

Evaluación de la cinética de crecimiento y determinación de clorofila de un consorcio del género *Scenedesmus* empleando diferentes medios de cultivo.

Growth kinetics evaluation and chlorophyll determination of a *Scenedesmus* consortium using different culture media

Camacho-Barraza, T.J.¹, Domínguez-López, A.V.², Ramírez-Medina, J.A.³, Luna-Avelar, K.D.⁴, Santos-Ballardo, D.U.^{4,5}, Gárate-Osuna, A.J.^{6*}

¹Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias, Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de febrero 818 Sur, CP 85000, Cd. Obregón, Sonora, México. ²Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Blvd. Benito Juárez S/N, Parcela 44, CP 21280, Mexicali, Baja California, México. ³Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa, Calzada de las Américas Norte 2771, Cd. Universitaria, Burócrata, CP 80030, Culiacán Rosales, Sinaloa, México. ⁴Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD) Mazatlán Unidad Av. Sábalo Cerritos s/n Estero del Yugo, A.P. 711, CP 82000, Mazatlán, Sinaloa, México. ⁵Unidad Académica de Ingeniería en Energía, Maestría en Ciencias Aplicadas, Universidad Politécnica de Sinaloa, Carretera Municipal Libre Mazatlán-Higueras Km 3, CP 82199, Mazatlán, Sinaloa, México. ⁶Doctorado en Ciencias en Biotecnología, Programa Integral de Posgrado en Biotecnología, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán, Sinaloa.

RESUMEN

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos que han captado un creciente interés debido a su potencial en aplicaciones industriales y biotecnológicas. El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de dos medios de crecimiento (Guillard & Ryther F/2 Media, y Bold's Basal Medium BBM) en parámetros cinéticos y la producción de clorofila de un consorcio nativo de Sinaloa del género *Scenedesmus*. Los resultados obtenidos mostraron la influencia en el medio utilizado, se obtuvo un tiempo de duplicación (*td*) de 0.9259 días en BBM y 1.0804 días en F/2. De igual manera, las densidades celulares máximas alcanzadas fueron de $6.03 \pm 0.34 \times 10^6$ células mL⁻¹ para BBM y $14.06 \pm 3.20 \times 10^6$ células mL⁻¹ para F/2, respectivamente. Con estos resultados, se pudo inferir que el medio BBM favorece el tiempo de duplicación, mientras que el F/2 favoreció en la densidad celular máxima alcanzada, pudiéndose traducir a más cantidad de biomasa por litro. Evaluar el comportamiento de la cinética de crecimiento en distintos medios de cultivo es crucial para optimizar las condiciones del cultivo, maximizando las tasas de crecimiento y acumulación de compuestos de interés, identificando las condiciones óptimas para la producción a gran escala, lo que permite optimizar la eficiencia, sostenibilidad y viabilidad económica de una biorrefinería.

Palabras claves: Bioenergía, Bioprocesos, Microalgas, Parámetros cinéticos

ABSTRACT

Microalgae are photosynthetic microorganisms that have garnered increasing interest due to their potential in industrial and biotechnological applications. The aim of this study was to analyze the effect of two growth media (Guillard & Ryther F/2 Media, y Bold's Basal Medium) on growth parameters and chlorophyll production in a native consortium from Sinaloa belonging to the genus *Scenedesmus*. The results have shown the growth medium influences the outcomes, with a doubling time (*dt*) of 0.9259 days in BBM and 1.0804 days in F/2. Similarly, the maximum cell densities reached were $6.03 \pm 0.34 \times 10^6$ cells mL⁻¹ for BBM and $14.06 \pm 3.20 \times 10^6$ cells mL⁻¹ for F/2. According to these results, it can be inferred that BBM favors the doubling time, while F/2 promotes a higher maximum cell density, potentially translating into more biomass per liter. Evaluating growth kinetics in different culture media is crucial to optimizing cultivation conditions, maximizing growth rates and accumulation of target compounds, and identifying optimal conditions for large-scale production, thus improving the efficiency, sustainability, and economic viability of a biorefinery.

Keywords: Bioenergy, Bioprocesses, Microalgae, Kinetic parameters.

*Autor de correspondencia: Andrea Garate Osuna

Email: andregarateosuna@gmail.com

ORCID ID: [0009-0008-1014-790X](https://orcid.org/0009-0008-1014-790X)

Registro ORCID Autores: SB: [0000-0001-5058-8621](https://orcid.org/0000-0001-5058-8621); LA: [0000-0002-3493-8123](https://orcid.org/0000-0002-3493-8123); RM: [0009-0008-2822-0407](https://orcid.org/0009-0008-2822-0407);

DL: [0009-0007-7659-9565](https://orcid.org/0009-0007-7659-9565); CB: [0009-0007-0904-4375](https://orcid.org/0009-0007-0904-4375);

Revista online: <https://revistas.uas.edu.mx/index.php/QBU/index>

INTRODUCCIÓN

Las microalgas son microorganismos unicelulares que se encuentran en los ecosistemas acuáticos y contribuyen a la fotosíntesis, y son las responsables de generar aproximadamente el 60-70% del oxígeno del planeta (Shaikh *et al.*, 2022). Las microalgas han sido estudiadas desde mediados del siglo XX debido a su capacidad para producir metabolitos de interés, así como su importancia industrial para la producción de pigmentos, biocombustibles, fármacos y suplementos alimenticios (Vázquez-Romero *et al.*, 2022). El uso de la biotecnología en el cultivo y formulación de bioprocesos a base de microalgas se considera pilar fundamental e innovador para la bioeconomía y el desarrollo sostenible debido al incremento de demanda de alimentos, energía y biocombustibles, lo que lo convierte en una materia prima fundamental en términos de sustentabilidad y desarrollo, ya que no compromete recursos y es amigable con el medio ambiente (Fasaei *et al.*, 2018; Wibisono *et al.*, 2019; Maroneze *et al.*, 2021).

