁻¹)

6.3 Rendimiento cuántico efectivo *in situ* Y(II)

Para la medida del Y(II) se utilizó el método del pulso de saturación con luz azul, proporcionada por el fluorómetro JUNIOR-PAM (WALZ). Metodológicamente, la fibra óptica del equipo se introdujo al cultivo de la microalga. Con la luz de medida, el PM-gain y Out-gain, se ajustó la fluorescencia basal de los centros de reacción parcialmente reducidos del FSII (F_0), en un valor entre 200 y 400 mV. Después de ajustar el equipo, se realizó auto cero. Diariamente se dieron los pulsos de saturación en el centro de cada cultivo.

6.4 Superóxido dismutasa (SOD) (E.C. 1.15.1.1)

Para la determinación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD), se pesaron 100 mg de biomasa fresca de cada réplica por tratamiento, la cual se homogenizó (273 x g, 40 s en frío) (Pro250 BioHomogenizer, Biospec Products) con 2 mL de la solución para homogenizar (K_2PO_4 50 mM, pH 7.5) y 20 μ L de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (1 mM en etanol al 96%). El homogenizado se centrifugó a 2,200 x g a 4°C, 15 min (Sorvall Legend RT D37520). El extracto se empleó inmediatamente para cuantificar la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT.

La determinación de la actividad enzimática de SOD se realizó de acuerdo al protocolo de Suzuki (2000), que se fundamenta en la generación de $O_2^{\bullet-}$ de manera constante a partir del sistema xantina/xantina oxidasa (Fig. 6). El $O_2^{\bullet-}$ entra en contacto con el nitrozul de tetrazoli (NBT), lo reduce y produce formazán, cuyo cambio puede ser detectado por espectrofotometría a una absorbancia 560 nm cuando la SOD inhibe la reducción del NBT.

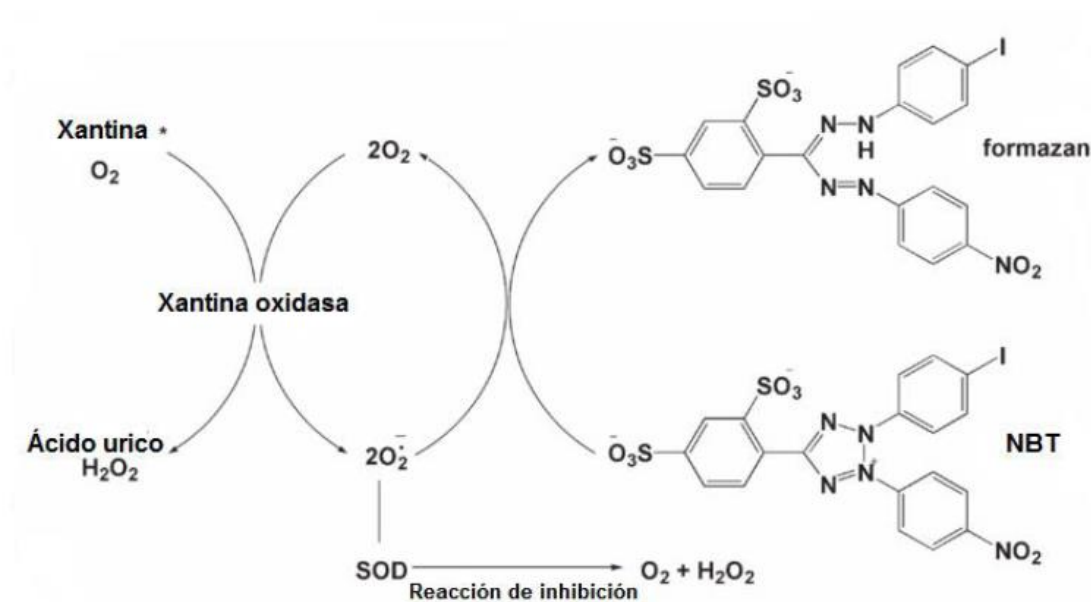


Figura 6. Fundamento para la determinación de SOD. El sistema xantina/xantina oxidasa produce el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$). El $O_2^{\bullet-}$ entra en contacto con el nitroazul de tetrazolio (NBT), lo reduce y genera formazan, cuyo cambio puede ser detectado por espectrofotometría cuando la SOD inhibe la reducción del NBT.

Todos los reactivos se mantuvieron en baño de agua a $25^\circ C$. En una celda de plástico, se mezclaron 1.45 mL de la solución de trabajo (solución amortiguadora carbonato de sodio 50 mM, xantina 0.1 mM, NBT 0.025mM, EDTA 0.1 mM), y 25 μL del extracto enzimático con solución para homogenizar. Posteriormente se registró en un espectrofotómetro de microplaca (Thermo Scientific, MULTISKAN FC) el cambio de absorbancia a 560 nm cada 30 segundos durante 5 min. Una unidad de SOD se define como la concentración de enzima necesaria para la inhibición del 50% de la máxima reacción del $O_2^{\bullet-}$ con el NBT. La actividad de la enzima se expresa en U de SOD mg^{-1} proteína.

6.5 Catalasa (CAT) (E.C. 1.11.1.6)

Para la determinación de la actividad de la enzima CAT se utilizó el protocolo de Aebi (1984), el cual se fundamenta en la capacidad que tiene esta enzima en descomponer H_2O_2 en agua y oxígeno, por lo que se cuantifica la descomposición del H_2O_2 por espectrofotometría. Todos los reactivos se mantuvieron en baño de agua a 25°C . La solución de trabajo se preparó en fresco utilizando una solución patrón de H_2O_2 (20 mM), la cual se diluye (1:1) con solución amortiguadora de fosfatos (0.1 mM). En una celda de cuarzo se mezclaron 1.5 mL de la solución de trabajo con 10 μL del extracto enzimático (obtenido previamente en la determinación de SOD, (apartado 7.4) y se registró el cambio en la absorbancia a 240 nm cada 15 segundos durante 3 min. Una unidad de CAT se define como la concentración de enzima necesaria para reducir 1 μmol de H_2O_2 por minuto. La actividad enzimática se expresa en U de CAT mg^{-1} de proteína.

6.6 Glutación peroxidasa (GPx) (EC 1.11.1.9)

La actividad de la enzima GPx dependiente de Se, se midió monitoreando la disminución continua de la concentración de NADPH usando H_2O_2 como sustrato, al mantener constante los niveles de glutatión reducido (Folh  y Gunzler, 1984). Para preparar las muestras, se homogenizaron 12.5 mg de biomasa fresca con 250 μL de solución para homogenizar y 10 μL de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF). La mezcla se centrifugó a $2124 \times g$, a 4°C (Sorvall Legend RT D37520) por 15 min y se recuperó el extracto que se mantuvo en hielo hasta su uso. Se prepararon las siguientes mezclas para la reacción enzimática. **Mezcla 1:** 3 mL de solución amortiguadora de fosfato de potasio (500 mM), 300 μL de EDTA (50 mM) y 3 mL de azida de sodio (20 mM). **Mezcla 2:** 3 mL de glutatión reductasa (15 U mL^{-1}), 3 mL de NADPH (1.5 mM), 6 μL de glutatión reducido (250 mM). **Mezcla 3:** 6 mL de agua desionizada o muestra y 240 μL de H_2O_2 (10 mM) se mezclaron. Se leyó la absorbancia a 340 nm y se calculó el cambio en la absorbancia por minuto (ΔA_{340}). Las mezclas se cargaron en una microplaca con un volumen final por pocillo de 200 μL . Se corrieron simultáneamente

dos blancos, uno sin H₂O₂ y otro sin muestra. El cambio en la absorbancia se registró cada minuto durante 5 min. La actividad enzimática se expresó en U GPx mg⁻¹ de proteína. Una unidad de actividad GPx se define como la cantidad de enzima que oxida 1 mol de NADPH por minuto.

6.7 Determinación de la producción de radical superóxido (O₂^{•-})

Este método fotométrico indirecto y discontinuo, mide la tasa de producción endógena de O₂^{•-} a través de la cuantificación de la reducción del ferricitocromo *c* por el O₂^{•-} durante un intervalo de tiempo fijo (Drossos *et al.*, 1995; Markert *et al.*, 1984). Para la preparación de las muestras, se pesaron 50 mg de biomasa fresca y se le adicionaron 500 µL de solución amortiguadora de Krebs: NaCl (118 mM), KCl (4.7 mM), MgSO₄ (1.2 mM), NaH₂PO₄ (12 mM), NaHCO₃ (31.5 mM), glucosa (1 mM). Posteriormente se adicionaron 500 µL de solución de citocromo *c* (15 µM). Los tubos se taparon e incubaron en baño de agua a 37°C durante 15 min en agitación. Transcurrido el tiempo, se retiraron los tubos del baño de agua y se les adicionaron 500 µL de solución de N-etilmaleimida (30 mM) para detener la reacción (evitar que el citocromo *c* continúe reduciéndose). Se centrifugó a 2,200 *x g* a 4°C (Sorvall Legend RT D37520) durante 10 min. El extracto enzimático se transfirió a una celda de plástico y se leyó a una absorbancia de 550 nm calibrando al aire. Para preparar los blancos, se retiró el remanente del sobrenadante de los tubos y se adicionaron 500 µL de solución amortiguadora de Krebs, 500 µL de solución de N-etilmaleimida (30 mM) y 500 µL de solución de citocromo *c* (15 µM). Los tubos se taparon, se homogenizaron en vortex y se incubaron por 15 min a 37°C. Los tubos se retiraron y se centrifugaron a 2,200 *x g* a 4°C, 10 min. Se transfirió el sobrenadante a una celda de plástico y se leyó la absorbancia a 550 nm calibrando al aire. Para el cálculo de la producción del radical se utilizó el coeficiente de extinción de 21 nmol, por el cambio de ferricitocromo a ferrocitocromo. Los resultados se expresaron en nmol mg⁻¹ proteína min⁻¹.

6.8 Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Los hidroperóxidos y aldehídos lipídicos resultantes de la peroxidación de la membrana celular reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBA) y forman malonaldehído (MDA) de color rosa cristalino cuya absorción máxima es entre 532-536 nm. La cuantificación de TBARS se realizó por el protocolo de Persky *et al.* (2000). Del extracto de cada muestra, se añadieron 250 μL en tubos eppendorf y se incubaron en baño de agua a 37°C, con agitación durante 15 min. Después de la incubación, se colocaron en baño de hielo y se detuvo la reacción adicionando a cada tubo 250 μL de solución de ácido tricloroacético (TCA) y ácido clorhídrico (HCl) (1 mol L⁻¹) para detener el ensayo. Posteriormente, se adicionaron 500 μL de TBA al (1% p/v). Se homogenizaron en vortex (Scientific Industries/Vortex -2 Genie G560) e incubaron en baño de agua a 90°C con agitación durante 10 min. Los tubos se retiraron del baño y se colocaron en hielo por 5 min para enfriarlos. Se centrifugaron a 2,200 $\times g$ a 4°C, 10 min (Sorvall Legend RT D37520). El sobrenadante se transfirió a una celda de plástico y se leyó la absorbancia a 532 nm, calibrando el espectrofotómetro al aire (Jenway 6505 UV/VIS). Para el cálculo de TBARS se realizó la curva de calibración con 1, 1, 3,3-tetraetoxipropano (TEP) de 0 a 5 nmoles con 250 μL de solución para homogenizar. Se graficó la absorbancia contra la concentración de la curva estándar. Se calculó la ecuación de regresión lineal de la curva y se obtuvo la concentración de los TBARS en cada muestra a partir de la ecuación de la curva estándar. Los datos se corrigieron por la concentración de proteína en cada muestra y se expresaron en nmol mg⁻¹ proteína.

6.9 Cuantificación de la capacidad antioxidante total

Se utilizó el protocolo de Brand-Williams *et al.* (1995), el cual se fundamenta en la evaluación de la capacidad que tienen las células para atrapar radicales libres. Se preparó una solución de 2,2-difenil-2-picril-hidrácil (DPPH 125 μM) en metanol. Para preparar las muestras, se homogenizaron con vortex (Scientific Industries/Vortex -2 Genie G560) 50 mg de biomasa fresca con 500 μL de solución de mezcla de extracción H₂O:CH₃OH:CH₃COCH₃ (2:3:5). El extracto se obtuvo por centrifugación a 2200 $\times g$ a 4°C, 15 min. En microplacas

se mezclaron 20 μL de cada extracto hidroalcohólico y 200 μL de la solución de DPPH. Previamente, se realizó la curva de calibración utilizando ácido gálico en un gradiente de concentración de 5 a 100 μM y se leyó en un espectrofotómetro de microplaca (Thermo Scientific, MULTISKAN FC) a una absorbancia de 515 nm. La capacidad antioxidante total de las muestras se determinó por la disminución en la absorbancia en un lector de microplacas. Los resultados se expresaron en μM de ácido gálico.

6.10 Cuantificación de proteínas totales

La determinación de proteínas se realizó por el método de Lowry *et al.* (1951). Se pesaron 5 mg de muestra liofilizada y pulverizada y se colocaron en un tubo de vidrio limpio. Las muestras se sometieron a hidrólisis alcalina con 5 mL de hidróxido de sodio (NaOH) 0.1N. Se tapó la boca de los tubos con papel aluminio para evitar la evaporación y se colocaron en un baño de agua a 80°C por 20 min (Terlab MA40). Posteriormente, se dejaron enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente y se centrifugaron a 1200 $\times g$ por 15 min a 10°C (Beckman Coulter Allegra 21R)). Se decantó y recuperó el extracto alcalino en otro tubo limpio. Se calculó el volumen del extracto para cuantificar el contenido de proteínas. La alícuota calculada se colocó en otro tubo y se completó a 1 mL con NaOH 0.1 N. Luego se mezcló con un vortex (Scientific Industries/Vortex -2 Genie G560) y se agregaron 5 mL de una solución de carbonato de sodio (NaCO_3) al 2% en NaOH 0.1 N (solución A) + sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) al 0.5 % y tartrato de potasio ($\text{KC}_4\text{H}_5\text{O}_6$) al 1% (solución B), en una proporción de 50:1 A:B. Posteriormente, se mezcló con vortex y se dejó reposar 15 min. Se añadieron 500 μL de la solución de 1:1 Folin:agua destilada y se dejó reposar en oscuridad por 40 min. Previamente, se realizó una curva de calibración, con una solución concentrada de 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de albúmina de suero bovina (BSA, por sus siglas en inglés), a partir de la cual se preparó un gradiente de concentración de 0 a 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Fig. 7) (Arredondo-Vega, Cordero Esquivel y Voltolina, 2017). Se leyó la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro (Hach, DR5000). Se utilizó un blanco preparado con el mismo tratamiento que las muestras, sustituyendo la alícuota por 1 mL de NaOH 0.1 N. El porcentaje de proteínas con respecto al peso seco se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Proteínas} = (((A_{750}/m) * V_e) / V_m) / P_s) * 100 \quad (3)$$

Donde:

A_{750} : absorbancia a 750nm

m: pendiente de la curva de calibración

V_e : volumen del extracto alcalino (mL)

V_m : volumen de la alícuota calculada (mL)

P_s : peso seco de la muestra liofilizada (mg)

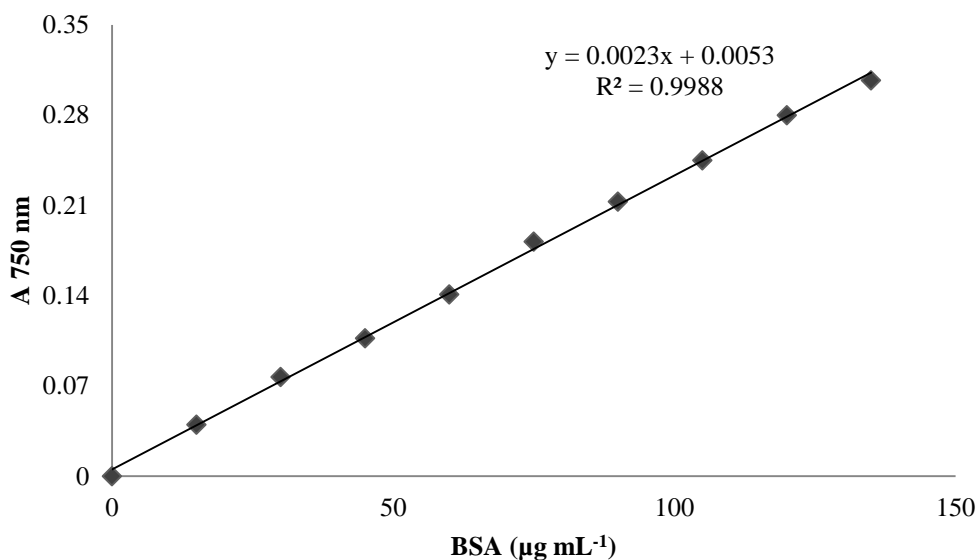


Figura 7. Curva de calibración de proteínas totales elaborada con albúmina de suero bovino. (Tomada de Arredondo-Vega *et al.*, 2017).

6.11 Cuantificación de carbohidratos

Para la cuantificación de carbohidratos, se utilizó el método de Dubois *et al.* (1956). Se pesaron 5 mg de biomasa liofilizada y se colocaron en tubos limpios de vidrio con tapones

de rosca. Se agregó 1 mL de H₂SO₄ (1 M) a cada tubo, para realizar la hidrólisis ácida. Se sonicaron por 5 min y se agregaron 4 mL de H₂SO₄ (1 M). Los tubos se taparon con papel aluminio y se colocaron en un baño de agua (Terlab MA40) a 100°C por 1 h. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se transfirieron los extractos ácidos a otros tubos limpios. Se calculó el volumen del extracto ácido para la cuantificación de carbohidratos. La alícuota calculada se colocó en otro tubo, se añadió un volumen necesario de H₂SO₄ (1 M) para completar 1 mL. Se agregó 1 mL de fenol al 5% y se mezcló con vortex (Scientific Industries/Vortex -2 Genie G560) y se dejó reposar por 40 min. Se añadieron lentamente 5 mL de H₂SO₄ concentrado con el tubo inclinado y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Previamente, se realizó la curva de calibración empleando una solución concentrada de 120 µg mL⁻¹ de glucosa anhidra, a partir de la cual se preparó un gradiente de concentración de 0 a 120.40 µg mL⁻¹ (Fig. 8) (Arredondo-Vega, Cordero Esquivel y Voltolina, 2017). Se midió la absorbancia de las muestras a 485 nm en un espectrofotómetro (Spectronic 4001/4). Se utilizó un blanco preparado con el mismo tratamiento que las muestras, sustituyendo la alícuota por 1 mL H₂SO₄ (1 M). El porcentaje de carbohidratos con respecto al peso seco se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Carbohidratos} = (((A_{485}/m) * V_e) / V_m) / P_s * 100 \quad (4)$$

Donde:

A₄₈₅: absorbancia a 485 nm

m: pendiente de la curva de calibración

V_e: volumen del extracto ácido (mL)

V_m: volumen de la alícuota calculada (mL)

P_s: peso seco de la muestra liofilizada (mg)

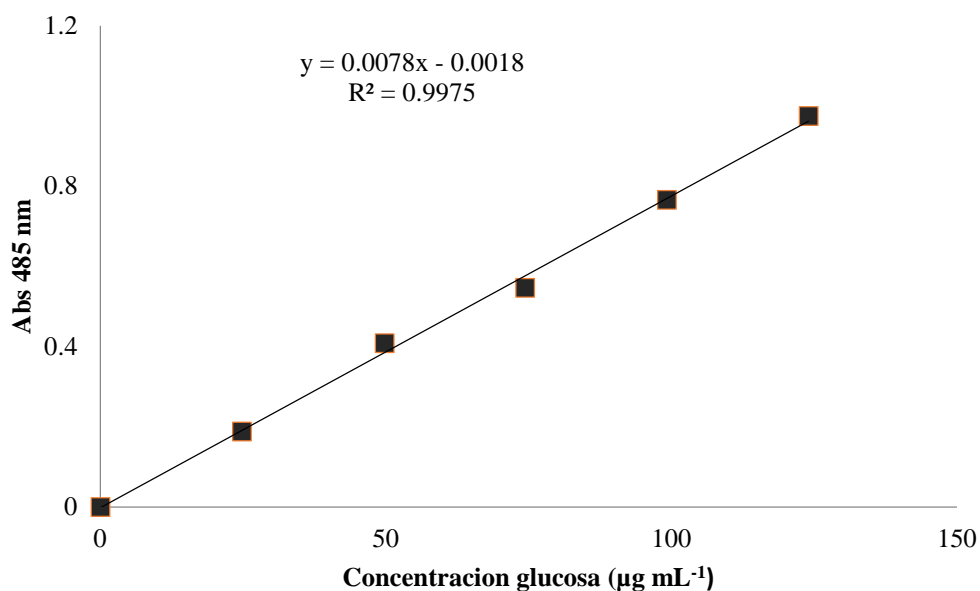


Figura 8. Curva de calibración de carbohidratos elaborada con glucosa anhidra. (Tomada de Arredondo-Vega *et al.*, 2017).

6.12 Extracción y cuantificación de lípidos totales

La cuantificación de lípidos totales se basa en la formación de una mezcla monofásica de cloroformo, metanol y agua ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$) con la que se asegura la extracción de la mayoría de los lípidos, incluyendo aquellos que se encuentran ligados a otras moléculas. Para la extracción de lípidos totales se utilizó el protocolo de Bligh y Dyer (1959). Se agregaron 3 mL de la mezcla de $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:2:0.6) y 5 µL del antioxidante butilhidroxitolueno (BHT) (1 mg L^{-1} en CHCl_3) a 5 mg de biomasa liofilizada en un tubo de tapón de rosca limpio. Los tubos se colocaron en el sonicador (VWR Ultrasonic Cleaner, 97043- 984) por 20 min y se incubaron a 4°C protegidos de la luz durante 24 h para asegurar la extracción completa de los lípidos. Transcurrido el tiempo, se sonicaron nuevamente en frío durante 15 min y se añadieron 1 mL de CHCl_3 y 1.2 mL de agua destilada. Se centrifugaron a $2215 \times g$ a 10°C durante 15 min (Beckman, Coulter Allegra 21 R). El extracto cloroformo:lípidos se recuperó con pipeta Pasteur y se colocó en un tubo nuevo.

Para la cuantificación de lípidos totales se utilizó el método de calcinación de Marsh y Weinstein (1966). A partir de los lípidos totales extraídos se tomó una alícuota y se concentró a sequedad con nitrógeno gaseoso. Posteriormente, se añadieron 2 mL de H₂SO₄ concentrado, se sellaron los tubos con papel aluminio y se cerraron con las tapas. La mezcla se calentó a 200°C por 15 min (Terlab, MA40). Pasado el tiempo, los tubos se sacaron y se dejaron 10 min a temperatura ambiente. Se colocaron en agua con hielo por 5 min. Una vez enfriada la muestra, se agregaron 3 mL de agua destilada y se mezclaron con vortex (Scientific Industries/Vortex -2 Genie G560) verificando que la mezcla quedara homogénea y sin residuos de materia orgánica. Previamente, se realizó la curva de calibración utilizando tripalmitina como estándar en un rango de concentración de 30 a 180 mg mL⁻¹. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro a una absorbancia de 375 nm (Thermo Scientific, Spectronic 20 Genesys). El equipo se calibró con un blanco de H₂SO₄ que se trató de igual manera que las muestras. Los datos se expresaron en % con respecto al peso seco.

