

**Universidad Nacional
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Escuela de Ciencias Biológicas
Licenciatura en Biotecnología**

Informe Escrito Final

**Productividad de la biomasa y producción de metabolitos secundarios en el
co-cultivo de las microalgas dulceacuícolas *Chlorella sorokiniana* y
*Desmodesmus communis***

**Tesis de grado presentada como requisito parcial para optar al grado de
Licenciatura en Biotecnología**

Alejandra Sánchez Miranda

**Campus Omar Dengo
Heredia, 2020**

Este trabajo de graduación fue **APROBADO** por el Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Biología con Énfasis en Biotecnología.



Licda. Sidey Arias Valverde

Representante, Decano, quién preside



Dra. Andrea García Rojas

Director, Unidad Académica



Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega

Tutora



Licda. Nancy Villalobos Sandí

Asesora



M.Sc. Rocío Ugalde Salazar

Invitada especial

Agradecimiento

Agradezco primero a Dios y a la Virgen María por acompañarme y bendecirme siempre.

A la Universidad Nacional de Costa Rica y al programa de Intercambio Estudiantil del Departamento de Bienestar Estudiantil por brindarme apoyo económico para realizar el proyecto en México.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C (CIBNOR) México, por todo el apoyo brindado, por permitirme utilizar sus instalaciones para llevar a cabo este proyecto. Especialmente agradezco al Programa de Acuicultura, proyecto 20231 del Laboratorio de Biotecnología de Microalgas.

Al Laboratorio de Biotecnología de Microalgas y al Laboratorio de Alimento Vivo (CIBNOR) por permitirme utilizar los equipos necesarios. Extiendo mi agradecimiento a los coordinadores de estos laboratorios: Bertha Olivia Arredondo Vega, Adriana Greene Yee, Julián Garzón Favela y Gabriel González Gómez por guiarme y enseñarme, por su apoyo, paciencia y amabilidad.

A mi comité asesor: Bertha Olivia Arredondo Vega, Nancy Villalobos Sandí y Milagro Carvajal Oses por los consejos, compromiso, por ser siempre responsables y brindarme tanto apoyo. Son investigadoras que admiro muchísimo por todo lo que han alcanzado, por su sabiduría y sobre todo por su profesionalismo, humildad, pasión por la ciencia y la enseñanza.

A mis compañeras del Laboratorio de Biotecnología de Microalgas (CIBNOR), Karla Cota Quintero y Claudia Rojas Rodríguez por apoyarme, guiarme y enseñarme. Ambas fueron de gran ayuda en todo el proceso y les extiendo mi más sincero agradecimiento por tanta paciencia y tanto apoyo que me brindaron.

Un profundo agradecimiento a Kitty, por ser un gran apoyo. Por recibirme en su país, laboratorio y hogar, por su hospitalidad, consejos, amabilidad y responsabilidad. Por contagiarme

siempre de esa alegría y energía que la caracteriza. Por motivarme cada día y ser esa persona fundamental para lograr realizar este proyecto.

A los profesores de la Universidad Nacional, Nancy Villalobos Sandí y Luis Vega Corrales por sus buenos consejos, por motivarme a realizar este proyecto en el extranjero, por preocuparse siempre por mí y por ser excelentes profesores, sin duda son de mis profesores de carrera que más admiro.

Finalmente, y no menos importante, agradezco profundamente a mis padres, hermanos, familia y amigos en quienes me he apoyado siempre, me han levantado cuando caigo y me han impulsado a continuar con mis estudios, metas y sueños. Gracias por todo el apoyo que me han brindado cuando tanto lo necesité.

Dedicatoria

A mi papá Benedicto Sánchez Vega por ser mi mayor inspiración para cumplir mis metas y que desde el cielo me continúa guiando.

A mi mamá Marta Miranda Hernandez por ser mi apoyo incondicional en todos mis años de Universidad, por siempre inspirarme y apoyarme para alcanzar mis metas y sueños.

A mis hermanos David y Alfredo por estar siempre a mi lado impulsándome a terminar mis estudios.

A mi abuelo Alfredo que me ha apoyado en mi proceso de terminar la tesis y a mis abuelos que están en el cielo, Nelly, Julia y Odilio, que siempre me animaron a continuar.

Índice de contenido

Agradecimiento.....	II
Dedicatoria.....	IV
Índice de contenido	V
Índice de cuadros	VIII
Índice de figuras.....	IX
Abreviaturas.....	XI
Resumen	XII
1. Introducción	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Justificación	3
1.3. Planteamiento del problema a investigar	6
1.4. Objetivos	6
1.5. Objetivo general.....	6
1.6. Objetivos específicos	6
2. Marco teórico	7
2.1. Microalgas: generalidades, importancia y principales aplicaciones	7
2.2. Importancia de las microalgas dulceacuícolas <i>D. communis</i> y <i>C. sorokiniana</i>	10
2.2.1. <i>Desmodesmus communis</i>	10
2.2.2. <i>Chlorella sorokiniana</i>	11
2.3. Co-cultivo de microalgas.....	13
3. Marco Metodológico	15
3.1. Sitio de estudio	15

3.2.	Material biológico	15
3.3.	Condiciones de cultivo	15
3.4.	Recuento celular, tasa de crecimiento, tiempo de generación y cosecha	16
3.5.	Determinación de peso seco y contenido orgánico e inorgánico	18
3.6.	Determinación de proteínas (Lowry et al., 1951)	19
3.7.	Determinación de carbohidratos (DuBois et al., 1956).....	21
3.8.	Determinación de pigmentos y lípidos totales.....	23
3.8.1.	Cuantificación de pigmentos totales	24
3.8.2.	Cuantificación de lípidos totales.....	24
3.9.	Análisis estadísticos	26
4.	Resultados.....	27
4.1.	Curvas de crecimiento, tasa de crecimiento y tiempo de generación	27
4.2.	Rendimiento de la biomasa	30
4.3.	Productividad de la biomasa.....	31
4.4.	Peso seco total, orgánico e inorgánico	32
4.5.	Composición bioquímica.....	33
4.5.1.	Determinación de proteínas totales	33
4.5.2.	Determinación de carbohidratos totales	34
4.5.3.	Determinación de lípidos totales	35
4.5.4.	Determinación de pigmentos totales	36
5.	Discusión	39
5.1.	Crecimiento de los cultivos unialgales y co-cultivo	39
5.2.	Rendimiento y productividad de la biomasa	40
5.3.	Peso seco total, orgánico e inorgánico	41
5.4.	Composición bioquímica.....	42

5.4.1.	Determinación de proteínas totales	42
5.4.2.	Determinación de carbohidratos totales	43
5.4.3.	Determinación de lípidos totales	44
5.4.4.	Determinación de pigmentos totales.....	45
6.	Conclusiones	47
7.	Recomendaciones.....	48
8.	Referencias.....	49

Índice de cuadros

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de <i>Desmodesmus communis</i>	10
Cuadro 2. Clasificación taxonómica de <i>Chlorella sorokiniana</i>	122
Cuadro 3. Tasa de crecimiento (d^{-1}) y tiempo de generación (d) correspondiente a la fase exponencial de <i>Chlorella sorokiniana</i> , <i>Desmodesmus communis</i> y el co-cultivo de ambas.	30

Índice de figuras

Figura 1. Cultivos de <i>C. sorokiniana</i> unialgal (A), <i>D. communis</i> unialgal (B) y co-cultivo de <i>C. sorokiniana</i> con <i>D. communis</i> (C) realizados en este estudio en el cuarto de crecimiento del Laboratorio de Alimento Vivo (CIBNOR).....	16
Figura 2. Curva de calibración de proteínas elaborada con albúmina de suero bovino. Obtenida de Arredondo-Vega et al. (2017c).....	20
Figura 3. Curva de calibración de carbohidratos a partir de glucosa anhidra. Obtenida de Arredondo-Vega et al. (2017d).....	22
Figura 4. Curva de calibración para la determinación de lípidos totales con la diatomea <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (Carreón-Palau et al., 2017).	25
Figura 5. Curva de crecimiento de <i>C. sorokiniana</i> por recuento celular expresado en cél mL ⁻¹ en función del tiempo (días). Las barras de error muestran los intervalos de confianza.....	27
Figura 6. Curva de crecimiento de <i>D. communis</i> por recuento celular expresado en cél mL ⁻¹ en función del tiempo (días). Las barras de error muestran los intervalos de confianza.....	28
Figura 7. Curva de crecimiento del co-cultivo de <i>C. sorokiniana</i> y <i>D. communis</i> por recuento celular expresado en cél mL ⁻¹ en función del tiempo (días). Las barras de error muestran los intervalos de confianza.....	29
Figura 8. Curva de crecimiento de <i>C. sorokiniana</i> y <i>D. communis</i> en el co-cultivo por recuento celular expresado en cél mL ⁻¹ en función del tiempo (días). Las barras de error muestran los intervalos de confianza.....	29
Figura 9. Células de <i>C. sorokiniana</i> y <i>D. communis</i> en el co-cultivo observado en el microscopio óptico Carl Zeiss Primo Star del CIBNOR a 40X. Las células encerradas en círculos pertenecen a <i>C. sorokiniana</i>	30
Figura 10. Rendimiento de la biomasa (mg L ⁻¹) de los cultivos unialgales de <i>C. sorokiniana</i> , <i>D. communis</i> y el co-cultivo de ambas especies. Las barras de error muestran los intervalos de confianza. Letras diferentes muestran diferencias significativas.....	31
Figura 11. Productividad de la biomasa (mg L ⁻¹ d ⁻¹) de los cultivos unialgales de <i>C. sorokiniana</i> , <i>D. communis</i> y del co-cultivo de ambas especies. Las barras de error muestran los intervalos de confianza. Letras diferentes muestran diferencias significativas.....	32

Figura 12. Contenido de peso seco total (PST), orgánico (PSO) e inorgánico (PSI) (mg L^{-1}) de los cultivos de <i>C. sorokiniana</i> , <i>D. communis</i> y co-cultivo de ambas especies. Las barras de error muestran los intervalos de confianza. Letras diferentes muestran diferencias significativas.	33
Figura 13. Porcentaje de proteínas totales con respecto al peso seco de los cultivos de <i>C. sorokiniana</i> , <i>D. communis</i> y el co-cultivo de ambas especies. Las barras de error muestran los intervalos de confianza. Letras diferentes muestran diferencias significativas.	34
Figura 14. Porcentaje de carbohidratos totales con respecto al peso seco de los cultivos de <i>C. sorokiniana</i> , <i>D. communis</i> y el co-cultivo de ambas especies. Las barras de error muestran los intervalos de confianza. Letras diferentes muestran diferencias significativas.	35
Figura 15. Porcentaje de lípidos totales con respecto al peso seco de los cultivos de <i>C. sorokiniana</i> , <i>D. communis</i> y el co-cultivo de ambas especies. Las barras de error muestran los intervalos de confianza. Letras diferentes muestran diferencias significativas.	36
Figura 16. Porcentaje de pigmentos totales de los cultivos unialgales de <i>C. sorokiniana</i> , <i>D. communis</i> y el co-cultivo de ambas especies con respecto al peso seco. Las barras de error muestran los intervalos de confianza. Letras diferentes muestran diferencias significativas.	37
Figura 17. Perfil de contenido porcentual de pigmentos obtenidos (clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> y carotenoides) con respecto al peso seco para los cultivos de <i>C. sorokiniana</i> , <i>D. communis</i> y el co-cultivo. Las barras de error muestran los intervalos de confianza. Letras diferentes muestran diferencias significativas.	38

Abreviaturas

Abs	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribunucleico
BSA	Albúmina de suero bovino (por sus siglas en ingles)
CCAP	Culture Collection of Algae and Protozoa
Cél	Células
CIBNOR	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
CO ₂	Dióxido de carbono
CuSO ₄ 5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado
DHA	Ácido docosaheptaenoico
EPA	Ácido eicosapentaenoico
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución, del inglés high performance liquid chromatography
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
KC ₄ H ₅ O ₆	Tartrato de potasio
Kg	Kilogramos
L	Litros
mg	Miligramos
mL	Mililitros
NaCl	Cloruro de sodio
NaCO ₃	Carbonato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
nm	Nanómetros
PSF	Peso seco del filtro
PSFM	Peso seco del filtro con muestra
PSFC	Peso seco del filtro con muestra incinerada
PSI	Peso seco inorgánico
PSO	Peso seco orgánico
PST	Peso seco total
rpm	Revoluciones por minuto
UTEX	Universidad de Texas, Austin
°C	Grados centígrados
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µm	Micrómetros

Resumen

Las microalgas son organismos fotosintéticos con una alta tasa de crecimiento y capacidad de generar compuestos bioactivos con potencial industrial. Los géneros *Chlorella* y *Desmodesmus* se han estudiado por su alto contenido de nutrientes y acumulación de lípidos y carbohidratos de interés. El co-cultivo se presenta como un sistema promisorio para incrementar la productividad de la biomasa ya que se genera menor riesgo de contaminación por microorganismos patógenos y se mejora la utilización de nutrientes. Al ser *Chlorella sorokiniana* y *Desmodesmus communis* dos microalgas pertenecientes al mismo hábitat, se asume que tienen la capacidad de lograr una relación de cooperación en el co-cultivo y generar una alta productividad. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de un co-cultivo con ambas microalgas en cuanto a productividad de la biomasa y de metabolitos secundarios. Para lo cual, se cultivaron de manera unialgal y en co-cultivo en medio F de Guillard y Ryther con 10% de agua de mar; se realizó el recuento celular, la cosecha de la biomasa y posteriores análisis al inicio de la fase estacionaria de cada cultivo. La mayor productividad de la biomasa ($\text{mgL}^{-1}\text{d}^{-1}$) se obtuvo tanto en el co-cultivo (50.90 ± 4.49) como en el cultivo unialgal de *D. communis* (50.69 ± 5.02), siendo menor en *C. sorokiniana* unialgal (39.03 ± 3.63). No hubo diferencias significativas entre los tres cultivos para el contenido de proteínas y carbohidratos, mientras que el contenido de lípidos y pigmentos fue mayor en el cultivo unialgal de *C. sorokiniana*. En co-cultivo ambas especies lograron crecer sin desplazar una a la otra, generando productividad de la biomasa y metabolitos de manera uniforme, sin embargo, no se encontró diferencias significativas con el cultivo unialgal de *D. communis*, por lo que se deben realizar más estudios para incrementar la productividad y eficiencia del co-cultivo.

1. Introducción

Las microalgas son organismos que forman parte del fitoplancton y que presentan una alta tasa de crecimiento, algunas tienen la capacidad de duplicar sus células varias veces al día lo que genera altos rendimientos de biomasa, razón por la cual se han utilizado como alimento vivo para especies larvarias de crustáceos, peces y moluscos (Zafra Trelles, 2017; Ferreira et al., 2019). Otras aplicaciones se presentan en la industria de la biorrefinería algal, la cual se define como la transformación de la biomasa a través de procesos sostenibles, para la producción de biocombustible y productos químicos de valor agregado (Khoo et al., 2019). El co-cultivo entre especies de la misma o diferentes familias, se ha propuesto como una alternativa para aumentar la productividad tanto de la biomasa como de lípidos (Padmaperuma et al., 2018). En la actualidad, son pocos los estudios que se han realizado de co-cultivos entre microalgas (Rashid et al., 2019), por lo que en el presente estudio se evaluó la productividad de la biomasa y producción de metabolitos secundarios en el co-cultivo de *Chlorella sorokiniana* y *Desmodesmus communis*.

1.1. Antecedentes

Las microalgas han sido ampliamente utilizadas en la industria acuícola para alimentar especies larvarias de peces, crustáceos y moluscos. Además, los productos naturales a partir de estas tienen aplicaciones en la industria de nutracéuticos, alimentos, cosméticos y biocombustibles. No obstante, la obtención de combustibles fósiles de manera rentable a partir de microalgas continúa en investigación debido a la dificultad para desarrollar procedimientos simples y económicos para convertir lípidos en biodiesel (Anbuechzhian et al., 2015; D'Alessandro & Antoniosi Filho, 2016).

Su cultivo se ha desarrollado principalmente como monocultivos cuya productividad es elevada; tal es el caso de la microalga dulceacuícola *Chlorella* sp. Este género presenta un alto contenido de lípidos totales y el perfil de sus ácidos grasos y pigmentos la colocan en un plano de interés biotecnológico (Corcoran et al., 2019). Actualmente, se ha estudiado la implementación de sistemas de co-cultivos de microalgas para obtener una mayor productividad de la biomasa, con énfasis en mejorar la producción de metabolitos de interés (Magdouli et al., 2016).

Las investigaciones acerca del co-cultivo de microalgas para incrementar el rendimiento y la producción se han basado en la simbiosis entre microalgas con levaduras, hongos y bacterias. Algunos de los co-cultivos estudiados son de la microalga *Chlorella vulgaris* con la levadura *Rhodotorula glutinis*, *C. vulgaris* con el hongo *Trametes versicolor*, *Chlamydomonas reinhardtii* con la bacteria *Mesorhizobium loti*, *Tetrademus obliquus* con la bacteria *Nocardia bhagyanarayanae*, entre otros (Cheirsilp et al., 2012; Angelis et al., 2012; Kazamia et al., 2012; Kumsiri et al., 2018).

Por su parte, la especie *C. sorokiniana* ha sido anteriormente utilizada en co-cultivos. En la investigación de De-Bashan y colaboradores (2002), se empleó la co-inmovilización en alginato de la microalga dulceacuícola *C. sorokiniana* con la bacteria *Azospirillum brasilense*; ellos observaron un aumento en la producción de pigmentos y lípidos debido al efecto del crecimiento en conjunto de ambas especies (De-Bashan et al., 2002). De igual forma, Mackay y colaboradores (2015) realizaron un co-cultivo de *C. sorokiniana* con el hongo *Isaria fumosorosea* como posible materia prima para la gasificación hidrotérmica (Mackay et al., 2015).

En cuanto a la microalga dulceacuícola *Desmodesmus communis*, anteriormente se conocía como *Scenedesmus communis*, sin embargo, en el año 2000 fue caracterizada por Hegewald como *D. communis* (Hegewald, 2000). Hasta la fecha, no se han realizado estudios de co-cultivos propiamente de esta especie, sin embargo, Contreras-Angulo y colaboradores (2019) emplearon un co-cultivo de *Scenedesmus* sp. con la bacteria *Azospirillum brasilense* resultando en un sistema potencial para mejorar el contenido de ácidos grasos de la biomasa (Contreras-Angulo et al., 2019).