En los últimos años, las industrias de nutricosmética y de alimentación funcional se han sumado a las industrias que pueden ser beneficiadas por las microalgas, ya que estas son reconocidas por ser productoras naturales de pigmentos bioactivos como la clorofila. La clorofila es un pigmento natural que se encuentra en plantas, algas y cianobacterias, tiene un importante potencial medicinal como agente antioxidante, antibacteriano y antitumoral (Sun *et al.*, 2024). La clorofila desempeña un papel crucial en la fotosíntesis para absorber y transformar la energía solar en energía química, desencadenar la fijación de CO₂ en carbohidratos, entre otros (Rinawati *et al.*, 2020). La extracción de clorofila a partir de microalgas representa numerosas ventajas sobre fuentes convencionales debido a la eficiencia, sustentabilidad y bioactividad de los procesos de extracción. El contenido de clorofila en las microalgas va desde el 2.5-10% dependiendo de la especie, en el caso de las microalgas verdes pueden acumular niveles de clorofila de hasta el 10% de su peso seco celular (Herrera & Roca, 2023). Esta alta concentración intracelular los convierte en una prometedora fuente alternativa para la extracción de clorofila (Halim y Danquah, 2013; Fernandes *et al.*, 2020; Sarkar *et al.*, 2020). Actualmente, se han desarrollado métodos avanzados que permiten mejorar los rendimientos y la calidad del extracto de clorofila a partir de microalgas, métodos como la extracción asistida por microondas (MAE), ultrasonido (EAU) e infrarrojos (IR) han demostrado mejorar los rendimientos y la calidad del extracto; además, el uso de biorreactores para el cultivo y extracción de

microalgas permiten cultivarlas bajo condiciones controladas lo que reduce el consumo de energía e impacto ambiental (Georgiopoulou *et al.*, 2023; Herrera & Roca, 2023).

La acumulación de compuestos en las microalgas se ve afectado por distintas condiciones, como la temperatura, la iluminación, el pH, y la fuente de nutrientes (Ozkurt, 2009); esta última teniendo una repercusión en el comportamiento de crecimiento microalgal y el tipo de compuesto que acumulan (Udayan *et al.*, 2023). Las microalgas necesitan nitrógeno y fósforo como nutrientes principales, y estos representan del 10 al 20% de la biomasa microalgal. Otros requisitos nutrimentales para el crecimiento son los macronutrientes (Sodio [Na], Magnesio [Mg], Calcio [Ca] y potasio [K]); micronutrientes (Molibdeno [Mo], Manganeseo [Mn], Boro [B], Cobre [Co], Hierro [Fe] y Zinc [Zn]); y otros oligoelementos (Khan *et al.*, 2018). La formulación de los medios de cultivo tiene un impacto significativo en la producción de biomasa debido a que puede influir en el crecimiento y la acumulación de metabolitos de interés (Hernández-Pérez & Labbé, 2014). Diversos estudios destacan la importancia de optimizar la composición de los medios de cultivo para mejorar la producción de biomasa y la síntesis de compuestos de valor agregado (Phuong & Ly, 2023). Factores como el equilibrio de nutrientes, la luz, la temperatura y la presencia de reguladores del crecimiento desempeñan un papel crucial en la eficiencia del cultivo y el rendimiento de compuestos bioactivos (Udayan *et al.*, 2023).

Se ha demostrado que alterar la concentración de nitrógeno y fósforo en géneros como *Spirulina*, *Chlorella*, *Scenedesmus* y *Nannochloropsis* puede afectar la curva de crecimiento y la producción de biomasa por lo que seleccionar una composición adecuada de medio de cultivo es esencial para optimizar la producción de clorofila y compuestos de interés en el cultivo de microalgas (Difusa *et al.*, 2015; Pratiwi *et al.*, 2023).

Las microalgas del género *Scenedesmus* son microalgas verdes dulceacuícolas, tienen un tamaño de aproximadamente 10-20 µm, y presenta un contenido de lípidos de 16-40% (Khodadadianzaghmari *et al.*, 2024). Además, son reconocidas por su alta producción de biomasa y composición bioquímica que incluye carbohidratos, proteínas, clorofila *a*, carotenoides y lípidos (Difusa *et al.*, 2015). Distintos estudios argumentan que las especies de este género de microalga podrían ser buena fuente de clorofila en condiciones específicas como una temperatura de 25-30°C, una intensidad de luz de 95-150 µmol m⁻² s⁻¹ y

un pH entre 6.0 a 8.5 (Yadav *et al.*, 2023; Ziganshina *et al.*, 2023; Tapia-López *et al.*, 2024), empleando medios de cultivo como lo son el Basal Bold's Medium (BBM) y el BG-11 (Thakur *et al.*, 2022). El medio BBM incrementa la producción de biomasa, lípidos y carotenoides en *Scenedesmus obliquus* (Thakur *et al.*, 2022). Mientras que el medio BG-11 ha demostrado mejorar la tasa de crecimiento de microalgas y la acumulación de ácidos grasos, lo que lo convierte en un medio de cultivo viable en procesos de producción de biodiésel (Pandey *et al.*, 2020).

Algunas de las especies más investigadas son *Scenedesmus obliquus*, *Scenedesmus bijugusi* y *Scenedesmus rubescens* (Maroneze *et al.*, 2019; Thakur *et al.*, 2022); sin embargo, existen pocos estudios que utilicen consorcios de microalgas nativas, debido a que su uso representa desafíos en la biotecnología industrial, como la lentitud de las tasas de crecimiento y baja productividad, pero ofrece soluciones multidisciplinarias para la producción sostenible (Barraza, 2011).

Actualmente, existen pocos estudios que utilicen consorcios de microalgas, puesto que representan desafíos para su total cultivo y aprovechamiento. No obstante, también es considerada una ventaja al poder ser encontradas en diversos cuerpos de agua locales de manera natural, siendo una oportunidad que se considera inexplorada hoy en día, desperdiciando un recurso natural al alcance. El objetivo del presente estudio es evaluar el comportamiento de crecimiento y la producción de clorofila de un consorcio microalgal nativo de cuerpos de agua de Mazatlán, Sinaloa, conformado mayoritariamente de especies del género *Scenedesmus*, utilizando dos distintos medios de cultivo (Guillard & Ryther Medio [F/2], y el Bold's Basal Medium [BBM]) bajo condiciones controladas de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

MICROALGAS

El consorcio C-SceMAZ fue recolectado de una laguna en el municipio de Mazatlán, Sinaloa, México. Este consorcio fue purificado de microorganismos como bacterias y hongos, y posteriormente almacenado en tubos de ensayo (15 mL) a una temperatura de 25 (± 1) °C, e iluminación constante (6000 luxes). Los cultivos de C-SceMAZ en los tubos de 15 mL fueron monitoreados diariamente, y se les suministró nutrientes cada siete días. Se lograron identificar algunas especies mayoritarias del género *Scenedesmus* (Figura 1) y algunas otras especies minoritarias (<1%). El consorcio fue donado por el laboratorio de Bioenergía de la Universidad Politécnica de Sinaloa (UPSIN), y el Centro Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C (CIAD) unidad Mazatlán.