6.13 Cuantificación de ácidos grasos

Para la extracción y cuantificación de ácidos grasos es necesario preparar derivados no reactivos de éstos, es decir, metil-ésteres. Los ácidos grasos se extrajeron utilizando una mezcla de solventes con ácido clorhídrico:metanol (HCl:CH₃OH) y se transformaron por una reacción de transesterificación a metil-ésteres, en la cual un mol de triglicérido es desplazado por tres moles de otro alcohol (metanol) en condiciones ácidas (Sato y Murata, 1988).

Los extractos de lípidos obtenidos anteriormente, se sometieron a una reacción de metanólisis (o derivatización) en la cual se adicionaron 2.5 mL de la mezcla de HCl:CH₃OH (5% v/v) y se colocaron en un termobañó (Terlab MA40) a 85°C por 2.5 h. Pasado ese tiempo, se sacaron las muestras y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Los metil-ésteres obtenidos de la reacción, se extrajeron con 1.5 mL de hexano (grado HPLC). Con una pipeta Pasteur limpia, se tomó la fase superior y se colocó en otro tubo. La mezcla se lavó una segunda vez con 1.5 mL de hexano (grado HPLC); nuevamente se separó la fase superior y se colocó en el tubo anterior. Con el fin de eliminar humedad del extracto de ácidos grasos-

metil esterificados, a la muestras se les agregó una pizca de sulfato de sodio anhidro (NaSO_4). Se inyectó manualmente un volumen conocido de cada muestra en el equipo de cromatografía de gases-espectrometría de masas (GCMS) (HP, 1800B GCD System). Para la separación y cuantificación de los ácidos grasos en el GCMS se utilizó una columna capilar OMEGAWAX 250 (SUPELCO) cuyas dimensiones son: 30 m longitud x 0.25 mm diámetro externo x 0.25 μm diámetro interno. Las condiciones del GCMS fueron: volumen de inyección: 1 a 5 μL , gas portador: He (pureza 99.997%), flujo de He en la columna: 0.9 mL min^{-1} , inyección sin división (splitless), temperatura del inyector: 250°C, temperatura del detector: 260°C. El programa del GCMS fue: temperatura inicial del horno 110°C durante 3 min, incremento de 30°C min^{-1} hasta 165°C, se mantiene a esa temperatura 2 min y posteriormente se incrementa 2.2°C min^{-1} hasta 209°C. Se mantuvo esa temperatura 35 min. El método de adquisición de espectros de masas es: retardo del solvente: 4.5 min, rango de masas: 45-450 unidades de masa atómica (uma), tiempo entre barridos 0.5 min. La identificación de cada ácido graso se realizó comparando los tiempos de retención de los ácidos grasos de la curva de calibración y se corroboró mediante la identificación de los iones característicos de los espectros de masa de cada grupo de ácidos grasos. La cuantificación se realizó considerando la pendiente (factor de corrección) de cada uno de los ácidos grasos de la curva de calibración previamente realizada con una mezcla de 37 ácidos grasos metilados, en donde el área de cada pico del ácido graso, es directamente proporcional a la concentración de ese ácido graso. Para la identificación de los ácidos grasos se utilizó el programa WSEARCH2005 liberado gratuitamente por la Universidad de Australia. Los resultados se expresaron como porcentaje relativo al total de ácidos grasos.

6.14 Separación y cuantificación de ácidos grasos de las fracciones lipídicas

Para la separación de las diferentes fracciones lipídicas, se partió del extracto lipídico total obtenido anteriormente. Se utilizaron columnas de separación Strata SPE[®] (Solid Phase Extraction) empacadas con sílica gel. Las columnas se colocaron en un soporte y fueron previamente acondicionadas con 6 mL de CH_3OH , 6 mL de CHCl_3 y 3 mL de la mezcla

$\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{HCOOH}$ (98:1:0.5). Los residuos de cada lavado, se colectaron en un tubo para ser desechados. Una vez lavadas las columnas, se agregó la muestra y se inició la separación de las fracciones lipídicas. Para obtener la fracción de lípidos neutros (NL, por sus siglas en inglés) se agregó a la columna 8 mL de $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{HCOOH}$ (98:1:0.5). Para la fracción de los galactolípidos o lípidos polares afines a la acetona (AMPL, por sus siglas en inglés), se añadió 6 mL de acetona. Para la fracción de lípidos polares o fosfolípidos (PL, por sus siglas en inglés) se agregó 9 mL de $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (5:4). Las fracciones NL, AMPL y PL obtenidas, se concentraron con nitrógeno gaseoso y se derivatizaron de acuerdo al protocolo mencionado anteriormente (7.13). Los ácidos grasos metil esterificados de las fracciones, se inyectaron en el GCMS y una vez obtenido el cromatograma, se identificaron los ácidos grasos tanto por el tiempo de retención así como utilizando el programa WSEARCH2005.

6.15 Cuantificación de pigmentos

Para la extracción de pigmentos se utilizó la técnica de Lamers *et al.* (2010). A partir de un volumen conocido del cultivo, se centrifugó a $1,850 \times g$ a 5°C (Beckman, Coulter Allegra 21 R) por 10 min. A la pastilla celular obtenida de cada muestra se le agregaron 4 mL de la mezcla $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (2:2.5) y 5 μL del antioxidante BHT. Las muestras se homogenizaron con vortex (Scientific Industries/Vortex -2 Genie G560) por 1 min y se sonicaron (VWR ultrasonic cleaner) con hielo por 20 min. Posteriormente, se agregaron 2.5 mL de la mezcla TRIS ácido: TRIS base: NaCl 1M (3:0.4:5) a pH de 7.5, para facilitar la recuperación de la fase acuosa y orgánica (Mulders *et al.*, 2014). Se repitió el proceso de homogenización y sonicado. Los extractos se centrifugaron a $1,850 \times g$ a 10°C por 15 min (Beckman, Coulter Allegra 21 R). Se recuperó la fase inferior con pipeta Pasteur mediante burbujeo y se colocó en un tubo de vidrio con tapón de rosca. Para recuperar los pigmentos remanentes, se agregó 1 mL de CHCl_3 al tubo anterior, y se repitieron los pasos de homogenizar, sonicar y centrifugar. Finalmente, se recupera el segundo extracto con una pipeta Pasteur mediante burbujeo y se colocó en el tubo del primer extracto.

Para recuperar solamente los pigmentos del extracto anterior, se tomó una alícuota (75 a 150 μL), se colocó en un tubo limpio y se secó con nitrógeno gaseoso. Se agregaron 3 mL de acetona al 100% grado HPLC. Se calculó el volumen de inyección utilizando los valores de clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides totales determinados por espectrofotometría midiendo las absorbancias a, 662 nm, 645 nm y 470 nm, respectivamente (Lichtenthaler y Buschmann, 2001). Previamente, se realizó la curva de calibración (de 2 a 10 ng) con siete estándares de pigmentos (fucoxantina, violaxantina, diadinoxantina, astaxantina *trans*, zeaxantina, luteína, cantaxantina, clorofila *b*, xantofila, β -caroteno *cis*, criptoxantina, clorofila *a* y β -caroteno *trans*). Las alícuotas se inyectaron en un HPLC 1260 Infinity series Agilent Technologies, de acuerdo al método de separación de Vidussi *et al.* (1996), utilizando las siguientes condiciones de operación del equipo y solventes:

Solventes A: metanol / acetato de amonio (1N), (70:30).

Solvente B: metanol grado HPLC.

Tabla III. Condiciones de operación del HPLC para la determinación de pigmentos.

Columna Zorbax C8 SB (5 μm x 150 nm x 4.6 nm)	
Tiempo de corrida	18.5 min
Tiempo de parado	1.5 min
Flujo	1 mL min ⁻¹
Presión de bomba	300 bares
Longitud de onda del detector	DAD 440 nm

Tabla IV. Características del gradiente de solventes.

Gradiente	Solvente A	Solvente B
Minuto 0	75%	25%
Minuto 1	50%	50%
Minuto 15	0%	100%
Minuto 18	0%	100%
Minuto 18.5	75%	25%

6.16 Análisis estadísticos

A los datos obtenidos se les aplicaron pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk y posteriormente pruebas de homocedasticidad de Bartlett. Para evaluar si existían diferencias significativas entre tratamientos, se aplicó la prueba t-student a los datos que presentaron distribución normal y prueba de Wilcoxon para los que no, con un nivel de significancia de $p < 0.05$. Para los análisis estadísticos se utilizó el Software R versión 3.3.1

7. RESULTADOS

7.1 Curva de crecimiento

La curva de crecimiento de *E. oleoabundans* se graficó con los datos de concentración celular (cel mL^{-1}) y el tiempo (días) para cada tratamiento (Figs. 9 y 10). En ambos tratamientos, la mayor concentración celular fue en el día cinco con $3.39 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ para el tratamiento control y $3.30 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ en limitación de nutrientes.

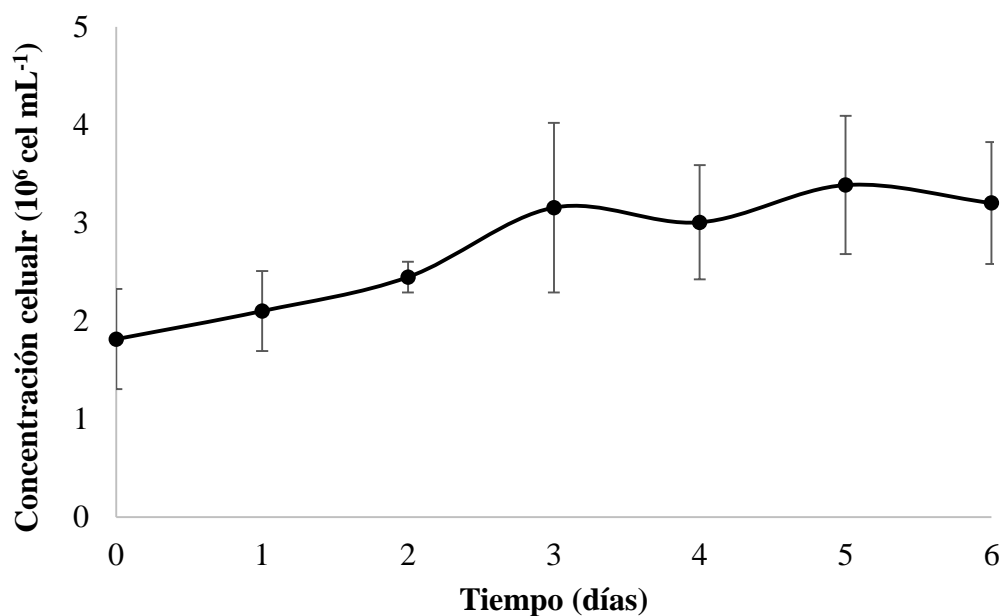


Figura 9. Curva de crecimiento de *Ettlia oleoabundans* cultivada en agua de mar enriquecida con Fertiplus® (tratamiento control, $882 \mu\text{M}$ de nitrógeno). Cada punto representa el valor promedio de seis réplicas independientes, las barras de dispersión indican desviación estándar, $p < 0.05$.

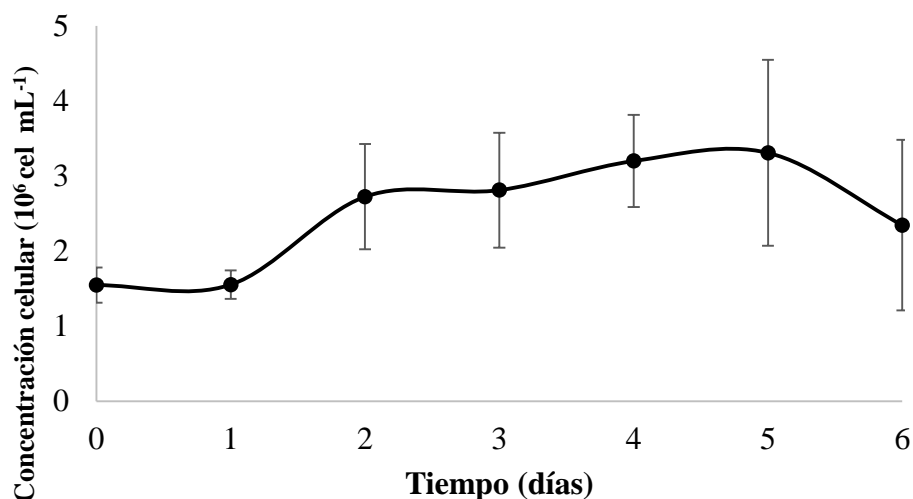


Figura 10. Curva de crecimiento de *Ettlia oleoabundans* cultivada en agua de mar enriquecida con Fertiplus® (tratamiento en limitación de nutrientes, 20 μM de nitrógeno). Cada punto representa el valor promedio de seis réplicas independientes, las barras de dispersión indican desviación estándar, $p < 0.05$.

En el cultivo control, *E. oleoabundans* tuvo una μ de 0.2 d^{-1} y en limitación de nutrientes fue de 0.15 d^{-1} . En cuanto a T_g en el control fue de 3.8 y en limitación de nutrientes fue de 4.6 días. En la tabla V se muestra el rendimiento y la productividad de la biomasa microalgal de la cepa en ambos tratamientos.

Tabla V. Rendimiento y productividad de biomasa de *Ettlia oleoabundans* en el tratamiento control y en limitación de nutrientes.

	Rendimiento (mg L^{-1})	Productividad ($\text{mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$)
Control	246.11 ± 62^a	49.22 ± 11^a
Limitación de nutrientes	103.56 ± 7^b	20.71 ± 1.3^b

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas $p < 0.05$

7.2 Rendimiento cuántico efectivo *in situ* Y(II)

En el tratamiento control se obtuvo un valor máximo de Y(II) de 0.77 y un mínimo de 0.48. En limitación de nutrientes, el máximo fue de 0.72 y el mínimo de 0.35. No hubo diferencias significativas entre los dos tratamientos al inicio de cultivo, ni en el primero y segundo día (Fig. 11). En los días tres, cuatro y cinco se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$), resaltando un mayor valor de Y(II) en el control en los días cuatro y cinco.

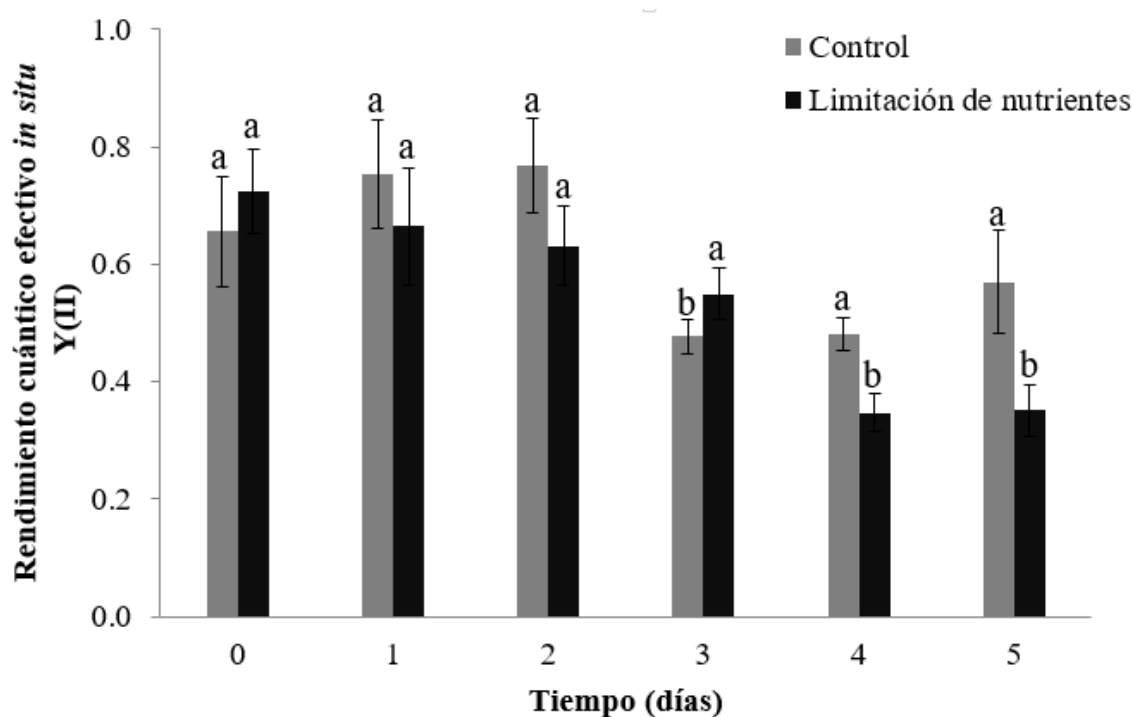


Figura 11. Rendimiento cuántico efectivo *in situ* Y(II) de *Ectliia oleoabundans* cultivada en el fertilizante agrícola Fertiplus®, en condiciones control y en limitación de nutrientes. Las barras representan el promedio de seis réplicas independientes \pm intervalo de confianza. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0.05$ (t-Student).

7.3 Actividad de las enzimas antioxidantes

7.3.1 Superóxido dismutasa (SOD) (E.C. 1.15.1.1)

La actividad de la enzima SOD fue 3.9 veces mayor en el tratamiento de limitación de nutrientes (2096.26 ± 416.50 U mg^{-1} proteína) con respecto al control (527.54 ± 209.44 U mg^{-1} proteína). Los resultados mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) y coincidieron con el aumento en la tasa de producción endógena de radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Fig. 12).

7.3.2 Catalasa (CAT) (E.C. 1.11.1.6)

La actividad de la enzima CAT fue 4.2 veces mayor en limitación de nutrientes (797.07 ± 244.16 U mg^{-1} proteína), con respecto al control (189.82 ± 53.31 U mg^{-1} proteína). Los resultados mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) (Fig. 12).

7.3.3 Glutación peroxidasa (GPx) (EC 1.11.1.9)

La actividad de la enzima GPx fue 4.3 veces mayor en el control (92.67 ± 12.23 U mg^{-1} proteína) con respecto al tratamiento en limitación de nutrientes (21.52 ± 3.69 U mg^{-1} proteína). Los resultados mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) (Fig. 12).

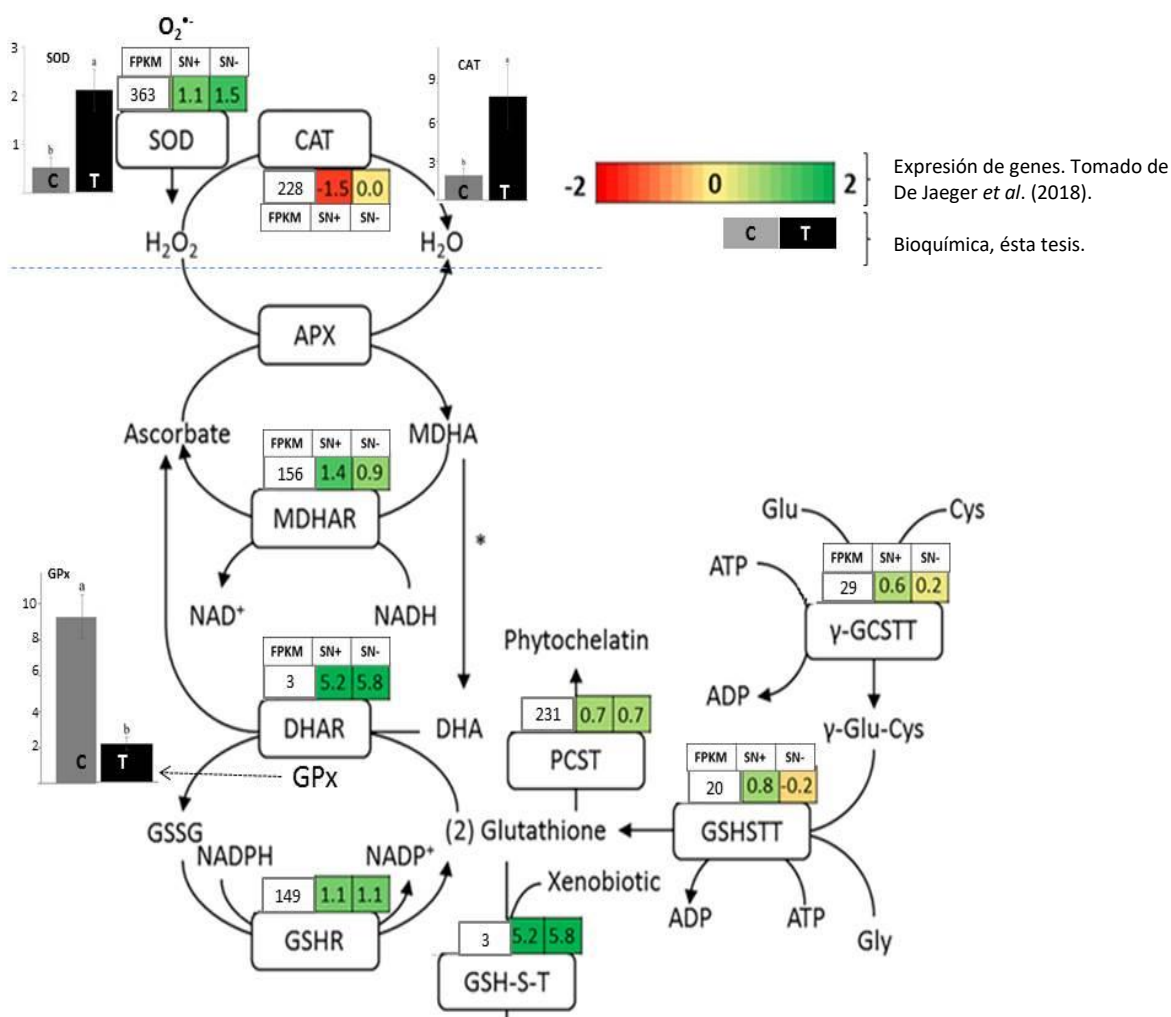


Figura 12. Comparativo de la expresión global de genes (tomada de De Jaeger *et al.*, 2018) y la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) en *Ectlia oleoabundans*. Los valores son expresados en unidades (U) de enzima por mg^{-1} proteína. Abreviaciones: FPKM: Fragmentos por kilobase de millones de fragmentos mapeados; SN+: Agua de mar sin limitación de nitrógeno (De Jaeger *et al.*, 2018); SN-: Agua de mar con limitación de nitrógeno (De Jaeger *et al.*, 2018); C: Control agua de mar sin limitación de nutrientes (ésta tesis); T: Tratamiento agua de mar con limitación de nutrientes (ésta tesis). APX Ascorbato peroxidasa; MDHA monodehydroascorbato; MDHAR monodehydroascorbato reductasa; DHA dehydroascorbato; DHAR dehydroascorbato reductasa; GSH glutatión reducido; GSSG glutatión oxidado; GSHR glutatión reductasa; Glu glutamato; Cys cisteína; Gly glicina; γ -GCSTT γ -glutamilcisteína sintetasa; γ -Glu-Cys γ -glutamilcisteína; GSHSTT glutatión sintetasa; GSH-S-T glutatión S-transferasa; PCST fitoquelatina sintetasa. Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0.05$ (Prueba de Wilcoxon para SOD y GPx y t-student para CAT).

7.4 Tasa de producción endógena de radical superóxido

La tasa de producción endógena de $O_2^{\bullet-}$ fue 1.96 veces mayor en limitación de nutrientes (0.139 ± 0.035 nmol mg^{-1} proteína min^{-1}) con respecto al control (0.071 ± 0.020 nmol mg^{-1} proteína min^{-1}). Los resultados mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) (Fig. 13).