En términos generales, al realizar un co-cultivo utilizando microalgas, se genera un cultivo denso que beneficia el aumento en la velocidad de crecimiento de ambos organismos (Magdouli et al., 2016). Sin embargo, se han encontrado múltiples limitaciones y desventajas al realizar un co-cultivo de microalgas con bacterias, levaduras y hongos; una razón es que las bacterias y levaduras poseen una tasa de crecimiento mayor a las microalgas, lo que puede afectar la productividad (Padmaperuma et al., 2018).

En consecuencia, se ha comenzado a estudiar los beneficios que podría generar un co-cultivo entre dos microalgas. Los sistemas de co-cultivo microalga-microalga ofrecen una alta asimilación natural entre las dos especies que pertenecen al mismo hábitat, presentan menos diferencias en la tasa de crecimiento, generan una estable composición de la biomasa, además, en la biorrefinería,

estos sistemas se pueden considerar más confiables y sostenibles que los sistemas de monocultivo y co-cultivo tradicionales (Rashid et al., 2019).

De este modo, actualmente existen pocas investigaciones acerca del sistema de co-cultivo entre dos microalgas. Recientemente, se estudió el co-cultivo de la microalga *Tetraselmis suecica* (clorófita, marina) con *Amphora* sp. (bacilariófita, halotolerante) y *Amphora* sp. con *Dunaliella salina* (corófito, halofílica) en diferentes rangos de salinidad, sin embargo en el caso de estos co-cultivos la productividad de la biomasa fue menor que en los cultivos unialgales (Ishika et al., 2019).

Asimismo, Corcoran y colaboradores (2019) estudiaron las interacciones alelopáticas de las microalgas *C. sorokiniana* y *Coelastrella* sp. mediante un co-cultivo de ambas, encontrando que al realizar el co-cultivo, se produce compuestos que inhiben el crecimiento de *C. sorokiniana*, lo cual es atribuido a una presunta interacción de alelopatía (Corcoran et al., 2019). Por otro lado, Rashid y colaboradores (2019) investigaron el efecto del co-cultivo de las microalgas dulceacuícolas *Ettlia* sp. y *Chlorella* sp., observando una alta productividad de biomasa y un alto contenido de carbohidratos, lo cual fue considerado como favorable para aplicaciones de biorrefinería (Rashid et al., 2019).

De igual forma, en la investigación de Tejido-Nuñez y colaboradores (2020), se realizó un co-cultivo entre las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Tetradismus obliquus* en un sistema de recirculación acuícola con la finalidad de obtener mejor tasa de crecimiento y remoción de nutrientes que los monocultivos. En este caso se encontró que ambas especies lograron crecer de manera satisfactoria sin que una desplace a la otra, generando buena productividad de la biomasa y remoción de nutrientes (Tejido-Nuñez et al., 2020).

1.2. Justificación

Las microalgas han sido ampliamente estudiadas debido a la gran variedad de aplicaciones en la industria acuícola, alimenticia, cosmética, entre otros. También, son las principales responsables de la conversión de CO₂ en biomasa, lo que contribuye a la reducción del efecto del calentamiento global. Sin embargo, de las más de 30,000 especies clasificadas, solo alrededor de 100 han sido estudiadas y unas 20 especies están en explotación comercial (Fernández et al., 2017).

Estos organismos son considerados de gran importancia industrial, ya que tienen la capacidad de producir metabolitos como proteínas, lípidos y azúcares complejos. Además, a partir de estos productos se pueden generar bioquímicos, biocombustibles, alimento, aceites, entre otros compuestos de alto valor en la biorrefinería (Bhattacharya & Goswami Saswata, 2020).

Actualmente, la mayoría de las necesidades energéticas se satisfacen mediante el uso de combustibles fósiles, conllevando a un agotamiento de las reservas y a la contaminación ambiental, por lo que las estrategias están enfocadas hacia el uso de fuentes de energía renovables y sostenibles, amigables con el medio ambiente (Sajjadi et al., 2018). Por esta razón, recientemente se ha estudiado el potencial de los lípidos que se obtienen de las microalgas para la producción de biocombustibles (Rashid et al., 2019).

Se ha encontrado que, mundialmente, los combustibles fósiles son responsables de la liberación de 29 giga toneladas por año de CO₂, además, el 88% de la energía utilizada por los seres humanos para uso doméstico es derivada de ellos; esto ha generado que las economías de los países sean vulnerables a los precios y suplementos de petróleo. Actualmente se está haciendo un esfuerzo global por pasar a una economía bio-dependiente, donde la biomasa reemplaza el petróleo (Khan et al., 2018; Suparmaniam et al., 2019). Por lo anterior, es importante realizar investigaciones acerca del potencial de los lípidos de diferentes especies de microalgas, así como diferentes métodos de cultivo para generar biocombustibles de manera rentable.

Por otra parte, entre los metabolitos importantes para la industria y la sociedad, se encuentran las proteínas de las microalgas; éstas contienen casi todos los aminoácidos esenciales para los seres humanos, además, tienen una alta tasa de digestión de 87.45% a 97.81% y, al constituir casi la mitad de la biomasa de las microalgas, podrían generar beneficios para el ser humano. Asimismo, los carbohidratos constituyen el 10% al 15% de la biomasa de las microalgas y se encuentran en forma de almidón, celulosa, azúcares y otros polisacáridos con aplicaciones industriales, por ejemplo, el beta-glucano, un polisacárido abundante en *Chlorella* sp con propiedades antivirales y antibacteriales en seres humanos y peces (Dineshbabu et al., 2019).

De igual manera, los pigmentos que se obtienen a partir de la biomasa microalgal, son considerados de gran importancia en la industria médica, tal es el caso de algunos carotenoides que pueden convertirse en vitamina A en el cuerpo humano. Además, se ha encontrado que los pigmentos obtenidos de especies del género *Chlorella* pueden ser utilizados como ingredientes en suplementos alimenticios y como colorantes en alimentos para humanos y animales. Entre otras

aplicaciones de los pigmentos a partir de microalgas de este género, destaca su utilización en productos de cuidado de la piel, el cabello, en bloqueadores solares y productos de antienvjecimiento (Morais Junior et al., 2020).

En este sentido, se han implementado distintas técnicas para producir los metabolitos anteriormente mencionados. Una de ellas es el sistema de co-cultivo, el cual se basa en el cultivo en conjunto de dos o más especies, donde sus interacciones podrían generar beneficios como una mayor asimilación en el cultivo, una mayor tasa de crecimiento y una óptima productividad de la biomasa. Así, mediante esta técnica novedosa se podría aumentar la producción de lípidos y subproductos como pigmentos, polisacáridos y ácidos grasos poliinsaturados (Magdouli et al., 2016).

Frente a esta alternativa, y al haber poca información acerca de la interacción de dos microalgas en co-cultivo, es necesaria la búsqueda de especies que logren co-existir en un mismo cultivo y al mismo tiempo generen una alta productividad de biomasa y subproductos importantes. Estudios previos del Laboratorio de Biotecnología de Microalgas (CIBNOR) han reportado un crecimiento óptimo y un buen perfil de lípidos en las microalgas dulceacuícolas *C. sorokiniana* y *D. communis*, además de que esta última fue aislada en México, por lo que es importante estudiar su comportamiento.

Por esta razón, el propósito de esta investigación fue analizar las microalgas *C. sorokiniana* y *D. communis* tanto en cultivos unialgales como en co-cultivo, para su comparación en cuanto a productividad de la biomasa, contenido de lípidos, proteínas, carbohidratos y pigmentos totales que puedan ser utilizados en aplicaciones industriales

1.3. Planteamiento del problema a investigar

Hasta el momento, no se han realizado investigaciones de co-cultivo entre las microalgas dulceacuícolas *Chlorella sorokiniana* y *Desmodesmus communis*, además, hay poca información acerca del efecto de este sistema de cultivo sobre la productividad de la biomasa y de los metabolitos secundarios. Por lo que surge la pregunta: ¿Cuál es el efecto del co-cultivo de las microalgas dulceacuícolas *Chlorella sorokiniana* y *Desmodesmus communis* en la productividad de la biomasa y la producción de metabolitos secundarios?

1.4. Objetivos

1.5. Objetivo general

Evaluar la productividad de la biomasa y la producción de metabolitos secundarios en el cultivo unialgal y co-cultivo de dos microalgas dulceacuícolas (*Chlorella sorokiniana* y *Desmodesmus communis*) bajo condiciones controladas de laboratorio.

1.6. Objetivos específicos

1. Determinar la tasa de crecimiento y productividad de la biomasa de los cultivos unialgales y co-cultivo de *Chlorella sorokiniana* y *Desmodesmus communis*.
2. Estimar el contenido de proteínas, carbohidratos, lípidos y pigmentos totales de los cultivos unialgales y co-cultivo de *Chlorella sorokiniana* y *Desmodesmus communis*.
3. Comparar la productividad de biomasa y el contenido de metabolitos secundarios de los cultivos unialgales de *Chlorella sorokiniana* y *Desmodesmus communis* con el co-cultivo.

2. Marco teórico

2.1. Microalgas: generalidades, importancia y principales aplicaciones

El término microalgas hace referencia a las algas que son tan pequeñas que no pueden ser observadas a simple vista. Dentro de algunos grupos taxonómicos se incluyen: Rhodophyta (algas rojas), Chlorophyta (algas verdes), Bacillariophyta (diatomeas) y Chrysophyta (algas doradas). Comprende alrededor de 800.000 especies de las cuales solo alrededor de 50.000 han sido descritas (Mobin et al., 2019; Mohd Udaiyappan et al., 2017).

La identificación taxonómica continúa siendo difícil hasta el momento ya que su clasificación depende de la composición de los pigmentos, del ciclo de vida, de la estructura celular, del almacenamiento de compuestos, de datos moleculares, entre otros. Sin embargo, comprende tanto microorganismos procariontes (cianobacterias) y eucariotes (Gaignard et al., 2019).

Las microalgas son microorganismos responsables de la producción de oxígeno y de la transformación de CO₂ a biomasa en el planeta, lo que contribuye a la reducción del efecto del calentamiento global. Estos organismos son capaces de crecer en diferentes ambientes, así como desiertos, altas montañas y polos, aguas de mar, aguas de ríos, aguas salobres, aguas residuales, entre otros (Fernández et al., 2017).

A partir de las microalgas se puede obtener aceite y biomasa con importancia industrial y con mayores beneficios que los obtenidos a partir de cultivos terrestres, esto debido a que tienen un crecimiento rápido, en pocas horas pueden duplicar la población y ser recolectadas diariamente. Además, tienen la capacidad de fotosintetizar hasta 2 Kg de CO₂ por Kg de biomasa producida, pueden vivir en aguas residuales y purificarlas mientras producen biomasa y aceites; entre otras ventajas que poseen sobre los cultivos oleaginosos tradicionales (Sajjadi et al., 2018).

Se considera que estos microorganismos son atractivos en la industria debido a su composición bioquímica de proteínas, lípidos, pigmentos y carbohidratos, de los cuales la productividad depende de las condiciones ambientales, la estación, ubicación geográfica, etapa del ciclo de vida, condiciones de cultivo, entre otros (Anbuezhian et al., 2015). Algunos de estos compuestos bioactivos pueden ser producidos a partir del metabolismo primario o secundario, y en la mayoría de microalgas estos compuestos se acumulan en la biomasa o pueden ser excretados al medio (De Moraes et al., 2015).

Aunado a esto, las microalgas tienen múltiples aplicaciones ambientales, entre ellas se encuentra el tratamiento de aguas residuales, la captura de CO₂ y la absorción de metales pesados. También tienen aplicaciones comerciales, como la producción de pigmentos y ácidos grasos de la familia ω₃ como el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el docosahexaenoico (DHA), los biofertilizantes, los cosméticos; así como aplicaciones de bioenergía para la producción de biodiesel, bioetanol, biogás, entre otros (Sudhakar et al., 2019).

Entre los compuestos bioactivos, los carbohidratos producidos por microalgas son de importancia comercial. Entre el 15 y 55% de la biomasa de microalgas puede ser extraída como polisacáridos, y estos pueden ser usados como anticoagulantes, antitumorales, antimicrobianos, gelificantes, entre otras aplicaciones. Además, un 80% de la pared celular de las especies del género *Chlorella* dulceacuícolas están compuestas por polisacáridos (Mobin et al., 2019) por lo que es importante su determinación y cuantificación.

Existen varios métodos colorimétricos para la cuantificación de carbohidratos. El descrito por DuBois y colaboradores (1956) es el más utilizado por ser un procedimiento fácil, sensible, reproducible y rápido, además que permite cuantificar monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Este método consiste en agregar al extracto de la muestra que contiene carbohidratos, ácido sulfúrico para hacer la hidrólisis, seguidamente adicionar el fenol para generar la reacción colorimétrica y las lecturas de absorbancia se realizan a 490 nm (Dubois et al., 1956; López-legarda et al., 2017).

En el caso de las proteínas, en las distintas especies de microalgas constituyen alrededor del 6% a 70% de su biomasa seca. Actualmente su consumo ha aumentado, por lo que se espera que proteínas obtenidas a partir de insectos, algas o biología sintética cubran el 50% del mercado de las fuentes alternativas de proteínas en el año 2054 (Khanra et al., 2018).

El método espectrofotométrico de Lowry y colaboradores (1951) para la cuantificación de proteínas de microalgas, ha sido de los más utilizados debido a su precisión, sensibilidad y fácil implementación. Consiste en agregar al extracto alcalino, las soluciones A (hidróxido de sodio, carbonato de sodio y tartrato de sodio); B (hidróxido de sodio, sulfato de cobre pentahidratado, tartrato de sodio y potasio tetrahidratado) y C (reactivo de fenol:agua); finalmente, la concentración de proteínas se estima mediante las lecturas de absorbancia a 750 nm (Flores Ramos & Ruiz Soto, 2017; González-Delgado et al., 2017; Lowry et al., 1951).

Por otra parte, el contenido de lípidos en estos organismos puede ser hasta un 75% de la biomasa en dependencia de la especie y las condiciones de cultivo. Se estima que la producción de lípidos a partir de microalgas puede ser 20 veces mayor que en las plantas. De esta manera, se ha encontrado que especies como *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. son considerados como candidatos para la extracción de lípidos y su transformación química en biodiesel (Menegazzo & Fonseca, 2019; Park et al., 2019).

Actualmente, la demanda de posibles recursos para la producción de biodiesel ha aumentado. Estudios previos han encontrado que las microalgas tienen la capacidad de producir lípidos que posteriormente son transformados a biodiesel, y sus propiedades dependen de la composición de los ácidos grasos. No obstante, la producción de biodiesel a partir de microalgas tiene muchos desafíos, como el uso de medios de cultivo económicos, suministro de agua y nutrientes para el cultivo a gran escala de manera rentable (Sajjadi et al., 2018; Yao et al., 2015).

Otros metabolitos importantes son los pigmentos obtenidos a partir de microalgas, estos son moléculas esenciales que tienen la capacidad de absorber la luz del espectro visible; son utilizados para generar productos nutracéuticos, aditivos o colorantes para la industria alimenticia, acuicultura, farmacéutica, entre otras aplicaciones. Las microalgas tienen la capacidad de producir varios tipos de pigmentos en dependencia de la especie y su color, por ejemplo, producen clorofila, pigmento con actividad antioxidante, anticancerígena, antimutagénica y antígenotóxica (Christaki et al., 2015; Koyande et al., 2019).

Las microalgas poseen diferentes tipos de clorofilas, sin embargo, la clorofila *a* es el compuesto principal para la captura de luz y se encuentra en todos los organismos fotosintéticos, mientras que la clorofila *b* solo se encuentra en las algas clorófitas. Las especies del género *Chlorella* pueden contener ambos tipos de clorofilas y, al tener un crecimiento acelerado, estos pigmentos pueden constituir hasta un 4.5% del peso seco, lo que las hace atractivas para la producción (Christaki et al., 2015; Khanra et al., 2018). Para su extracción, se han utilizado solventes orgánicos como etanol, acetona, metanol y dietilformamida. Dada la tendencia a utilizar solventes no tóxicos y amigables con el medio ambiente, se ha demostrado que con acetona al 90% se obtiene una extracción completa de clorofila *a* (Khanra et al., 2018).

En efecto, los compuestos bioactivos son los principales componentes de las microalgas y debido a la gran diversidad de especies existentes, la composición de la biomasa puede cambiar en dependencia de las condiciones de cultivo como intensidad luminosa, temperatura y

disponibilidad de nutrientes (Bernaerts et al., 2019). Es por esto que es importante la optimización de los métodos y las condiciones de cultivo de las microalgas para la obtención de una alta productividad de bioproductos a bajo costo.

2.2. Importancia de las microalgas dulceacuícolas *D. communis* y *C. sorokiniana*

2.2.1. *Desmodesmus communis*

Las microalgas de la especie *D. communis* pertenecen al phylum Chlorophyta, clase Chlorophyceae, familia Scenedesmaceae (Guiry, 2020). Son algas verdes de agua dulce estudiadas por su resistencia ante condiciones de estrés y a la gran cantidad de metabolitos que producen (Akgül, 2020). Originalmente, pertenecía al género *Scenedesmus*, sin embargo, a través de estudios de ADN se reubicó al género *Desmodesmus* como se observa en el cuadro 1 (Hegewald, 2000; Hegewald & Braband, 2017).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Desmodesmus communis*

Dominio: Eukaryota
Phylum: Chlorophyta
Subphylum: Chlorophytina
Clase: Chlorophyceae
Orden: Sphaeropleales
Familia: Scenedesmaceae
Género: *Desmodesmus*
Especie: *communis*

Fuente: AlgaeBase (Guiry, 2020).

Entre sus características generales se encuentra que es una microalga verde clorococal, cuyas células se encuentran formando un cenobio en múltiplos de dos y hasta ocho células. Posee espinas polares en las células externas del cenobio que pueden ser rectas o sinuosas. Las dimensiones de las células son: 4.7 a 6.3 μm de diámetro, 12 a 18 μm de largo y con espinas de hasta 12.5 μm de largo (Bica et al., 2012; Elias, 2018; Hegewald & Braband, 2017).