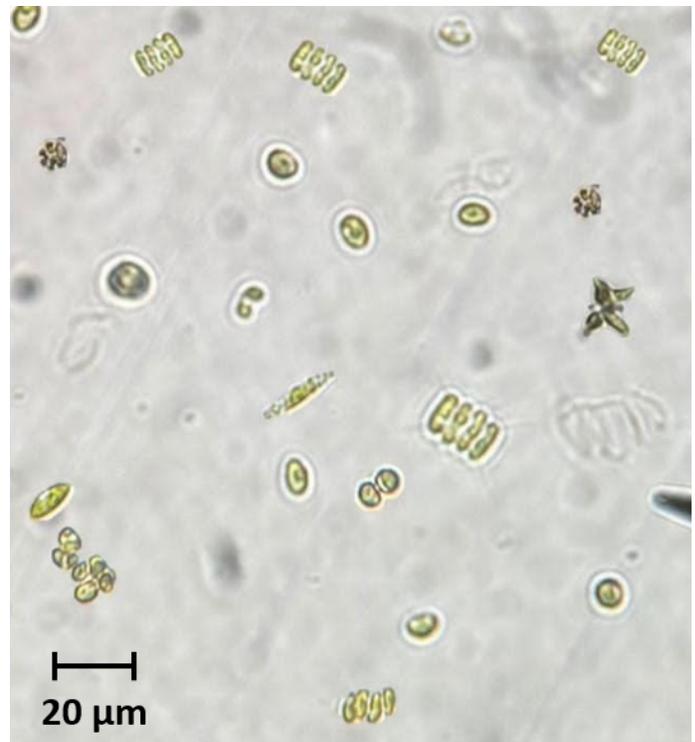


Figura 1. Consorcio microalgal del género *Scenedesmus*.

CULTIVO MICROALGAL

El cultivo de microalgas se realizó mediante la técnica de transferencias sucesivas, donde se inocularon 15 mL del consorcio en matraces de 250 mL hasta alcanzar una concentración aproximada de 10.0×10^6 células mL^{-1} . Posteriormente, se inocularon reactores de 3 L con dos medios de cultivo, Bold's Basal Medium (BBM) y Guillard & Rtyher Media (F/2) por triplicado (Figura 2), donde se calculó una concentración inicial por reactor de aproximadamente 5.0×10^5 células mL^{-1} . Las condiciones de cultivo fueron: temperatura de 25 ± 1 °C, agitación administrada mediante aire filtrado (bomba), pH entre 6.0-6.5, y un régimen de luz constante suministrado por LEDs con una intensidad lumínica de 6000 luxes (LightMeter modelo HS1010). La composición nutrimental final por litro para medio BBM reportado por Brown *et al.* (1964) & Nichols y Bold (1965) fue de 0.25 g de NaNO_3 , 0.025 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.075g K_2HPO_4 , 0.175 g KH_2HPO_4 , 0.075 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.025 NaCl, 0.001 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.0028 g HBO_3 , 0.0018 g MnCl_2 , 0.002 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.004 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.0008 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, y 0.0005 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Para el medio F/2 reportado por Guillard y Ryther (1962) la composición final por litro fue de 75 g NaNO_3 , 5.65 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4.36 g EDTA, 3.15 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.010 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.022 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.010 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.180 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.006 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2 g de

cianocobalamina cristalina (B12), 0.100 g de tiamina-HC (B1) y 0.001 g de biotina cristalina.

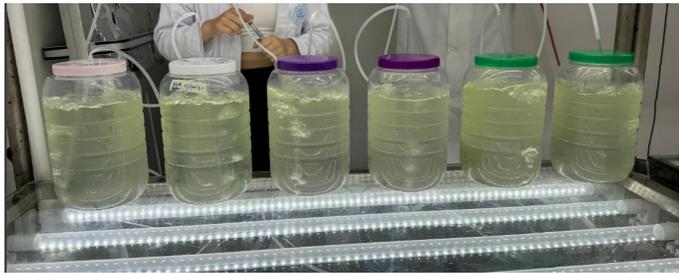


Figura 2. Experimento en reactores de 3 L del cultivo del consorcio C-SceMAZ (consorcios *Scenedesmus* sp.) inicial.

CINÉTICA DE CRECIMIENTO

La determinación de la concentración celular se realizó por medio de dos metodologías, (1) conteos celulares con hematocítmetro, y (2) determinación de absorbancia por espectrofotometría las cuales fueron adaptadas de Godoy-Hernández & Vázquez-Flota (2006), Mikschofsky *et al.* (2009) y Santos-Ballardo *et al.* (2015). Para los conteos celulares, se tomaron muestras por triplicado cada 24 horas de cada uno de los reactores, y se contabilizaron las células por mililitro utilizando un hematocítmetro (cámara de Neubauer doble línea brillante, 0.0025 mm² LUZERN®), y un microscopio (OLYMPUS CX31). Para la determinación de absorbancia por espectrofotometría, se utilizó un espectrofotómetro (GENESIS 10-S UV-Vis, Thermo Scientific), del triplicado de muestras de cada reactor, a la misma hora de los conteos celulares, medidos a una longitud de onda de 680 nm.

PARÁMETROS DE EFICIENCIA DE CRECIMIENTO

Para el análisis de eficiencia de crecimiento, se calcularon dos parámetros, la tasa de crecimiento específico (μ), y el tiempo de duplicación (td). Estos parámetros se calcularon siguiendo la Ecuación (1) y la Ecuación (2) (Godoy-Hernández & Vázquez-Flota, 2006).

$$(1) \quad \mu = \frac{\ln X - \ln X_0}{t}$$

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

donde μ corresponde a la tasa de crecimiento específico, que se traduce en la eficiencia de crecimiento de la microalga (días⁻¹); X valor final (de absorbancia o densidad celular) de la etapa de crecimiento exponencial,

X_0 indica el valor inicial (de absorbancia o densidad celular) de la etapa de crecimiento exponencial, t es el tiempo; y td es el tiempo de duplicación (días). Asimismo, se determinaron las densidades celulares máximas y las absorbancias máximas alcanzadas.

DETERMINACIÓN DE CLOROFILA

Para la determinación de clorofila se empleó una metodología adaptada de Price & Harrison (1987). Se colectaron 2 mL de cultivo cada 24 horas de cada reactor después de las 72 horas transcurridas de la cinética, debido al cambio significativo de color percibido entre medios de cultivo. Las muestras de cada reactor fueron filtradas y posteriormente se añadieron 10 mL de acetona al 90% y se dejaron reposar a 20°C por 24 horas. Pasado el tiempo, se leyeron las muestras por espectrofotometría UV-Vis a tres longitudes de onda: 664, 647 y 639 nm para determinar el contenido de clorofila *a*, *b* y *c* producida durante la cinética. Una vez finalizada la cinética, las muestras que se procesaron fueron cuantificadas y el total de la clorofila fue expresada en microgramos por mililitro ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de manera individual.