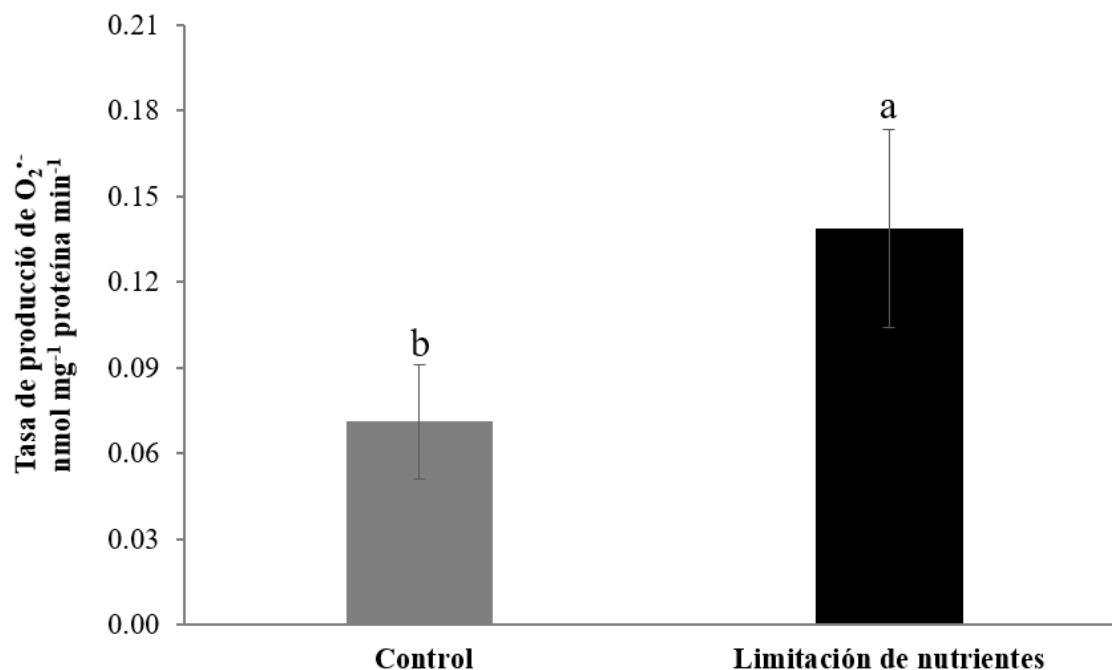


Figura 13. Tasa de producción endógena de radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) en *Ettlia oleoabundans* en el tratamiento control y limitación de nutrientes. Los valores están expresados en nmol mg^{-1} proteína min^{-1} . Las barras representan el promedio \pm intervalo de confianza. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0.05$ (t-student).

7.5 Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

La concentración de TBARS fue 3.4 veces mayor en limitación de nutrientes (3.81 ± 0.99 nmol mg^{-1} proteína) con respecto al control (1.12 ± 0.31 nmol mg^{-1} proteína). Los resultados mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) (Fig. 14).

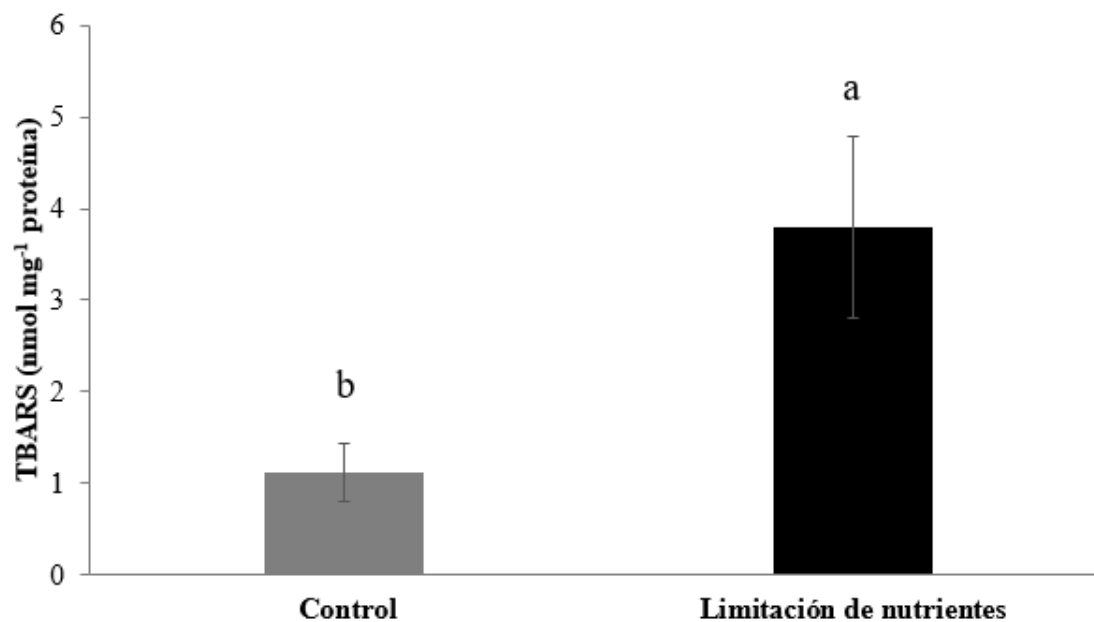


Figura 14. Contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en *Ettlia oleoabundans* en el tratamiento control y limitación de nutrientes. Valores expresados en nmol mg⁻¹ proteína. Las barras representan el promedio \pm intervalo de confianza. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0.05$ (t-student).

7.6 Capacidad antioxidante total

La capacidad antioxidante total en el control fue de $68.68 \pm 11.84 \mu\text{M}$ y en limitación de nutrientes de $54.349 \pm 8.49 \mu\text{M}$. No hubo diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$) (Fig. 15).

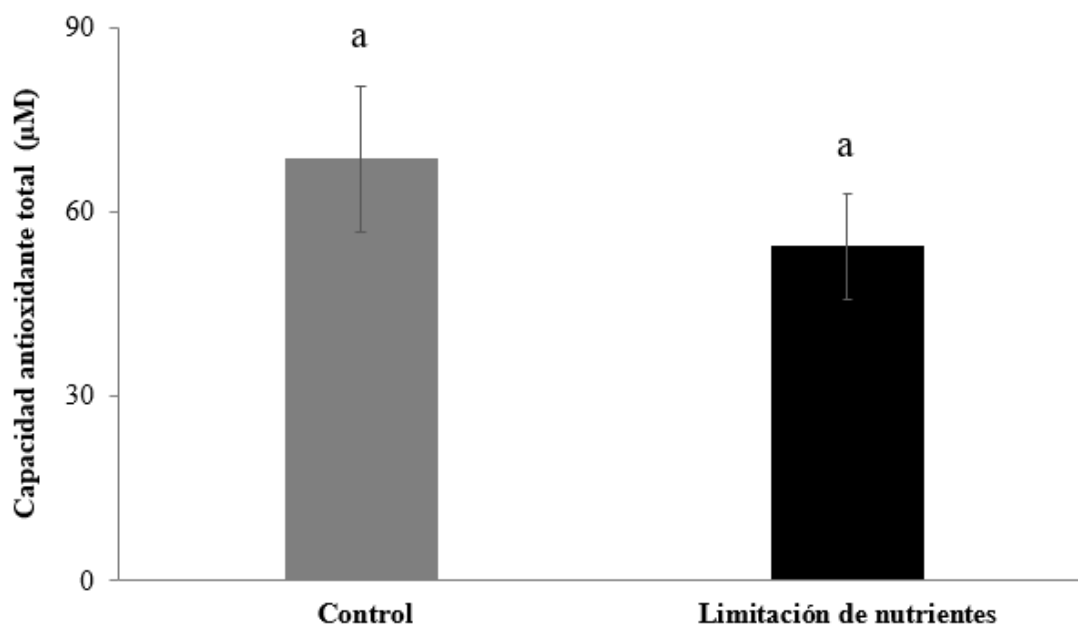


Figura 15. Capacidad antioxidante total de *Ettlia oleoabundans* expresada en µM en el tratamiento control y limitación de nutrientes. Las barras representan el promedio \pm intervalo de confianza. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0.05$ (t-student).

7.7 Proteínas totales

En el tratamiento de limitación de nutrientes, la concentración de las proteínas totales ($17 \pm 0.40\%$) fue 1.59 veces menor con respecto al control ($27 \pm 0.84\%$). Los resultados mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) (Fig. 16).

7.8. Carbohidratos totales

El contenido de carbohidratos fue 1.7 veces mayor en el tratamiento con limitación de nutrientes ($26 \pm 1.48\%$) con respecto al control ($15 \pm 1.55\%$). Los resultados mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) (Fig. 16).

7.9 Lípidos totales

El contenido de lípidos totales fue 1.8 veces mayor en el tratamiento con limitación de nutrientes ($28.4 \pm 0.17\%$) con respecto al control ($15.8 \pm 3\%$) (Fig. 17). Los resultados mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) (Fig. 16).

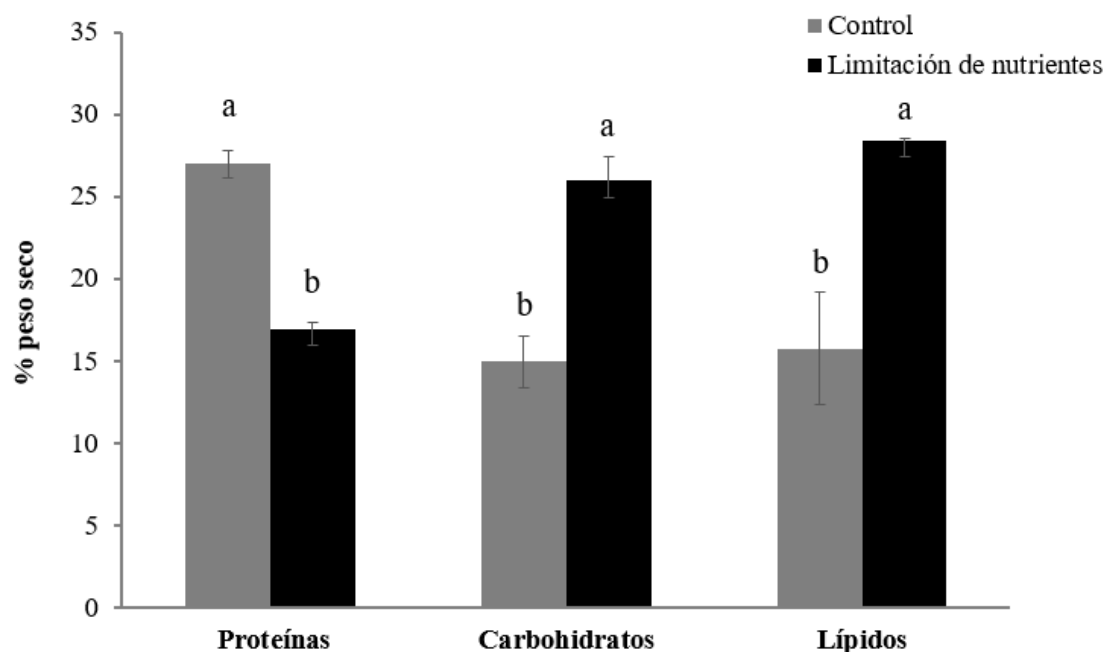


Figura 16. Contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos totales en *Ettlia oleoabundans* en el tratamiento control y limitación de nutrientes. Los valores son expresados en porcentaje (%) con respecto al peso seco. Las barras representan el promedio \pm intervalo de confianza. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0.05$ (Prueba de Wilcoxon).

7.10 Cuantificación de ácidos grasos

Los ácidos grasos (AG) de *E. oleoabundans* se agruparon de acuerdo al número de insaturaciones en saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI), biinsaturados (AGBI) y poliinsaturados (AGPI). El perfil de AG obtenidos en ambos tratamientos se muestra en la figura 17. Todos los resultados se expresaron como porcentajes con respecto al total de ácidos

grasos. Los AGS obtuvieron porcentajes de $34.34 \pm 3.55\%$ en el control y $30.31 \pm 1.13\%$ en limitación de nutrientes, sin diferencias significativas ($p > 0.05$). En ambos tratamientos, el ácido hexadecaenoico (C16:0) fue el más abundante con $29.64 \pm 3.06\%$ (control) y $26.85 \pm 0.99\%$ (limitación de nutrientes), sin diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$). El ácido tetradecanoico (C14:0) y el octadecanoico (C18:0), fueron los menos abundantes (Tabla VI).

En limitación de nutrientes, el porcentaje de AGMI ($17.74 \pm 2.87\%$) fue 2.48 veces mayor con respecto al control ($7.16 \pm 0.36\%$) (Fig. 17). El ácido cis-9-octadecaenoico (C18:1 ω 9) fue el que se encontró en mayor porcentaje en limitación de nutrientes ($16.03 \pm 3.04\%$), mientras que el ácido 11-hexadecaenoico (C16:1 ω 5) en el tratamiento control tuvo $3.94 \pm 0.24\%$. Otros ácidos grasos identificados en ambos tratamientos pero en menor porcentaje fueron el C16:1 ω 7 y el 11-octadecenoico (C18:1 ω 7) (Tabla VI).

En el caso de los AGBI los porcentajes para el control y limitación de nutrientes fueron de 19.42 ± 1.17 y $21.01 \pm 1.65\%$, respectivamente. No hubo diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$) (Fig. 17). El ácido 9,12-octadecadienoico (C18:2 ω 6) fue el más abundante en los dos tratamientos, con $16.68 \pm 1.05\%$ para el control y $20.14 \pm 1.71\%$ para limitación de nutrientes. El AGB de menor porcentaje fue el ácido 9,12-hexadecadienoico (C16:2 ω 6) (Tabla VI).

En cuanto a los AGPI, el porcentaje en el control fue de 38.50 ± 3.02 y en limitación de nutrientes de $30.65 \pm 4.52\%$, sin diferencias significativas ($p > 0.05$). El ácido 9, 12,15 octadecatrienoico (C18:3 ω 3) tuvo el mayor porcentaje en ambos tratamientos ($30.58 \pm 2.22\%$ en el control y $23.38 \pm 3.43\%$ en limitación de nutrientes). En menor porcentaje se identificó el ácido 8,11,14 hexadecatrienoico (C16:3 ω 3) con $7.93 \pm 0.86\%$ (control) y $7.27 \pm 1.14\%$ (limitación de nutrientes) (Tabla VI).

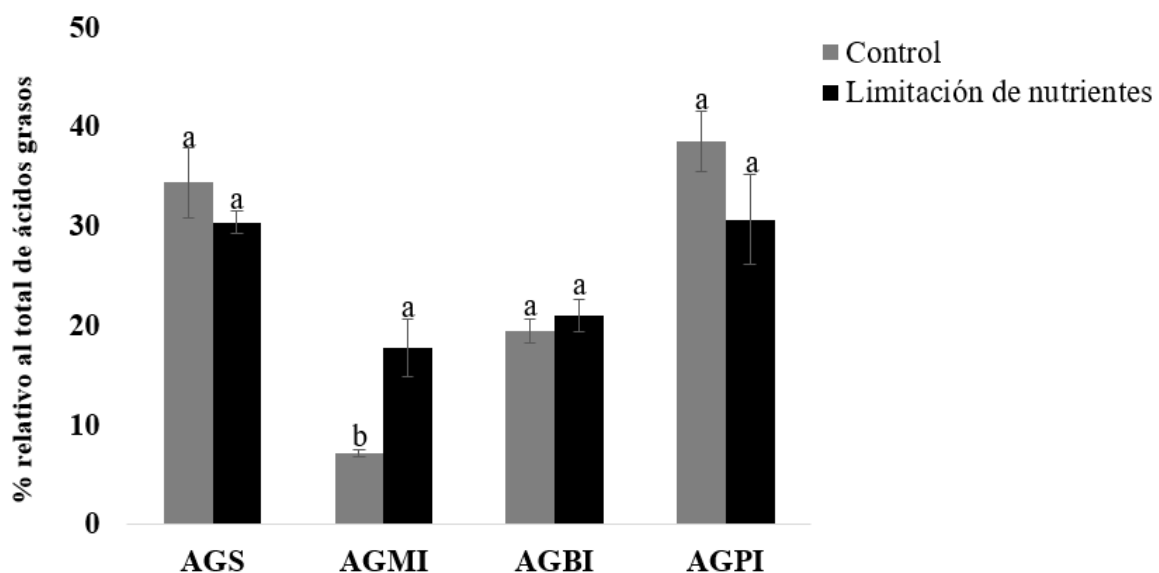


Figura 17. Grupo de ácidos grasos en *Ettlia oleoabundans* en el tratamiento control y limitación de nutrientes. AGS= ácidos grasos saturados. AGMI= ácidos grasos monoinsaturados. AGBI= ácidos grasos biinsaturados. AGPI = ácidos grasos poliinsaturados. Los valores son expresados en porcentaje relativo al total de ácidos grasos. Las barras representan el promedio \pm intervalo de confianza. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0.05$ (t-student).

Tabla VI. Perfil de ácidos grasos de *Ettlia oleoabundans*.

Ácido graso	Control (% con respecto al total de ácido grasos)	Limitación de nutrientes (% con respecto al total de ácido grasos)
14:0	3.47±0.32 ^a	1.56 ±0.17 ^b
16:0	29.64 ±3.06 ^a	26.85 ± 0.99 ^a
18:0	1.23±0.30 ^a	1.90 ± 0.22 ^a
ΣAGS	34.34 ± 3.55^a	30.31 ± 1.13^a
16:1ω7	0.32±0.12 ^a	0.15 ± 0.04 ^a
16:1ω5	3.94±0.24 ^a	0.75 ± 0.07 ^b
18:1ω9	2.29±0.16 ^b	16.03 ± 3.04 ^a
18:1ω7	0.61 ±0.12 ^a	0.81 ±0. 15 ^a
ΣAGMI	7.16 ± 036^b	17.74 ± 2.87^a
16:2ω6	2.74 ± 0.25 ^a	0.87 ± 0.15 ^b
18:2ω6	16.68 ± 1.05 ^b	20.14 ± 1.71 ^a
ΣAGBI	19.42 ± 1.17^a	21.01 ± 1.65^a
16:3ω3	7.93 ±0.86 ^a	7.27 ± 1.14 ^a
18:3ω3	30.58 ± 2.22 ^a	23. 38 ± 3.43 ^b
ΣAGPI	38.50 ± 3.02^a	30.65 ± 4.52^a
AGT %PS	0.97±0.21^a	1.29±0.42^a

Notas: Los valores son el promedio de réplicas independientes. ΣAGS ácidos grasos saturados. ΣAGMI ácidos grasos monoinsaturados. ΣAGBI ácidos grasos biinsaturados. ΣAGPI ácidos grasos poliinsaturados. AGT ácidos grasos totales ± intervalo de confianza. Letras diferentes en superíndice indican diferencias significativas $p < 0.05$ (t-student).

7. 11 Cuantificación de ácidos grasos en las fracciones lipídicas

Se cuantificó el perfil de ácidos grasos en las fracciones de lípidos neutros (NL, por sus abreviaciones en inglés), galactolípidos (AMPL, por sus abreviaciones en inglés) y fosfolípidos o lípidos polares (PL, por sus abreviaciones en inglés) para cada condición de cultivo.

Fracción NL: los AGS obtuvieron porcentajes de $52.48 \pm 3.30\%$ para el control y $36.17 \pm 0.80\%$ en limitación de nutrientes, con una disminución significativa ($p < 0.05$) entre tratamientos (Fig. 18). El ácido graso más abundante en ambos tratamientos fue el hexadecaenoico (C16:0) con $29.90 \pm 1.82\%$ y $27.39 \pm 0.41\%$ para el control y limitación de nutrientes, respectivamente (Tabla VII).

En limitación de nutrientes, el porcentaje de AGMI ($30.37 \pm 1.34\%$) fue 3.46 veces mayor con respecto al control ($8.78 \pm 0.93\%$) (Fig. 18). El ácido C18:1 ω 9 fue el que se encontró en mayor porcentaje en ambos tratamientos, con $6.71 \pm 0.84\%$ para el control y $29.59 \pm 1.48\%$ en limitación de nutrientes ($p < 0.05$). Otros ácidos grasos identificados en ambos tratamientos pero en menor porcentaje fueron el C16:1 ω 7 y el C18:1 ω 7 (Tabla VII).

En el caso de los AGBI, los valores para el control y limitación de nutrientes fueron de $22.16 \pm 2.26\%$ y $26.16 \pm 1.35\%$, respectivamente. No hubo diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$) (Fig. 18). El ácido 9,12 octadecadienoico (C18:2 ω 6) fue el más abundante en ambos tratamientos, con $21.78 \pm 2.29\%$ para el control y $26.16 \pm 1.35\%$ para limitación de nutrientes. El AGB de menor porcentaje fue el ácido 9,12-hexadecadienoico (C16:2 ω 6) (Tabla VII).

En cuanto a los AGPI, en el control fue de $16.18 \pm 1.24\%$ y en limitación de nutrientes de $7.08 \pm 1.83\%$. El ácido 9, 12,15 octadecatrienoico (C18:3 ω 3) tuvo el mayor porcentaje en ambos tratamientos (control: $14.80 \pm 1.14\%$ y en limitación de nutrientes: $6.04 \pm 0.98\%$). Los resultados mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$), entre tratamientos. En menor porcentaje se identificó el ácido 8, 11,14 hexadecatrienoico (C16:3 ω 3) (Tabla VII).

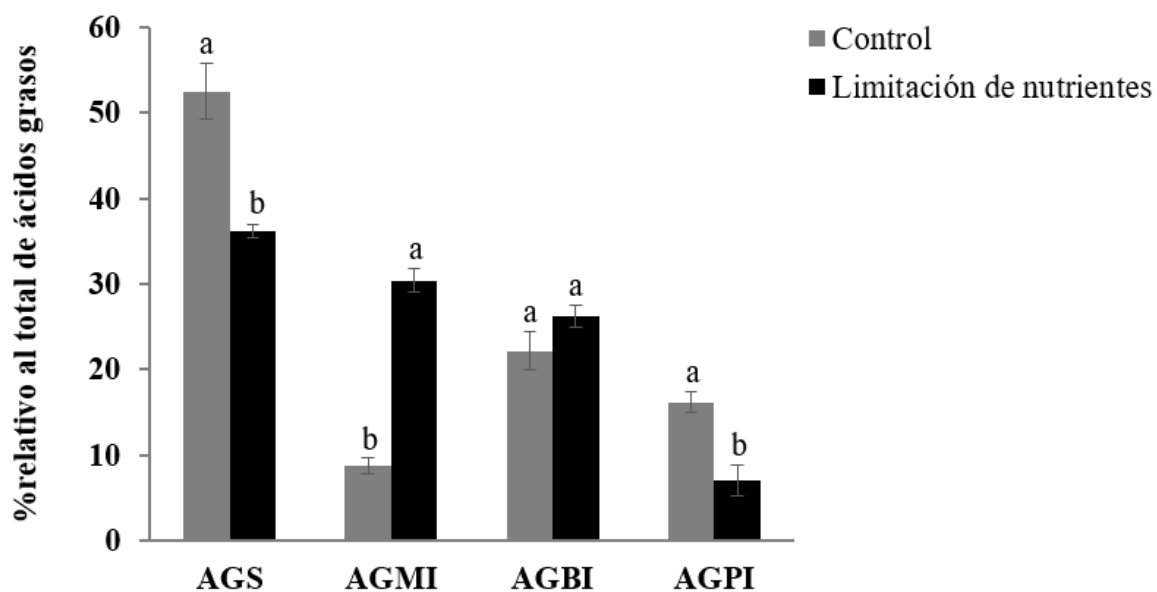


Figura 18. Grupo de ácidos grasos de la fracción de lípidos neutros (NL) de *Etilia oleoabundans* en el tratamiento control y limitación de nutrientes. AGS= ácidos grasos saturados. AGMI= ácidos grasos monoinsaturados. AGBI= ácidos grasos biinsaturados. AGPI = ácidos grasos poliinsaturados. Los valores son expresados en porcentaje relativo al total de ácidos grasos. Las barras representan el promedio \pm intervalo de confianza. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0.05$ (t-student).