Esta especie ha sido ampliamente utilizada en investigaciones por su alta tasa de crecimiento, su capacidad de generar concentraciones óptimas de biomasa y lograr competir con otros organismos en cultivo (Pezzolesi et al., 2015). Entre los estudios realizados, se ha demostrado que puede crecer y producir altas cantidades de biomasa en aguas residuales con alto contenido de amonio y al mismo tiempo remover nutrientes; por lo que podría utilizarse este tipo de medios para su cultivo (Samorì et al., 2013).

En un primer estudio realizado por Conti y colaboradores (2016) de un cultivo de *D. communis* en escala media utilizando reactores de 70 L, se observó una alta productividad de biomasa y un incremento en la acumulación de lípidos. De la misma manera, Hernández-García y colaboradores (2019), encontraron en un cultivo de la misma especie bajo condiciones limitadas de nutrientes, un aumento en el contenido de carbohidratos y de lípidos, por lo que sugieren que ambas rutas metabólicas están relacionadas y es posible que productos del catabolismo de carbohidratos sean utilizados en la síntesis de lípidos (Conti et al., 2016; Hernández-García et al., 2019).

2.2.2. *Chlorella sorokiniana*

En cuanto a las microalgas del género *Chlorella*, comúnmente son de agua dulce al igual que *D. communis*, tienen un alto contenido de proteínas, vitaminas y clorofila y han sido ampliamente utilizadas en acuicultura, industrias cosméticas y farmacéuticas. Se considera que este es uno de los taxones de microalgas más prometedores para la producción de biocombustible y es uno de los pocos que ha sido cultivado de manera satisfactoria a gran escala (Ma et al., 2019).

Por su parte, la especie *C. sorokiniana* pertenece al filo Chlorophyta, clase Trebouxiophyceae; su clasificación taxonómica se muestra en el cuadro 2. Tiene la capacidad de crecer en ambientes con temperaturas de más de 40°C y también en aguas deterioradas. Ha sido ampliamente estudiada por su potencial para la producción de biodiesel y la acumulación de grandes cantidades de lípidos y proteínas (Qiu et al., 2017).

Cuadro 2. Clasificación taxonómica de *Chlorella. sorokiniana*

Dominio: Eukaryota
Phylum: Chlorophyta
Subphylum: Chlorophytina
Clase: Trebouxiophyceae
Orden: Chlorellales
Familia: Chlorellaceae
Género: *Chlorella*
Especie: *sorokiniana*

Fuente: AlgaeBase (Guiry, 2020).

Esta especie se caracteriza por sus células de forma esférica de unos 5 µm de diámetro, posee un cloroplasto en forma de copa y un pirenoide. Se considera de alto potencial biotecnológico ya que tiene la capacidad de adaptarse a distintas condiciones tanto ambientales como nutricionales, por lo que se describe como un alga cosmopolita. Además, se han realizado amplios estudios tanto fisiológicos como genéticos y de productividad por su alto contenido de lípidos de importancia industrial (Moreno et al., 2012).

La microalga dulceacuícola *C. sorokiniana* UTEX 1230 fue reportada por primera vez en el año 1953; es una de las cepas del género *Chlorella* más utilizadas para cultivos masivos y fue identificada como un candidato ideal para cultivos mixotróficos por su potencial en la producción de biomasa para aplicaciones de bioenergía. En condiciones heterotróficas se ha encontrado que tienen un crecimiento 5 veces más rápido que en condiciones autotróficas con óptimas producciones de biomasa y lípidos (Chai et al., 2018).

Estudios previos en esta especie han demostrado que tiene la capacidad de aumentar su tasa de crecimiento en medios de cultivo suplementados con glucosa en la oscuridad a comparación del cultivo fototrófico. Además, se ha reportado rendimientos de 37.6 g L⁻¹ y contenido de lípidos de 31.5% cuyo perfil de ácidos grasos y lípidos la hacen ser una especie idónea como materia prima para biocombustibles (Zheng et al., 2013).

Asimismo, investigaciones demuestran que el inducir factores estrés como deficiencia de nitrógeno, fosforo, NaCl, carbono, variaciones de pH y temperatura en el cultivo de microalgas puede aumentar el contenido de lípidos, siendo esta especie más sensible ante condiciones de estrés (Sajjadi et al., 2018). En este sentido, Li y colaboradores (2014) encontraron una mayor productividad de lípidos en *C. sorokiniana* al ser cultivada de manera mixotrófica (Li et al., 2014).

2.3. Co-cultivo de microalgas

Como se ha mencionado anteriormente, el cultivo de microalgas se presenta como una alternativa biotecnológica para la obtención de productos de alto valor industrial por su alta tasa de crecimiento y producción de compuestos bioactivos. Las investigaciones realizadas acerca de estos bioproductos se basan principalmente en monocultivos, no obstante, estos son muy susceptibles a contaminación por otros microorganismos. Es por esto que recientemente se ha estudiado como alternativa el sistema de co-cultivo de microalgas con bacterias, levaduras, hongos y con otras especies de microalgas, ya que se dice que puede generar protección ante agentes contaminantes (Rashid et al., 2019).

Estudios recientes han encontrado que la diversidad genética que se produce en este tipo de cultivos contribuye a una disminución de las perturbaciones que ocurren normalmente en los monocultivos, además que se genera una menor pérdida de biomasa. Lo anterior puede ser beneficioso en el caso de ser utilizado para tratamiento de aguas residuales, ya que al haber diversidad en el cultivo también hay una diferencia en el requerimiento de nutrientes, por lo que mejora la utilización de éstos (Tejido-Nuñez et al., 2020).

Por otra parte, el uso de combustibles fósiles a nivel mundial ha generado preocupación por la contaminación ambiental que ocasiona, por lo que se han buscado alternativas amigables con el medio ambiente para generar biocombustibles. El co-cultivo de comunidades de microorganismos para la producción de biodiesel ha sido una opción viable ya que tiene ventajas como un corto ciclo de vida, alta productividad y fácil escalamiento (Magdouli et al., 2016).

Este sistema presenta grandes beneficios ya que las microalgas tienen la capacidad de producir oxígeno y otros compuestos orgánicos que son utilizados por los otros microorganismos en el co-cultivo. Estos organismos heterotróficos degradan el carbono orgánico en CO₂ y otras moléculas que son utilizadas por las microalgas para promover el crecimiento (Rashid et al., 2018).

Asimismo, se han encontrado bacterias como las del género *Azospirillum*, que tienen la capacidad de fijar nitrógeno y establecer relaciones mutualistas con las microalgas. Por otro lado, se ha demostrado que estas bacterias promueven el crecimiento y la productividad de la biomasa en co-cultivo con *Chlorella* sp. (Contreras-Angulo et al., 2019).

La alta eficiencia de este sistema puede ser atribuido a las interacciones entre la bacteria y la microalga; así como intercambio de nutrientes, traducción de señales y transferencia de genes. Sin

embargo, para este tipo de cultivos es necesario conocer muy bien el tipo y la especie de bacteria que se va a utilizar ya que una mala elección puede generar efectos adversos en la microalga como inhibir su crecimiento y disminuir su productividad (Qi et al., 2018).

Del mismo modo, se ha estudiado la utilización de hongos y levaduras en co-cultivo con microalgas. Algunos hongos tienen la capacidad de secretar enzimas extracelulares que convierten la materia orgánica en nutrientes como dióxido de carbono que puede ser asimilado de manera fácil por la microalga, además, las microalgas autotróficas producen oxígeno que promueve la respiración del hongo (Chu et al., 2021).

En el caso de levaduras en co-cultivo con microalgas se produce una alta cantidad de ácidos grasos saturados. Se ha encontrado que al acoplar la fermentación de lípidos con la degradación de biomasa lignocelulósica a través de este sistema podría mejorar el rendimiento de lípidos y reducir los costos de producción (Magdouli et al., 2016).

En este sentido, en los últimos años se han realizado investigaciones del co-cultivo de dos microalgas, donde se ha encontrado que se produce un cultivo denso y la velocidad de crecimiento es mayor. Este sistema puede generar una mayor producción de sustancias poliméricas extracelulares, lo cual puede ser beneficioso y aumentar la producción de lípidos con importancia industrial (Magdouli et al., 2016; Tejido-Nuñez et al., 2020).

Sin embargo, al realizar un cultivo mixto entre dos microalgas se debe tomar en cuenta el fenómeno de alelopatía, esto es, los efectos que puede causar los productos del metabolismo secundario de una especie en el crecimiento y función fisiológica de otra. Tal es el caso de la invasión de la microalga *Coelastrella* sp. en el cultivo de *C. sorokiniana*, donde los productos producidos por ambas especies en un mismo cultivo ocasionaron una inhibición del crecimiento de *C. sorokiniana*, por lo que al realizar este tipo de cultivos es importante estudiar previamente su comportamiento para no generar efectos adversos. (Corcoran et al., 2019).

Los sistemas de co-cultivo son novedosos y atractivos por la alta eficiencia y productividad, sin embargo, los efectos de un co-cultivo de dos microalgas se encuentran aún en investigación. Así, el co-cultivo microalga-microalga es un sistema promisorio ya que al realizarse con dos especies que pertenecen al mismo hábitat, se logra una mayor asimilación de nutrientes, hay menos diferencias en la velocidad de crecimiento y la biomasa producida es de composición estable (Rashid et al., 2019).

3. Marco Metodológico

3.1. Sitio de estudio

El proyecto de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas y el Laboratorio de Alimento Vivo del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) (24° 8'5.65" N, 110°25'36.78" O), ubicado en La Paz, Baja California Sur, México; durante los meses de enero a marzo del 2020.

3.2. Material biológico

Las cepas de microalgas dulceacuícolas utilizadas en este estudio fueron colectadas de las siguientes fuentes: *Chlorella sorokiniana* se obtuvo de la colección de la CCAP (*Culture Collection of Algae and Protozoa*, por sus siglas en inglés) y se mantiene en el cepario del CIBNOR con la clave CIB48. *Desmodesmus communis* fue aislada de la presa Miguel Hidalgo de Ciudad Victoria, Tamaulipas, México en el año 2009 y fue donada al cepario del CIBNOR donde se mantiene con la clave CIB53.

3.3. Condiciones de cultivo

Tanto los cultivos unialgales de *C. sorokiniana* y *D. communis* como el co-cultivo se llevaron a cabo por cuadruplicado, por lo que se generó un total de 12 muestras para cada experimento como se observa en la figura 1. Se utilizó el medio F de Guillard y Ryther (1962) con 10% de agua de mar en matraces Erlenmeyer de 2 L con un volumen final de cultivo de 1.7 L. El porcentaje de inóculo de ambas cepas fue del 25% tanto en los cultivos unialgales como en co-cultivo.

Los matraces Erlenmeyer con los cultivos se colocaron en condiciones controladas de laboratorio a una temperatura de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperiodo de 12h luz: 12h oscuridad, intensidad luminosa de $56.31 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ medida con un luxómetro marca Steren modelo HER-410 y aireación constante.

Debido a que *C. sorokiniana* tiene una tasa de crecimiento mucho mayor a la de *D. communis*, se determinó la proporción de células de cada especie a utilizar en el co-cultivo. Para esto se realizó cultivos unialgales de prueba donde se hizo un recuento celular de cada especie para obtener una

proporción donde ambas se encuentren en concentración celular similar. Así, se determinó realizar el co-cultivo en una proporción 1:13 (1 célula de *C. sorokiniana* por cada 13 células de *D. communis*).

Para lo anterior se tomó 30 mL del cultivo unialgal de *C. sorokiniana* y 395 mL del cultivo unialgal de *D. communis*, se colocó en un matraz Erlenmeyer de 2L y se llevó a un volumen final de 1.7 L con medio de cultivo F de Guillard y Ryther con 10% de agua de mar, obteniendo así un porcentaje de inóculo del 25% en el co-cultivo.



Figura 1. Cultivos de *C. sorokiniana* unialgal (A), *D. communis* unialgal (B) y co-cultivo de *C. sorokiniana* con *D. communis* (C) realizados en este estudio en el cuarto de crecimiento del Laboratorio de Alimento Vivo (CIBNOR).

3.4. Recuento celular, tasa de crecimiento, tiempo de generación y cosecha

El recuento celular de los cultivos unialgales y del co-cultivo se llevó a cabo con una cámara de Neubauer de 0.1 mm de profundidad en un microscopio (Primo Star ZEISS) según Arredondo-Vega y colaboradores (2017a). Este procedimiento se realizó diariamente para generar las curvas de crecimiento de cada cultivo.

La concentración celular se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$C = N \times 10^4 \times \text{dilución}$$

En donde:

C: concentración celular en mL^{-1}

N: promedio de células en 1 mm^2 (0.1 μL)

10⁴: factor de conversión de 0.1 µL a 1 mL

Dilución: factor de dilución cuando fue necesario diluir la muestra.

Además, se calculó la tasa de crecimiento μ (d⁻¹) según la ecuación definida por Guillard (1973):

$$\mu = \frac{\ln X_f - \ln X_i}{T_f - T_i}$$

Donde X es la concentración de la biomasa (cél mL⁻¹) y T es el tiempo en días tanto final (f) como inicial (i).

De igual manera, se calculó el tiempo de generación (d), el cual está definido por la siguiente ecuación:

$$T_g = \frac{\ln 2}{\mu}$$

A partir de la curva de crecimiento experimental, se determinó realizar la cosecha en el tiempo al cual se encontraban los cultivos al inicio de la fase estacionaria. Para lo cual, en el tiempo establecido, se separó del volumen de 1.7 L de cada cultivo, cantidades específicas para los siguientes procedimientos: 600 mL para la extracción de lípidos y pigmentos respectivamente, asimismo 20 mL para determinar el peso seco, peso orgánico e inorgánico.

Adicionalmente, se separaron volúmenes conocidos a partir de cada réplica de los cultivos para liofilizar y determinar el rendimiento y productividad, los cuales fueron: *C. sorokiniana* (350 mL, 275 mL, 275 mL, 275 mL), *D. communis* (284 mL, 382 mL, 340 mL, 312 mL) y co-cultivo (375 mL, 385 mL, 360 mL, 355 mL).

Por su parte, tanto los volúmenes separados para lípidos y pigmentos respectivamente como para liofilizar, fueron centrifugados a 3000 rpm, durante 10 minutos, a 20 °C en una centrífuga Allegra X-15R. La biomasa final (exudado) obtenido de dicha centrifugación, se colectó en tubos de cristal previamente lavados con etanol y cloroformo y pesados para los análisis de pigmentos y lípidos, y en tubos cónicos de 50 mL previamente pesados para realizar la liofilización y posterior extracción de proteínas y carbohidratos.

A partir de lo anterior, la biomasa se colocó en una liofilizadora marca Labconco® FreeZone 1 L. Posteriormente se pesó para así obtener un promedio y determinar el rendimiento y la productividad de la biomasa mediante las siguientes formulas:

Rendimiento de la biomasa (mg L^{-1}) = biomasa liofilizada (mg) x volumen de cosecha (L)

Productividad de la biomasa ($\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) = rendimiento de la biomasa (mg L^{-1}) / tiempo de cosecha (d)

De la biomasa liofilizada, se separó aproximadamente 50 mg en tubos de vidrio de tapón de rosca lavados previamente con etanol y cloroformo para la extracción de proteínas y carbohidratos. Los tubos con biomasa fresca para pigmentos y lípidos se congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su extracción y análisis.

3.5. Determinación de peso seco y contenido orgánico e inorgánico

La determinación del peso seco total, orgánico e inorgánico se realizó de acuerdo con Sorokin (1973) descrito en Arredondo-Vega y colaboradores (2017b). Para lo cual, al momento de la cosecha, se separó una alícuota de 20 mL de la biomasa de cada cultivo y se filtró al vacío en membranas de fibra de vidrio Whatman GF/F de $0.7\text{ }\mu\text{m}$ de diámetro de poro, previamente quemados en la mufla a 490°C por 6 h y puestas a peso constante.

La biomasa filtrada se lavó con 20 mL de agua destilada. Posteriormente, se guardaron los filtros pre-quemados con biomasa en sobres de papel aluminio y se colocaron en la estufa (65°C) por 1 h y seguidamente en el desecador al vacío por 1.5 h. Después de transcurrido este tiempo, se pesaron los filtros con biomasa en una balanza analítica y se registró el peso. Este procedimiento se repitió hasta obtener el peso constante.

Una vez que se determinó el peso constante de los filtros con biomasa seca, estos se colocaron en la mufla a 480°C por 6 h para obtener las cenizas. Posteriormente los filtros con las cenizas se colocaron en la estufa por 1h, después en el desecador por 1.5 h y se procedió a pesarlos en la

balanza analítica, repitiendo estos últimos tres pasos de colocar en estufa, desecador y pesar hasta obtener un peso constante.

Las ecuaciones para calcular el peso seco total (PST), inorgánico (PSI) y orgánico (PSO) fueron las siguientes:

$$\text{PST } (\mu\text{g mL}^{-1}) = \frac{(\text{PSFM} - \text{PSF})}{\text{VF}}$$

$$\text{PSI } (\mu\text{g mL}^{-1}) = \frac{(\text{PSC} - \text{PSF})}{\text{VF}}$$

$$\text{PSO } (\mu\text{g mL}^{-1}) = \text{PST} - \text{PSI}$$

En donde: PST, PSI, PSO es el peso seco total, inorgánico (cenizas) y orgánico ($\mu\text{g mL}^{-1}$) respectivamente. PSF, PSFM y PSFC son el peso seco del filtro sin muestra, del filtro con muestra y del filtro con la muestra incinerada ($\mu\text{g mL}^{-1}$) respectivamente y VF es el volumen de muestra filtrado (mL).

3.6. Determinación de proteínas (Lowry et al., 1951)

Para este procedimiento, se pesaron entre 5 y 10 mg de cada muestra liofilizada (obteniendo un total de 4 muestras por cultivo), se colocaron en un tubo de vidrio limpio previamente lavado con jabón libre de fosfatos (Micro 90), etanol y cloroformo. Seguidamente, se agregó 5 mL de NaOH 0.1 N y se realizó la hidrólisis alcalina en un termo baño a 85°C por 2 h. Se centrifugó a 3000 rpm por 15 minutos a 10 °C y posteriormente el extracto alcalino se colocó en un tubo limpio.