Tabla 1. Parámetros de eficiencia de crecimiento del consorcio microalgal

Parámetro	Medio BBM	Medio F/2
μ (d ⁻¹)	0.75 ± 0.04 ^a	0.56 ± 0.14 ^a
td (días)	0.92 ± 0.05 ^a	1.26 ± 0.38 ^a
μ (d ⁻¹)*	0.96 ± 0.05 ^a	0.71 ± 0.09 ^b
td (días)*	0.72 ± 0.04 ^a	0.97 ± 0.13 ^b
DMáx (células mL ⁻¹)	6.03 ± 0.34 x10 ^{6a}	14.06 ± 3.20 x10 ^{6b}
AbsMáx (u.a.)	0.48 ± 0.01 ^a	0.66 ± 0.01 ^b

Los resultados presentados representan el promedio de los reactores, y (\pm) representa la desviación estándar. Letras representan diferencias significativas en cada uno de los parámetros (filas). Análisis estadístico prueba de Tukey ($p \leq 0.05$, $n=3$). DMáx: Densidad máxima; AbsMáx: Absorbancia máxima; u.a.: unidad arbitraria; d : días; cél: células; mL: mililitro; μ : tasa de crecimiento específico; td : tiempo de duplicación. *: parámetros de eficiencia de crecimiento calculados en función a la absorbancia; los valores sin (*) corresponden a los calculados mediante conteos celulares.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para las pruebas estadísticas se realizaron pruebas de normalidad Shapiro-Wilk para comprobar la normalidad de los datos, y se realizaron análisis de varianzas (ANOVA) de un solo factor y comparación de medias por la prueba de Tukey's ($p \leq 0.05$, $n=3$), para los parámetros de eficiencia de crecimiento (tasas de crecimiento específico [μ] y tiempos de duplicación [td]), densidades y absorbancias máximas; como también para los análisis de clorofila. Los análisis estadísticos fueron realizados en el software SigmaPlot Software ® versión 12.5.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PARÁMETROS DE EFICIENCIA DE CRECIMIENTO

En relación con el comportamiento de crecimiento del consorcio microalgal, se encontraron diferencias en los parámetros de eficiencia de crecimiento, y en las densidades celulares entre ambos medios de cultivo (Tabla 1). En relación con los parámetros de eficiencia de crecimiento basados en conteos celulares, no se demostraron diferencias significativas entre los cultivos empleados. Esto puede deberse a que en uno de los cultivos (F/2) se observó un crecimiento errático de las microalgas para esta metodología (Figura 3), lo que influyó en los cálculos. Los resultados para el medio BBM mostraron una μ de $0.75 \pm 0.04 \text{ d}^{-1}$, mientras que el medio F/2 mostró una μ de $0.58 \pm 0.18 \text{ d}^{-1}$. Esto se traduce a que el medio BBM tuvo un tiempo de duplicación menor al medio F/2, siendo una td de 0.92 ± 0.05 días, y 1.24 ± 0.38 días, respectivamente. Para tener una visión más clara, estos tiempos se traducen a que BBM tardó 22 horas promedio en duplicarse, mientras que F/2 tardó casi 30 horas en duplicarse. Por otro lado, los mismos parámetros basados en la metodología de medición de absorbancia sí mostraron diferencias significativas, esto podría deberse a la naturaleza de la metodología, ya que la superposición de células y la presencia de restos celulares podría influir en la medición (Ribeiro-Rodrigues *et al.*, 2011), lo que se traduciría en diferencias entre los parámetros de eficiencia. Los resultados con esta metodología reportaron valores de μ y td menores a la metodología por conteos celulares (alrededor de un 22% menor), obteniendo valores de μ de 0.96 ± 0.05 y $0.71 \pm 0.09 \text{ d}^{-1}$, y valores de td de 0.72 ± 0.04 y 0.97 ± 0.13 días, para BBM y F/2, respectivamente.

Esto concuerda con lo reportado por algunos autores que ofrecen modelos matemáticos predictivos de concentración celular, donde correlacionan las metodologías para poder predecir los conteos

celulares en función de la absorbancia, ya que la espectrofotometría es un método más rápido, y disminuye los errores por el humano (Santos-Ballardo *et al.*, 2015).

Un estudio realizado por Díaz-Escudero *et al.* (2023) en la Universidad de la Guajira, emplearon tres cepas de *Scenedesmus* sp. (N7, N10 y N15) cultivadas en medio Guillard F/2 para la obtención de pigmentos liposolubles e hidrosolubles, obteniendo valores de μ de 0.11, 0.14 y 0.09 d^{-1} , respectivamente, y valores de td de 6.30, 4.95 y 7.70 días durante su etapa exponencial. Verduga (2020) realizó un estudio sobre la propagación de *Scenedesmus* sp. empleando medio BG11 mezclado con aguas residuales de industrial láctica (DIWW), reportando resultados de parámetros de eficiencia de crecimiento de $\mu=0.69 \pm 0.08 \text{ d}^{-1}$ y una td de 1.00 ± 0.136 días en el medio BG11 y 1.00 ± 0.004 días en las aguas residuales lácticas (DIWW). En ambos estudios se obtuvieron parámetros de eficiencia de crecimiento menores a los reportados, esto se puede atribuir a la influencia del medio de cultivo y las condiciones del cultivo que influye en la producción de biomasa en la eficiencia de uso de los recursos disponibles, o también la adaptabilidad inicial del consorcio a los medios de cultivo empleados, y también diferencias en los tiempos de depleción de nutrientes (Quevedo *et al.*, 2008; Brito *et al.*, 2013). La transición más rápida hacia la fase de muerte celular en el medio BBM puede limitar su aplicación en procesos biotecnológicos a largo plazo, donde se requiera un crecimiento sostenido. Por otro lado, la capacidad del medio F/2 para mantener un crecimiento celular elevado durante un período más prolongado sugiere que podría ser más adecuado para la producción continua de biomasa (Brito *et al.*, 2013).