Tabla VII. Perfil de ácidos grasos en la fracción de lípidos neutros (NL) de *Ettlia oleoabundans*.

Ácido graso	Control (% con respecto al total de ácidos grasos)	Limitación de nutrientes (% con respecto al total de ácidos grasos)
14:0	7.98 ± 0.93 ^a	1.41 ± 0.12 ^b
16:0	29.90 ± 1.82 ^a	27.39 ± 0.41 ^a
18:0	14.60 ± 2.02 ^a	7.38 ± 0.88 ^b
ΣAGS	52.48 ± 3.30^a	36.17 ± 0.80^b
16:1ω7	0.33 ± 0.10 ^a	0.18 ± 0.06 ^a
16:1ω5	0.29 ± 0.06 ^a	0.06 ± 0.03 ^b
18:1ω9	6.71 ± 0.84 ^b	29.59 ± 1.48 ^a
18:1ω7	1.45 ± 0.12 ^a	0.54 ± 0.09 ^b
ΣAGMI	8.78 ± 0.93^b	30.37 ± 1.34^a
16:2ω6	0.38 ± 0.14 ^a	ND
18:2ω6	21.78 ± 2.29 ^b	26.16 ± 1.35 ^a
ΣAGBI	22.16 ± 2.26^a	26.6 ± 1.35^a
16:3ω3	1.38 ± 0.17 ^a	1.03 ± 1.05 ^a
18:3ω3	14.8 ± 1.14 ^a	6.04 ± 0.98 ^b
ΣAGPI	16.18 ± 1.24^a	7.08 ± 1.83^b
AGT %PS	0.20±0.07^b	0.76±0.23^a

Notas: Los valores son el promedio de réplicas independientes. ΣAGS ácidos grasos saturados. ΣAGMI ácidos grasos monoinsaturados. ΣAGBI ácidos grasos biinsaturados. ΣAGPI ácidos grasos poliinsaturados. AGT ácidos grasos totales ± intervalo de confianza. Letras diferentes en superíndice indican diferencias significativas $p < 0.05$ (t-student).

Fracción AMPL: en el tratamiento en limitación de nutrientes, el porcentaje de AGS aumentó 2.12 veces con respecto al control. Los resultados mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$). Los porcentajes por tratamiento fueron para el control $13 \pm 1.66\%$ y $27.6 \pm 4.30\%$ en limitación de nutrientes. (Fig. 19). En ambos tratamientos, el ácido hexadecaenoico (C16:0) fue el más abundante con porcentajes de $8.20 \pm 0.87\%$ (control) y

$17.46 \pm 2.67\%$ (limitación de nutrientes), con diferencias significativas ($p < 0.05$). El ácido tetradecanoico (C14:0) y octadecanoico (C18:0) fueron los menos abundantes (Tabla VIII).

En limitación de nutrientes, el porcentaje de AGMI ($4.7 \pm 0.97\%$) fue 2.5 veces mayor con respecto al control ($1.84 \pm 0.35\%$) (Fig. 19). El ácido *cis* 9 octadecaenoico (C18:1 ω 9) fue el que se encontró en mayor porcentaje en limitación de nutrientes ($3.44 \pm 0.93\%$) con respecto al control ($0.90 \pm 0.09\%$). Otros ácidos grasos identificados en ambos tratamientos pero en menor porcentaje fueron el C16:1 ω 7 y el C18:1 ω 7 (Tabla VIII).

En el caso de los AGBI, los valores para el control y limitación de nutrientes fueron de $17.76 \pm 1.12\%$ y $6.02 \pm 1.83\%$, respectivamente. Estos resultados mostraron diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$) (Fig. 19). El ácido 9,12 octadecadienoico (C18:2 ω 6) fue el más abundante en ambos tratamientos, con porcentajes de $10.45 \pm 0.86\%$ para el control y $6.02 \pm 1.83\%$ para limitación de nutrientes. El AGB de menor porcentaje fue el ácido 9,12 hexadecadienoico (C16:2 ω 6) que solamente se encontró en el control (7.31 ± 0.33) (Tabla VIII). Los AGPI no mostraron diferencias significativas.

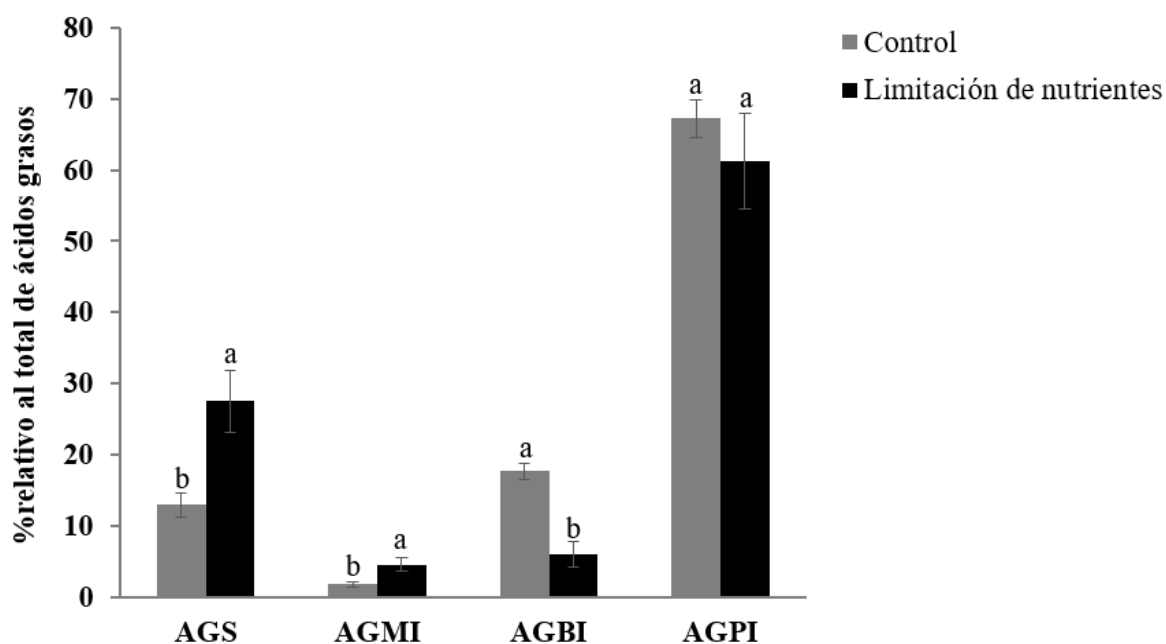


Figura 19. Grupo de ácidos grasos de la fracción de lípidos afines a la acetona (AMPL) de *Ettlia oleoabundans* en el tratamiento control y limitación de nutrientes. AGS= ácidos grasos saturados. AGMI= ácidos grasos monoinsaturados. AGBI= ácidos grasos biinsaturados. AGPI = ácidos grasos poliinsaturados. Los valores son expresados en porcentaje relativo al total de ácidos grasos. Las barras representan el promedio \pm intervalo de confianza. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0.05$ (t-student).

Tabla VIII. Perfil de ácidos grasos en la fracción de lípidos afines a la acetona (AMPL) de *Ettlia oleoabundans*.

Ácido graso	Control (% con respecto al total de ácidos grasos)	Limitación de nutrientes (% con respecto al total de ácidos grasos)
14:0	2.60 ± 0.28 ^b	3.76 ± 0.49 ^a
16:0	8.20 ± 0.87 ^b	17.46 ± 2.67 ^a
18:0	2.20 ± 0.66 ^b	6.34 ± 1.35 ^a
ΣAGS	13.0 ± 1.66^b	27.6 ± 4.30^a
16:1ω7	0.32 ± 0.04 ^a	0.49 ± 0.14 ^a
16:1ω5	0.28 ± 0.28 ^a	0.29 ± 0.16 ^a
18:1ω9	0.90 ± 0.09 ^b	3.44 ± 0.93 ^a
18:1ω7	0.34 ± 0.09 ^a	0.42 ± 0.16 ^a
ΣAGMI	1.84 ± 0.35^b	4.7 ± 0.97^a
16:2ω6	7.31 ± 0.33 ^a	ND
18:2ω6	10.45 ± 0.86 ^a	6.02 ± 1.83 ^b
ΣAGBI	17.76 ± 1.12^a	6.02 ± 1.83^b
16:3ω3	27.14 ± 1.71 ^a	25.51 ± 4.06 ^a
18:3ω3	40.08 ± 1.53 ^a	35.77 ± 3.85 ^a
ΣAGPI	67.2 ± 2.63^a	61.3 ± 6.66^a
AGT%PS	0.38 ± 0.14^a	0.20 ± 0.07^a

Notas: Los valores son el promedio de réplicas independientes. ΣAGS ácidos grasos saturados. ΣAGMI ácidos grasos monoinsaturados. ΣAGBI ácidos grasos biinsaturados. ΣAGPI ácidos grasos poliinsaturados. AGT ácidos grasos totales ± intervalo de confianza. Letras diferentes en superíndice indican diferencias significativas $p < 0.05$ (t-student).

Fracción PL: Los AGS fueron los más abundantes en ambos tratamientos (Fig. 20). En el control se tuvo $40.19 \pm 6.36\%$ y en limitación de nutrientes fue de $41.65 \pm 2.21\%$. El ácido hexadecaenoico (C16:0) se encontró con porcentajes de $27.16 \pm 3.11\%$ y $30.85 \pm 1.73\%$ para el control y limitación de nutrientes, respectivamente. El ácido octadecanoico (C18:0) presentó porcentajes de $11.55 \pm 3.01\%$ (control) y $9.69 \pm 1.78\%$ (limitación de nutrientes) (Tabla IX). No hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) entre tratamientos, al igual que para AGMI y AGBI. Con respecto a los AGP, en el control fue de $13.88 \pm 3.16\%$ y en el

tratamiento de limitación de nutrientes $8.31 \pm 0.65\%$ (Fig. 20). Los resultados mostraron una disminución significativa entre tratamientos ($p < 0.05$).

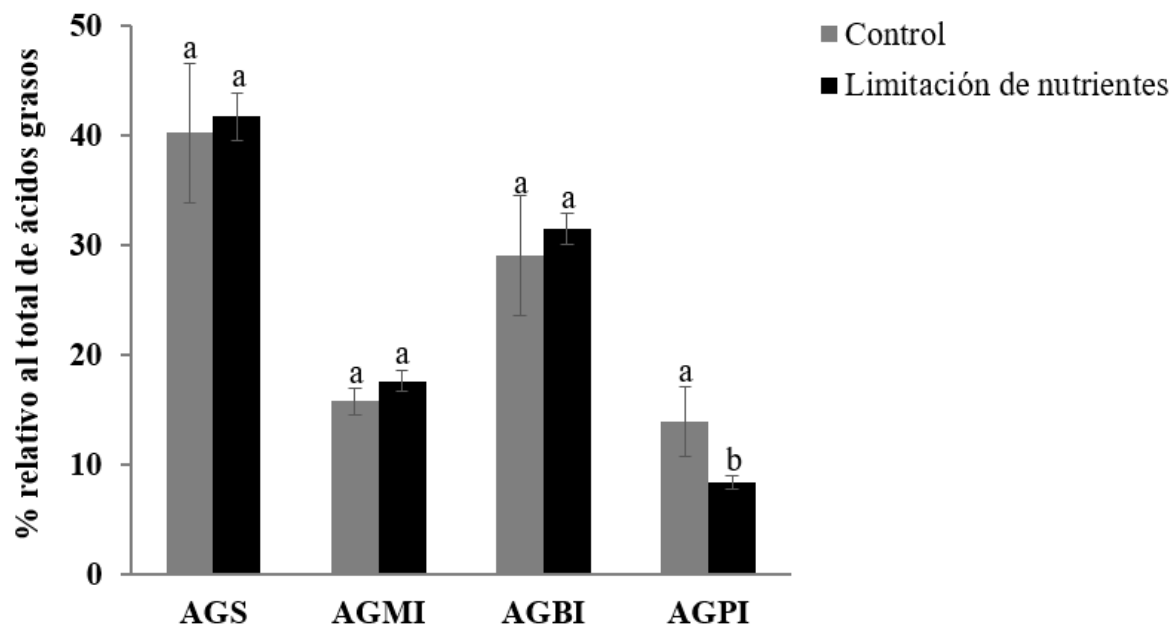


Figura 20. Grupo de ácidos grasos de la fracción de lípidos polares (PL) de *Ectliia oleoabundans* en el tratamiento control y limitación de nutrientes. AGS= ácidos grasos saturados. AGMI= ácidos grasos monoinsaturados. AGBI= ácidos grasos biinsaturados. AGPI = ácidos grasos poliinsaturados. Los valores son expresados en porcentaje relativo al total de ácidos grasos. Las barras representan el promedio \pm intervalo de confianza. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0.05$ (t-student).

Tabla IX. Perfil de ácidos grasos en la fracción de lípidos polares (PL) de *Ettlia oleoabundans*.

Ácido graso	Control (% con respecto al total de ácidos grasos)	Limitación de nutrientes (% con respecto al total de ácidos grasos)
14:0	1.48 ± 0.51 ^a	1.12 ± 0.27 ^a
16:0	27.16 ± 3.11 ^a	30.85 ± 1.73 ^a
18:0	11.55 ± 3.01 ^a	9.69 ± 1.78 ^a
ΣAGS	40.19 ± 6.36^a	41.65 ± 2.21^a
16:1ω7	1.04 ± 0.26 ^a	0.97 ± 0.15 ^a
16:1ω5	1.65 ± 0.22 ^a	1.17 ± 0.46 ^a
18:1ω9	9.52 ± 1.20 ^a	11.40 ± 0.69 ^a
18:1ω7	3.49 ± 0.33 ^a	3.98 ± 0.46 ^a
ΣAGMI	15.69 ± 1.20^a	17.52 ± 0.95^a
16:2ω6	0.85 ± 0.21 ^a	ND
18:2ω6	28.13 ± 5.42 ^a	31.46 ± 1.40 ^a
ΣAGBI	28.98 ± 5.43^a	31.46 ± 1.40^a
16:3ω3	2.63 ± 0.47 ^a	1.03 ± 0.15 ^b
18:3ω3	11.26 ± 3.30 ^a	7.28 ± 0.65 ^a
ΣAGPI	13.88 ± 3.16^a	8.31 ± 0.65^b
AGT %PS	0.04±0.01^a	0.05±0.01^a

Notas: Los valores son el promedio de réplicas independientes. ΣAGS ácidos grasos saturados. ΣAGMI ácidos grasos monoinsaturados. ΣAGBI ácidos grasos biinsaturados. ΣAGPI ácidos grasos poliinsaturados. AGT ácidos grasos totales ± intervalo de confianza. Letras diferentes en superíndice indican diferencias significativas $p < 0.05$ (t-student).

7.12 Pigmentos

En *E. oleoabundans* se identificaron los pigmentos violaxantina, luteína y las clorofilas *a* y *b*, mostrando diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$). El pigmento más abundante en el control fue la clorofila *a* con $0.80 \pm 0.26 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $0.16 \pm 0.031 \mu\text{g mL}^{-1}$ en limitación de nutrientes, seguida por la luteína con 0.26 ± 0.08 y $0.069 \pm 0.013 \mu\text{g mL}^{-1}$ para el control y limitación de nutrientes, respectivamente. También se identificaron los

feofórbides, que son productos de la degradación de la clorofila *a*. No hubo diferencias significativas entre tratamientos ($p>0.05$) (Fig. 21).

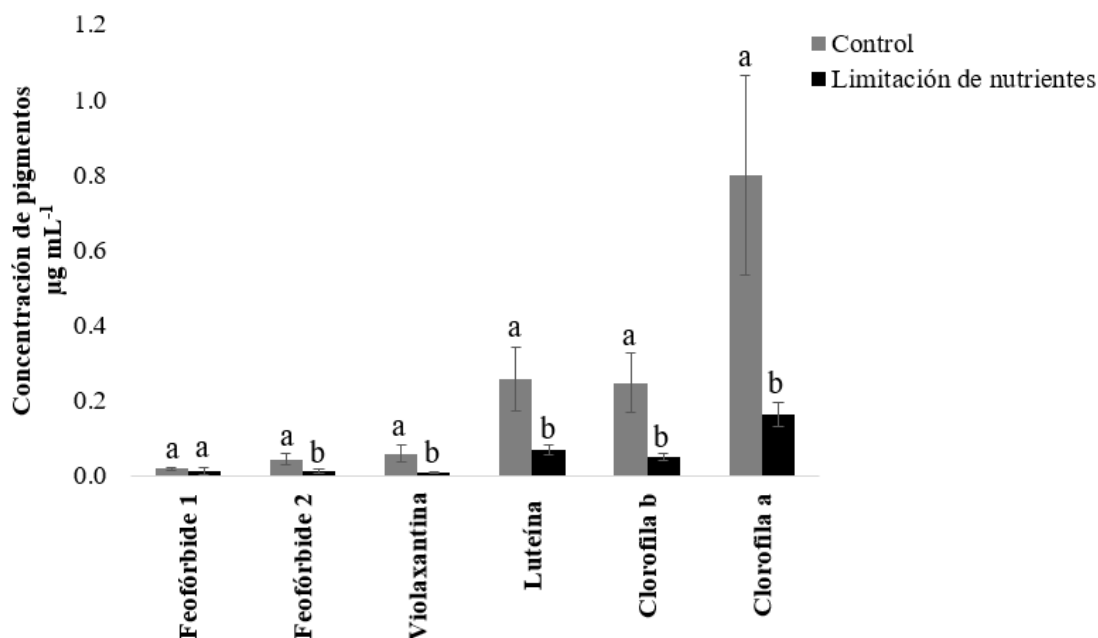


Figura 21. Pigmentos de *Ettlia oleoabundans* en el tratamiento control y en limitación de nutrientes. Los valores son expresados en $\mu\text{g mL}^{-1}$. Las barras representan el promedio \pm intervalo de confianza. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p<0.05$ (t-student).

Tabla X. Concentración de pigmentos en *Ettlia oleoabundans*.

Pigmento	Control ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Limitación de nutrientes ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Feofórbide 1	0.02 ± 0.00^a	0.013 ± 0.009^a
Feofórbide 2	0.05 ± 0.02^a	0.013 ± 0.006^b
Violaxantina	0.06 ± 0.02^a	0.010 ± 0.003^b
Luteína	0.26 ± 0.08^a	0.069 ± 0.013^b
Clorofila <i>b</i>	0.25 ± 0.08^a	0.052 ± 0.009^b
Clorofila <i>a</i>	0.80 ± 0.26^a	0.164 ± 0.031^b
ΣPigmentos ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1.55^a	0.35^b

8. DISCUSIÓN

8.1 Crecimiento y productividad de la biomasa.

Las microalgas se adaptan naturalmente a un ambiente en el que los nutrientes disponibles fluctúan continuamente. Este proceso implica dos respuestas, específicas y generales. Las específicas son aquellas que permiten que el nutriente limitante sea utilizado eficazmente a través de la inducción de sistemas de transporte de alta afinidad. Así mismo, favorecen la síntesis de enzimas hidrolíticas, que facilitan la liberación del nutriente desde moléculas orgánicas extracelulares o de reservas internas. En cambio, las respuestas generales ocurren cuando un organismo experimenta diferentes condiciones de estrés. Incluyen cambios en la tasa de división celular y alteraciones globales en las actividades metabólicas (Grossman y Takahashi, 2001).

Se ha reportado que la limitación de nitrógeno en los cultivos de microalgas disminuye la proliferación celular (Li *et al.*, 2008; Pruvost *et al.*, 2009). En *E. oleoabundans* se han probado tratamientos con diferentes medios de cultivo y variaciones en las concentraciones de nutrientes, principalmente del nitrógeno (De Jagger *et al.*, 2018; Garibay *et al.*, 2013).

En este estudio, se observó que los parámetros poblacionales cuantificados, como la μ , el rendimiento y productividad de la biomasa, fueron menores en el tratamiento en limitación de nutrientes comparados con el control. La μ en condiciones control fue de 0.2 d^{-1} , resultado semejante al obtenido por Félix-Castro (2016). Esta semejanza puede deberse al hecho de que ambos medios están adicionados con fertilizantes agrícolas cuyas composiciones elementales son similares. Además, el nitrógeno se aportó en la misma concentración ($882 \mu\text{M}$) en ambos casos. En limitación de nutrientes la μ fue menor que en el tratamiento control, con un valor de 0.15 d^{-1} . Sin embargo, Popovich *et al.* (2012), reportaron que no hubo crecimiento cuando sometieron a *E. oleoabundans* a deficiencia de nutrientes, utilizando medio F/2 sin nitrógeno.

Cuando los nutrientes en el medio de cultivo están limitados, la división celular y la tasa de crecimiento son afectadas negativamente. En *E. oleoabundans*, se ha observado que la

división celular continúa incluso en condiciones en las que los nutrientes están limitados y se ha sugerido que dicho crecimiento es posible debido al uso de fuentes de nitrógeno intracelular, como las proteínas y las moléculas de clorofila (Li *et al.*, 2008).

El Tg tiene una relación inversa a la μ , dado que si hay menor división celular, el tiempo necesario para que la concentración se duplique es mayor. Esto se corroboró en este estudio, ya que el Tg fue mayor en limitación de nutrientes (4.56 d) que en el control (3.76 d). Gouveia *et al.* (2009), observaron el mismo comportamiento en esta especie, cultivada en medio dulceacuícola, resultando el Tg de 3.9 d para el control y 5 d para la deficiencia de nitrógeno.

La productividad de la biomasa obtenida en este estudio, para ambos tratamientos en agua de mar fue de 49.22 mg L⁻¹d⁻¹ para el control y 20.71 mg L⁻¹d⁻¹ en limitación de nutrientes, siendo menor en comparación a los valores reportados en medio dulceacuícola por Garibay *et al.* (2013), que en condiciones de suficiencia y deficiencia de nitrógeno, obtuvieron 85 mg L⁻¹ d⁻¹ y 68 mg L⁻¹ d⁻¹, respectivamente, al igual que Gouveia *et al.* (2009), quienes reportaron 90 mg L⁻¹ d⁻¹ en el control y 30 mg L⁻¹ d⁻¹ para la deficiencia de nitrógeno. Esto podría deberse al hecho de que *E. oleoabundans* es considerada una especie que crece preferentemente en agua dulce, pero ha sido adaptada al crecimiento en agua de mar, lo que conlleva un mayor gasto energético enfocado a la producción de compuestos osmoreguladores, como la prolina (De Jagger *et al.*, 2018) que permitan su crecimiento en este medio.

8.2 Rendimiento cuántico efectivo *in situ* Y(II)

Los organismos fotosintéticos en condiciones ambientales están expuestos a flujos de materia y energía, por lo que han desarrollado diferentes estrategias de protección que incluyen mecanismos a corto (alteraciones en la actividad fotosintética), mediano (modificaciones en los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos) y largo plazo (cambios a nivel de ADN) (Kerr y McElroy, 1993; McKeenzie *et al.*, 1999).

Como se ha mencionado anteriormente, la fluorescencia proporciona información acerca de la capacidad de un organismo fotosintético para tolerar el estrés ambiental así como el grado de daño en el aparato fotosintético.

En el presente estudio, se usó la cuantificación de la emisión de la fluorescencia de la clorofila *a* para determinar el rendimiento cuántico efectivo *in situ* Y(II). En el cultivo de *E. oleoabundans* en condiciones de limitación de nutrientes, el valor máximo fue de 0.72 y el mínimo de 0.35. Así mismo, se observó una disminución significativa de Y(II) en los días cuatro y cinco en comparación con el control, donde el valor máximo fue de 0.77 y el mínimo de 0.48.