Se calculó la alícuota del extracto alcalino a utilizar tomando en cuenta el punto medio de la concentración de la curva de calibración ($75 \mu\text{g mL}^{-1}$) y el porcentaje de proteínas de referencia obtenido anteriormente en el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas (CIBNOR), el cual fue de 22% para *C. sorokiniana* y 16% para *D. communis*. Además, para el co-cultivo se utilizó como referencia un 18% tomado del valor más bajo obtenido en los resultados de proteínas de este proyecto. Se utilizó la curva de calibración previamente elaborada en el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas (CIBNOR) donde se empleó una solución concentrada de $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ de BSA (albúmina de suero bovino, por sus siglas en ingles) y a partir de esta se preparó un gradiente de concentración de 0 a $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 2) (Arredondo-Vega et al., 2017c).

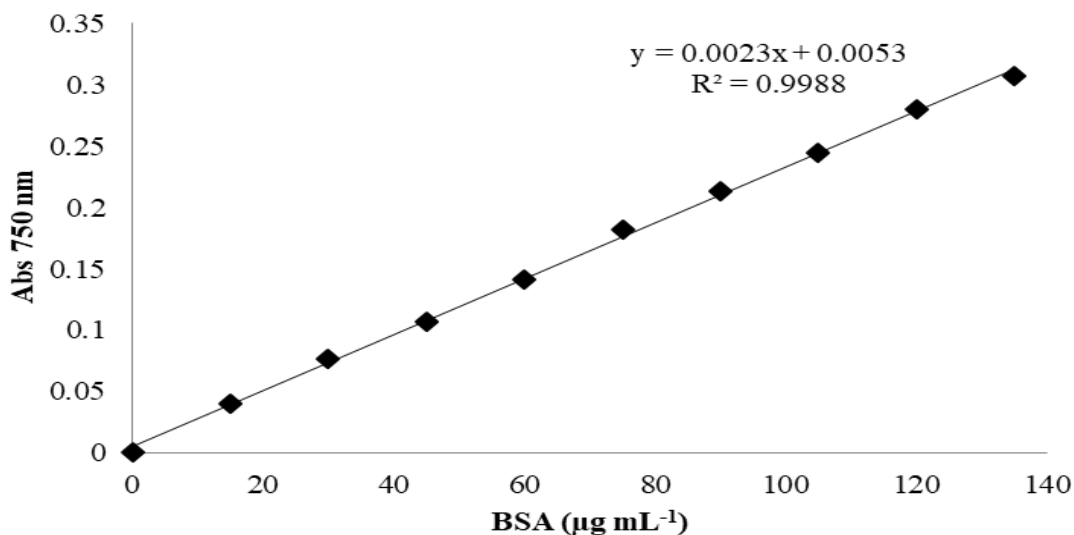


Figura 2. Curva de calibración de proteínas elaborada con albúmina de suero bovino. Obtenida de Arredondo-Vega et al. (2017c)

Las ecuaciones utilizadas para el cálculo de la alícuota fueron las siguientes:

A) Proteínas calculadas (μg) = (biomasa separada (mg) x porcentaje de proteínas de referencia) x 1000

B) Concentración de proteínas en extracto ($\mu\text{g mL}^{-1}$) = proteínas calculadas (μg) / 5 mL (NaOH)

C) Alícuota calculada (μL) = $(75 (\mu\text{g mL}^{-1}) / \text{Concentración de proteínas en el extracto } (\mu\text{g mL}^{-1})) \times 1000$

Posteriormente, el volumen de la alícuota calculado se colocó en un tubo de vidrio de tapón de rosca, se completó a 1 mL con NaOH 0.1 N y se homogeneizó por medio de vortex. Seguido a esto, se prepararon las siguientes soluciones:

Solución A: carbonato de sodio (NaCO_3) al 2% (p/v) en NaOH 0.1 N.

Solución B: 1:1 de sulfato de cobre (II) 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 C (50:1): 50 partes de la solución B + 1 parte de solución A.

Una vez obtenida la solución C, se agregaron 5 mL a cada tubo, se homogeneizó por medio de vortex y se dejó reposar por 15 minutos. Finalmente, se agregaron 500 μ L de una solución 1:1 de Folin : H₂O destilada, se agitó en el vortex y se dejó reposar en la oscuridad por 40 minutos. Se procedió a leer las absorbancias en el espectrofotómetro marca Spectronic® modelo 4001/4 a 750 nm calibrándolo con un blanco preparado con el mismo tratamiento que el de las muestras, pero utilizando 1 mL de NaOH 0.1 N en lugar de la muestra.

La determinación de la concentración de proteínas totales (%) se realizó a partir de la ecuación:

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

Donde A_{750} es la absorbancia obtenida a 750nm, m es la pendiente de la curva de calibración, V_e es el volumen del extracto alcalino (mL), V_m es el volumen de la alícuota calculada (mL) y P_s es el peso de la muestra liofilizada (mg).

3.7. Determinación de carbohidratos (DuBois et al., 1956)

Este procedimiento se realizó mediante el método colorimétrico de fenol - ácido sulfúrico (DuBois et al., 1956). Al igual que en la extracción de proteínas, se pesó de 5 a 10 mg de muestra liofilizada y se colocó en tubos de vidrio limpios (4 muestras por cultivo). A cada muestra se le agregaron 5 mL de H₂SO₄ 1.0 M y se colocaron los tubos en un termo-baño a 85°C durante 2 h.

Una vez que los tubos alcanzaron la temperatura ambiente, se centrifugaron a 3000 rpm por 15 minutos a 10°C y se separó el extracto ácido con una pipeta Pasteur en otro tubo de cristal limpio. Se determinó el volumen de la alícuota del extracto ácido a utilizar, para lo cual se tomó en cuenta el punto medio de la concentración de la curva de calibración (60 μ g mL⁻¹) y el contenido de carbohidratos obtenido anteriormente en el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas (CIBNOR), el cual fue de 34% para *C. sorokiniana* y 28% para *D. communis*; además se tomó un valor de referencia de 15% para el co-cultivo según los resultados obtenidos en los cultivos unialgales de este estudio.

Se utilizó la curva de calibración elaborada en el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas (CIBNOR), en la cual se empleó una solución concentrada de 120 μ g mL⁻¹ de glucosa anhidra y a partir de esta se preparó un gradiente de concentración de 0 a 120.40 μ g mL⁻¹ (Figura 3)

(Arredondo-Vega et al., 2017)(Arredondo-Vega et al., 2017)(Arredondo-Vega et al., 2017)(Arredondo-Vega et al., 2017)(Arredondo-Vega et al., 2017d).

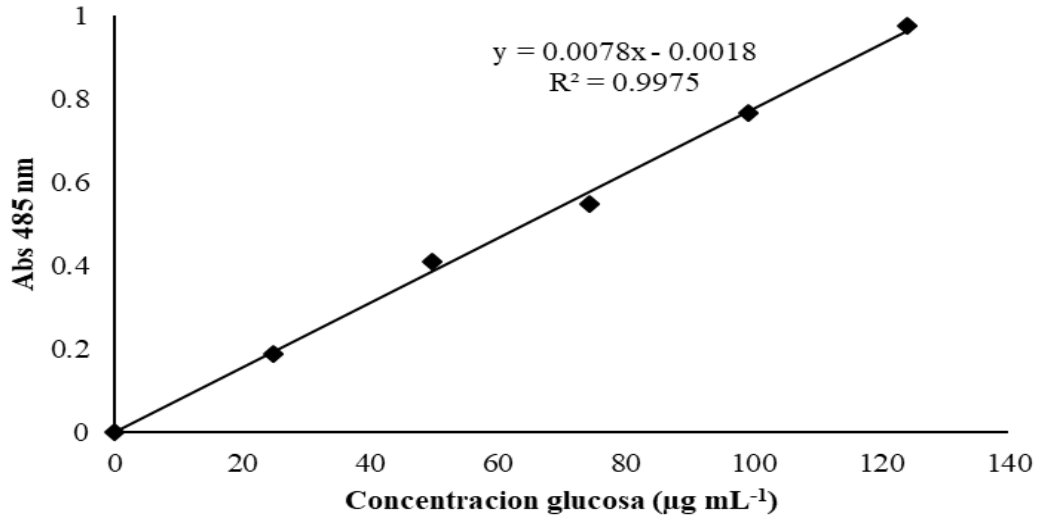


Figura 3. Curva de calibración de carbohidratos a partir de glucosa anhidra. Obtenida de Arredondo-Vega et al. (2017d)

Las ecuaciones para el cálculo de la alícuota a utilizar fueron las siguientes:

- A) Carbohidratos calculados (µg) = (biomasa separada (mg) x porcentaje de carbohidratos de referencia) x 1000
- B) Concentración de carbohidratos en extracto (µg mL⁻¹) = carbohidratos calculados (µg) / 5 mL (H₂SO₄)
- C) Alícuota calculada (µL) = (60 (µg mL⁻¹) / concentración de carbohidratos en el extracto (µg mL⁻¹)) x 1000

La alícuota calculada se colocó en un tubo de vidrio y se completó a 1 mL con H₂SO₄ 1.0 M. Seguidamente se agregó 1 mL de fenol al 5% y se dejó reposar por 40 minutos. Luego se agregaron lentamente 5 mL de H₂SO₄ concentrado con el tubo inclinado para que no existan pérdidas por evaporación y se dejó enfriar. Posteriormente se leyó las absorbancias a 485 nm en un

espectrofotómetro marca Spectronic® modelo 4001/4, utilizando como blanco una solución preparada de la misma manera que las muestras, sustituyendo el extracto ácido de la muestra por 1 mL de H₂SO₄ 1M.

La concentración de carbohidratos totales se calculó mediante la fórmula:

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

Donde A₄₈₅ es la absorbancia obtenida a 485 nm, m es la pendiente de la curva de calibración, V_e es el volumen del extracto ácido (mL), V_m es el volumen de la alícuota calculada (mL) y P_s el peso de la muestra liofilizada (mg).

3.8. Determinación de pigmentos y lípidos totales

Este procedimiento se realizó mediante el método de Lamers y colaboradores (2010). Se utilizó la biomasa fresca que había sido congelada en tubos de vidrio de tapón de rosca, se obtuvo un total de 4 tubos por cada cultivo tanto para lípidos como para pigmentos. Una vez descongeladas las muestras, se agregaron 4 mL de la mezcla cloroformo: metanol (2: 2.5 v/v) y 5 µL del antioxidante butil-hydroxi tolueno (BHT). Posteriormente se homogeneizó en vortex y se sonicó en un baño con hielo por 20 minutos. Se dejó extrayendo en oscuridad durante 12 horas aproximadamente a 4°C.

Después de este tiempo, se procedió a sonicar en baño con hielo por 20 minutos. Seguidamente se añadió a los tubos destinados para la extracción de pigmentos, 2.5 mL de la solución Tris ácido: Tris base: NaCl 1 M (3: 0.4: 5 partes respectivamente) y a los tubos destinados para la extracción de lípidos, 2.5 mL de agua destilada. Se homogeneizó en vortex todos los tubos y se centrifugaron a 800 rpm por 15 minutos a 10 °C.

Luego se recuperó la fase inferior (fase orgánica de cloroformo y lípidos/pigmentos) por medio de burbujeo en otro tubo de vidrio de tapón de rosca limpio. Se agregaron 2 mL de cloroformo, se sonicó en un baño con hielo por 20 minutos, se centrifugó nuevamente a 800 rpm por 15 minutos a 10 °C y se procedió a realizar una segunda extracción de la fase orgánica por burbujeo. De esta manera se obtuvo los extractos tanto de lípidos como pigmentos.

3.8.1. Cuantificación de pigmentos totales

Se calculó la concentración de pigmentos en el extracto obtenido en el procedimiento anterior a partir de un porcentaje de pigmentos de referencia de 2% para todas las muestras y se calculó la alícuota requerida del extracto para que esté a una concentración de $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ tomando en cuenta el rendimiento de la biomasa (mg mL^{-1}) de cada muestra.

Se colocó la alícuota calculada en un tubo de cristal de tapón de rosca y se llevó a sequedad con nitrógeno gaseoso; posteriormente se diluyó con 3 mL de acetona al 90%. Seguidamente, se calibró el espectrofotómetro con acetona al 90% y para cada muestra se realizó un barrido espectral desde los 400 a los 700 nm. Luego, a partir de estas absorbancias obtenidas se calculó la concentración de clorofila *a* (*Ca*), clorofila *b* (*Cb*) y carotenoides mediante las ecuaciones descritas en Arredondo-Vega y colaboradores (2017e):

$$Ca = 11.97 \times (\text{Abs}_{664}) - 1.93 \times (\text{Abs}_{647})$$

$$Cb = 20.36 \times (\text{Abs}_{647}) - 5.50 \times (\text{Abs}_{664})$$

$$\text{Carotenoides} = 7.6 \times (\text{Abs}_{480} - 1.49 \times (\text{Abs}_{510}))$$

3.8.2. Cuantificación de lípidos totales

Se realizó el cálculo de la alícuota correspondiente del extracto total para que se encuentre en el intervalo lineal de la curva de calibración elaborada previamente en el laboratorio (figura 4) que va de 30 a $180 \mu\text{g mL}^{-1}$ de lípidos, por lo que se tomó el punto medio de la curva ($90 \mu\text{g mL}^{-1}$). Para todas las muestras se tomó un porcentaje de lípidos de referencia de 25%.

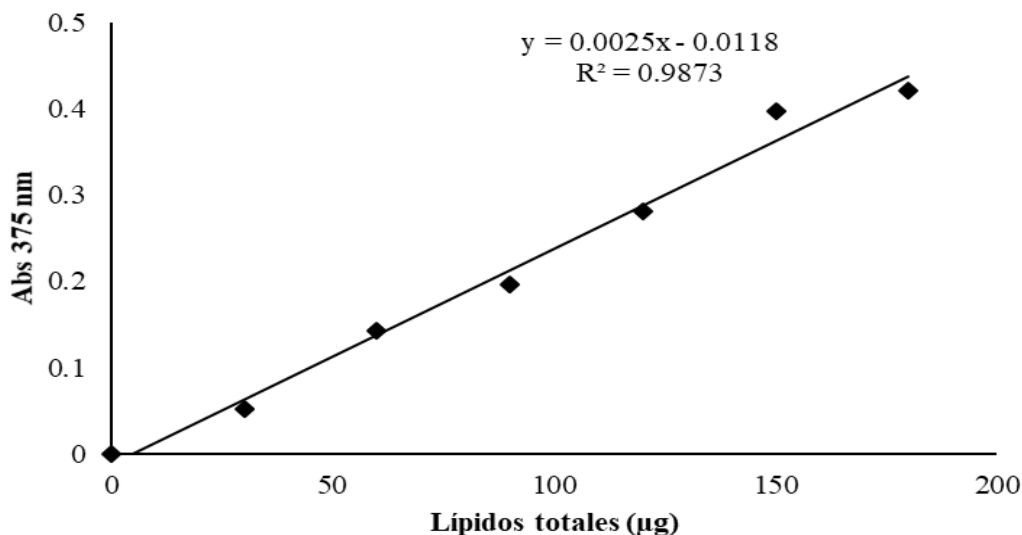


Figura 4. Curva de calibración para la determinación de lípidos totales con la diatomea *Phaeodactylum tricornotum* (Carreón-Palau et al., 2017).

Posteriormente se colocó el volumen de la alícuota calculada en un tubo limpio de tapón de rosca y se llevó a sequedad con nitrógeno gaseoso. Se agregaron 2 mL de H₂SO₄ concentrado y se cubrió la boca del tubo con papel aluminio. Se colocaron los tubos en el horno a 200 °C por 15 minutos y se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

Seguidamente en una campana de extracción se agregaron lentamente (ya que puede generar una reacción con el H₂SO₄ concentrado) 3 mL de H₂O destilada con el tubo inclinado, se homogeneizó con vortex y se dejó reposar en baño de hielo por 5 minutos. Se calibró el espectrofotómetro con un blanco de H₂SO₄ concentrado tratado de la misma manera que las muestras y se realizó las lecturas de absorbancia a 375 nm. La concentración de lípidos totales (%) se determinó mediante la fórmula:

$$\text{Lípidos (\%)} = [(((A_{375} / m) \times VE) / VA) / Ps] / 10$$

Donde A_{375} es la absorbancia a 375 nm, m es la pendiente de la curva de calibración, VE es el volumen del extracto (μL), VA el volumen de la alícuota (μL) y Ps es el peso de la muestra liofilizada (mg).

3.9. Análisis estadísticos

Se realizó un análisis estadístico de varianza (ANOVA) de una vía con el software R Studio con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$. Se aplicó la prueba de Shapiro para determinar la normalidad de los datos y la prueba de Barlett con el fin de comprobar la homogeneidad de varianzas. Además, se realizaron pruebas Post Hoc de TuckeyHSD para determinar si existen diferencias significativas entre los monocultivos y el co-cultivo de ambas especies en cuanto al contenido de proteínas, lípidos, carbohidratos, pigmentos totales, carotenoides, clorofila *a* y clorofila *b*, así como en el rendimiento, productividad, peso seco orgánico e inorgánico de la biomasa.

4. Resultados

4.1. Curvas de crecimiento, tasa de crecimiento y tiempo de generación

En la curva de crecimiento correspondiente a la fase exponencial obtenida para el cultivo unialgal de *C. sorokiniana* (figura 5), se puede observar que hubo un incremento exponencial de la concentración celular. Al alcanzar el día 9 de cosecha (en el cual la microalga se encontraba a inicio de la fase estacionaria), se alcanzó una concentración de alrededor de 40 millones de células mL^{-1} .