Sin embargo, se observó un fenómeno opuesto en las densidades celulares máximas alcanzadas. El medio BBM alcanzó una densidad celular máxima de $6.03 \pm 0.34 \times 10^6$ células mL^{-1} , mientras que F/2 mostró una densidad celular mayor, alcanzando más del doble de células por mililitro, con un promedio de $14.06 \pm 3.20 \times 10^6$ células mL^{-1} . La densidad máxima alcanzada para el medio BBM entre los días seis y siete de la cinética, mientras que para el medio F/2 se encontró entre los días siete y nueve. El comportamiento observado en las absorbancias refleja comportamientos distintos, en el medio F2 es constante, lo que sugiere un crecimiento uniforme y sostenido del consorcio microalgal. Mientras que el medio BBM muestra un comportamiento errático lo que podría indicar la necesidad de mejorar las condiciones operativas o ajustar la composición del medio para garantizar estabilidad. Con respecto a las diferencias de densidades celulares encontradas en ambos medios, es

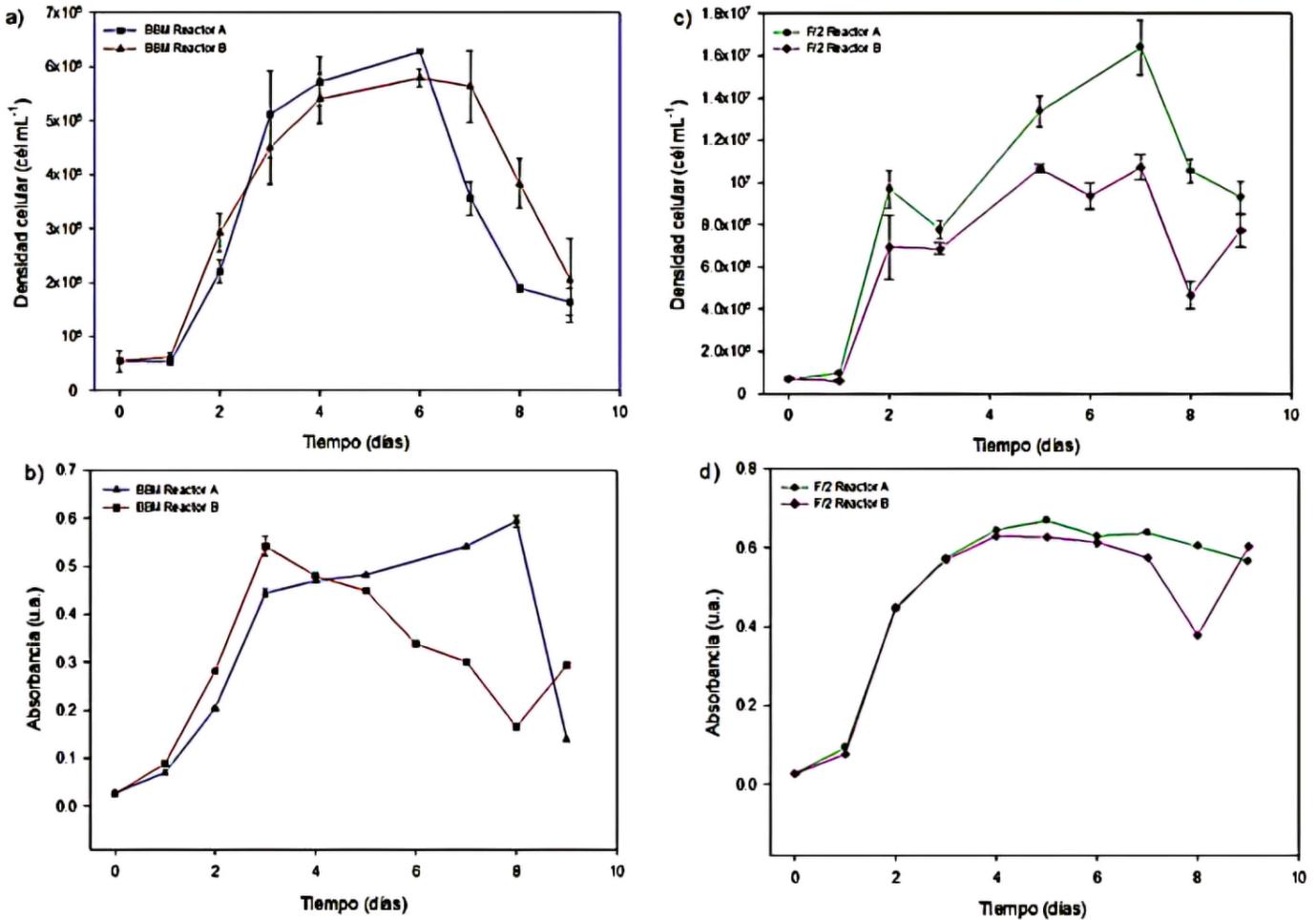


Figura 3. Cinéticas de crecimiento del consorcio microalgal. a) Conteos celulares medio BBM, b) absorbancia medio BBM, c) conteos celulares medio F/2 y d) absorbancia medio F/2.

posible que el medio F/2 debido a su composición rica en nutrientes, permitió un desarrollo celular más prolongado en comparación con el medio BBM. Por otra parte, existe la posibilidad de que el patrón de crecimiento inusual se deba a un fenómeno de adaptación a condiciones de estrés para *Scenedesmus*, puesto que el medio F/2 tiene concentraciones de NaCl más elevadas que el medio BBM (Morales *et al.*, 2019). Este último, aunque promovió un crecimiento inicial rápido, no mantuvo las células viables durante tanto tiempo, lo que sugiere limitaciones nutricionales que aceleraron la fase de muerte celular.

En el estudio realizado por Vázquez & Ayala (2017) encontraron una densidad celular máxima de *Scenedesmus obliquus* de 6.14×10^6 células mL⁻¹ en el día 14 en medio BBM, mientras Zhao *et al.* (2011) encontraron una densidad celular máxima de 30.30×10^6 en el día seis en medio F/2

para *S. obliquus*. La variabilidad en las concentraciones celulares máximas y las tasas de crecimiento entre ambos medios podría deberse a ligeras diferencias en las condiciones operativas o a factores inherentes al consorcio de microalgas, como la heterogeneidad en la población celular (Iba *et al.*, 2023). De igual manera, las diferencias presentadas entre reactores del mismo medio, puede deberse a las mismas circunstancias de desafíos al momento de adaptabilidad microalgal. Esto destaca la importancia de la replicación experimental para asegurar la reproducibilidad de los resultados (Herrera & Roca, 2023).