Entre los estudios previos relacionados a fotobiología, se encuentra el de Figueroa *et al.* (2001), quienes investigaron el efecto de la radiación solar UV durante el ciclo diario de luz sobre la actividad fotosintética en macroalgas del sur de España. Durante los ciclos diarios, la fotoinhibición fue linealmente dependiente de la irradiancia diaria, en las diferentes macroalgas, la cual se expresó como el porcentaje de disminución del rendimiento cuántico efectivo ($\Delta F/F_m'$). El mismo grupo trabajó con *Gracilaria conferta* y la expuso a dos concentraciones de nutrientes, denominadas alto y bajo. Observaron una disminución del Y(II) en el transcurso del día y un valor menor cuando hubo bajo suministro de nutrientes (Figueroa *et al.*, 2010).

Hernández-Uribe (2016) cultivó *Spirulina maxima* en suficiencia y deficiencia de nitrógeno y obtuvo una tendencia igual a la observada en *E. oleoabundans*, donde Y(II) disminuyó con respecto al tiempo. Al momento de la cosecha, en *S. maxima* el valor de Y(II) en deficiencia de nitrógeno fue de 0.22. En el caso de la cianobacteria *Phormidium persicinum* sometida al mismo tratamiento que *S. maxima*, no se observaron diferencias entre los tratamientos.

El aumento de fluorescencia se ha explicado como una consecuencia de la reducción (ganancia de electrones) del total de aceptores de electrones en el FSII, particularmente la quinona A (QA) y la plastoquinona (PQ). Cuando el FSII absorbe luz y QA ha aceptado un electrón, ya no es capaz de aceptar otro hasta que el primero ha pasado. Durante este periodo, el centro de reacción está "cerrado" porque está totalmente reducido. En cualquier punto en

el tiempo, la presencia de una proporción de centros de reacción reducidos "cerrados", conduce a una disminución en la eficiencia fotoquímica, con un correspondiente incremento en la fluorescencia.

El nitrógeno es el precursor para la síntesis de aminoácidos, proteínas, bases nitrogenadas y otros compuestos derivados. Durante la limitación de este elemento, dichos compuestos sirven como nutrientes, los cuales primeramente son convertidos a amonio intracelular, después es asimilado por la ruta glutamina sintetasa-glutamato sintasa por la incorporación al esqueleto carbonado de 2-oxoglutarato, resultando en la síntesis de glutamato (Lee *et al.*, 1999). A nivel de expresión génica, se ha reportado una disminución en la tasa de síntesis de proteínas, aunque se ha demostrado una inducción de la síntesis de ciertas proteínas que se requieren para el proceso de aclimatación (Aldehni *et al.*, 2003; Roche y Sauer, 2001).

En el presente estudio, se observó cambio de coloración en el cultivo en el tratamiento en limitación de nutrientes, el cual está relacionado a procesos de clorosis debido a la limitación de nitrógeno. Este proceso de clorosis, se ha observado en otros organismos como plantas, y algas. Las microalgas difieren con respecto a su tolerancia al estrés ambiental. Los distintos niveles de tolerancia están determinados por la eficiencia fotosintética, composición pigmentaria e historia evolutiva (He *et al.*, 2002).

En otros estudios, se observó que el estrés inducido por exposición a radiación UV-B en cianobacterias, generó degradación de los polipéptidos D-1 y D-2 del complejo antena de FSII (Campbell *et al.*, 1998; Sass *et al.*, 1997).

En general, el daño a los centros fotoquímicos del fotosistema genera ERO que provoca el blanqueo de los pigmentos, daño a la proteína D-1 y aumento de la oxidación de lípidos de membrana (Bischof *et al.*, 2002; He y Häder, 2002; Hideg *et al.*, 1994). Estos procesos están relacionado con deficiencias en el funcionamiento del FSII y del transporte de electrones, que conlleva a una disminución del Y(II) como se observó en el presente estudio con *E. oleobundans*.

8.3 Indicadores de estrés y daño oxidativo

En los organismos fotosintéticos debe haber una regulación precisa de la actividad fotosintética, ya que cuando la limitación severa de nutrientes evita el crecimiento celular continuo, la excitación de los pigmentos podría dar lugar a la formación de ERO, que pueden dañar las características estructurales y funcionales de la célula.

La producción de ERO en las microalgas se da de manera continua, ya que son organismos que poseen un metabolismo energético basado en reacciones de oxidación-reducción (Mano, 2002). Si las condiciones óptimas de cultivo son modificadas, la fisiología del organismo puede verse alterada y favorecer la producción de ERO. Un desbalance en el equilibrio entre pro- y antioxidantes a favor de los primeros, puede ocasionar estrés y posteriormente, daño oxidativo (Sies, 1986).

En este estudio se observó que el tratamiento en limitación de nutrientes provocó estrés oxidativo, ya que la tasa de producción de $O_2^{\bullet-}$ fue mayor (0.139 ± 0.035 nmol mg^{-1} proteína min^{-1}) en comparación con el control (0.071 ± 0.020 nmol mg^{-1} proteína min^{-1}), y ello incrementó la oxidación de los lípidos. Se observó una mayor concentración de TBARS en el tratamiento en limitación de nutrientes (3.81 ± 0.99 nmol mg^{-1} proteína), comparado con el control (1.12 ± 0.31 nmol mg^{-1} proteína). Este efecto también se reportó en las clorofíceas *Dunaliella salina* (Yilancioglu *et al.*, 2014), *Chorella sorokiniana* (Zhang *et al.*, 2013) y *Chlorella pyrenoidosa*, (Fan *et al.*, 2014) al someterlas a deficiencia de nitrógeno.

Chokshi *et al.* (2017) cultivaron a *Acutodesmus dimorphus* en deficiencia de nitrógeno y evaluaron la producción de $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 y el daño a lípidos. A diferencia del presente estudio, observaron que en el tratamiento con estrés los niveles de $O_2^{\bullet-}$ disminuyeron en comparación con el control; sin embargo, los de H_2O_2 aumentaron, pasando de $1.4 \mu g g^{-1}$ en el control a $2.33 \mu g g^{-1}$ en deficiencia de nitrógeno. Con respecto a la peroxidación lipídica, no hubo variación significativa entre los tratamientos, debido principalmente a la desviación estándar en los cultivos sin nitrógeno en los días 1 y 2. Sin embargo, la peroxidación lipídica fue numéricamente más alta ($2.33 \pm 0.29 \mu M g^{-1}$ de peso fresco) en el tercer día del cultivo sin nitrógeno.

Hernández-Uribe (2016) reportó en la cianobacteria *Phormidium persicinum* cultivada en deficiencia de nitrógeno y expuesta a radiación UV, una tasa de producción de $O_2^{\bullet-}$ de $0.164 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ proteínas min}^{-1}$, similar a la obtenida en *E. oleoabundans*. El daño oxidativo a lípidos (TBARS) también fue evaluado y obtuvo un valor de $2.43 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ proteínas min}^{-1}$. Este comportamiento puede ser explicado de acuerdo a lo reportado por Tichy y Vermaas, (1999), quienes encontraron que la deficiencia de nitrógeno promueve la fotorespiración en organismos fotosintéticos, generando ERO que pueden llevar a estrés oxidativo. En este estudio, se observó un aumento de la lipoperoxidación en limitación de nutrientes, debido a un incremento de ERO y una disminución de algunos compuestos antioxidantes, tipo carotenoides, como la luteína ($0.26 \pm 0.08 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ para el control y $0.069 \pm 0.013 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ para limitación de nutrientes) valor control vs valor limitación) y violaxantina ($0.06 \pm 0.02 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ para el control y $0.010 \pm 0.003 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ para limitación de nutrientes). Estos compuestos forman parte del mecanismo de defensa frente a ERO y evitan las reacciones en cadena en las membranas celulares. Sin embargo, cuando la capacidad protectora y de reparación es excedida, otras biomoléculas como proteínas, pigmentos y lípidos sufren daño oxidativo (Barros *et al.*, 2003).

8.4 Enzimas antioxidantes

De las enzimas antioxidantes, SOD es la primera línea de defensa contra las ERO, dismutando el $O_2^{\bullet-}$ y reduciéndolo a H_2O_2 (Ahmad, 2010; Halliwell, 2006). Posteriormente, intervienen otras enzimas antioxidantes, entre las que se encuentra la catalasa. Ésta se encarga de detoxificar el H_2O_2 sin necesidad de ningún cofactor como fuente de electrones. Esta ventaja energética frente a otras peroxidasas es contrarrestada por su baja afinidad por el H_2O_2 , por lo que CAT es activa preferentemente a altas concentraciones de este sustrato (Arora *et al.*, 2002). Es especialmente abundante en los peroxisomas, donde puede evitar que el H_2O_2 difunda hacia el citoplasma y reaccione con otras moléculas (Engel *et al.*, 2006; Feierabend, 2005; Vuleta *et al.*, 2010). Se ha sugerido un aumento en la actividad de CAT

por efecto de la temperatura, la exposición a cobre, la luz ultravioleta (Mataix-Verdú *et al.*, 2001) y el estrés salino (Vega *et al.*, 2006).

En este estudio se observó que las actividades de SOD y CAT fueron mayor en el tratamiento en limitación de nutrientes en comparación con el control. Este resultado concuerda con la mayor tasa de producción de $O_2^{\bullet-}$, provocado por el estrés nutricional. Al haber mayor producción de ERO (como $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2), aumentó la actividad de las enzimas encargadas de contrarrestarlas. Otros estudios, como el de Hernández-Uribe (2016), han reportado este mismo patrón. En *Phormidium persicinum*, cultivada en deficiencia de nitrógeno, se observó actividad de SOD de 51.6 y 530.4 U mg^{-1} proteína, para el control y deficiencia de nitrógeno, respectivamente. La actividad de CAT aumentó 5.1 veces bajo condiciones de estrés (deficiencia de nitrógeno y radiación UV), hasta 55 U mg^{-1} de proteína (Hernández-Uribe, 2016). Aunque los valores fueron menores que los observados en *E. oleoabundans*, ambos organismos presentaron una respuesta antioxidante similar, puesto que la variación de las condiciones óptimas de cultivo aumentó la producción de ERO y la actividad de SOD y CAT. El mismo efecto se reportó en estudios con otras microalgas como *Chlorella sorokiniana* (Zhang *et al.*, 2013) y *Acutodesmus dimorphus* (Chokshi *et al.*, 2017), cultivadas en deficiencia de nitrógeno. En esta última, se reportó que la actividad de SOD incrementó, pasando de 687.26 U mg^{-1} proteína para el control a 3857.92 U mg^{-1} proteína para el tratamiento en deficiencia de nitrógeno, valores similares a los encontrados en este trabajo. La actividad de CAT bajo estrés también fue mayor que en el control (24.78 vs 38.63 $\times 10^3$ U mg^{-1} proteína, respectivamente). El cultivo en altas concentraciones de Cu en el medio (3.0 $mg L^{-1}$), también propició un aumento en la actividad de SOD y CAT en *Pavlova viridis* sometida a estas condiciones (Li *et al.*, 2006).

La GPx es una enzima que cataliza la reducción de H_2O_2 y lipoperóxidos y usa como agente reductor al glutatión reducido (GSH). Se localiza principalmente en el citosol. Se ha observado que actúa preferentemente a concentraciones bajas de H_2O_2 (Gil y Tuteja, 2010). Este comportamiento corresponde con lo obtenido en el presente estudio; se observó mayor actividad de GPx en el control. En dicho tratamiento no existía un agente estresante que aumentara la concentración de H_2O_2 en la célula, manteniéndose los niveles basales de este

sustrato, siendo GPx la encargada de degradarlo a moléculas menos dañinas. La actividad de CAT aumentó considerablemente cuando el cultivo fue sometido a limitación de nutrientes.

En el presente estudio se cuantificó, además, la capacidad antioxidante total, lo que permitió evaluar la capacidad de las células para neutralizar radicales libres y otras ERO. La técnica analítica utilizada valora la habilidad de todos los compuestos antioxidantes donantes de un hidrógeno o un electrón (no sólo los enzimáticos), presentes en la célula para reducir a las especies oxidantes en el sistema. Además de las enzimas antioxidantes mencionadas anteriormente, las microalgas también contienen otros compuestos antioxidantes, como los tocoferoles (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C) o compuestos fenólicos.

El estrés por limitación de nutrientes aumenta la producción de ERO en la célula y, por lo tanto, puede producir cambios en el contenido de antioxidantes. La limitación de nutrientes induce la acumulación de carotenoides en especies como *Dunaliella* (Ben-Amotz y Avron, 1983), *Haematococcus* (Boussiba, 2000) y otras clorofitas como *Scenedesmus* (Pirastru *et al.*, 2012). Se conoce poco sobre la influencia del estrés por nutrientes en otras clases de antioxidantes en microalgas, aunque se ha observado un aumento en el contenido de α -tocoferol (Durmaz, 2007) y ácido ascórbico (El-Baky *et al.*, 2004) en *Dunaliella salina* con estrés por deficiencia de nitrógeno.

Otros estudios han demostrado que cuando una microalga es sometida a algún tipo de estrés, se espera que los antioxidantes respondan a éste, aumentando su producción para tratar de contrarrestar los efectos dañinos que la sobreproducción de ERO pudiera causar. En el presente estudio no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos probados.

En el tratamiento control, en comparación con la limitación de nutrientes, se observó una mayor actividad de la enzima GPx que elimina el H_2O_2 cuando está en concentraciones bajas o basales, como las que se producen de manera natural cuando la célula no está estresada. Aunque la limitación de nutrientes aumentó la actividad de las enzimas antioxidantes CAT y SOD, la capacidad antioxidante total en este tratamiento fue menor, aunque no significativamente, que en el control. Esto podría sugerir que estas dos enzimas aportan la

mayor contribución a la capacidad antioxidante total en limitación de nutrientes y que otros compuestos no cuantificados en este trabajo, como la vitamina C y E o los compuestos fenólicos totales, pudieron haber disminuido como se ha reportado en otros estudios (Hernández-Uribe, 2016)

Goiris *et al.* (2015) observaron algo similar al comparar la capacidad antioxidante total, además de otros cuatro compuestos antioxidantes en tres especies de microalgas, *Phaeodactylum tricornutum*, *Tetraselmis suecica* y *Chlorella vulgaris* en suficiencia de nutrientes y con limitación de P y de N. Los autores reportaron que la capacidad antioxidante total, así como la producción de carotenoides y compuestos fenólicos disminuyó, particularmente en el tratamiento en deficiencia de N, aunque dicha limitación incrementó la producción de tocoferoles y ácido ascórbico.

8.5 Proteínas y carbohidratos totales

El componente cuantitativamente más importante de la biomasa orgánica de la mayoría de las microalgas son las proteínas, las cuales pueden representar hasta más del 50% del peso seco total. Por otra parte, el contenido de carbohidratos puede variar ampliamente dependiendo de las condiciones del cultivo, entre el 10 y el 50% de la biomasa seca, cuando el crecimiento no está limitado. Estos porcentajes tienden a aumentar en condiciones de limitación de nutrientes o como resultado de un cambio en la tasa de crecimiento. Por ejemplo, cuando se pasa de la fase exponencial a la estacionaria, se presenta un incremento de lípidos y carbohidratos en relación con las proteínas (Gatenby *et al.*, 2003; Granum *et al.*, 2002; León-Saiki, 2018).

En el presente estudio, se cuantificó la concentración de proteínas y carbohidratos totales para evaluar el efecto de la limitación de nutrientes en *E. oleoabundans*. Se observaron niveles de proteínas totales de $27 \pm 0.84\%$ del peso seco para el control y $17 \pm 0.40\%$ del peso seco en limitación de nutrientes. El nivel más alto ($27\% \pm 0.84\%$ del peso seco) fue en el tratamiento donde el nitrógeno no estaba limitado. Por el contrario, los carbohidratos

totales aumentaron en limitación de nutrientes ($26 \pm 1.48\%$ del peso seco) en comparación con el control ($15 \pm 1.55\%$ del peso seco).

Diversos estudios han evaluado los efectos de la concentración del nitrógeno en el medio de cultivo sobre el contenido de proteínas y carbohidratos totales. Elías-Castelo (2018) cuantificó el efecto del consumo de nitrógeno en *Desmodemus communis*, y observó que en la etapa final del cultivo (17 días), cuando el nitrógeno del medio se había agotado, el contenido de proteínas totales disminuyó a 5% del peso seco en comparación con el inicio del cultivo (10.71% del peso seco). En cuanto al contenido de carbohidratos totales, hubo un incremento, que fue desde 9.83% al inicio del cultivo hasta 34.86 % del peso seco en la etapa final.

La misma tendencia fue observada por Garibay *et al.* (2013) en *N. oleoabundans* cuando variaron las concentraciones iniciales de nitratos en el medio de cultivo de 0 a 1 mM. El contenido de proteínas totales disminuyó cuando el nitrato suministrado fue menor, pasando de 20.44% del peso seco (0.8 mM de nitratos) a 10.60 % del peso seco (0 mM de nitratos), mientras que el contenido de carbohidratos aumentó de 22.84% del peso seco en suficiencia de nitrógeno (0.8 mM de nitratos) a 27.39 % del peso seco en limitación de nitrógeno (0 mM).

En otro estudio, Gatenby *et al.* (2003) cultivaron dos clorofíceas (*B. grandis* y *N. oleoabundans*) y una diatomea (*P. tricornutum*) y analizaron su composición bioquímica en cuatro fases de crecimiento. Al inicio del cultivo, el contenido de proteínas totales estuvo entre el 47 y 52% del peso seco para las tres microalgas, y disminuyó al final de la fase estacionaria donde se obtuvieron concentraciones entre el 18 y 38% del peso seco. Por otra parte, el contenido de carbohidratos totales aumentó, presentando valores entre el 9 y 22% al inicio del cultivo y del 32 al 55% del peso seco al final de la fase estacionaria.

La disminución en el contenido de proteínas totales observada en el presente estudio concuerda con trabajos anteriores de *N. oleoabundans* cultivada en deficiencia de nitrógeno (Garibay *et al.*, 2013; Popovich *et al.*, 2012). En consecuencia, se sugiere que la limitación de nitrógeno desvía el flujo de carbono fijado en la fotosíntesis, de la ruta de la síntesis de

proteínas hacia la que conduce a compuestos de almacenamiento tales como lípidos, carbohidratos o carotenoides (Popovich *et al.*, 2012; Rodolfi *et al.*, 2009). Esta tendencia está relacionada con la condición ocasionada por la limitación de nutrientes en el medio de cultivo, principalmente de nitrógeno, el cual forma parte estructural de la molécula de la clorofila. Además, es necesario para la formación de aminoácidos que son las unidades básicas de las proteínas, las cuales están involucradas en muchos aspectos del crecimiento, incluyendo procesos estructurales y metabólicos (Doucette y Harrison, 1991; Li *et al.*, 2012; Simionato *et al.*, 2013).

Los organismos fotosintéticos sometidos a deficiencia de nitrógeno pueden utilizar fuentes intracelulares de este elemento como mecanismo de adaptación (Moore *et al.*, 2002). El nitrógeno obtenido de esta manera es canalizado al anabolismo de materiales celulares esenciales, como proteínas, ácidos nucleicos y materiales de la pared celular. Este es un mecanismo que se ha sugerido para apoyar el crecimiento limitado por nitrógeno de *N. oleoabundans* (Garibay *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2008; Pruvost *et al.*, 2009). Lo anterior se vio reflejado en el presente trabajo como una disminución del contenido de compuestos nitrogenados, por ejemplo, las clorofilas.

Como se mencionó anteriormente, la deficiencia de nitrógeno incrementa la tasa de fotorespiración, y ésta puede inducir al estrés oxidativo mediante la producción de ERO. Éstas pueden interaccionar con los grupos sulfidrilo de las enzimas y causar su oxidación (Burke *et al.*, 1985).

Como resultado de la deficiencia de nitrógeno, algunos organismos fotosintéticos bloquean el anabolismo de compuestos nitrogenados y estimulan la síntesis de todas las fracciones de carbohidratos (intracelulares, capsulares y solubles) (De Philippis *et al.*, 1993; Fresnedo y Sierra, 1992). En el presente estudio, los carbohidratos aumentaron en respuesta a la limitación de nutrientes en el medio. Dichos resultados coinciden con lo reportado por Coruzzi y Zhou (2001) quienes observaron que la asimilación del nitrógeno es un proceso conectado al metabolismo del carbono. Dado que en los organismos fotosintéticos el carbono asimilado se reparte entre la formación de carbohidratos y la síntesis de aminoácidos, al

disminuir la síntesis de proteínas y aminoácidos la vía del metabolismo del carbono se redirige a la síntesis de carbohidratos (Coruzzi y Zhou, 2001).

Para comprender mejor el mecanismo osmorregulador y las condiciones de acumulación de TAG y almidón de *N. oleoabundans* durante su crecimiento, De Jaeger *et al.* (2018) secuenciaron el transcriptoma de la microalga en cuatro condiciones diferentes: agua dulce y agua salada con suficiencia y deficiencia de nitrógeno. Los autores reportaron que 24 horas después de la exposición a deficiencia de nitrógeno, los genes involucrados en la biosíntesis del almidón estaban positivamente regulados. En deficiencia de nitrógeno, los niveles de almidón aumentaron en agua dulce de $10.5\% \pm 0.1$ a $33.5\% \pm 0.4$ del peso seco, y en agua salada de $12.9\% \pm 0.1$ a 39.5% del peso seco (De Jaeger *et al.*, 2018).

Los resultados obtenidos en el presente estudio y los reportados por Garibay *et al.* (2013) sugieren que los carbohidratos son compuestos de almacenamiento en las células de *E. oleoabundans* bajo limitación de nutrientes. Esto se ha descrito para microalgas oleaginosas (Li *et al.*, 2011), incluyendo *N. oleoabundans* (Gatenby *et al.*, 2003).

Considerando que los carbohidratos son materias primas renovables que se utilizan actualmente para la obtención de varios productos de origen biológico, como biocombustibles, sustancias químicas y otros materiales (Carvalho *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2011) el análisis de la composición de carbohidratos es esencial para determinar el potencial y la calidad de la biomasa de *E. oleoabundans*.

8.6 Lípidos totales

El contenido total de lípidos en las microalgas puede variar entre 1 y 85% del peso seco (Borowitzka, 1988; Chisti, 2007; Spoehr y Milner, 1949); los valores superiores al 40% se logran, típicamente, bajo limitación de nutrientes. Se ha propuesto que factores como la temperatura, la irradiancia y, lo que es más notable, la disponibilidad de nutrientes afectan tanto la composición como el contenido de lípidos (Guschina y Harwood, 2006; Hu, 2004; Hu *et al.*, 2008; Roessler, 1990).

En el presente estudio, se observó en *E. oleoabundans* un aumento en el contenido de lípidos totales de 1.8 veces en limitación de nutrientes ($8.4 \pm 0.17\%$ con respecto al peso seco) comparado con el cultivo control ($15.8 \pm 3\%$).

Diversos estudios han reportado incrementos en el contenido de lípidos de hasta el 70% de la biomasa seca en varias especies, en respuesta a la limitación de nitrógeno en cultivos discontinuos, en donde los TAG (que contienen principalmente ácidos grasos saturados y monoinsaturados) constituyen el mayor porcentaje (hasta el 80%) de la fracción lipídica en las células (Borowitzka, 1988; Hu, 2004; Roessler, 1990).