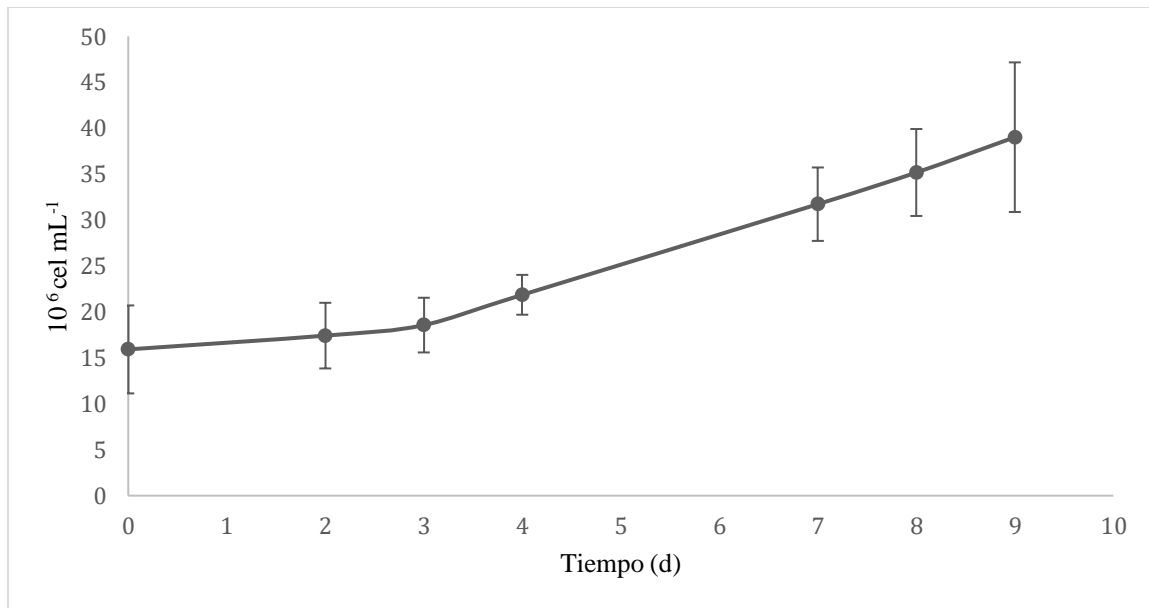


Figura 5. Curva de crecimiento de *C. sorokiniana* por recuento celular expresado en células mL^{-1} en función del tiempo (días). Las barras de error muestran los intervalos de confianza

Por su parte, el cultivo unialgal de *D. communis* (figura 6) en la fase exponencial mantuvo un aumento gradual en la concentración celular, al tiempo de cosecha (día 6) la concentración celular fue de alrededor de 2 millones de células mL^{-1} .

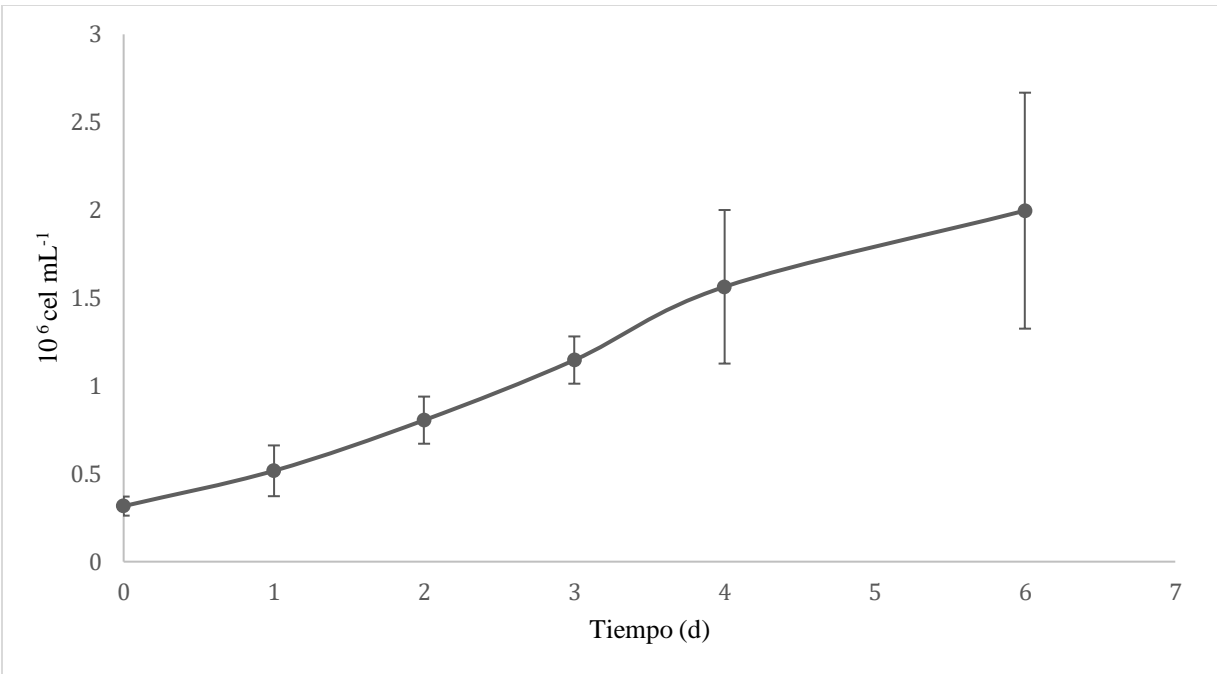


Figura 6. Curva de crecimiento de *D. communis* por recuento celular expresado en cél mL^{-1} en función del tiempo (días). Las barras de error muestran los intervalos de confianza

En el caso del co-cultivo (figura 7), el promedio de la concentración celular de ambas especies fue de alrededor de 4 millones de cél mL^{-1} al día 7 de cosecha. Al realizar el recuento de cada especie por separado en el co-cultivo, se obtuvo alrededor de 2 millones de cél mL^{-1} de *C. sorokiniana* y 2 millones de cél mL^{-1} de *D. communis* como se observa en la figura 8.

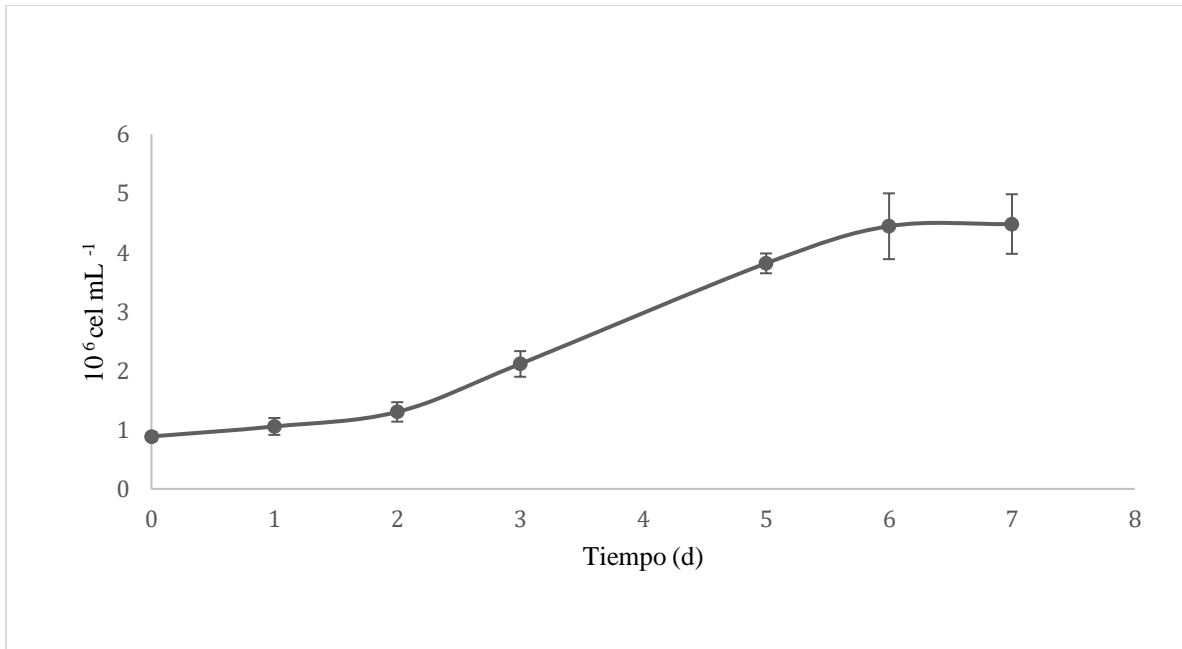


Figura 7. Curva de crecimiento del co-cultivo de *C. sorokiniana* y *D. communis* por recuento celular total expresado en cél mL^{-1} en función del tiempo (días). Las barras de error muestran los intervalos de confianza.

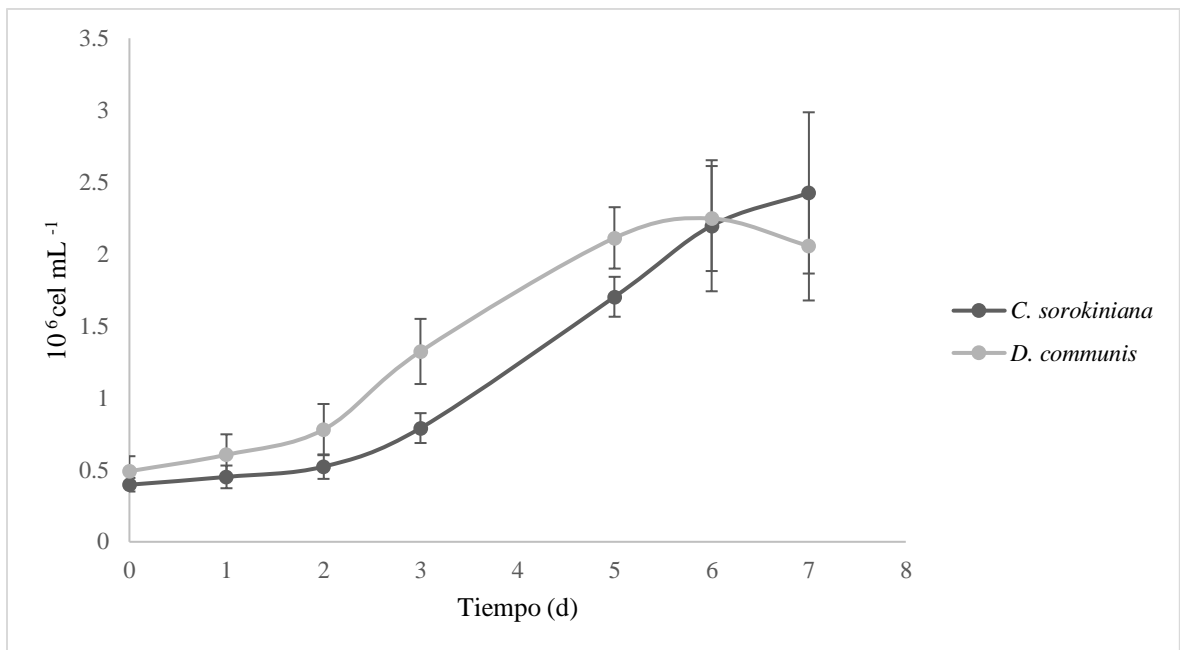


Figura 8. Curva de crecimiento de *C. sorokiniana* y *D. communis* en el co-cultivo por recuento celular por especie expresado en cél mL^{-1} en función del tiempo (días). Las barras de error muestran los intervalos de confianza.

Asimismo, en la figura 9 se muestra la imagen del co-cultivo observada al microscopio a 40X.

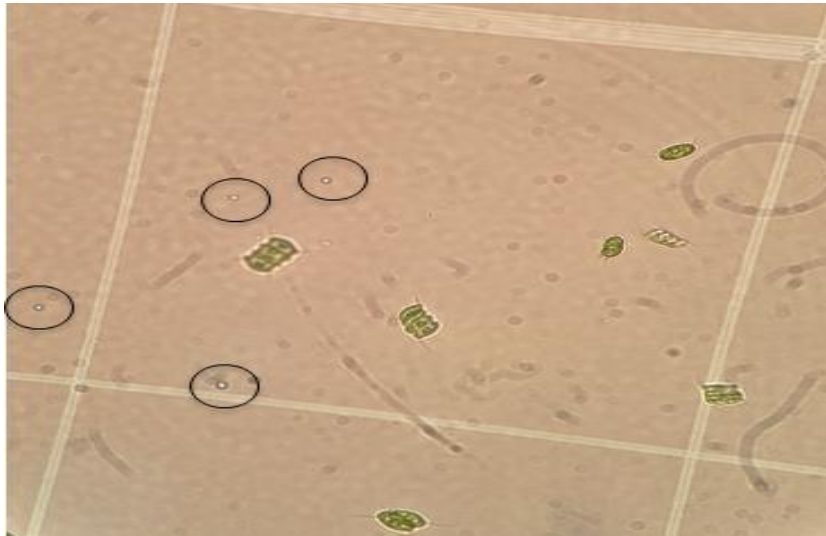


Figura 9. Células de *C. sorokiniana* y *D. communis* en el co-cultivo observado en el microscopio óptico Carl Zeiss Primo Star del CIBNOR a 40X. Las células encerradas en círculos pertenecen a *C. sorokiniana* y las células verdes pertenecen a *D. communis*.

En el cuadro 3 se muestra los datos de tasa de crecimiento (μ) y tiempo de generación (T_g) correspondiente a la fase exponencial de los cultivos de *C. sorokiniana*, *D. communis* y el co-cultivo. Además de los tiempos iniciales y finales tomados en cuenta para las ecuaciones.

Cuadro 3. Tasa de crecimiento (d^{-1}) y tiempo de generación (d) correspondiente a la fase exponencial de *Chlorella sorokiniana*, *Desmodesmus communis* y el co-cultivo de ambas.

Cultivo	Tiempo inicial y final (d)	μ (d^{-1})	T_g (d)
<i>C. sorokiniana</i>	2-9	0.1	6.0
<i>D. communis</i>	1-6	0.3	2.6
Co-cultivo	1-7	0.2	2.9

4.2. Rendimiento de la biomasa

El rendimiento de la biomasa de los tres cultivos se encuentra en la figura 10, donde se observa que hubo mayor rendimiento en el co-cultivo ($356.33 \pm 31.46 \text{ mg L}^{-1}$), seguido por el cultivo

unialgal de *C. sorokiniana* ($351.31 \pm 33 \text{ mg L}^{-1}$) y el cultivo de *D. communis* ($304.14 \pm 30 \text{ mg L}^{-1}$), sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tres cultivos ($F= 3.224$; $gl= 2,9$; $p= 0.0879$).

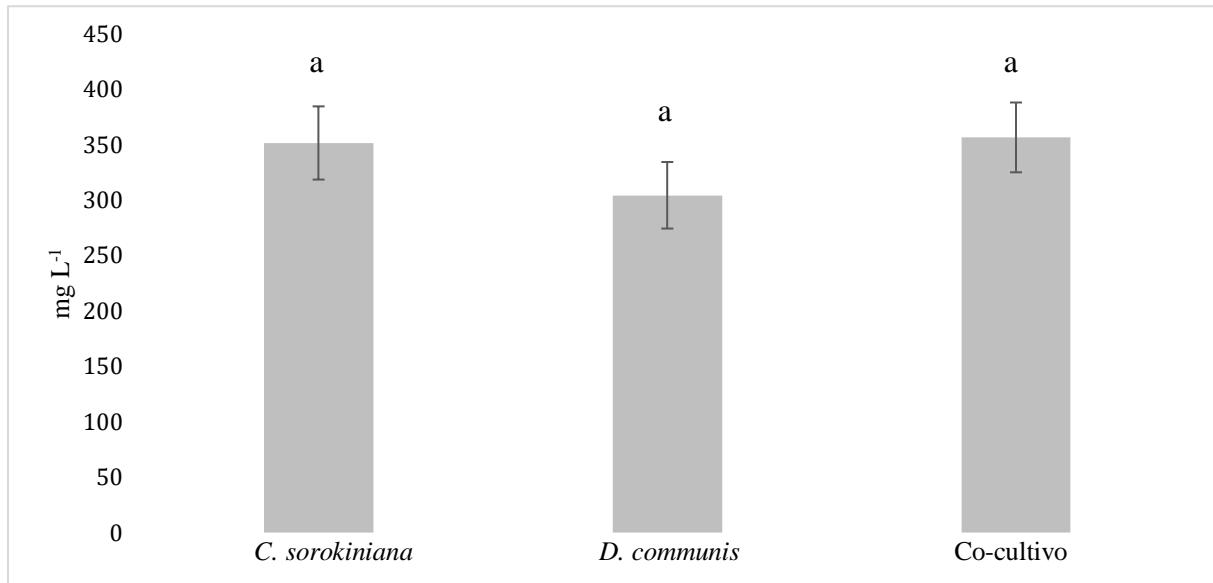


Figura 10. Rendimiento de la biomasa (mg L^{-1}) de los cultivos unialgales de *C. sorokiniana*, *D. communis* y el co-cultivo de ambas especies. Las barras de error muestran los intervalos de confianza. Letras diferentes muestran diferencias significativas.

4.3. Productividad de la biomasa

La mayor productividad de la biomasa se obtuvo tanto en el co-cultivo ($50.90 \pm 4.49 \text{ mgL}^{-1}\text{d}^{-1}$) como en el cultivo unialgal de *D. communis* ($50.69 \pm 5.02 \text{ mgL}^{-1}\text{d}^{-1}$), entre los cuales no se hubo diferencias significativas según la prueba estadística de TukeyHSD ($p>0.05$). Como se observa en la figura 11, la menor productividad de la biomasa se obtuvo en el cultivo unialgal de *C. sorokiniana* ($39.03 \pm 3.63 \text{ mgL}^{-1}\text{d}^{-1}$), el cual presentó diferencias significativas ($F= 9.079$; $gl= 2,9$; $p= 0.00694$) con los dos cultivos anteriormente mencionados.