DETERMINACIÓN DE CLOROFILA

Se evaluó la concentración de clorofila *a*, *b* y *c* totales en los reactores de ambos medios (BBM y F/2), esto para determinar la eficiencia

fotosintética del consorcio microalgal. Los cultivos mostraron diferencias significativas en las clorofilas tipo *a* y *b* entre los medios BBM en comparación con los del medio F/2; sin embargo, no mostraron diferencias en la clorofila *c* (Tabla 2). Es importante resaltar que la clorofila tipo *c* fue analizada debido a que el consorcio tiene especies de microalgas no identificadas, a pesar de que la bibliografía menciona que las algas del género *Scenedesmus* poseen clorofila *a* y *b*, el empleo de medios diferentes podría contribuir al crecimiento de otras especies que posiblemente estaban presentes en el consorcio en concentraciones pequeñas, que pudieron pasar por procesos de adaptación o competir entre especies (Morales *et al.*, 2017). En la Figura 4 se observa un cambio en los biorreactores, donde se intensificó el color verde del medio, tras 48 horas de la cinética. La producción de clorofila tuvo variaciones en medio BBM y F/2. En la clorofila *a* se encontraron valores de $2.52 \pm 0.29 \mu\text{g mL}^{-1}$ en el medio BBM mientras que en el medio Guillard se encontraron valores de $0.23 \pm 0.02 \mu\text{g mL}^{-1}$, para la clorofila *b* se encontraron valores de $2.05 \pm 0.53 \mu\text{g mL}^{-1}$ en medio BBM y de $0.14 \pm 0.04 \mu\text{g mL}^{-1}$ en F/2 y para la clorofila *c* de $2.79 \pm 0.64 \mu\text{g mL}^{-1}$ en medio BBM y de $1.10 \pm 0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$ en medio F/2, lo que representa que el medio BBM tuvo una producción significativamente mayor en comparación con el medio Guillard. Las microalgas del género *Scenedesmus* tienen un contenido alto de clorofila (en promedio un 49.47% del total de lípidos), lo que las convierte en una fuente valiosa para la extracción de pigmentos y compuestos bioactivos (Fidalgo *et al.*, 1998).

La mayor concentración de clorofila en el medio BBM sugiere una mayor eficiencia fotosintética y un uso más efectivo de los nutrientes disponibles, contribuyendo a un crecimiento celular más rápido. En contraste, la disminución de la clorofila en el medio F/2 indica una rápida depleción de los nutrientes esenciales, lo que resultó en una reducción de la actividad fotosintética y consecuentemente, en una actividad de duplicación más lenta.

García-Cañedo *et al.* (2009) evaluaron la producción de clorofila *a* y *b* en *Scenedesmus incrassatulus* en medio BBM obteniendo valores máximos de 10.6 y $5.72 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Tabla 2. Clorofilas totales en cada uno de los medios del consorcio microalgal

Clorofila	Medio BBM	Medio F/2
<i>a</i>	2.52 ± 0.29^a	0.23 ± 0.02^b
<i>b</i>	2.05 ± 0.53^a	0.14 ± 0.04^b
<i>c</i>	2.79 ± 0.64^a	1.10 ± 0.01^a

Todos los resultados están expresados en $\mu\text{g mL}^{-1}$. Los resultados presentados representan el promedio, y (\pm) representa la desviación estándar entre reactores del mismo medio. Letras representan diferencias significativas en cada una de las clorofilas (filas). Análisis estadístico prueba de Tukey ($p \leq 0.05$, $n=3$).

Mientras que otro estudio realizado por Rinanti *et al.* (2013) determinó el contenido de clorofila *a* y *b* de *Scenedesmos obliquus* en distintos tipos de medios de cultivo (Zarrouk, Schlosser y Haematococcus provasollis). Dicho estudio demuestra cómo las composiciones de los medios de cultivo repercuten en la cinética de crecimiento y la producción de clorofila, así como la viabilidad de la microalga *Scenedesmos obliquus* para la producción de clorofila, en la cual el medio de Haematococcus Provasollis Medium (PHM) mostró una mayor eficiencia en la producción de clorofilas *a* y *b* con valores 1300 y $1600 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente; seguido del medio Zarrouk con $700 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ mientras que en el medio Schlosser obtuvo un rendimiento menor con $140 \mu\text{g mL}^{-1}$ para ambos tipos de clorofila.

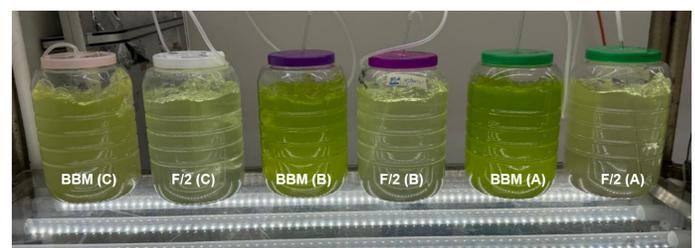


Figura 4. Cinética de crecimiento en curso del consorcio C-SceMAZ, donde se visualizan intensidades de verde distintos en cada medio después de 48 horas.

El contenido de clorofila en las microalgas está influenciado por factores ambientales y las condiciones de cultivo (Ferreira *et al.*, 2016). Las investigaciones indican que tanto la intensidad de la luz como la disponibilidad de nutrientes (como nitrógeno y fósforo) desempeñan un papel fundamental en la modulación de los niveles de clorofila, que son

esenciales para la fotosíntesis y la producción de biomasa (Dean *et al.*, 2010; da Silva Ferreira & Sant'Anna, 2017).

Los estudios realizados por García-Cañedo *et al.* (2009) y Rinanti *et al.* (2013) demuestran como las condiciones de cultivo están directamente relacionadas con la producción de clorofila. García-Cañedo *et al.* (2009) reportaron valores de $10.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ para clorofila a y $5.72 \mu\text{g mL}^{-1}$ para clorofila b en *Scenedesmus incrassatulus* cultivado en medio BBM. Mientras que Rinanti *et al.* (2013) obtuvieron valores de hasta $1300 \mu\text{g mL}^{-1}$ de clorofila a y $1600 \mu\text{g mL}^{-1}$ de clorofila b. Estas diferencias pueden deberse a que la composición de los medios de cultivo de Rinanti *et al.* (2013) están diseñados para funciones específicas, ofreciendo una mayor disponibilidad de nutrientes esenciales para la biosíntesis de pigmentos, en comparación con el medio BBM. Otro factor que pudo inferir es el fotoperiodo y la intensidad lumínica. García-Cañedo *et al.* (2009) reportaron un fotoperiodo de 10:14h (luz/oscuridad) y $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$. Mientras que Rinanti *et al.* (2013) reportó un fotoperiodo de 24:0 h y una intensidad lumínica de 2500 luxes, si bien nuestras condiciones operativas se acercaron más a las reportadas por Rinanti *et al.* (2013) con un fotoperiodo de 24:0 y 6000 luxes, lo que pudo influir más es el tipo de medio de cultivo y la etapa en la cual se determinó la clorofila, ya que el contenido de ésta puede variar significativamente dependiendo de la etapa del cultivo; se ha observado que durante la etapa estacionaria la producción de clorofila tiende a disminuir, lo que puede afectar la eficiencia fotosintética y, en consecuencia, el rendimiento general del cultivo (Fidalgo *et al.*, 1998).