Sin embargo, existe una gran variabilidad en la respuesta a la deficiencia de nitrógeno. En general, las diatomeas que presentan un alto contenido de lípidos, no lo incrementan en respuesta a la deficiencia de nitrógeno (Benemann y Oswald, 1996; Shifrin y Chisholm, 1981). Las microalgas verdes muestran una variedad de respuestas, desde incrementos (por ejemplo, en *C. pyrenoidosa*), a ningún cambio o incluso una ligera reducción (como en *Dunaliella* y en *Tetraselmis suecica*) (Borowitzka, 1988). Dentro del mismo género, como en *Chlorella*, se encontró que algunas cepas acumulaban almidón bajo la falta de nitrógeno, mientras que otras acumularon lípidos predominantemente neutros (Hu, 2004).

En otros estudios, como el de Félix-Castro (2016), cultivaron a *N. oleoabundans* en medio preparado, tanto de agua dulce como agua de mar adicionada con un fertilizante agrícola. Sus resultados mostraron una mayor acumulación de lípidos en agua de mar con 16 % con respecto al peso seco, en comparación con agua dulce, donde se obtuvo el 11%. Estos valores son semejantes a los reportados en el presente estudio para las condiciones control.

Cuando un cultivo expuesto a irradiancias adecuadas, se somete a deficiencia de nutrientes la fotosíntesis continúa, aunque a una velocidad reducida, y el flujo de carbono fijado se desvía de la síntesis de proteínas a la de lípidos o carbohidratos. Mientras que estos últimos pueden alcanzar más del 70% de la biomasa seca sin reducir la productividad, la acumulación

de lípidos a menudo se asocia a una reducción en la productividad de la biomasa. Además, es posible que los aumentos en el contenido de lípidos durante la limitación de nutrientes como el nitrógeno se obtengan a expensas de otras moléculas, particularmente las proteínas. Sin embargo, también hay indicios de que la acumulación de lípidos celulares durante la limitación de nitrógeno puede derivar del carbono recién fijado y que, en ciertas microalgas (en su mayoría verdes), la masa de lípidos acumulada durante la deficiencia de nutrientes puede ser mayor que la biomasa total presente en condiciones basales (Fogg, 1965; Shifrin y Chisholm, 1981).

8.6.1 Cultivo en dos fases

Para mejorar el rendimiento de aceite de los cultivos microlagales, el contenido de lípidos celulares debe incrementarse sobre el valor basal sin pérdidas significativas de productividad. Esto parece una tarea bastante difícil porque el alto valor calórico específico de los lípidos (38.9 kJ g^{-1}) está compuesto de proteínas (24 kJ g^{-1}) y carbohidratos ($15.6 - 17.5 \text{ kJ g}^{-1}$) (Klass, 2004). Generalmente, bajo escasez de nutrientes, aunque la fracción de lípidos puede aumentar, el crecimiento celular disminuye y el efecto general es una disminución de la productividad de los lípidos (Huesemann y Benemann, 2009). Una tendencia similar se observó en el presente estudio. El contenido de lípidos obtenido en el tratamiento con limitación de nutrientes fue de casi dos veces el obtenido en condiciones control; sin embargo, la deficiencia de elementos como el nitrógeno repercutió en una disminución de la productividad y rendimiento de la biomasa de *E. oleoabundans*. Una alternativa que se ha propuesto para obtener mayor contenido de metabolitos, como los lípidos, sin repercusiones en la productividad y rendimiento de la biomasa, es el cultivo en dos fases. En este método, en la primera fase, los nutrientes en el medio de cultivo no están limitados, por lo que se obtendrá el máximo crecimiento celular. Una vez alcanzado este punto, la biomasa es transferida a un medio de cultivo con limitación de nutrientes. El estrés inducido en estas condiciones, propiciará los efectos anteriormente descritos que redirigen las rutas

metabólicas hacia la síntesis y acumulación de compuestos de reserva, principalmente los lípidos y carbohidratos. (Rodolfi *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2016).

8.7 Ácidos grasos

En el presente estudio, la limitación de nutrientes provocó una disminución de la concentración de los ácidos grasos poliinsaturados, un aumento de 2.48 veces los niveles de los ácidos grasos monoinsaturados, además de un aumento en la producción de los ácidos grasos 18:1 ω 9 y 18:2 ω 6 con respecto al control. El ácido graso 16:0 y el 18:3 ω 3 fueron los más abundantes en ambos tratamientos; mientras que la concentración del AGPI 18:3 ω 3, disminuyó, quizá debido a que los AGPI, con el característico número de insaturaciones, son más susceptibles a la oxidación por ERO (Long *et al.*, 2018).

De manera similar, Levine *et al.* (2011) cultivaron *N. oleoabundans* variando las concentraciones de nitrógeno en el medio de cultivo, tanto sintético como procedente de un digestor anaeróbico. El contenido de lípidos celulares fue inversamente proporcional a la concentración de nitrógeno en ambos medios. Además, la proporción de ácidos grasos poliinsaturados (16:3 y 18:3) también disminuyó con el tiempo de cultivo, mientras que la concentración del ácido graso 18:1 aumentó. Los principales AG detectados fueron, 16:0 (23-30%), 18:1 (30-43%), 18:2 (18-23%) y 18:3 (5-12%). Este perfil de ácidos grasos es similar a los valores reportados previamente para *N. oleoabundans* y a los obtenidos para *E. oleoabundans* en el presente estudio.

En el estudio de Jazzar *et al.* (2016), se cultivó a *C. sorokiniana* y *Neochloris* sp. en diferentes medios de cultivo y determinaron el perfil de ácidos grasos de ambas microalgas. El análisis, tanto en *C. sorokiniana* como en *Neochloris* sp., reveló que los principales ácidos grasos presentes en todos los medios probados fueron palmítico (16:0), oleico (18:1), linoleico (18:2) y linolénico (18:3). La concentración de los ácidos grasos saturados de *Neochloris* sp. no fue significativamente diferente entre los medios de cultivo, mientras que la concentración de los monoinsaturados fueron significativamente más bajos (24.3%) y la de los poliinsaturados fueron significativamente más altos (35.7%) en el medio BG-11.

En el presente estudio, se cuantificó el perfil de ácidos grasos en las fracciones de lípidos neutros (NL), glicolípidos (AMPL) y fosfolípidos o lípidos polares (PL) para cada condición de cultivo y se expresó en % relativo al total de ácidos grasos. Bajo limitación de nutrientes, en la fracción NL, correspondiente a los lípidos de reserva citosólicos, se observó un aumento de los AGMI (30.78%) y una disminución de los AGS (36.17%) y AGPI (7.08%) con respecto al control. En la fracción AMLP, presente principalmente en membranas de los cloroplastos, aumentó la cantidad de AGS (27.6%) y AGMI (4.7%) con respecto al control, pero el principal componente fueron los AGPI con 61.3% (sin diferencias significativas entre tratamientos). En los PL, sólo se observó una disminución AGPI (8.31%) con respecto al control.

Popovich *et al.* (2012) quienes cultivaron a *N. oleoabundans* bajo condiciones limitantes de nitrógeno, reportaron la misma tendencia para NL, es decir, un alto contenido de AGMI (49.8%) y una disminución de los AGS (25.76%) y AGPI (22.21%). Para los AMLP, reportaron un aumento de los AGS (28.66%) y AGMI (29.71%); en ambos casos, valores mayores a lo encontrado en el presente estudio. Los niveles de AGPI en el estudio de Popovich *et al.* (2012) disminuyeron (31.72%), aunque siguieron siendo el componente principal de esta fracción. Por último, para los PL, los autores observaron una disminución de los AGS (25.31%) y AGMI (30.94%) y un aumento en los AGPI (Popovich *et al.*, 2012), en contraste a lo encontrado en el presente estudio.

Bona *et al.* (2014) observaron que en *N. oleoabundans* bajo limitación de nitrógeno, la concentración de AGS aumentó hasta 71.5 mg g⁻¹ de peso seco, contrario a los AGMI y AGPI, cuya concentración disminuyó. Este comportamiento es similar al encontrado en el presente estudio con *E. oleoabundans*.

La capacidad para la síntesis *de novo* de lípidos parece ser una característica de algunas microalgas oleaginosas que, cuando se cultivan bajo deficiencia de nitrógeno (u otro estrés que limita el crecimiento), canalizan el exceso de carbono y energía hacia los lípidos de almacenamiento (principalmente TAG). Los TAGs, compuestos principalmente de ácidos grasos saturados y monoinsaturados, se pueden empaquetar de manera eficiente en la célula y generar más energía que los carbohidratos durante la oxidación, lo que constituye la mejor

reserva para la reconstrucción de la célula después de algún evento estresante (Roessler, 1990). Bajo la limitación de nutrientes, las especies no oleaginosas, dejan de crecer o desvían el carbono asimilado a los polisacáridos de almacenamiento (León- Saiki, 2018).

La estructura y concentraciones de los ácidos grasos presentes en las microalgas cambian cuando éstas se someten a diferentes tipos de estrés (Ehling y Scherer, 1999). Por ejemplo, cuando *Dunaliella salina* se sometió a estrés por salinidad, el grado de insaturación de lípidos de membrana y de reserva cambiaron; los ácidos grasos poliinsaturados disminuyeron y los ácidos grasos saturados aumentaron (Galván-Álvarez, 2018). La disminución de la proporción de ácidos grasos poliinsaturados en las membranas celulares de fitoplancton puede reducir la permeabilidad y la habilidad de asimilar nutrientes como nitrógeno y fósforo. Como resultado, el crecimiento disminuye y la composición bioquímica cambia (De Castro Araújo y Tavano Garcia, 2005; Goes *et al.*, 1997; Khozin- Goldberg y Cohen, 2006). Esto se observó en el presente estudio; en la fracción de los lípidos de membrana celular (PL), los AGPI disminuyeron bajo limitación de nutrientes, posiblemente debido a la oxidación provocada por las ERO; además, los AGMI aumentaron en la fracción de lípidos de reserva (TAG).

8.8 Pigmentos

En los organismos fotosintéticos, los pigmentos actúan como absorbentes de energía lumínica. Se agrupan en clorofilas, carotenoides y ficobilinas. Las clorofilas están presentes en todas las plantas superiores y algas fotosintéticas, mientras que los carotenoides están presentes en la mayoría de las algas, y las ficobilinas están solo en las cianobacterias y en las rodofíceas. El contenido de pigmentos en la biomasa depende de las condiciones de cultivo, especialmente varios pigmentos secundarios se acumulan en cantidades más altas bajo condiciones de estrés, mientras que las clorofilas y pigmentos primarios en general se degradan bajo estrés y, por lo tanto, su contenido en la biomasa disminuye significativamente (Markou y Nerantzis, 2013).

Hoy en día los sistemas de cultivo de microalgas con fines de producción de energía no parecen ser todavía económicamente viables. Cuando se cultivan en condiciones de estrés, tales como la falta de nutrientes, la alta salinidad, las altas temperaturas, etc. acumulan cantidades considerables (hasta 60 a 65% del peso seco) de lípidos o carbohidratos junto con varios metabolitos secundarios, entre los que se encuentran los pigmentos. Especialmente estos últimos son productos de alto valor que pueden aplicarse en el sector cosmético, alimentario o farmacéutico. La producción simultánea de lípidos o carbohidratos para la producción de biocombustibles y de metabolitos secundarios en un concepto de biorrefinería, podría permitir que la producción de microalgas sea económicamente viable.

En condiciones de estrés, algunas microalgas regulan en forma ascendente ciertas rutas biosintéticas, lo que lleva a la acumulación de compuestos específicos. Por ejemplo, el cambio en la composición de nutrientes puede inducir estrés en las actividades fisiológicas de las microalgas, lo que puede desencadenar un aumento en la producción de carotenoides. En el presente estudio, en *E. oleoabundans* se identificaron y cuantificaron cuatro pigmentos. En el tratamiento control se obtuvieron concentraciones en $\mu\text{g mL}^{-1}$ de 0.80 ± 0.26 para la clorofila *a*, 0.26 ± 0.08 para luteína, 0.25 ± 0.0 para clorofila *b* y 0.06 ± 0.02 para violaxantina. En cambio, en el tratamiento en limitación de nutrientes, las concentraciones de todos los pigmentos disminuyeron significativamente.

En el estudio de Pirastru *et al.* (2012) se analizó el efecto en los cultivos de *Scenedesmus* sp de la limitación de nitrógeno y adición de acetato de sodio, sobre la actividad fotosintética y la producción de carotenoides. Se observó una disminución del contenido de clorofila y del funcionamiento de los FSII y FSI, así como un incremento en el contenido de carotenoides secundario, como la astaxantina y cantaxantina. Durante el proceso de acumulación de carotenoides, se encontró una degradación de la clorofila y disminución en el transporte de electrones fotosintéticos. Tales cambios pueden estar asociados con la reorganización estructural del aparato fotosintético y pueden ser un indicador útil de la acumulación de carotenoides secundarios en cultivos de microalgas.

Del Campo *et al.* (2000) evaluaron el contenido de carotenoides de 15 cepas de microalgas clorofíceas, donde la especie *Muriellopsis* sp. fue seleccionada para evaluar el efecto de

diferentes condiciones ambientales sobre su producción de carotenoides, principalmente luteína. La limitación de nitrógeno en los cultivos resultó en una disminución del nivel de este pigmento. La luteína se duplicó cuando el nitrato en el medio aumentó de 10 a 20 mM, pasando de 12.3 mg L⁻¹ a 23.0 mg L⁻¹ y permaneció constante a concentraciones más altas de nitrato. Los datos muestran que las altas concentraciones de nitrógeno favorecen la acumulación de luteína en *Muriellopsis* sp., lo que podría reflejar la necesidad de una síntesis continua de proteínas para apoyar la acumulación masiva de este carotenoide. El efecto de la irradiancia también fue evaluado. Se observó que las concentraciones más altas de luteína, violaxantina y β-caroteno se obtuvieron cuando la irradiancia se aumentó de 184 a 460 μmol fotón m⁻² s⁻¹.

En otro estudio, Del Campo *et al.* (2003), investigaron el efecto de factores nutricionales y ambientales relevantes en el crecimiento autotrófico y la producción de carotenoides totales y específicos en *Chlorella zofingiensis* CCAP 211/14, con el fin de evaluar su potencial como fuente de luteína y astaxantina. La concentración de nitrato tuvo efecto sobre el contenido de carotenoides de *C. zofingiensis*, ya que los niveles celulares de luteína y astaxantina siguieron una tendencia opuesta en respuesta a la concentración de nitrato en el medio. Así, el nivel celular máximo de luteína (0.24 pg cél⁻¹) y la relación más alta de luteína-astaxantina (1.8) se registraron a un nivel alto de nitrato, mientras que el nivel máximo de astaxantina (0.35 pg cél⁻¹) y la menor relación de luteína a astaxantina (0.2) se encontraron con bajo contenido de nitrato.

Bar *et al.* (1995) sometieron a *Chlorella zofingiensis* a estrés por deficiencia de nitrógeno y alta irradiancia (300 μmol foton m⁻² s⁻¹). Encontraron que *Chlorella zofingiensis* responde rápidamente a la exposición a este estrés. La acumulación de carotenoides secundarios se detectó 60 minutos después de la inducción. La cantaxantina y la astaxantina se detectaron 2 a 3 h después. La acumulación de carotenoides secundarios totales fue lineal en relación con el tiempo. Durante las primeras 8 h de estrés, el contenido de los carotenoides primarios β-caroteno y luteína aumentó, pero posteriormente se redujo el contenido tanto de clorofila como de estos carotenoides primarios. La disminución en el contenido de clorofilas, cuando los cultivos microalgales se someten a estrés por limitación de nutrientes, especialmente de

nitrógeno, es un comportamiento muy conocido y estudiado (Gao *et al.*, 2015; Merzlyak *et al.*, 2007).

La disponibilidad de nutrientes afecta la acumulación de carotenoides de diferentes maneras en las microalgas. Por ejemplo, la limitación de nitrógeno aumenta el nivel de β -caroteno en *Dunaliella*. En *Haematococcus*, algunos autores han informado que la acumulación de astaxantina es estimulada por la limitación de nitrógeno, mientras que otros afirman que se necesita nitrógeno en concentraciones no limitantes (Borowitzka, 1992; Borowitzka *et al.*, 1991; Boussiba y Vonshak, 1991).

Los carotenoides se dividen en dos grupos principales, los carotenos (moléculas no oxigenadas) y las xantofilas (moléculas oxigenadas). Desempeñan diferentes funciones en las células microalgales. En el proceso de la fotosíntesis intervienen en la captación de luz y la fotoprotección, en la inactivación de $^1\text{O}_2$, la disipación del exceso de energía y la estabilización de la estructura (Frank y Cogdell, 1996). Los carotenoides se forman con complejos de proteínas y pigmentos peptídicos y se localizan principalmente en la membrana tilacoide, pero también en el citoplasma (Takaichi, 2011).

Los principales carotenoides de las microalgas son astaxantina, β -caroteno y luteína. La síntesis de carotenoides secundarios se ve afectada por la variación de los ajustes de cultivo y su acumulación es inducida por la exposición de las células a varios factores de estrés (Lemoine y Schoefs, 2010). La carotenogénesis se ve reforzada por las ERO, que se generan en condiciones de estrés como alta intensidad de luz, estrés salino o alta temperatura (Galván-Álvarez, 2018; Gouveia *et al.*, 1996; Kobayashi, 2003). Sin embargo, los carotenoides primarios, como la luteína y violaxantina se degradan bajo estrés y, por lo tanto, su contenido en la biomasa disminuye. Así mismo, varios carotenoides primarios como el β -caroteno, pueden actuar como metabolitos secundarios y por lo tanto, se acumulan en condiciones de estrés (Rabbani *et al.*, 1998).

Otros estudios reportan, que la acumulación de carotenoides primarios se da durante las primeras horas después de inducirse el estrés por deficiencia de nitrógeno. Si este es prolongado, ocurre una degradación de estos compuesto, incluyendo las clorofilas

(principalmente porque el nitrógeno forma parte estructural de su molécula y en agotamiento de este elemento en el medio, pueden servir como fuente intracelular) (Bar *et al.*, 2015). Este comportamiento se observó en esta tesis con *E. oleoabundans*.

Por otra parte, la acumulación de carotenoides secundarios se ve favorecida principalmente cuando los cultivos son sometidos a altas irradiancias (Bar *et al.*, 1995; Del campo *et al.*, 2003; Galván-Alvarez, 2018). En el presente estudio no se cuantificaron carotenoides secundarios. Posiblemente debido a que la irradiancia utilizada en este estudio ($62 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) fue menor a las reportadas por otros trabajos donde el objetivo era incrementar la producción de carotenoides secundarios como cantaxantina y astaxantina.

8.9 Análisis de las rutas metabólicas en *Ettlia oleoabundans* en limitación de nutrientes con potencial en la producción de compuestos de alto valor agregado.

Los resultados de la evaluación bioquímica de lípidos, carbohidratos y enzimas antioxidantes se compararon con los parámetros de expresión y rutas metabólicas observadas por De Jaeger y colaboradores en 2018 quienes analizaron el efecto de la sal (NaCl) y la deficiencia de nitrógeno en las rutas metabólicas de *N. oleabundans* (actualmente *E. oleabundans*).

Los parámetros de expresión y rutas metabólicas observadas por De Jaeger *et al.* (2018), quienes analizaron el efecto de la sal (NaCl) y la deficiencia de nitrógeno en las rutas metabólicas de *N. oleabundans* (actualmente *E. oleabundans*), se utilizaron como base para integrar los resultados de la evaluación bioquímica de lípidos, carbohidratos y enzimas antioxidantes obtenidos en el presente estudio.

El concepto de biorrefinería, se acuña ante la necesidad de realizar el procesamiento de biomasa para lograr su conversión en una variedad de bio-compuestos y bioenergía (biocombustibles, poder y/o calor) de manera económica y ecológicamente sustentable. En ese sentido, *E. oleabundans* al ser sometida a deficiencia de nutrientes re-direccionó su metabolismo a la producción de metabolitos como: antioxidantes (SOD y CAT, Fig.12), carbohidratos y lípidos (Fig. 22) que le permitieron mitigar el estrés y sobrevivir. Al igual como reportan De Jaeger *et al.* (2018), en donde al analizar el transcriptoma de *N.*

oleabundans (actualmente *E. oleabundans*) encuentran que los genes del metabolismo de la sacarosa y almidón están sobre expresados, así como la ruta de formación de glicerol que se requiere posteriormente para la síntesis de triacilgliceroles. Interesantemente, la reducción en nutrientes en *E. oleabundans* tiene ventajas biotecnológicas puesto que además de favorecer el aumento en antioxidantes (Fig. 12), incrementa la síntesis de carbohidratos y lípidos que pueden utilizarse en la producción de energías renovables como lo son bioetanol y biodiesel respectivamente (Fig. 22).

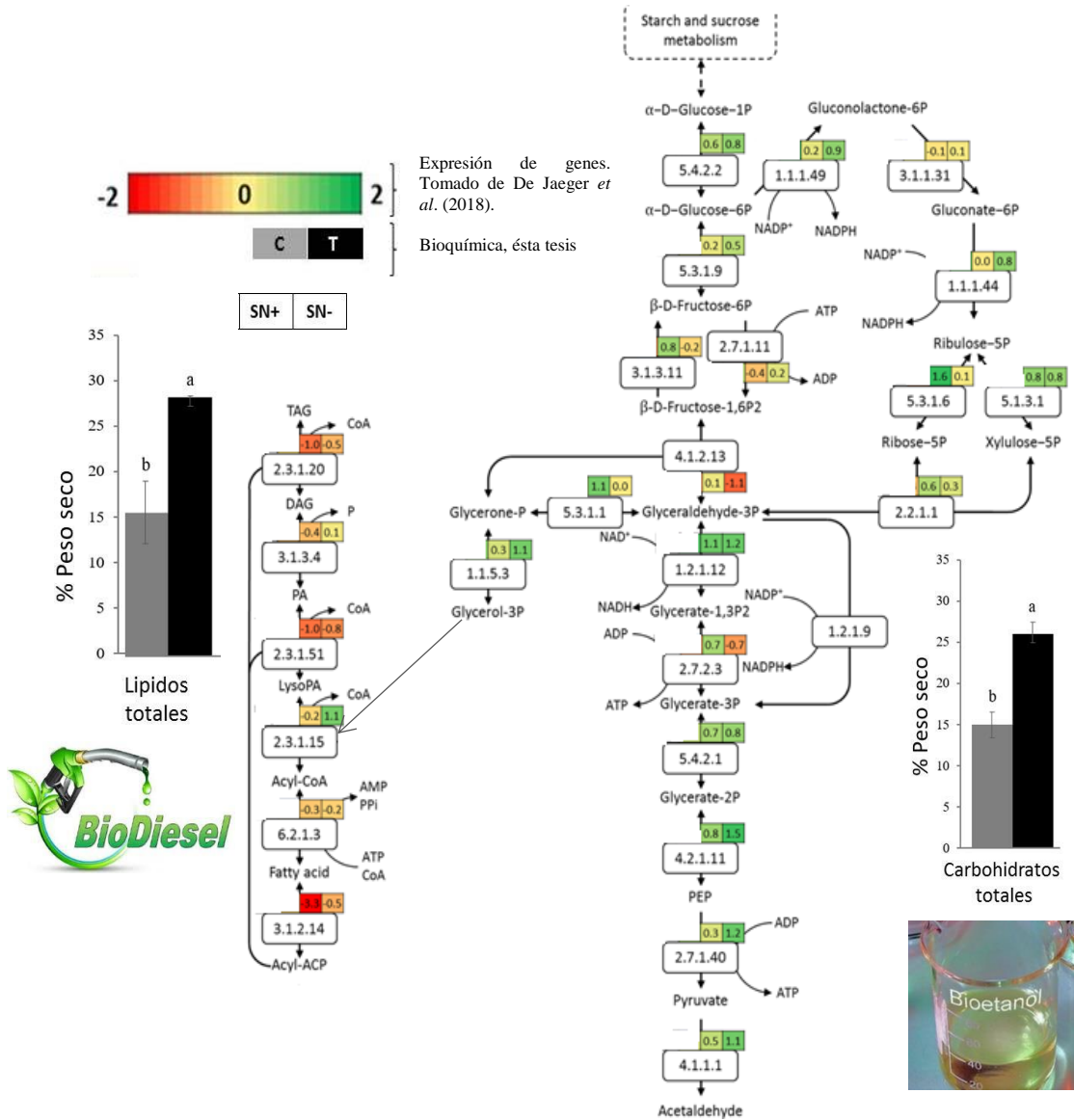


Figura 22. Comparativo de la expresión global de genes (Tomada de De Jaeger *et al.*, 2018) en las rutas metabólicas de azúcares y glicerol en *E. oleoabundans*. Los valores son expresados en % de peso seco. Abreviaciones: SN+: Agua de mar sin limitación de nitrógeno (De Jaeger *et al.*, 2018); SN-: Agua de mar con limitación de nitrógeno (De Jaeger *et al.*, 2018); C: Control agua de mar sin limitación de nutrientes (ésta tesis); T: Tratamiento agua de mar con limitación de nutrientes (ésta tesis). Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0.05$.