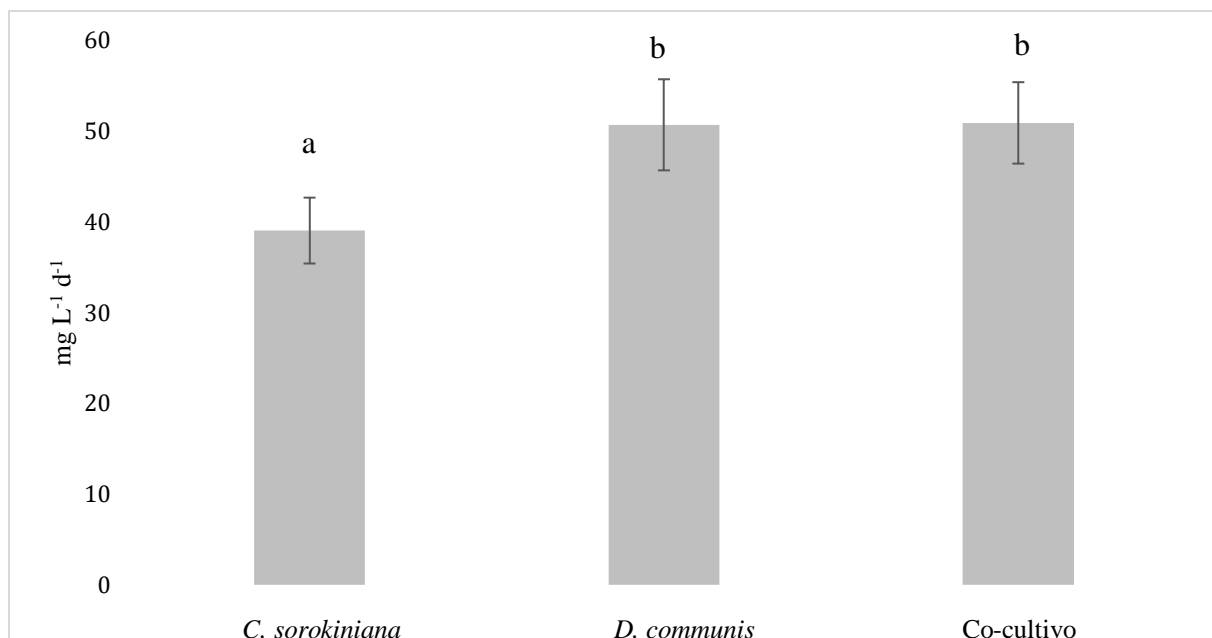


Figura 11. Productividad de la biomasa ($\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) de los cultivos unialgales de *C. sorokiniana*, *D. communis* y del co-cultivo de ambas especies. Las barras de error muestran los intervalos de confianza. Letras diferentes muestran diferencias significativas.

4.4. Peso seco total, orgánico e inorgánico

Como se observa en la figura 12, el peso seco total (PST) (mg L^{-1}) fue mayor en el cultivo unialgal de *C. sorokiniana* (803.33 ± 14.24). No hubo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) entre el cultivo unialgal de *D. communis* (446.67 ± 46.08) y el co-cultivo (405 ± 29.4) según la prueba de TuckeyHSD ($F = 158.8$; $gl = 2,6$; $p < 0.05$).

En el caso del peso seco orgánico (PSO), no se encontraron diferencias significativas entre los cultivos unialgales y el co-cultivo ($F = 4.09$; $gl = 2,6$; $p = 0.0757$). Mientras que el peso seco inorgánico (PSI), presentó diferencias significativas entre los 3 cultivos según la prueba de TuckeyHSD ($p < 0.05$) ($F = 2801$; $gl = 2,6$; $p < 0.05$) siendo el mayor contenido (mg L^{-1}) en *C. sorokiniana* (411.67 ± 6.53), seguido por *D. communis* (115 ± 5.66) y el co-cultivo (26.67 ± 8.64).

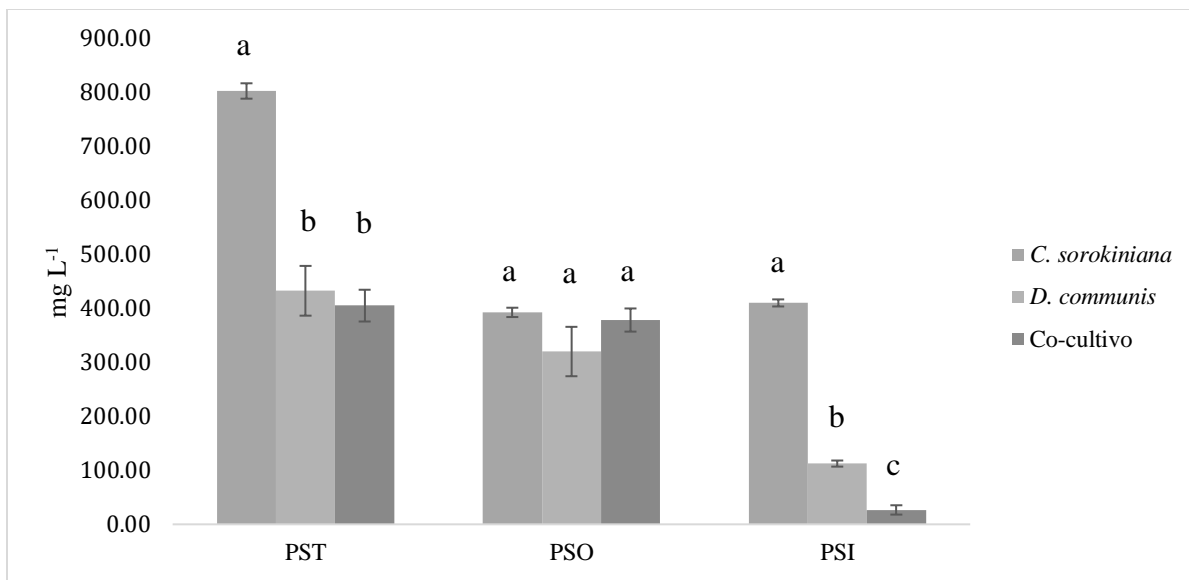


Figura 12. Contenido de peso seco total (PST), orgánico (PSO) e inorgánico (PSI) (mg L⁻¹) de los cultivos de *C. sorokiniana*, *D. communis* y co-cultivo de ambas especies. Las barras de error muestran los intervalos de confianza. Letras diferentes muestran diferencias significativas.

4.5. Composición bioquímica

4.5.1. Determinación de proteínas totales

En la figura 13 se encuentra el porcentaje de proteínas obtenidas con respecto al peso seco de los cultivos de *C. sorokiniana* (22% ± 4), *D. communis* (18% ± 1.26) y el co-cultivo (19% ± 1.57). Sin embargo, no hubo diferencias significativas ($F= 3.026$; $gl= 2,9$; $p= 0.0989$) entre los cultivos según la prueba de TukeyHSD.

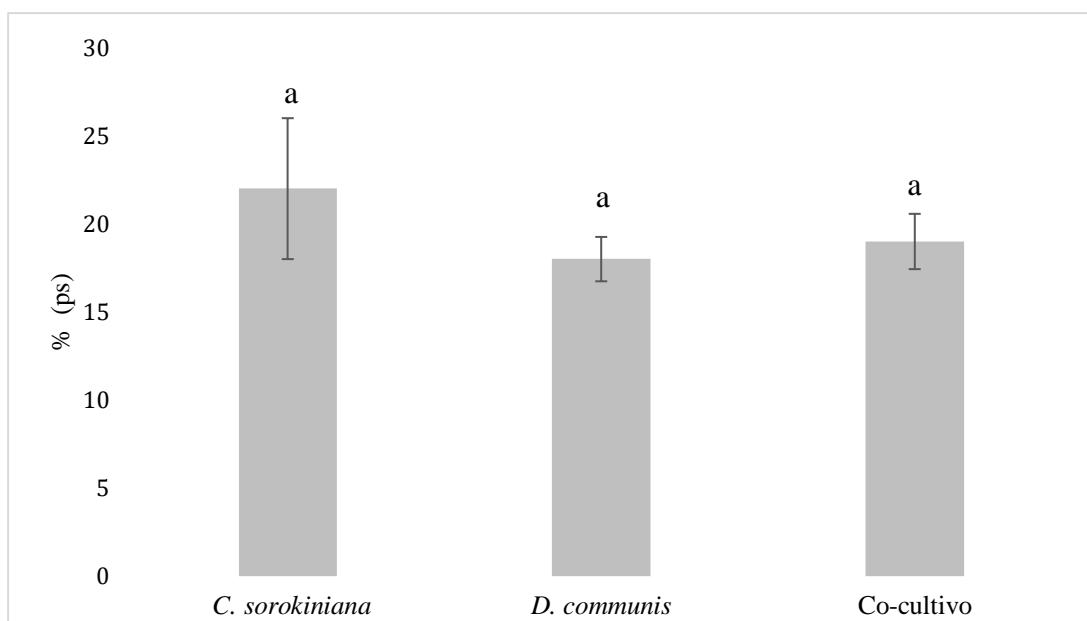


Figura 13. Porcentaje de proteínas totales con respecto al peso seco de los cultivos de *C. sorokiniana*, *D. communis* y el co-cultivo de ambas especies. Las barras de error muestran los intervalos de confianza. Letras diferentes muestran diferencias significativas.

4.5.2. Determinación de carbohidratos totales

La producción de carbohidratos no presentó diferencias significativas entre los cultivos ($F=1.431$; $gl= 2,9$; $p= 0.289$). Como se observa en la figura 14, para *C. sorokiniana* se obtuvo un porcentaje de carbohidratos de $18\% \pm 2.26$, para *D. communis* el porcentaje fue de $15\% \pm 2.15$ y para el co-cultivo de ambas especies fue de $15.73\% \pm 3.44$.

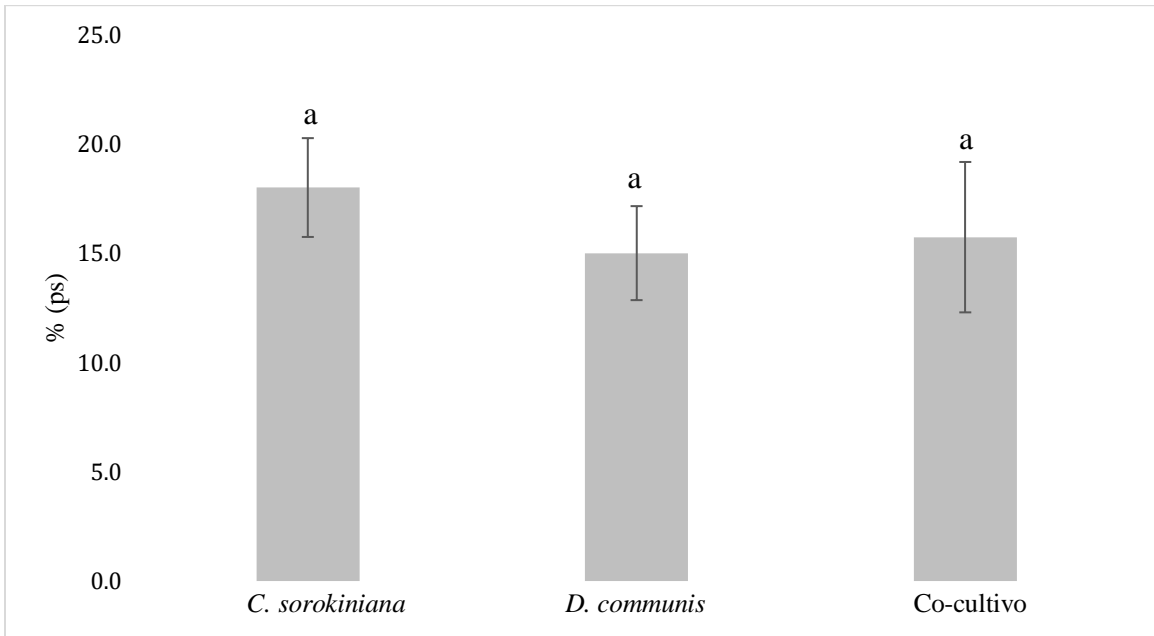


Figura 14. Porcentaje de carbohidratos totales con respecto al peso seco de los cultivos de *C. sorokiniana*, *D. communis* y el co-cultivo de ambas especies. Las barras de error muestran los intervalos de confianza. Letras diferentes muestran diferencias significativas.

4.5.3. Determinación de lípidos totales

En la figura 15 se observa el porcentaje de lípidos totales con respecto al peso seco, el mayor porcentaje de lípidos se encontró en el cultivo de *C. sorokiniana* ($F=38.9$; $gl= 2,6$; $p= 0.00037$) con un contenido de $18.51\% \pm 0.03$. Según la prueba estadística de TukeyHSD ($\alpha > 0.05$) no hubo diferencias significativas entre el porcentaje de lípidos del cultivo unialgal de *D. communis* ($12.72\% \pm 1.77$) y el co-cultivo ($11.33\% \pm 0.32$).

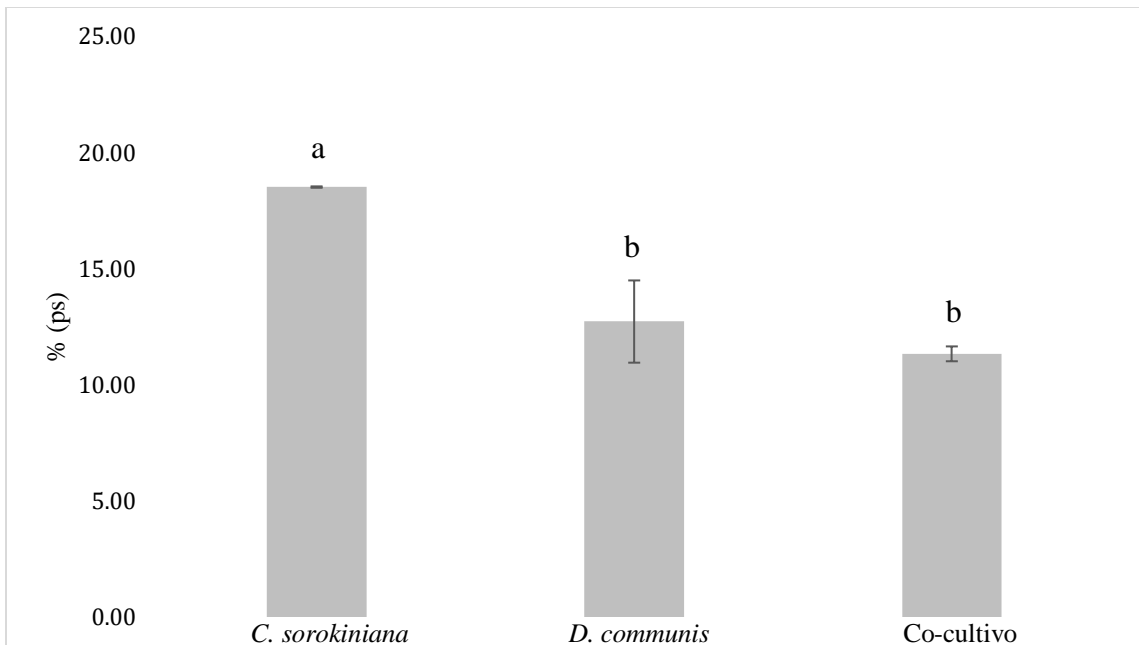


Figura 15. Porcentaje de lípidos totales con respecto al peso seco de los cultivos de *C. sorokiniana*, *D. communis* y el co-cultivo de ambas especies. Las barras de error muestran los intervalos de confianza. Letras diferentes muestran diferencias significativas.

4.5.4. Determinación de pigmentos totales

En cuanto al porcentaje de pigmentos totales, se encontraron diferencias significativas ($F=39.5$; $gl= 2,9$; $p<0.05$) entre el cultivo de *C. sorokiniana* ($3.19\% \pm 0.68$) y los cultivos de *D. communis* ($0.61\% \pm 0.15$) y el co-cultivo ($0.80\% \pm 0.35$) según la prueba estadística de TukeyHSD. No se encontraron diferencias significativas entre el co-cultivo y *D. communis* teniendo estos el menor porcentaje de pigmentos totales (figura 16).

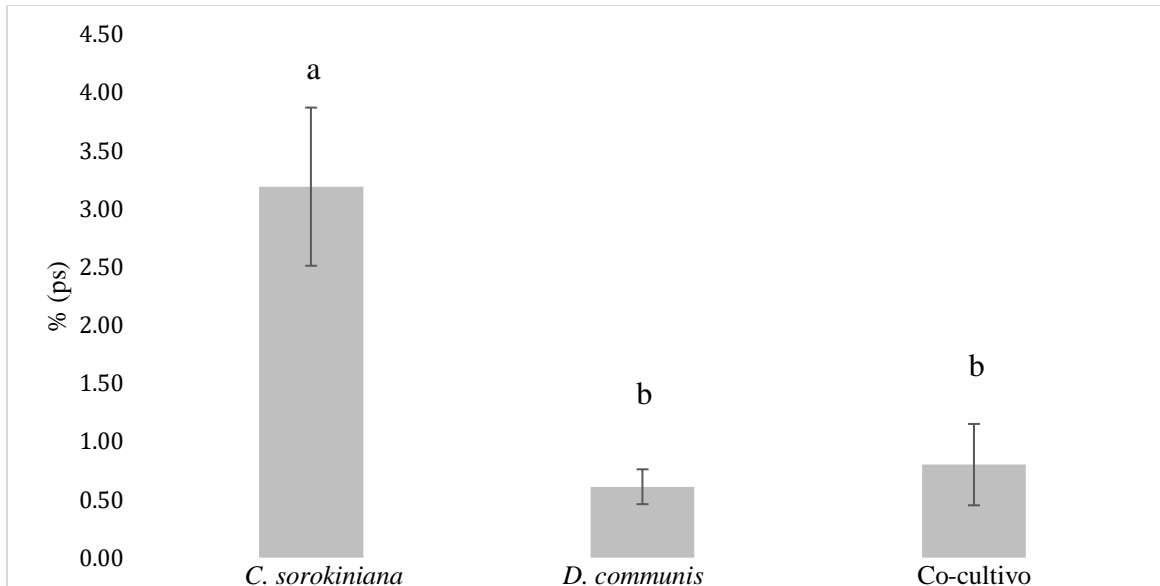


Figura 16. Porcentaje de pigmentos totales de los cultivos unialgales de *C. sorokiniana*, *D. communis* y el co-cultivo de ambas especies con respecto al peso seco. Las barras de error muestran los intervalos de confianza. Letras diferentes muestran diferencias significativas.