CONCLUSIONES

En la región de Sinaloa, cepas de géneros que crecen naturalmente, como el género *Scenedesmus*, presentan una notable ventaja en la adaptación y crecimiento con diferentes composiciones nutrimentales, siendo un recurso al alcance para su aprovechamiento, y una fuente potencial para la obtención de biomasa bajo condiciones controladas, y de pigmentos de alto nivel comercial como la clorofila. Las diferentes formulaciones de medios de cultivo impactaron significativamente el crecimiento y la producción de clorofila, lo que sugiere que la composición del medio es un factor crítico para optimizar la producción de microalga. Los resultados arrojados en las cinéticas y en la determinación de pigmentos abren un área de oportunidad para elegir que requerimientos nutrimentales se apegan más a nuestros objetivos, es decir, si es de interés un crecimiento rápido para la obtención de clorofila, se podría optar por un medio BBM; mientras que, si nos interesa una densidad

celular mayor, lo que se puede traducir a una mayor cantidad de biomasa, podemos recurrir a utilizar el medio F/2. Estos estudios abren horizontes para optimizar los bioprocesos que hoy en día, aún se encuentran en investigación para alcanzar una viabilidad técnico-económica favorable, sin dejar de lado el aspecto medioambiental, ya que el cultivo y aprovechamiento de estos recursos puede ser bajo un esquema sustentable. Se recomienda hacer análisis de otros parámetros como la acumulación de lípidos, proteínas y carbohidratos, para la elaboración de biocombustibles como biodiésel y biogás.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) Unidad Mazatlán por el apoyo en el desarrollo de este proyecto. Se agradece a la M.C Irma Eugenia Martínez Rodríguez (CIAD), por el apoyo en las actividades de espectrofotometría, a la M.C Gabriela Aguilar Zarate (CIAD) por el apoyo en el desarrollo de los cálculos y análisis de resultados, a Gabriela Velasco Blanco (CIAD), Jesús Alejandro Ramírez Vargas (CIAD) por el apoyo en la capacitación de cultivo de microalgas, al Dr. Juan Manuel Martínez Brown (CIAD) por el apoyo con el espacio, equipo y material para el desarrollo de la investigación, y finalmente a Virginia Patricia Domínguez Jiménez (CIAD) por el apoyo con las mediciones de clorofila.

DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERÉS

Se declara que no existen conflictos de interés con respecto a la investigación, la autoría y/o la publicación de este manuscrito.

REFERENCIAS

- Barraza, C. R. M. (2011). *Inducción lipídica por limitación de nutrientes en las microalgas Scenedesmus dimorphus y Chlorella sorokiniana* [Tesis de maestría, Centro de Investigación en Materiales Avanzados]. Repositorio Institucional CIMAV. <https://cimav.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1004/2306>
- Boulay, C., Abasova, L., Six, C., Vass, I., & Kirilovsky, D. (2008). Occurrence and function of the orange carotenoid protein in photoprotective mechanism in various cyanobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1777(10), 1344–1354. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.07.002>
- Brito, D., Castro, A., Colivet, J., Gómez, E., & Mora, R. (2013). Cinética de crecimiento de un cultivo mixto de las microalgas *Hyaloraphidium contortum* y *Pseudokirchneriella subcapitata*.

- Interciencia*, 38(8), 604–608. <https://www.redalyc.org/pdf/339/33928557009.pdf>
- Brown, R. M., Jr., Larson, D. A., & Bold, H. C. (1964). Airborne algae: Their abundance and heterogeneity. *Science*, 143(3606), 583–585. <https://doi.org/10.1126/science.143.3606.583>
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3), 294–306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>
- Dean, A. P., Sigee, D. C., & Pittman, B. E. J. K. (2010). Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. *Bioresource Technology*, 101(12), 4499–4507. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.065>
- Díaz-Escudero, J. D., Cárdenas, D. A. C. A., & Ayala, D. G. (2023). Cinética de crecimiento y producción de pigmentos de cepas nativas de *Scenedesmus* aisladas de un sistema de tratamiento de agua residual en La Guajira colombiana. *Ciencia e Ingeniería*, 10(1), e8091836. <https://doi.org/10.5281/zenodo.8091836>
- Difusa, A., Talukdar, J., Kalita, M. C., Mohanty, K., & Goud, V. V. (2015). Effect of light intensity and pH condition on the growth, biomass and lipid content of microalgae *Scenedesmus* species. *Biofuels*, 6(1–2), 37–44. <https://doi.org/10.1080/17597269.2015.1045274>
- Fernandes, A. S., Petry, F. C., Mercadante, A. Z., Jacob-Lopes, E., & Zepka, L. Q. (2020). HPLC-PDA-MS/MS as a strategy to characterize and quantify natural pigments from microalgae. *Current Research in Food Science*, 3, 100–112. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2020.03.009>
- Ferreira, V. S., Pinto, R. F., & Sant'Anna, C. (2016). Low light intensity and nitrogen starvation modulate the chlorophyll content of *Scenedesmus dimorphus*. *Journal of Applied Microbiology*, 120(3), 661–670. <https://doi.org/10.1111/jam.13007>
- da Silva Ferreira, V., & Sant'Anna, C. (2017). Impact of culture conditions on the chlorophyll content of microalgae for biotechnological applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(1), 20. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2181-6>
- Fidalgo, J. P., Cid, A., Torres, E., Sukenik, A., & Herrero, C. (1998). Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*, 166(1–2), 105–116. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00278-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00278-6)
- Fasaei, F., Bitter, J. H., Slegers, P. M., & Van Boxtel, A. J. B. (2018). Techno-economic evaluation of microalgae harvesting and dewatering systems. *Algal Research*, 31, 347–362. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.038>
- García-Cañedo, J. C., Cristiani-Urbina, E., Flores-Ortiz, C. M., Ponce-Noyola, T., & Olivia, R. (2009). Obtención de carotenoides a partir de la microalga *Scenedesmus incrassatulus*. *Memorias del Congreso de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería*. https://smbb.mx/congresos%20smbb/acapulco09/TRABAJO_S/AREA_III/OIII-10.pdf
- Georgiopoulou, I., Louli, V., & Magoulas, K. (2023). Comparative study of conventional, microwave-assisted and supercritical fluid extraction of bioactive compounds from microalgae: The case of *Scenedesmus obliquus*. *Separations*, 10(5), 290. <https://doi.org/10.3390/separations10050290>
- Godoy-Hernández, G., & Vázquez-Flota, F. A. (2006). Growth measurements: Estimation of cell division and cell expansion. In F. A. Vázquez-Flota & J. J. Loyola-Vargas (Eds.), *Plant cell culture protocols* (pp. 51–58). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-959-1:1051>
- Halim, R., & Danquah, M. K. (2013). Bioprocess development for chlorophyll extraction from microalgae. In J. W. Lee (Ed.), *Advanced biofuels and bioproducts* (pp. 365–379). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3348-4_34
- Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(2), 157–173. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>
- Herrera, M., & Roca, M. (2023). Microalgal chlorophylls for food/feed applications. In *Handbook of food and feed from microalgae* (pp. 147–160). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99196-4.00041-3>
- Ishaq, A. G., Matias-Peralta, H. M., & Basri, H. (2016). Bioactive compounds from green microalga *Scenedesmus* and its potential applications: A brief review. *Journal of Tropical Agricultural Science*, 39(1), 13–20. <http://psasir.upm.edu.my/id/eprint/58220/1/JTAS%20Vol.%2039%20281%29%20Feb.%202016%20%28View%20Full%20Journal%29.pdf#page=13>