9. CONCLUSIONES

La limitación de macro y micronutrientes en el cultivo de *E. oleoabundans* disminuyó la división celular y repercutió sobre el crecimiento celular. Este decremento en el conteo celular, se reflejó como un menor rendimiento y productividad de la biomasa en comparación con el cultivo control.

La limitación de nutrientes en el cultivo propició un aumento en la producción de ERO, cuantificada en este estudio como la tasa de producción del radical superóxido. Para tratar de mantener la homeostasis en *E. oleoabundans* hubo un aumento en la actividad de enzimas antioxidantes, como SOD que neutraliza los efectos de $O_2^{\cdot-}$, y CAT, que convierte al H_2O_2 en moléculas menos reactivas. Este aumento no fue suficiente para evitar la oxidación de biomoléculas. Uno de los blancos de las ERO son los compuestos de carácter lipídico, principalmente los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI). En este estudio, la concentración de TBARS, que se utilizó como indicador de peroxidación lipídica, fue mayor en el tratamiento en limitación de nutrientes, mientras que la concentración de AGPI totales disminuyó, comparada con el control, posiblemente debido al efecto de las ERO.

El cultivo en limitación de nutrientes también tuvo un efecto sobre las rutas metabólicas que se dirigieron a la acumulación de compuestos de reserva, como los carbohidratos y lípidos. En *E. oleoabundans* cultivada bajo condiciones limitantes de nutrientes, las concentraciones de ambos tipos de sustratos de reserva alcanzaron valores de casi el doble en comparación con el control. En contraste, en condiciones limitantes de nutrientes, disminuyó la concentración de compuestos en los que el nitrógeno es parte de su estructura, por ejemplo, las proteínas totales y las clorofilas *a* y *b*.

En el cultivo con limitación de nutrientes, hubo producción de los ácidos grasos 16:0, 16:3 ω 3, 18:2 ω 6 y principalmente 18:1 ω 9. En la fracción NL, hubo un aumento de los AGMI, que junto con los AGS constituyeron la mayor proporción; esto es lo recomendable para la obtención de biodiesel de alta calidad a partir de microalgas. La fracción de PL presentó una disminución de los AGPI; en la fracción AMPL (glicolípidos) fueron los AGS los que

presentaron mayor concentración en *E. oleoabundans* cultivada bajo condiciones limitantes de nutrientes.

En el tratamiento control se identificaron y cuantificaron cuatro pigmentos: clorofila *a* y *b*, luteína y violaxantina. La limitación de nutrientes provocó una degradación de los carotenoides primarios luteína y violaxantina, y la deficiencia de elementos como el nitrógeno repercutió en la concentración de las clorofilas. Aunque la producción de pigmentos en el tratamiento en deficiencia de nutrientes no se vio favorecida, el cultivo de *Ettlia oleoabundans* con suficientes nutrientes mostró un alta productividad de luteína.

Con el uso del medio de cultivo propuesto (agua de mar 35 UPS + Fertiplus) se obtuvieron tasas de crecimiento similares a las de otros medios utilizados en otros trabajos, pero no a las máximas reportadas para *E. oleoabundans*. Su menor costo, comparado con medios de grado analítico, y el empleo de agua de mar en lugar de agua dulce (recurso escaso en muchas regiones), hacen de este medio de cultivo una opción para el escalamiento de la producción de biomasa microalgal. Para maximizar la obtención de compuestos de interés biotecnológico, a la vez que se disminuyen los costos de producción, se propone la utilización de este medio de cultivo y la limitación de nutrientes en un cultivo en dos fases; en la primera fase se suministren los nutrientes sin limitación para obtener la máxima producción de biomasa, y en la segunda fase se someta a limitación de nutrientes para incrementar la producción de lípidos, carbohidratos y ácidos grasos.

10. LITERATURA CITADA

- Abalde, J., A. Cid, P. Fidalgo, E. Torres, C. Herrero. 1995. Microalgas: cultivo y aplicaciones. Universidad Da Coruña. Coruña, España. 210p.
- Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro*. In: L. Packer (Ed.). Methods in Enzymology, oxygen radicals in biological systems. Academic Press, Inc. EUA. 105:121-126.
- Ahmad, P. 2010. Growth and antioxidant responses in mustard (*Brassica juncea* L.) plants subjected to combined effect of gibberellic acid and salinity. Arch Agron Soil Sci. 56:575-588.
- Ahmed, H., E.J., Schott, J.D. Gauthier, G. R. Vasta. 2003. Superoxide dismutase from the oyster parasite *Perkinsus marinus*: purification, biochemical characterization, and development of a plate microassay for activity. Analytical Biochemistry. 318: 132-141.
- Aldehni, M.F., J. Sauer, C. Spielhauer, R. Schmid, K. Forchhammer. 2003. Signal transduction protein PII is required for NtcA-regulated gene expression during nitrogen deprivation in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942. J Bacteriol. 185:2582-2591.
- Arora, A., R.K. Sairam, G.C. Srisvastava. 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. Current Science. 82: 1227-1238
- Arredondo-Vega, B. O., C. J. Band-Schmidt, R.Vazquez-Duhalt. 1995. Biochemical composition of *Neochloris oleoabundans* adapted to marine medium. CYTOBIOS-CAMBRIDGE-, 201-206.
- Arredondo-Vega, B.Cordero- Esquivel, D. Voltolina. 2017. Determinación de proteínas por métodos espectrofotométricos. En: Arredondo Vega, B.O.,B.Cordero- Esquivel, D. Voltolina (eds). Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Segunda edición. La Paz, B.C.S. pp 64-70.
- Baker, N. R., K. Oxborough. 2004. Chlorophyll fluorescence as a probe of photosynthetic productivity. In Chlorophyll *a* Fluorescence. Springer, Dordrecht. 65-82.
- Bar, E., M. Rise, M. Vishkautsan, S.M. Arad. 1995. Pigment and structural changes in *Chlorella zofingiensis* upon light and nitrogen stress. Journal of Plant Physiology, 146(4), 527-534.
- Barros, P.M., M. Granbom, P. Colepicolo, M. Pedersen. 2003. Temporal mismatch between induction of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase correlates with high H₂O₂ concentration in seawater from clofibrate-treated red algae *Kappaphycus alvarezii*. Arch Biochem Biophys. 420(1):161-168.
- Barsanti, L., P. Gualtieri. 2014. *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. CRC press.

- Bauernfeind, J.C. 1972. Carotenoid of vitamin A precursors and analogs in foods and feeds. *J Agric Food Chem.* 20(3):456-73.
- Beckman, J.S., M. Carson, C.D. Smith. W.H. Koppenol. 1993. ALS, SOD, and peroxy nitrite. *Nature.* 364(6438):584.
- Begoña, O.A., F.L. Granado, I.N. Blanco. 2001. Carotenoides y Salud Humana. Madrid: Editorial Fundación Española de la Nutrición.13-63.
- Ben-Amotz, A., T. G. Tornabene, W. H. Thomas. 1985. Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. *J. Phycol.* 21(1): 72-81.
- Ben-Amotz, A., M. Avron. 1983. On the factors which determine massive β -carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiology.*72 (3), 593-597.
- Benemann, J.R., W.J. Oswald. 1996. Systems and economic analysis of microalgae ponds for conversion of CO₂ to biomass. Final Report, Subcontract XK 4-04136- 06, Pittsburgh Energy Technology Center Grant No. DE-FG22-93PC93204Ñ.
- Berlett BS, E.R. Stadtman. 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry.* 272(33): 20313-20316.
- Bischof, K., G. Kräbs, C. Wiencke y D. Hanelt. 2002. Solar ultraviolet radiation affects the activity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase and the composition of photosynthetic and xanthophylls cycle pigments in the intertidal green alga *Ulva lactuca L.* *Planta.* 215(3):502-509.
- Bligh, E.G., W.J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 37(8):911-917.
- Bold, H.C. 1949. The morphology of *Chlamydomonas chlamydogama* sp. nov. *Bulletin of the Torrey Botanical Club.* 76: 101–108
- Bona, F., A. Capuzzo, M. Franchino, M.E. Maffei. 2014. Semicontinuous nitrogen limitation as convenient operation strategy to maximize fatty acid production in *Neochloris oleoabundans*. *Algal Research.* 5: 1-6.
- Boney, A. D. 1989. *New studies in biology. Phytoplankton.* 2nd ed. Edward Arnold. London, 118p.
- Borowitzka, M.A. 1998 Vitamins and fine chemicals from microalgae. In: Borowitzka M.A., Borowitzka LJ (ed) *Microalgal biotechnology.* Oxford University Press, Oxford. 153–196p.
- Borowitzka, M. A., J.M. Huisman, A. Osborn. 1991. Culture of the astaxanthin producing green alga *Haematococcus pluvialis*. Effects of nutrients on growth and cell type. *J. Appl. Phycol.* 3(4): 295–304.
- Borowitzka, M.A., 1992. Comparing carotenogenesis in *Dunaliella* and *Haematococcus*: implications for commercial strategies. In: Villa, T.G., Abalde, J. (Eds.), *Profiles on*

- Biotechnology. Servicio de Publicaciones, Universidad de Santiago, Santiago de Compostela, Spain. 301–310.
- Boussiba, S. 2000. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response. *Physiologia Plantarum*, 108(2): 111-117.
- Boussiba, S., A. Vonshak. 1991. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* I. *Plant Cell Physiol.* 32(7), 1077–1082.
- Boix, E., A.M. Pico. 2000. “Funciones endocrinas y envejecimiento”. *Endocr Nutr.* 47:113-121.
- Brand-Williams, W., M.E. Cuvelier, C. Berst. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology.* 28(1): 25-30.
- Briviba, K., L.O. Klotz, H. Sies. 1997. Toxic and signalling effects of photochemically or chemically generated singlet oxygen in biological systems. *Biological Chemistry.* 378(11):1259-1265.
- Butusuv, M., A. Jernelöv. 2013. Phosphorus in the organic life: cells, tissues, organisms. In *Phosphorus.* 13-17.
- Cakmak, T., P. Angun, Y.E. Demiray, A.D. Ozkan, Z. Elibol, T. Tekinay. 2012. Differential effects of nitrogen and sulfur deprivation on growth and biodiesel feedstock production of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology and Bioengineering.* 109(8), 1947-1957.
- Campbell, D., M.J. Ericksson, G. Oquist, P. Gustafsson, A.K. Clarke. 1998. The cyanobacterium *Synechococcus* resists UV-B by exchanging photosystem II reaction-center D1 proteins. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 95(1):364-369.
- Chantanachat, S., H.C. Bold. 1962. *Phycological Studies III. Some Algae From Arid Soils.* University of Texas Publications: Austin, TX, USA. 1–74.
- Carletti, P., A. Masi, A. Wonisch, D. Grill, M. Tausz, M. Ferretti. 2003. Changes in antioxidants and pigment pool dimensions in UV-B irradiated maize seedlings. *Environ Exp Bot.* 50(2):149-157.
- Carvalho, F., L.C. Duarte, F.M. Gírio. 2008. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. *Journal of Scientific & Industrial Research.* 849-864.
- Chelikani, P., I. Fita, P. Loewen. 2004. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci.* 61(2):192-208
- Chew, K. W., J. Y. Yap, P. L. Show, N. H. Suan, J. C. Juan, T. C. Ling, J. S. Chang. 2017. Microalgae biorefinery: High value products perspectives. *Bioresource Technology,* 229, 53–62.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotech Adv* 25:294–306.

- Chokshi, K., I. Pancha, A. Ghosh, S. Mishra. 2017. Nitrogen starvation-induced cellular crosstalk of ROS-scavenging antioxidants and phytohormone enhanced the biofuel potential of green microalga *Acutodesmus dimorphus*. *Biotechnology for Biofuels*. 10(1): 1–12.
- Coruzzi, G.M., L. Zhou. 2001. Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: emerging 'matrix effects'. *Current opinion in plant biology*. 4(3):247-253.
- De la Jara A, H. Mendoza, A. Martel, C. Molina, L. Nordström, V. de la Rosa, R. Diaz. 2003. Flow cytometric determination of lipid content in a marine dinoflagellate, *Cryptocodinium cohnii*. *J App Phycol* 15(5):433–438.
- Cresswell, R.C., P.J. Syrett. 1981. Uptake of nitrate by the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *J. Exp. Bot.* 32(1): 19-25.
- Cosgrove J, M.A. Borowitzka. 2010. Chlorophyll fluorescence terminology: an introduction. In: Suggett DJ, Prášil O, Borowitzka MA (eds) *Chlorophyll a fluorescence in aquatic sciences: methods and applications*. Springer Netherlands. 1–16.
- Czapski, G .1984. Reaction of – OH. *Methods in Enzymology*, Academic Press.105: 209-215.
- Deason, T., P.C.Silva, S. Watanabe, G.L. Floyd. 1991. Taxonomic status of the species of the green algal genus *Neochloris*. *Plant Syst Evol* 177(3-4): 213–219.
- De Castro Araújo, S., V.M. Tavano Garcia. 2005. Growth and biochemical composition of the diatom *Chaetoceros cf. wighamii* bright well under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. Protein, carbohydrates and lipids. *Aquacult.* 246(1-4):405-412.
- Del Campo, J. A., J. Moreno, H. Rodríguez, M.A.Vargas, J. Rivas, M.G. Guerrero. 2000. Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp.(Chlorophyta). *Journal of Biotechnology*. 76(1): 51-59.
- Del Campo, J. A., H. Rodríguez, J. Moreno, M.A. Vargas, J. Rivas, M.G. Guerrero. 2004. Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *Applied microbiology and biotechnology*. 64(6): 848-854.
- De Philippis, R., M. Margheri, E. Pelosi, S. Ventura. 1993. Exopolysaccharide production by a unicellular cyanobacterium isolated from a hypersaline habitat. *J Appl Phycol*. 5(4):387-394.
- De Jaeger, L., B.M. Carreres, J. Springer, P.J. Schaap, G. Eggink, V.A.M. Dos Santos, D.E. Martens. 2018. *Neochloris oleoabundans* is worth its salt: Transcriptomic analysis under salt and nitrogen stress. *PloS one*. 13(4): e0194834.
- Drossos, G., A. Lazou, P. Panagopoulos, S. Westaby. 1995. Deforexamine cardioplegia reduces superoxide radical production in human myocardium. *Ann Thorac Surg*. 59(1):169-172.

- Dubois, M., K. Gilles, J. Hamilton, P. Rebers, F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry* 28(3): 350-356.
- Durmaz, Y. 2007. Vitamin E (α -tocopherol) production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) in nitrogen limitation. *Aquaculture* 272(1-4):717-722.
- Edreva, A. 2005. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 106(2-3):119-133.
- El-Baky, H.H.A., F.K. El-Baz y G.S. El-Baroty. 2004. Production of antioxidant by the green alga *Dunaliella salina*. *Int J Agric Biol.* 6(1):49-57.
- Elías-Castelo, J.G. 2018. Efecto del consumo de nitrógeno de la microalga *Desmodesmus communis* sobre la composición bioquímica, productividad de la biomasa, comunidad bacteriana y longitud de los telómeros. Tesis (Maestría en Uso, Manejo y Protección de los Recursos Naturales). La Paz, B.C.S. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. 78p.
- Ehling-Schulz, M., S. Scherer. 1999. UV protection in cyanobacteria. *Eur J Phycol.* 34(4):329-338.
- Elstner, E.F., G.A. Wagner, W. Schutz. 1988. Activated oxygen in green plants in relation to stress situations. *Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology.* 7:159-187.
- Engel, N., M. Schmidt, C. Lütz, J. Feierabend. 2006. Molecular identification, heterologous expression and properties of light-insensitive plant catalases. *Plant, Cell and Environment*, 29(4): 593-607.
- Fábregas, J., L. Toribio, J. Abalde, B. Cabezas, C. Herrero. 1987. Approach to biomass production of the marine microalgae *Tetraselmis suecica* (Kytin) Butch using common garder fertilizes and soil extract as cheap nutrient supply in batch cultures. *Aquaculture. Eng.* 6:141-150.
- Fan, J., Y. Cui, M. Wan, W. Wang, Y. Li. 2014. Lipid accumulation and biosynthesis genes response of the oleaginous *Chlorella pyrenoidosa* under three nutrition stressors. *Biotechnology for biofuels.* 7(1): 17.
- Feierabend, J. 2005. Catalases in plants: molecular and functional properties and role in stress defence. *Antioxidants and reactive oxygen species in plants.* 101-140.
- Felix-Castro, M. 2017. Evaluación del potencial en la producción de Biodiesel de la microalga *Neochloris oleoabundans* transformada con un gen transportador de lípidos. Tesis (Maestría en Ciencias). La Paz, Baja California Sur. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. 90p.
- Figuroa, F. L., B. Viñepla. 2001. Efectos de la radiación solar UV sobre la fotosíntesis y actividades enzimáticas (anhidrasa carbónica y nitrato reductasa) en macroalgas marinas del sur de España. *Revista chilena de historia natural.* 74(2): 237-249.

- Figueroa, F. L., C.G. Jerez, N. Korbee. 2013. Use of in vivo chlorophyll fluorescence to estimate photosynthetic activity and biomass productivity in microalgae grown in different culture systems. *Latin American Journal of Aquatic Research*. 41(5).
- Flint, D. H., J.F. Tuminello, M.H. Emptage. 1993. The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *Journal of Biological Chemistry*. 68(30): 22369-22376.
- Fogg, G.E. 1965. *Algal cultures and phytoplankton ecology*. Madison: The University of Wisconsin Press. 126.
- Foyer, C.H., G. Noctor. 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell*. 17(7):1866-1875.
- Frank, H.A., R.J. Cogdell. 1996. Carotenoids in photosynthesis. *Photochem Photobiol*. 63(3): 257-264.
- Fresnedo, O. J.L. Serra. 1992. Effect of nitrogen starvation on the biochemistry of *Phormidium laminosum* (Cyanophyceae). *J Phycol*. 28(6):786-793.
- Fujita, M., Y. Fujita, Y. Noutoshi, F. Takahashi, Y. Narusaka, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki. 2006. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current opinion in plant biology*. 9(4): 436-442.
- Galván-Álvarez, V.A. 2018. U Efecto de la deficiencia de nitrógeno, elevada salinidad e intensidad luminosa como inductores de la carotenogénesis en la microalga *Dunaliella salina*: rendimiento fotosintético, composición bioquímica y capacidad antioxidante. Tesis (Licenciatura en Biología). Las Agujas, Zapopan, Jalisco. Universidad de Guadalajara. 72p.
- Gao, B., J. Yang, X. Lei, S. Xia, A. Li, C. Zhang. 2016. Characterization of cell structural change, growth, lipid accumulation, and pigment profile of a novel oleaginous microalga, *Vischeria stellata* (Eustigmatophyceae), cultured with different initial nitrate supplies. *Journal of applied phycology*. 28(2): 821-830.
- García-Bacallao, L., L.V. García-Gómez, D.M. Rojo-Dominguez, E. Sanchez- García. 2001. Plantas con propiedades antioxidantes. *Rev Cubana Invest Biomed*. 20(3):231-235.
- Garibay-Hernández, A., R. Vazquez-Duhalt, L.Serrano-Carreón, A. Martinez. 2013. Nitrogen limitation in *Neochloris oleoabundans*: A reassessment of its effect on cell growth and biochemical composition. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 171(7):1775-1791.
- Garibay-Hernández, A., B. J. Barkla, R. Vera-Estrella, A. Martinez, O. Pantoja. 2017. Membrane Proteomic Insights into the Physiology and Taxonomy of an Oleaginous Green Microalga 1, *Plant physiology*. 173(1):390-416.

- Gardner, P.R., I. Fridovich. 1991. Superoxide sensitivity of *Escherichia coli* 6-phosphogluconate dehydratase. *The Journal of Biological Chemistry*. 266(3): 1478-1483.
- Gatenby, C. M., D.M. Orcutt, D.A. Kreeger, B.C. Parker, V.A. Jones, R. J. Neves. 2003. Biochemical composition of three algal species proposed as food for captive freshwater mussels. *Journal of Applied Phycology*. 15(1): 1-11.
- Gross, W. 2000. Ecophysiology of algae living in highly acidic environments. *Hydrobiologia*, 43(1-3):31-37.
- Gaur, J.P., L.C. Rai. 2001. Heavy metal tolerance in algae. Algal adaptation to environmental stresses. En: Rai LC y Gaur JP (eds). *Physiological, Biochemical and Molecular Mechanisms*. Berlín, Heidelberg, New York.363-388p.
- Geider, R. J., J. La Roche. 2002. Redfield revisited: variability of C: N:P in marine microalgae and its biochemical basis. *European Journal of Phycology* 37(1):1 -17.
- Geldenhays, D.J., R.D. Walmsley, D.F. Torrient. 1985. Laboratory studies on the suitability of a fertiliser-tap water medium for mass culture of algae. *Biotechnol. Bioeng.* 27:1572-1576.
- Gil -Jérez, C. M. 2015. Photosynthetic performance and biomass composition, of *Chlorella fusca* (Chlorophyta) in thin-layer cascades: Possible biotechnological applications.
- Gill, S.S., N. Tuteja. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem*. 48(12):909-930.
- Goes, J.I., N. Handa, K. Suzuki, S. Taguchi, T. Hama. 1997. Ultraviolet radiation induced changes in the production of organic compounds in Antarctic marine phytoplankton. *NIPR Symp Pol Biol*. 10:25-38.
- Goiris, K., W. Van Colen, I. Wilches, F. León-Tamariz, L. De Cooman, K. Muylaert. 2015. Impact of nutrient stress on antioxidant production in three species of microalgae. *Algal Research*. 7:51-57.
- Gouveia, L., A.E. Marques, T.L. da Silva, A. Reis. 2009. *Neochloris oleoabundans* UTEX #1185: a suitable renewable lipid source for biofuel production. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36:821-826.
- Gouveia, L., V. Veloso, A. Reis, H. Fernandes, J. Novais, J. Empis. 1996. Evolution of pigment composition in *Chlorella vulgaris*. *Bioresour Technol*. 57(2):157-163.
- Granum, E., S. Kirkvold, S.M. Myklestad. 2002. Cellular and extracellular production of carbohydrates and amino acids by the marine diatom *Skeletonema costatum*: diel variations and effects of N depletion. *MEPS*. 242:83-94.
- Grill, S.S., N. Tuteja. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem*. 48:909-930.