El perfil de pigmentos obtenidos (clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides) se muestra en la figura 17. Se obtuvo significativamente mayor contenido de clorofila *a* ($F=43.97$; $gl= 2,9$; $p<0.05$), clorofila *b* ($F=42.9$; $gl= 2,9$; $p<0.05$) y carotenoides ($F=22.87$; $gl= 2,9$; $p<0.05$) en el cultivo unialgal de *C. sorokiniana* ($1.75\% \pm 0.64$, $0.71\% \pm 0.16$ y $0.74\% \pm 0.14$ respectivamente). Entre el cultivo de *D. communis* y el co-cultivo no se encontraron diferencias significativas según la prueba de TukeyHSD ($p>0.05$), siendo el contenido de clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides para *D. communis* de $0.24\% \pm 0.07$, $0.12\% \pm 0.03$ y $0.25\% \pm 0.08$ y para el co-cultivo de $0.31\% \pm 0.31$, 0.12 ± 0.07 y $0.37\% \pm 0.09$ respectivamente.

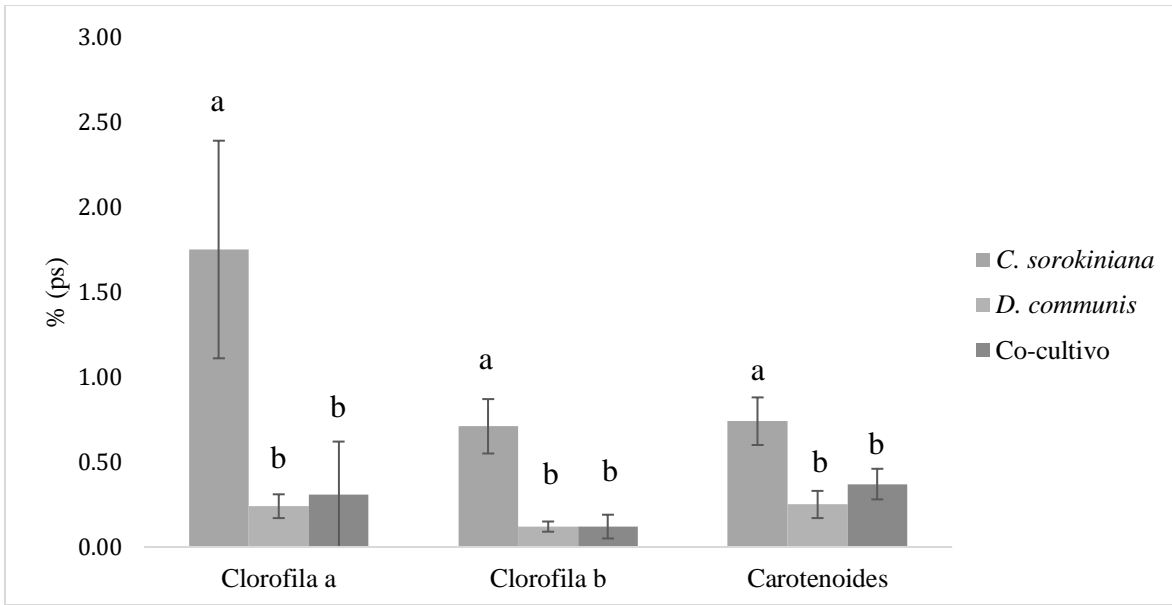


Figura 17. Perfil de contenido porcentual de pigmentos obtenidos (clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides) con respecto al peso seco para los cultivos de *C. sorokiniana*, *D. communis* y el co-cultivo. Las barras de error muestran los intervalos de confianza. Letras diferentes muestran diferencias significativas.

5. Discusión

5.1. Crecimiento de los cultivos unialgales y co-cultivo

En las curvas de crecimiento en fase exponencial, se observó que al cultivar *C. sorokiniana* de manera unialgal, al día 6 se alcanzó una concentración de alrededor de 30 millones de cél mL⁻¹, mientras que *D. communis* a este mismo tiempo alcanzó una concentración de alrededor de 2 millones de cél mL⁻¹. Por esta razón, el co-cultivo se realizó en una proporción 1:13 (*C. sorokiniana*: *D. communis*) para iniciar el co-cultivo con una concentración similar de ambas especies. En este caso, el crecimiento de las microalgas fue similar ya que al día 6 de co-cultivo la concentración tanto de *C. sorokiniana* como de *D. communis* fue de alrededor de 2 millones de cél mL⁻¹ como se observa en la figura 8. Esto sugiere que *C. sorokiniana* al estar en co-cultivo disminuyó su tasa de crecimiento en comparación con el cultivo unialgal.

Al realizar un co-cultivo de microalgas existen dos interacciones biológicas que pueden ocurrir, ya sea de competencia o de cooperación (Alam & Wang, 2019). En una interacción de competencia una especie desplaza a la otra resultando en una tasa de crecimiento y productividad de metabolitos baja; mientras que, en una interacción de cooperación, que se presume ocurrió entre *C. sorokiniana* y *D. communis*, ambas especies desarrollan un sinergismo para apoyarse mutuamente generando una alta productividad (Rashid et al., 2018; Rashid et al., 2019); no obstante, estas interacciones entre microalgas están poco estudiadas.

En el co-cultivo realizado en este estudio, se considera que ambas especies tienen la capacidad de crecer en un mismo medio de cultivo sin que una desplace a la otra, ya que ambas mantuvieron un crecimiento uniforme. Sin embargo, se observó una disminución en la tasa de crecimiento de *C. sorokiniana* en comparación con el cultivo unialgal. Esto puede deberse a que *C. sorokiniana* es una especie sensible ante condiciones de estrés (Sajjadi et al., 2018) como puede ocurrir en un co-cultivo al tener menor disponibilidad de nutrientes, menor exposición a la luz y/o a la presencia de compuestos que inhiban su crecimiento por un efecto de alelopatía a causa de la otra especie en cultivo.

El término alelopatía en fitoplancton hace referencia a los efectos de los metabolitos secundarios producidos por una especie sobre el crecimiento y funciones fisiológicas de otra o la misma especie. En un estudio realizado por Corcoran y colaboradores (2019), se encontró que en

el co-cultivo de *C. sorokiniana* con otra microalga dulceacuícola de la familia Scenedesmaceae (*Coelastrella* sp) se produjeron exudados con posibles compuestos aleloquímicos que inhibieron el crecimiento de *C. sorokiniana* (Corcoran et al., 2019), por lo que, presuntamente en este estudio, al realizar un co-cultivo entre *C. sorokiniana* y *D. communis*, se producen este tipo de compuestos y el crecimiento de *C. sorokiniana* disminuye a comparación del cultivo unialgal. No obstante, en el presente estudio no se realizó un análisis de alelopatía, por lo que para confirmar esta hipótesis se debe realizar más estudios al respecto.

La tasa de crecimiento en los cultivos unialgales fue de 0.1 d^{-1} para *C. sorokiniana* y 0.3 d^{-1} para *D. communis*. Lo anterior concuerda con estudios realizados donde se reporta una tasa de crecimiento de 0.1 a 0.3 d^{-1} para *C. sorokiniana* y 0.2 d^{-1} para *D. communis*. En el caso del co-cultivo la tasa de crecimiento fue de 0.2 d^{-1} , igual a *D. communis*. Además, se logró observar la capacidad que tiene la especie *C. sorokiniana* de adaptarse a la disponibilidad de nutrientes del medio y mantener un crecimiento y productividad uniforme aún al encontrarse en condiciones de estrés por el co-cultivo con otra especie, lo cual se debe posiblemente a una acumulación suficiente de nitrógeno y fósforo en la célula que beneficia su crecimiento en un medio con deficiencia de estos (Shriwastav et al., 2014; Yao et al., 2015).

5.2. Rendimiento y productividad de la biomasa

El rendimiento de la biomasa no presentó diferencias significativas entre los cultivos unialgales y el co-cultivo. Por su parte, la productividad de la biomasa fue mayor tanto en el co-cultivo como en el cultivo unialgal de *D. communis*, encontrándose la menor productividad en el cultivo unialgal de *C. sorokiniana*. Estudios previos reportan una productividad para *C. sorokiniana* de $28.25 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Shriwastav et al., 2014) y para *Desmodesmus* sp, $50 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Rugnini et al., 2018) lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este estudio.

Además, una mayor productividad de la biomasa en el co-cultivo que en los cultivos unialgales de dos microalgas dulceacuícolas se obtuvo de igual manera en el estudio realizado por Rashid y colaboradores (2019), ellos co-cultivaron las microalgas *Chlorella* sp. y *Ettlia* sp. en proporción 1:08. Contrario a los resultados de este estudio con *C. sorokiniana*, la productividad fue mayor tanto en el co-cultivo como en el cultivo unialgal de *Chlorella* sp. pero menor en el cultivo unialgal de *Ettlia* sp; esto indica que al realizar un co-cultivo de dos microalgas se puede incrementar la

productividad de la biomasa de una de las especies, en el caso del estudio de Rashid y colaboradores, para la especie *Ettlia* sp. y en el caso de este estudio se puede incrementar la productividad de la especie *C. sorokiniana* al cultivarla junto con *D. communis* (Rashid et al., 2019).

En este sentido, Pang y colaboradores (2019) mencionan que para lograr una alta productividad, se debe mejorar la eficiencia en la biosíntesis de los metabolitos secundarios, ya que la producción rentable de estos productos de interés requiere de una alta productividad de la biomasa (Pang et al., 2019). Por lo anterior, los resultados de este estudio pueden ser beneficiosos ya que la productividad de la biomasa en el co-cultivo fue mayor que la productividad en los cultivos unialgales, sin embargo, al no haber diferencias significativas entre el co-cultivo y el cultivo unialgal de *D. communis*, se considera necesario realizar análisis del perfil de ácidos grasos producido, de la capacidad antioxidante de los compuestos y analizar otros compuestos bioactivos importantes para determinar la eficiencia de la productividad obtenida en este estudio.

5.3. Peso seco total, orgánico e inorgánico

El peso seco total obtenido (mg L^{-1}) fue mayor en el cultivo unialgal de *C. sorokiniana* y no hubo diferencias significativas entre el cultivo unialgal de *D. communis* y el co-cultivo, los cuales presentaron un menor peso seco total. En cuanto al peso seco orgánico, no presentó diferencias entre los tres cultivos, contrario al contenido de peso seco inorgánico (cenizas) donde hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tres cultivos, siendo mayor su contenido en *C. sorokiniana* y menor en el co-cultivo. Cabe mencionar que en el caso de *C. sorokiniana*, no hay diferencia entre el contenido de peso seco orgánico y el inorgánico, lo cual es inusual ya que, al someter la biomasa a temperaturas de $480\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la mufla, se debería eliminar la materia orgánica y quedar solo el remanente inorgánico o cenizas y este, generalmente, es significativamente menor que el contenido orgánico.

El mayor contenido de cenizas se da principalmente en algunas microalgas que tienen cubierta de sílice; además este se puede ver afectado o aumentar su contenido si se da una acumulación de ciertos minerales en la microalga o también por el alto contenido de sales en el medio que no pudieron ser removidas (Jiménez-Valera & Sánchez-Saavedra, 2016). Es por lo anterior que se considera que en *C. sorokiniana* no se debería acumular un alto contenido de cenizas ya que esta

microalga no posee cubierta de sílice y la biomasa al ser filtrada se lavó con agua destilada para eliminar el contenido de sales; así, estos resultados se pudieron ver afectados por un mal manejo de los filtros y/o una mala manipulación a la hora del secado y pesado.

Por su parte, el contenido de peso seco total de las microalgas es importante para estimar la concentración de biomasa, productividad y puede influir en la tasa de crecimiento. Tanto la intensidad luminosa, como la temperatura y los sustratos orgánicos e inorgánicos son factores importantes en el crecimiento y la acumulación de productos de interés. La materia orgánica de la biomasa microalgal está compuesta principalmente por macromoléculas como proteínas, polisacáridos, lípidos y ácidos nucleicos (Li et al., 2014; Gaignard et al., 2019). Por lo que al haber un mayor peso seco total en *C. sorokiniana*, se asume que, si no hubiese habido un error, el contenido de materia orgánica sería mayor en esta microalga y habría diferencias significativas con respecto al cultivo de *D. communis* y co-cultivo, ya que, según los resultados obtenidos en la composición bioquímica, el contenido de estas macromoléculas fue mayor en el cultivo unialgal de *C. sorokiniana* que en el cultivo de *D. communis* y el co-cultivo.

5.4. Composición bioquímica

5.4.1. Determinación de proteínas totales

En cuanto al contenido de proteínas totales, se observó que no hubo diferencias significativas cuando se cultivaron las microalgas de manera unialgal y en co-cultivo. Para la especie *C. sorokiniana* se reporta alrededor de 24% de proteínas según el peso seco (Menegazzo & Fonseca, 2019) lo cual es similar al contenido de proteínas obtenido en este estudio (22% p/s). En el cultivo unialgal de *D. communis* y co-cultivo se obtuvo un 18% y 19%, respectivamente de proteínas totales, lo cual concuerda con un estudio realizado por Samorì y colaboradores (2013) donde se encontró un contenido de 16.9% de proteínas para la especie *D. communis* (Samorì et al., 2013).

A pesar de que no se encontró diferencias significativas entre los tres cultivos, el contenido de proteínas coincide con lo reportado para estas especies; sin embargo, fue bajo en comparación con otras especies de microalgas que logran producir hasta un 70% de proteínas según su peso seco (Morais Junior et al., 2020). Un alto contenido de proteínas es importante ya que son una fuente de péptidos bioactivos de gran interés industrial como factores de crecimiento, hormonas, inmunomoduladores, entre otros que se pueden utilizar de manera terapéutica generando

beneficios para la salud humana; además, las especies de *Chlorella* se pueden utilizar en la industria de nutraceuticos debido a su alto contenido de estos metabolitos (De Morais et al., 2015).

En las microalgas, la producción de los metabolitos secundarios depende de factores como la temperatura, salinidad, iluminación, el suplemento de CO₂ y la densidad de la población en el medio de cultivo, así por ejemplo, si hay condiciones de alta intensidad luminosa y limitación de nitrógeno, la ruta metabólica de la síntesis de proteínas se desvía hacia la síntesis de lípidos o carbohidratos (Trivedi et al., 2015), por lo que en el co-cultivo se podría generar menor producción de proteínas al estar las células menos expuestas a luz y nutrientes.

Al mismo tiempo, la calidad de las proteínas obtenidas de microalgas depende de los aminoácidos esenciales como el ácido glutámico, ácido aspártico, alanina, arginina, entre otros que estos organismos son capaces de acumular (Mobin et al., 2019); por lo que se puede estudiar el contenido de aminoácidos obtenido de los cultivos en estudio para de esta manera determinar su calidad.

5.4.2. Determinación de carbohidratos totales

El contenido de carbohidratos fue similar al contenido de proteínas, no se encontró diferencias significativas entre los cultivos unialgales y el co-cultivo. El porcentaje de carbohidratos para la especie *C. sorokiniana* es de 18% según el estudio realizado por Suparmaniam y colaboradores (2019), obteniendo también un 18% de carbohidratos como resultado. Por otra parte, en el co-cultivo, el contenido de carbohidratos fue de 15.73% y en *D. communis* se obtuvo un 15% de estos compuestos, de manera similar, Sriram & Seenivasan (2015) reportan un 13.6% de carbohidratos para esta especie (Sriram & Seenivasan, 2015; Suparmaniam et al., 2019).

De lo anterior, dado que la producción de carbohidratos fue semejante en los 3 cultivos, se observa que el co-cultivo no se vio afectado por una posible falta de nutrientes, esto ya que, al haber una deficiencia de nutrientes en el medio de cultivo, las microalgas cambian sus rutas metabólicas para sobrevivir, disminuyendo así el contenido de proteínas y acumulando carbohidratos (Bernaerts et al., 2019); por lo que posiblemente no hubo competencia por nutrientes entre ambas especies ya que la productividad de proteínas y carbohidratos fue similar.

Asimismo, debido a una producción óptima de carbohidratos tanto en los cultivos unialgales como en el co-cultivo comparado con otros estudios, se considera que estas microalgas podrían ser utilizadas para aplicaciones industriales (Bhattacharya & Goswami Saswata, 2020). Sin

embargo, para esto se debe realizar más investigaciones utilizando más replicas, variando condiciones de los cultivos y estudiando la calidad de estos productos para así determinar su capacidad de ser utilizados en la industria de manera rentable.

5.4.3. Determinación de lípidos totales

Por su parte, la producción de lípidos en el cultivo unialgal de *C. sorokiniana* fue de 18.51% lo cual concuerda con lo reportado por D'Alessandro y Antoniosi Filho (2016), donde se obtuvo un 19% de lípidos para esta especie. Para el cultivo unialgal de *D. communis* se obtuvo una concentración de 12.72% de lípidos totales; de manera similar en el estudio realizado por Pozzobon y colaboradores (2020), donde para *Desmodesmus* sp se reportó un 10.21%. En el caso del co-cultivo se obtuvo un 11.33% en este estudio sin diferencias significativas con respecto al cultivo unialgal de *D. communis* (D'Alessandro & Antoniosi Filho, 2016; Pozzobon et al., 2020).

Según el estudio realizado por Zhang y colaboradores (2016), la microalga *D. communis* tiene un contenido lipídico máximo de 20.37%, por lo que se observa que, según los resultados obtenidos en esta investigación, *D. communis* alcanzó un contenido de lípidos alto (Zhang et al., 2016). Además, al no encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre el co-cultivo y el cultivo unialgal de *D. communis*, se presume que la producción de lípidos en el co-cultivo se debe principalmente a esta microalga.

Por otra parte, tanto el contenido de carbohidratos (18%, 15% y 15.7%) como los lípidos (18.5%, 12.7% y 11.3%) obtenidos en este estudio en los cultivos unialgales de *C. sorokiniana*, *D. communis* y co-cultivo respectivamente se encuentran dentro de un rango similar. En un estudio realizado por Hernández-García y colaboradores (2019), se menciona que ambas rutas metabólicas se encuentran relacionadas y que los productos resultantes del catabolismo de carbohidratos pueden ser precursores para la síntesis de lípidos, por lo que en este caso las rutas metabólicas tanto de lípidos como de carbohidratos se vieron beneficiadas y la producción de ambos compuestos se dio de manera similar, es decir, ninguna de las dos rutas metabólicas se vio afectada (Hernández-García et al., 2019).

Como se ha mencionado anteriormente, los lípidos que se obtienen a partir de microalgas pueden ser utilizados en la industria de biocombustibles, para lo cual se deben buscar alternativas económicas para su obtención y transformación. En este sentido, Lu y colaboradores (2020),

señalan que la productividad de los lípidos es un importante indicador para poder evaluar la viabilidad de la generación de biodiesel a partir de microalgas (Lu et al., 2020).