- Grobbelaar, J.U. 2004. Algal nutrition: mineral nutrition. In: Richmond A (ed). Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology. Blackwell Science, Iowa. 97-115p.
- Grossman, A., H. Takahashi. 2001. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 52:163–210.
- Guillard, R. R. L., H. J. Ryther. 1962. Studies of marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Denotula confervacea* (cleve) Gran. Can. J. Microbiol. 8:229-239.
- Guiry in Guiry, M.D. y G.M. Guiry. 2018. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 21 September 2018.
- Gushina, I.A., J.L. Harwood. 2006. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. Prog Lipid Res 45:160–186.
- Gutteridge, J.M., D.A. Rowley y B. Halliwell. 1982. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals and lipid peroxidation in the presence of iron salts. Detection of catalytic iron and antioxidant activity in extracellular fluids. Biochem. 206(3):605-609.
- Halliwell, B. 1987. Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplasts. Chemistry and Physics of Lipids. 44(2-4):327-340.
- Halliwell, B. 1993. The chemistry of free radicals. Toxicol Ind Health. 9(1-2):1-21.
- Halliwell, B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. Plant Physiology. 14(2)1: 312-322.
- Halliwell, B., J.M.C.Gutteridge. 2015. Free radicals in biology and medicine. Oxford. Fifth edition. New York, USA. 823p.
- Hariyadi P, K.L Parkin. 1993. Chilling-induced oxidative stress in cucumber (*Cucumis sativus* L. cv. Calypso) seedlings. Journal of Plant Physiology. 141(6): 733-738.
- He, Y.Y., D.P. Häder. 2002. Reactive oxygen species and UV-B: effect on cyanobacteria. Photochem Photobiol Sci. 1(10):729-736.
- He, Y.Y., D.P. Häder. 2002. UV-B-induced formation of reactive oxygen species and oxidative damage of the cyanobacterium *Anabaena* sp.: protective effects of ascorbic acid and N-acetyl-L-cysteine. J Photochem Photobiol B Biol. 66(2):115-124.
- Huesemann, M.H., J.R. Benemann. 2009. Biofuels from Microalgae: Review of products, processes and potential, with special focus on *Dunaliella* sp. In: Ben-Amotz A, Polle JEW, Subba Rao DV, editors. The alga *Dunaliella*: Biodiversity, physiology, genomics, and biotechnology. Enfield: Science Publishers.
- Hernandez- Uribe, F. 2016. Efecto de la deficiencia de nitrógeno y la radiación UV en la actividad fotosintética y en los compuestos antioxidantes de las cianobacterias *Spirulina* (*Arthrospira*) *maxima* y *Phormidium persicinum*. Tesis (Maestría en Uso, Manejo y

- Preservación de los Recursos Naturales). La Paz, B.C.S. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. 180p.
- Hideg, E., C. Spetea, I. Vass. 1994. Singlet oxygen production in thylakoid membranes during photoinhibition as detected by EPR spectroscopy. *Photosynth Res.* 39(2):191-199.
- Ho, S.H., C.Y. Chen, J.S. Chang. 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.
- Ho S-H, S.W. Huang, C.Y. Chen, T. Hasunuma, A. Kondo y J.S. Chang. 2013. Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E. *Bioresource Technology* 135: 157-165.
- Hu, Q. 2004. Environmental effects on cell composition. In: Richmond A, editor. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Oxford UK: Blackwell Science Ltd. 83–93p.
- Hu, Q., M. Sommerfeld, E. Jarvis, M. Ghirardi, M. Posewitz, M. Seibert, A. Darzins. 2008. Microalgal triacylglycerols as a feedstocks for biofuel production: perspective and advances. *Plant J.* 54(4):621–639.
- Hung S.H., C.W. Yu, C.H. Lin. 2005. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Botanical Bulletin of Academia Sinica.* 46: 1-10.
- Ikarán Zugazaga, Z. 2011. Transformación genética de *Neochloris oleoabundans* S. chantanchat & HC Bold (Clorofita) mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Tesis (Mestría en Biotecnología). Navarra, España. Universidad Pública de Navarra. 28p.
- Jazzar, S., N. Berrejeb, C. Messaoud, C. Marzouki, M. N. I. Smaali. 2016. Growth parameters, photosynthetic performance, and biochemical characterization of newly isolated green microalgae in response to culture condition variations. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 179(7):1290–1308.
- Kaplan, D., A.E. Richmond, Z. Dubinsky, S. Aaronson. 1986. Algal nutrition. En: *Handbook of Microalgal Mass Culture*. Richmond, A. (ed), CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.43-67p.
- Kerr, J.B., C.T. McElroy. 1993. Evidence for large upward trends of ultraviolet-B radiation linked to ozone depletion. *Science.* 262(5136):1032-1034.
- Klass DL. 2004. Biomass for renewable energy and fuels. In: Cleveland CJ, editor. *Encyclopedia of energy*, Vol. 1. Amsterdam: Elsevier Inc. 193–212p.
- Klotz, L. O., K. D. Kroncke, D. P. Buchczyk, H. Sies. 2003. Role of cooper, zinc, selenium and tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. *J. Nutr.*, 133(5): 1448S-1451S.

- Khozin-Goldberg, I., Z. Cohen. 2006. The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochem.* 67(7):696-701.
- Kobayashi, M., T. Kakizono, K. Yamaguchi, N. Nishio, S. Nagai. 1992. Growth and astaxanthin formation of *Haematococcus pluvialis* in heterotrophic and mixotrophic conditions. *J Ferment Bioeng.* 74(1):17–20.
- Lamers, P.P., C.C.W. van de Laak, P.S. Kaasenbrood, J. Lorier, M. Janssen, R.C.H. De Vos, R.J. Bino, R.H. Wijffels. 2010. Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed *Dunaliella salina*. *Biotechnol Bioeng.* 106(4):638-648.
- Lampert, W., U. Sommer. 2007. *Limnoecology*. Oxford University Press Inc, New York, United States. 336p.
- Lee H-M., M.F. Vasquez-Bermudez, N. Tandeau de Marsac. 1999. The global nitrogen regulator NtcA regulates transcription of the signal transducer PLL (GlnB) and influences its phosphorylation level in response to nitrogen and carbon supplies in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain PCC 7942. *J Bacteriol.* 181:2697-2702.
- León-Saiki, G. M. L. 2018. Role of starch in *Tetradismus obliquus*. Tesis (Doctoral dissertation). Wageningen, the Netherlands. Wageningen University. 222p.
- Li, M., C. Hu, Q. Zhu, L. Chen, Z. Kong, Z. Liu. 2006. Copper and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in the microalga *Pavlova viridis* (Prymnesiophyceae). *Chemosphere*, 62(4):565–572.
- Li Y, M., B. Horsman, N. Wang, C.Q. Wu. 2008. Biofuels from microalgae. *Biotechnol Prog* 24:815–820.
- Lemoine, Y., B. Schoefs. 2010. Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress. *Photosynth Res.* 106:155–177.
- Le Quéré, C., M.R.Raupach, J.G. Canadell, G. Marland, L. Bopp, P. Ciais, T.J. Conway, S.C.Doney, R.A. Feely, P. Foster, P. Friedlingstein, K. Gurney, R.A. Houghton, J.I. House, C. Huntingford, P.E. Levy, M.R. Lomas, J. Majkut, N. Metzl, J.P. Ometto, G.P. Peters, I.C.Prentice, J.T. Randerson, S.W. Running, J.L. Sarmiento, U. Schuster, S. Sitch, T. Takahashi, N. Viovy, G.R.van der Werf, F.I. Woodward. 2009. Trends in the sources and sinks of carbon dioxide. *Nature Geoscience*, 2(12): 831-836.
- Levine, R.B., M.S. Costanza-Robinson, G.A. Spatafora. 2011. *Neochloris oleoabundans* grown on anaerobically digested dairy manure for concomitant nutrient removal and biodiesel feedstock production. *Biomass Bioenerg.* 35(1):40– 49.
- Li, Y., D. Han, M. Sommerfeld, Q. Hu. 2011. Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococcum* sp. (Chlorophyceae) under nitrogen-limited conditions. *Bioresource Technology.* 102(1):123-129.

- Li, Y., X. Fei, X. Deng. 2012. Novel molecular insights into nitrogen starvation- induced triacylglycerols accumulation revealed by differential gene expression analysis in green algae *Micractinium pusillum*. *Biomass bioenergy*. 42:199-211
- Li, Y., M. Horsman, B. Wang, N. Wu, C.Q. Lan. 2008. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81(4): 629–636.
- Lichtenhaler, K., C. Buschmann. 2001. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*. Supplement 1. F4.3.1-F4.3.8.
- Long, M., K. Tallec, P. Soudant, F. Le Grand, A. Donval, C. Lambert, H. Hégaret. 2018. Allelochemicals from *Alexandrium minutum* induce rapid inhibition of metabolism and modify the membranes from *Chaetoceros muelleri*. *Algal research*. 35:508-518.
- Lopes da Silva T., A. Reis, R. Medeiros, A.C. Oliveira y L. Gouveia. 2009. Oil production towards biofuel from autotrophic microalgae semicontinuous cultivations monitored by flow cytometry. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 159: 568–578
- Lowry, O.H., N.J., Rosenbrough, A.L. Farr, R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193:265-272.
- Maage, A.1994. Trace elements in Atlantic salmon *Salmo salar* nutrition. Tesis (Ph D). University of Bergen. Bergen, Norway. 210 p.
- MacIntyre, H.L., T.M. Kana, T. Anning, R.J. Geider. 2002. Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria. *J. Phycol.* 38(1): 17-38.
- Manduzio, H., T. Monsinjon, B. Rocher, F. Leboulenger, C. Galap. 2003. Characterization of an inducible isoform of the Cu/Zn superoxide dismutase in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*. 64(1): 73-83.
- Mano, J. 2002. Early events in environmental stresses in plants-induction mechanisms of oxidative stress. En: Inzé D, Van Montagu M (eds). *Oxidative Stress in Plants. Induction Mechanisms Ofoxidative Stress*. London, UK. 217-246.
- Market, M., P.C. Andrews, B.M. Babior. 1984. Measurement of O_2^{\bullet} production by human neutrophils. In *Methods in enzymology*, Academic Press. Orlando, Florida. 358-365p.
- Matés, J.M. 2000. Effects of antioxidants enzymes in the molecular control reactive oxygen species toxicology. *Toxicol*. 153(1-3):83-104
- Markou, G., E. Nerantzis. 2013. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions. *Biotechnol Adv* 31(8):1532–1542.
- Marsh, J.B., D.B. Weinstein. 1966. Simple charring method for determination of lipids. *J Lipid Res*. 7(4):574-6.

- Masojídek, J., J. Kopecký, L. Giannelli, G. Torzillo. 2011. Productivity correlated to photobiochemical performance of *Chlorella* mass cultures grown outdoors in thin-layer cascades. *J Ind Microbiol Biotechnol* 38(2):307–317.
- Masojídek J, G. Torzillo, M. Koblížek. 2013. Photosynthesis in Microalgae. In: Richmond A (ed) *Handbook of Microalgal Culture*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK. 21–36p.
- Mataix, J. 2001. Aceite de oliva virgen: nuestro patrimonio alimentario. Universidad de Granada-Puleva Food, Granada. 77-97.
- Maxwell K, G.N. Johnson. 2000. Chlorophyll fluorescence. A practical guide. *J Exp Bot*. 51(345):659-668.
- Mayo, F.R. 1986. The evolution of free radical chemistry at Chicago. *J Chem Educ*. 63(2): 97.
- McCord, J.M., I. Fridovich. 1988. Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988) *Free Radic Biol Med*. 5(5-6):363-369.
- McKenzie, R., B. Connor, G. Bodeker. 1999. Increased summertime UV radiation in New Zealand in response to ozone loss. *Science*. 285:1709-1711.
- Merzlyak, M.N., O.B. Chivkunova, O.A. Gorelova, I.V. Reshetnikova, A.E. Solovchenko, I. Khozin-Goldberg, Z. Cohen. 2007. Effect of nitrogen starvation on optical properties, pigments, and arachidonic acid content of the unicellular green alga *Parietochloris incisa* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *J Phycol* 43(4):833–843.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci*. 7(9):405-410.
- Mittler, R., S. Vanderauwera, M. Gollery, F. Van Breusegem. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Plant Science*. 9(10):490-498.
- Moore, L., A.F. Post, G. Rocap, S.W. Chisholm. 2002. Utilization of different nitrogen sources by the marine cyanobacteria *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. *Limnol Oceanogr*. 47:989-996.
- Moran, J.F., M. Becana, I. Iturbe-Ormaetxe, S. Frechilla, R.V. Klucas, P. Aparicio- Trejo. 1994. Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta*. 194(3):346-352.
- Moreno, S. G., H.P. Vela, M.O.S. Alvarez. 2008. La fluorescencia de la clorofila *a* como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Revista de Educación Bioquímica* 27(4): 119-129.
- Morris, I. 1974. Nitrogen assimilation and protein synthesis. En: *Algal Physiology and Biochemistry*. Steward, W.D.P. (ed). Blackwell Scientific Pub. Oxford. 583-609p.
- Munné-Bosch, S., L. Alegre. 2002. The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 21(1):31-57.

- Muniz-Rossa, M., M. Cabral de Oliveira, O.K. Okamoto, P.F. Lopes, P. Colepicolo. 2002. Effect of visible light on superoxide dismutase (SOD) activity in the red alga *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.*, 14(3):151- 157.
- Noctor, G., C.H. Foyer. 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol.* 49(1):249-279
- O’Kane, D., V.Gill, P. Boyd, R. Burdon. 1996. Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in *Arabidopsis thaliana callus*. *Planta.* 198(3):371-377.
- Park, J. R., R.J. Craggs, A.N. Shilton. 2011. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology* 102(1):35-42.
- Paulín, J. A. R. 2011. Modificación de la transferencia de nutrientes en la cadena nutritiva microalga-rotífero y microalga-Artemia mediante cambios en la formulación de los nutrientes en el cultivo microalgal. Tesis (Doctorado en Biología Marina y Acuicultura). Santiago de Compostela. Universidade de Santiago de Compostela. 526p.
- Paraskevaïdis, I.A., E.K. Iliodromitis, D. Vlahakos, D.P. Tsiapras, A. Nikolaidis. 2005. Deferoxamine infusion during coronary artery bypass grafting ameliorates lipid peroxidation and protects the myocardium against reperfusion injury: immediate and long-term significance. *Eur Heart J.* 26(3):263-270.
- Persky, A. M., P.S Green, L. Stublely, C.O. Howell, L. Zaulyanov, G.A. Brazeau, J.W. Simpkins. 2000. Protective effect of estrogens against oxidative damage to heart and skeletal muscle *in vivo* and *in vitro*. *Proc Soc Exp Biol Med.* 223(1):59-66.
- Pietta, P.G. 2000. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod.* 63(7):1035-1042.
- Pirastru, L., M. Darwish, F.L. Chu, F. Perreault, L. Sirois, L. Sleno, R. Popovic. 2012. Carotenoid production and change of photosynthetic functions in *Scenedesmus* sp. exposed to nitrogen limitation and acetate treatment. *Journal of Applied Phycology.* 24(1): 117–124.
- Popovich, C. A., C. Damiani, D. Constenla, A.M. Martínez, H. Freije, M. Giovanardi y P.I. Leonardi. 2012. *Neochloris oleoabundans* grown in enriched natural seawater for biodiesel feedstock: evaluation of its growth and biochemical composition. *Bioresource technology.* 114: 287-293.
- Pulz, O., W. Gross. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol* 61(6):635–648.
- Pruvost, J., G. Van Vooren, G. Cogne, J. Legrand. 2009. Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor. *Bioresource Technol* 100(23):5988–5995.

- Rabbani, S., P.Beyer, J.V. Lintig, P. Huguency, H. Kleinig. 1998. Induced β -Carotene synthesis driven by triacylglycerol deposition in the unicellular alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol.* 116(4):1239–1248.
- Raha, S., B.H Robinson. 2000. Mitochondria, oxygen free radicals, disease, and aging. *Trends Biochem Sci.* 25(10):502-508.
- Rao, A.V., L.G. Rao. 2007. Carotenoids and human health. *Pharmacol Res.* 55:207-216.
- Roche, E.D., R.T. Sauer. 2001. Identification of endogenous SsrA-tagged proteins reveals tagging at positions corresponding to stop codons. *J Biol Chem.* 276:28509-28515.
- Rodríguez-Amaya, D.B. 1999. Changes in carotenoids during processing and storage of foods. *Arch Latinoamericanos Nutrit.* 49:38-47.
- Rodolfi, L., G. Chini Zittelli, N. Bassi, G. Padovani, N. Biondi, G. Bonini, M.R. Tredici. 2009. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 102(1): 100–112.
- Rodríguez, J.M., J.R. Menéndez, Y. Trujillo. 2001. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Cubana Med Milit.* 30(1):36-44.
- Romero Cruz, M. D. C. 2017. El estrés abiótico en el metabolismo del nitrógeno y en el sistema antioxidante de la microalga acidófila. Tesis (Doctorado en Química). Huelva, España. Universidad de Huelva. 232p.
- Roessler, P.G. 1990. Environmental control of glycerolipid metabolism in microalgae: Commercial implications and future research directions. *J Phycol* 26(3):393–399.
- Sass, L., C. Spetea, Z. Maté, F. Nagy, I. Vass. 1997. Repair of UV-B induced damage of photosystem II via *de novo* synthesis of the D1 and D2 reaction center subunits in *Synechocystis* sp. PCC6803. *Photosynth Res.* 54(1):55-62.
- Sato, N., N. Murata. 1988. Membrane lipids. In: *Methods in Enzymology.* 167: 251-259
- Scott, S.A., M.P. Davey, J.S. Dennis, I. Horst, C.J. Howe, D.J. Lea-Smith, A.G. Smith. 2011. Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Curr Opin Biotech* 21(3):277–286.
- Schreiber, U., U. Schliwa, W. Bilger. 1986. Continuous recording of photochemical and non photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth. Res.* 10(1-2): 51- 62.
- Shahid, M., B.Pourrut, C. Dumat, M. Nadeem, M. Aslam, E. Pineli. 2014. Heavy metal induced reactive oxygen species: phytotoxicity and physicochemical changes in plants. En: Whitacre DM (ed). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology.* Volume 232. Switzerland. 1-44P.
- Shifrin, N.S., S.W. Chisholm. 1981. Phytoplankton lipids: Interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles. *J Phycol* 17(4):374–384.
- Sies, H. 1986. Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemi.* 25(12): 1058-1071

- Sies, H. 1991. Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klinische Wochenschrift*. 69(21-23): 965-968.
- Sies, H. 1993. Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection. *Mutation Research/Genetic Toxicology*. 299(3-4):183-191.
- Simionato, D., M.A. Block, N. La Rocca, J. Jouhet, E. Maréchal, G. Finazzi, T. Morosinotto. 2013. The response of *Nannochloropsis gaditana* to nitrogen starvation includes *de novo* biosynthesis of triacylglycerols, a decrease of chloroplast galactolipids, and reorganization of the photosynthetic apparatus. *Eukaryotic cell*. 12(5):665-676.
- Singh, P., S. Kumari, A. Guldhe, R. Misra, I. Rawat, F. Bux. 2016. Trends and novel strategies for enhancing lipid accumulation and quality in microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 55:1–16.
- Stewart, W.D.P. 1974. *Algal physiology and biochemistry*. Blackwell Scientific Publications Ltd. Osney Mead, Oxford. 998p.
- Spectoroba, L.V., O.I. Goronkova, L.P. Nosova, O.N. Albiskaya. 1982. High density culture of marine microalgae: promising items for mariculture. *Aquaculture*. 21:293-296.
- Spoehr, H.A., H.W. Milner. 1949. The chemical composition of *Chlorella*: Effect of environmental conditions. *Plant Physiol* 24(1):120–149.
- Spolaore, P., C. Joannis-Cassan, E. Duran, A. Isambert. 2006. Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng*. 101(2):87–96.
- Stadtman, E.R., R.L. Levine. 2003. Free radical mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino acids*. 25(3-4):207-218.
- Star, R.C. 1955. A comparative study of *Chlorococcum meneghini* and other spherical, zoospore-producing genera of the Chlorococcales. *Indiana University Publications Science* 20:1–111.
- Stewart, W.D.P. 1974. *Algal physiology and biochemistry*. Blackwell Scientific Publications Ltd. Osney Mead, Oxford.
- Suggett, D.J., O. Prášil, M.A. Borowitzka. 2011. *Chlorophyll-a fluorescence in aquatic sciences: methods and applications*. Springer-Verlag, Heidelberg. 323p.
- Suzuki, K. 2000. Measurements of Mn-SOD and Cu, Zn-SOD. In: N. Taniguchi and J. Gutteridge (Eds.). *Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species*. Oxford University Press. 91-95p.
- Syrett, P.J. 1987. Nitrogen assimilation by eukaryotic algae. En: *Inorganic Nitrogen Metabolism*. Ulrich, W.R., Aparicio, P.J., Syrett, P.J. y Castillo, F. (eds).
- Taiz, L., E. Zeiger. 2006. *Plant Physiology*. Fourth ed. Sinauer, Sunderland, MA. EUA. 764p.

- Takaichi, S. 2011. Carotenoids in algae: distributions, biosyntheses and functions. *Mar Drugs*. 9(6):1101–1118.
- Turekian, K. K. 1968. Deep-sea deposition of barium, cobalt and silver. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 32(6): 603-612.
- Vega, J.M., I. Garbayo, M.J. Domínguez, J. Vígara. 2006. Effect of abiotic stress on photosynthesis and respiration in *Chlamydomonas reinhardtii*. Induction of oxidative stress. *Enzyme and Microbial Technology*. 40(1):163-167.
- Velázquez-Paniagua, M., B. Prieto-Gómez, R. Contreras-Pérez. 2004. El envejecimiento y los radicales libres. *Ciencias*. 75:36-43.
- Vidussi, F., H. Claustre, J. Bustillos-Guzman, C. Cailliau y J.C. Marty. 1996. Determination of chlorophylls and carotenoids of marine phytoplankton: separation of chlorophyll *a* from divinyl-chlorophyll *a* and zeaxanthin from lutein. *J Plank Res*. 18(12):2377-2382.
- Vuleta, A., S.M.Jovanovic, D. Darka-Seslija, B. Tucic. 2010. Seasonal dynamics of foliar antioxidative enzymes and total anthocyanins in natural populations of *Iris pumila L.* *Journal of Plant Ecology*. 3(1): 59-69.
- Wendy Guiry in Guiry, M.D. y G.M. Guiry. 2018. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway.
- Wehr, J.D. 2007. *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology* by Barsanti; Gualtieri, P. *J PHICOL*. 43(2):412-414.
- Winter, L., I. T. D. Cabanelas, A. N. Órfão, E. Vaessen, D.E. Martens, R.H. Wijffels y M.J. Barbosa. 2017. The influence of day length on circadian rhythms of *Neochloris oleoabundans*. *Algal Research*. 22: 31-38.
- Yilancioglu, K., M Cokol, I. Pastirmaci, B. Erman, S. Cetiner. 2014. Oxidative stress is a mediator for increased lipid accumulation in a newly isolated *Dunaliella salina* strain. *PloS one*. 9(3):e91957.
- Zhang, Y. M., H. Chen, C.L. He, Q. Wang. 2013. Nitrogen starvation induced oxidative stress in an oil-producing green alga *Chlorella sorokiniana C3*. *PloS one*. 8(7): e69225.