Se ha demostrado que un gran número de microalgas tiene la capacidad de producir hasta un 50% de su biomasa en lípidos, especialmente triglicéridos que son importantes para la producción de biodiesel. No obstante, para obtener un perfil de ácidos grasos y contenido de lípidos óptimo para este fin, es importante elegir la microalga y el método de cultivo adecuados, así, el método más utilizado para inducir la acumulación de lípidos es la aplicación de estrés en el cultivo como la limitación de nitrógeno (Branco-Vieira et al., 2020). Por lo tanto, es de suma importancia analizar la composición de los lípidos obtenidos y considerar otros métodos de cultivo generando estrés para determinar la aplicación de estas microalgas en estudio en la industria del biodiesel.

5.4.4. Determinación de pigmentos totales

Finalmente, en este estudio se determinó el contenido de pigmentos totales, clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides, tanto para los cultivos unialgales como para el co-cultivo. El contenido de clorofila *a* para *D. communis* fue de 0.24%, de clorofila *b* 0.12% y de carotenoides se obtuvo un 0.25%. Los resultados anteriores concuerdan con el estudio de Pozzobon y colaboradores (2020), donde se obtuvo un 0.19% de clorofila *a* y 0.13% de clorofila *b* para *Desmodesmus* sp. (Pozzobon et al., 2020). En cuanto al contenido de carotenoides, Mobin y colaboradores (2019) mencionan que su contenido en microalgas varía de 0.1 a 2%, por lo que lo obtenido se encuentra dentro de lo reportado para microalgas (Mobin et al., 2019).

Para la especie *C. sorokiniana*, se obtuvo un 1.75% de clorofila *a*, 0.71% de clorofila *b* y 0.74% de carotenoides. Lo anterior se puede comparar con el perfil de pigmentos reportado para esta microalga en el estudio de Van Wageningen y colaboradores (2015), ya que se reportó un 1.78% de clorofila *a* y 0.62% de clorofila *b*. Asimismo, Koyande y colaboradores (2019), reportan un contenido de 0.69% de carotenoides según el peso seco para *C. sorokiniana*; por lo que el perfil de pigmentos obtenido en este estudio coincide con los resultados de estudios previos (Koyande et al., 2019; Van Wageningen et al., 2015).

En el caso del co-cultivo, el contenido de pigmentos fue menor que en el cultivo unialgal de *C. sorokiniana* pero no hubo diferencias estadísticamente significativas con respecto al cultivo unialgal de *D. communis*. Por lo tanto, para la obtención de pigmentos en este caso, es más

beneficioso realizar el cultivo unialgal de *C. sorokiniana* ya que se obtiene mayor concentración de estos.

Como se observa, el contenido de pigmentos fue mucho mayor en la especie *C. sorokiniana*, se dice que las microalgas del genero *Chlorella* son comúnmente utilizadas en la producción de clorofila por su alto contenido de estos pigmentos (Khanra et al., 2018). En general, se dice que la acumulación de estos metabolitos secundarios depende de las condiciones de cultivo, así, bajo condiciones de estrés, las clorofilas se pueden degradar y por lo tanto disminuir su producción en la biomasa (Markou & Nerantzis, 2013). Lo anterior se pudo haber visto reflejado en el co-cultivo a diferencia del cultivo unialgal de *C. sorokiniana*, al encontrarse las células en condiciones de estrés como limitación de luz y nutrientes necesarios para la producción de pigmentos.

En este sentido, los pigmentos obtenidos del cultivo unialgal de *C. sorokiniana* podrían ser utilizados para la industria alimenticia, farmacéutica, cosmética y textil. En el caso de los carotenoides, se dice que a pesar de que se conocen alrededor de 400 tipos, solo algunos son utilizados comercialmente, como el β -caroteno, astaxantina, luteína, zeaxantina, licopeno y bixina. Además, algunos carotenoides pueden actuar como provitamina A y ser convertidos en el cuerpo en vitamina A, por lo que además tienen importancia en el campo de la medicina (Mobin et al., 2019; Morais Junior et al., 2020).

Es por esto que es importante realizar un análisis de los tipos de carotenoides que se obtienen en la extracción de pigmentos para determinar su aplicación. Por lo que se necesita realizar análisis del perfil de pigmentos obtenidos en este estudio para de esta manera generar más información acerca de la aplicabilidad industrial de los metabolitos secundarios obtenidos.

6. Conclusiones

El co-cultivo de *D. communis* con *C. sorokiniana* generó una disminución significativa en la tasa de crecimiento de *C. sorokiniana* en comparación con su cultivo unialgal, que se puede deber a factores de estrés ocasionados en el co-cultivo o a interacciones de alelopatía entre las dos especies, sin embargo, estas interacciones no han sido estudiadas; mientras que *D. communis* mantuvo su crecimiento y productividad uniforme tanto en cultivo unialgal como en co-cultivo.

El rendimiento de la biomasa fue similar entre los cultivos unialgales y el co-cultivo. Por su parte, la productividad de la biomasa fue menor en el cultivo unialgal de *C. sorokiniana* y mayor en los otros dos cultivos encontrándose diferencias significativas con respecto a *C. sorokiniana*.

Este sistema de co-cultivo realizado generó productividad de proteínas, carbohidratos, lípidos y pigmentos en una concentración similar al cultivo unialgal de *D. communis*. Sin embargo, en el cultivo unialgal de *C. sorokiniana*, la acumulación de lípidos y pigmentos fue mayor, por lo que se considera más beneficioso para este fin realizar un cultivo unialgal de *C. sorokiniana*.

El co-cultivo en este estudio se presenta como un sistema promisorio para generar productividad de la biomasa y metabolitos secundarios con importancia industrial, no obstante, al no encontrarse diferencias significativas con respecto al cultivo unialgal de *D. communis* en la mayoría de los resultados, no se considera viable este co-cultivo para realizarse a gran escala, por lo que se debe realizar estudios con diferentes especies que logren generar mayor productividad en co-cultivo que en cultivo unialgal.

7. Recomendaciones

Debido al poco tiempo para desarrollar los experimentos, no se realizaron muchos análisis que podrían sustentar la investigación, por lo que se recomienda, primeramente, generar más réplicas de cada experimento para obtener de esta manera mayor cantidad de datos y así resultados y análisis estadísticos más robustos.

En cuanto al co-cultivo de estas dos especies, es importante investigar la razón por la cual *C. sorokiniana* disminuye su tasa de crecimiento al cultivarse junto con *D. communis*, por lo que se podría comenzar por estudiar los posibles efectos alelopáticos que puedan ocurrir en este caso para así tener conocimiento del comportamiento de ambas especies.

Como se ha descrito anteriormente, la producción de lípidos y pigmentos a partir de microalgas tiene un importante impacto en la biorrefinería, sin embargo, se debe analizar el contenido de ácidos grasos y los tipos de carotenoides y otros pigmentos obtenidos para así determinar si se podrían utilizar a nivel industrial.

8. Referencias

- Akgül, F. (2020). Effects of nitrogen concentration on growth, biomass, and biochemical composition of *Desmodesmus communis* (E. Hegewald) E. Hegewald. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 50(1), 98–105. <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1697884>
- Alam, M. A., & Wang, Z. (2019). *Microalgae Biotechnology for Development of Biofuel and Wastewater Treatment* (Springer S). [https://books.google.co.cr/books?id=0waWDwAAQBAJ&pg=PA576&dq=cooperative+interaction+in+microalgae&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwj1sGrrO7pAhWjdN8KHWwgAl4Q6AEIJjAA#v=onepage&q=cooperative interaction in microalgae&f=false](https://books.google.co.cr/books?id=0waWDwAAQBAJ&pg=PA576&dq=cooperative+interaction+in+microalgae&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwj1sGrrO7pAhWjdN8KHWwgAl4Q6AEIJjAA#v=onepage&q=cooperative+interaction+in+microalgae&f=false)
- Arredondo-Vega, B. O., Cordero Esquivel, B., & Voltolina, D. (2017). Determinación de proteínas por métodos espectrofotométricos. En B. O. Arredondo-Vega, D. Voltolina, T. Zenteno Savín, M. Arce Montoya, & G. Gómez Anduro (Eds.), *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal* (2nd ed., pp. 64–70). Pandora Impresores.
- Bernaerts, T. M. M., Gheysen, L., Foubert, I., Hendrickx, M. E., & Van Loey, A. M. (2019). The potential of microalgae and their biopolymers as structuring ingredients in food: A review. *Biotechnology Advances*, 107419. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107419>
- Bhattacharya, M., & Goswami Saswata. (2020). Microalgae – A green multi - product biorefinery for future industrial prospects. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 25. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101580>
- Branco-Vieira, M., Mata, T. M., Martins, A. A., Freitas, M. A. V., & Caetano, N. S. (2020). Economic analysis of microalgae biodiesel production in a small-scale facility. *Energy*

Reports, 6, 325–332. <https://doi.org/10.1016/j.egyr.2020.11.156>

Chu, R., Li, S., Zhu, L., Yin, Z., Hu, D., Liu, C., & Mo, F. (2021). A review on co-cultivation of microalgae with filamentous fungi: Efficient harvesting, wastewater treatment and biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 139(December 2020), 110689. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110689>

Corcoran, A. A., Seger, M., Niu, R., Nirmalakhandan, N., Lammers, P. J., Holguin, F. O., & Boeing, W. J. (2019). Evidence for induced allelopathy in an isolate of *Coelastrrella* following co-culture with *Chlorella sorokiniana*. *Algal Research*, 41(April), 101535. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101535>

De Moraes, M. G., Vaz, B. D. S., De Moraes, E. G., & Costa, J. A. V. (2015). Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/835761>

Ferreira, G. F., Ríos Pinto, L. F., Maciel Filho, R., & Fregolente, L. V. (2019). A review on lipid production from microalgae: Association between cultivation using waste streams and fatty acid profiles. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 109, 448–466. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.04.052>

Gaignard, C., Gargouch, N., Dubessay, P., Delattre, C., Pierre, G., Laroche, C., Fendri, I., Abdelkafi, S., & Michaud, P. (2019). New horizons in culture and valorization of red microalgae. *Biotechnology Advances*, 37(1), 193–222. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.014>

Guiry, M. D. (2018). *AlgaeBase*. World-Wide Electronic Publication, National University of Ireland, Galway.

Hernández-García, A., Velásquez-Orta, S. B., Novelo, E., Yáñez-Noguez, I., Monje-Ramírez, I.,

- & Orta Ledesma, M. T. (2019). Wastewater-leachate treatment by microalgae: Biomass, carbohydrate and lipid production. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *174*, 435–444. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.052>
- Ishika, T., Moheimani, N. R., Laird, D. W., & Bahri, P. A. (2019). Stepwise culture approach optimizes the biomass productivity of microalgae cultivated using an incremental salinity increase strategy. *Biomass and Bioenergy*, *127*, 105274. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.105274>
- Jiménez-Valera, S., & Sánchez-Saavedra, M. del P. (2016). Growth and fatty acid profiles of microalgae species isolated from the Baja California Peninsula, México. *Latin American Journal of Aquatic Research*, *44*(4), 689–702. <https://doi.org/10.3856/vol44-issue4-fulltext-4>
- Khan, M. I., Shin, J. H., & Kim, J. D. (2018). The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories*, *17*(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>
- Khanra, S., Mondal, M., Halder, G., Tiwari, O. N., Gayen, K., & Bhowmick, T. K. (2018). Downstream processing of microalgae for pigments, protein and carbohydrate in industrial application: A review. *Food and Bioprocess Processing*, *110*, 60–84. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.02.002>
- Khoo, C. G., Dasan, Y. K., Lam, M. K., & Lee, K. T. (2019). Algae biorefinery: Review on a broad spectrum of downstream processes and products. *Bioresource Technology*, *292*(June), 121964. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121964>
- Koyande, A. K., Chew, K. W., Rambabu, K., Tao, Y., Chu, D.-T., & Show, P.-L. (2019).

- Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. *Food Science and Human Wellness*, 8(1), 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2019.03.001>
- Li, T., Zheng, Y., Yu, L., & Chen, S. (2014). Mixotrophic cultivation of a *Chlorella sorokiniana* strain for enhanced biomass and lipid production. *Biomass and Bioenergy*, 66, 204–213. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.04.010>
- Lu, W., Asrafal Alam, M., Liu, S., Xu, J., & Parra Saldivar, R. (2020). Critical processes and variables in microalgae biomass production coupled with bioremediation of nutrients and CO₂ from livestock farms: A review. *Science of the Total Environment*, 716, 135247. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135247>
- Markou, G., & Nerantzis, E. (2013). Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1532–1542. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.07.011>
- Menegazzo, M. L., & Fonseca, G. G. (2019). Biomass recovery and lipid extraction processes for microalgae biofuels production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 107(February), 87–107. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.01.064>
- Mobin, S. M. A., Chowdhury, H., & Alam, F. (2019). Commercially important bioproducts from microalgae and their current applications-A review. *Energy Procedia*, 160(2018), 752–760. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2019.02.183>
- Morais Junior, W. G., Gorgich, M., Corrêa, P. S., Martins, A. A., Mata, T. M., & Caetano, N. S. (2020). Microalgae for biotechnological applications: Cultivation, harvesting and biomass processing. *Aquaculture*, 528, 735562. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735562>
- Moreno, M. L. O., Castillo, C. E. C., & Sánchez-villarraga, J. (2012). Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones

autotróficas y mixotróficas. *Acta Biomaterialia*, 16(1), 11–10. [https://doi.org/10.1016/s1742-7061\(07\)00145-6](https://doi.org/10.1016/s1742-7061(07)00145-6)

Padmaperuma, G., Kapoore, R. V., Gilmour, D. J., & Vaidyanathan, S. (2018). Microbial consortia: a critical look at microalgae co-cultures for enhanced biomanufacturing. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(5), 690–703. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1390728>

Pang, N., Gu, X., Chen, S., Kirchoff, H., Lei, H., & Roje, S. (2019). Exploiting mixotrophy for improving productivities of biomass and co-products of microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 112, 450–460. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.06.001>

Pozzobon, V., Levasseur, W., Guerin, C., Gaveau-Vaillant, N., Pointcheval, M., & Perré, P. (2020). Desmodesmus sp. pigment and FAME profiles under different illuminations and nitrogen status. *Bioresource Technology Reports*, 10, 100409. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100409>

Rashid, N., Park, W. K., & Selvaratnam, T. (2018). Binary culture of microalgae as an integrated approach for enhanced biomass and metabolites productivity, wastewater treatment, and bioflocculation. *Chemosphere*, 194, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.108>

Rashid, N., Ryu, A. J., Jeong, K. J., Lee, B., & Chang, Y. K. (2019a). Co-cultivation of two freshwater microalgae species to improve biomass productivity and biodiesel production. *Energy Conversion and Management*, 196(May), 640–648. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2019.05.106>

Rashid, N., Ryu, A. J., Jeong, K. J., Lee, B., & Chang, Y. K. (2019b). Co-cultivation of two freshwater microalgae species to improve biomass productivity and biodiesel production. *Energy Conversion and Management*, 196, 640–648.

<https://doi.org/10.1016/j.enconman.2019.05.106>

- Rugnini, L., Costa, G., Congestri, R., Antonaroli, S., Sanità di Toppi, L., & Bruno, L. (2018). Phosphorus and metal removal combined with lipid production by the green microalga *Desmodesmus* sp.: An integrated approach. *Plant Physiology and Biochemistry*, *125*, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.01.032>
- Sajjadi, B., Chen, W. Y., Raman, A. A. A., & Ibrahim, S. (2018). Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *97*(June), 200–232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.07.050>
- Samorì, G., Samorì, C., Guerrini, F., & Pistocchi, R. (2013). Growth and nitrogen removal capacity of *Desmodesmus communis* and of a natural microalgae consortium in a batch culture system in view of urban wastewater treatment: Part I. *Water Research*, *47*(2), 791–801. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.11.006>
- Shriwastav, A., Gupta, S. K., Ansari, F. A., Rawat, I., & Bux, F. (2014). Adaptability of growth and nutrient uptake potential of *Chlorella sorokiniana* with variable nutrient loading. *Bioresource Technology*, *174*, 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.149>
- Sriram, S., & Seenivasan, R. (2015). Biophotonic perception on *Desmodesmus* sp. VIT growth, lipid and carbohydrate content. *Bioresource Technology*, *198*, 626–633. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.065>
- Suparmaniam, U., Lam, M. K., Uemura, Y., Lim, J. W., Lee, K. T., & Shuit, S. H. (2019). Insights into the microalgae cultivation technology and harvesting process for biofuel production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *115*, 109361. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109361>

- Tejido-Nuñez, Y., Aymerich, E., Sancho, L., & Refardt, D. (2020). Co-cultivation of microalgae in aquaculture water: Interactions, growth and nutrient removal efficiency at laboratory-and pilot-scale. *Algal Research*, *49*, 101940. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101940>
- Trivedi, J., Aila, M., Bangwal, D. P., Kaul, S., & Garg, M. O. (2015). Algae based biorefinery - How to make sense? *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *47*, 295–307. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.03.052>
- Van Wageningen, J., De Francisci, D., & Angelidaki, I. (2015). Comparison of mixotrophic to cyclic autotrophic/heterotrophic growth strategies to optimize productivity of *Chlorella sorokiniana*. *Journal of Applied Phycology*, *27*(5), 1775–1782. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0485-1>
- Yao, L., Shi, J., & Miao, X. (2015). Mixed wastewater coupled with CO₂ for microalgae culturing and nutrient removal. *PLoS ONE*, *10*(9), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139117>
- Zafra Trelles, A. M. (2017). Cultivo de microalgas marinas potenciales para la acuicultura del litoral entre Puerto Salaverry y Puerto Chicama, La Libertad, Perú. *Arnaldoa*, *24*(2), 567–582. <https://doi.org/10.22497/arnaldoa.242.24209>
- Zhang, Y., He, M., Zou, S., Fei, C., Yan, Y., Zheng, S., Rajper, A. A., & Wang, C. (2016). Breeding of high biomass and lipid producing *Desmodesmus* sp. by Ethylmethane sulfonate-induced mutation. *Bioresource Technology*, *207*, 268–275. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.120>