- Iba, W., Akib, N. I., Jumardin, L. O. M., Arif, B., Yosalina, S., & Andas, J. A. (2023). Organic culture media for sustainable carotenoid production from microalgae. *IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.109789>
- 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), 36. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>
- Khodadadianzaghmari, F., Jahadi, M., & Goli, M. (2024). Biochemical profile of *Scenedesmus* isolates, with a main focus on the fatty acid profile. *Food Science & Nutrition*, 12(8), 5922–5931. <https://doi.org/10.1002/fsn3.425>
- Lodi, A., Binaghi, L., De Faveri, D., Carvalho, J. C. M., Converti, A., & Del Borghi, M. (2005). Fed-batch mixotrophic cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina platensis*, Cyanophyceae) with carbon source pulse feeding. *Annals of Microbiology*, 55(3), 181–185. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20053180728>
- Maroneze, M. M., Herrera, C. A. M., & Jiménez, A. M. (2021). Perspectivas sobre los sistemas de cultivo de microalgas: Una revisión crítica [Insights into microalgae culture systems: A critical review]. *BioTecnología*, 25(5), 11–34. <https://smbb.mx/wp-content/uploads/2021/12/Manzoni-Maroneze-et-al.-2021.pdf>
- Maroneze, M. M., Zepka, L. Q., Lopes, E. J., Pérez-Gálvez, A., & Roca, M. (2019). Chlorophyll oxidative metabolism during the phototrophic and heterotrophic growth of *Scenedesmus obliquus*. *Antioxidants*, 8(12), 600. <https://doi.org/10.3390/antiox8120600>
- Mikschofsky, H., Hammer, M., Schmidtke, J., König, P., Keil, G., Schirrmeier, H., & Broer, I. (2009). Optimization of growth performance of freshly induced carrot suspensions concerning PMP production. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 45, 740–749. <https://doi.org/10.1007/s11627-008-9189-z>
- Morales, E., Macías, D., García, L., Loor, Y., & Plúas, L. (2019). Efecto de la salinidad y pH en la composición bioquímica de la microalga *Scenedesmus* sp. en cultivos discontinuos. *Revista Científica Ciencias Naturales y Ambientales*, 13(1), 50–56. <https://doi.org/10.53591/cna.v13i1.352>
- Morales, E., Luna, V., Navarro, L., Santana, V., Gordillo, A., & Arévalo, A. (2017). Diversidad de microalgas y cianobacterias en muestras provenientes de diferentes provincias del Ecuador, destinadas a una colección de cultivos. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 34, 129–149. <https://doi.org/10.26807/remcb.v34i1-2.240>
- Nichols, H. W., & Bold, H. C. (1965). *Trichosarcina polymorpha* gen. et sp. nov. *Journal of Phycology*, 1(1), 34–38. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1965.tb04552.x>
- Ozkurt, I. (2009). Qualifying of safflower and algae for energy. *Energy Education Science and Technology Part A - Energy Science and Research*, 23, 145–151. <https://doi.org/10.1007/978-1-84996-050-2>
- Phuong, N. T. D., & Ly, D. T. B. (2023). Investigation of the influence of microalgal culture medium on biomass production. *Vietnam Journal of Biotechnology*, 21(4), 699–705. <https://doi.org/10.15625/1811-4989/20567>
- Price, N. M., & Harrison, P. J. (1987). Comparison of methods for the analysis of dissolved urea in seawater. *Marine Biology*, 94, 307–317. <https://doi.org/10.1007/BF00392945>
- Pratiwi, N. T. M., Widigdo, B., Krisanti, M., Ayu, I. P., & Iswantari, A. (2023). The potential of modified karst water as a substitute for microalgae culture media. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 1260, No. 1, p. 012007). IOP Publishing. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1260/1/012007>
- Quevedo, C., Morales, S. P., & Acosta, A. (2008). *Scenedesmus* sp. growth in different culture mediums for microalgal protein production. *Vitae*, 15(1). <https://www.redalyc.org/pdf/1698/169815394004.pdf>
- Ribeiro-Rodrigues, L., Arenzon, A., Raya-Rodríguez, M., & Fontoura, N. (2011). Algal density assessed by spectrophotometry: A calibration curve for the unicellular algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 225–228. <https://doi.org/10.5897/JECE2011.025>
- Rinawati, M., Sari, L. A., & Pursetyo, K. T. (2020). Chlorophyll and carotenoids analysis spectrophotometer using method on microalgae. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental*

- Science* (Vol. 441, No. 1, p. 012056). IOP Publishing. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/441/1/012056>
- Rinanti, A., Kardena, E., Astuti, D. I., & Dewi, K. (2013). Growth response and chlorophyll content of *Scenedesmus obliquus* cultivated in different artificial media. *Asian Journal of Environment Biology*, 1(1), 1–9. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3370.7926>
- Santo, G. E., Barros, A., Costa, M., Pereira, H., Trovão, M., Cardoso, H., ... & Silva, J. L. (2023). *Scenedesmus rubescens* heterotrophic production strategies for added value biomass. *Marine Drugs*, 21(7), 411. <https://doi.org/10.3390/md21070411>
- Santos-Ballardo, D. U., Rossi, S., Hernández, V., Gómez, R. V., del Carmen Rendón-Unceta, M., Caro-Corrales, J., & Valdez-Ortiz, A. (2015). A simple spectrophotometric method for biomass measurement of important microalgae species in aquaculture. *Aquaculture*, 448, 87–92. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.05.044>
- Sarkar, S., Manna, M. S., Bhowmick, T. K., & Gayen, K. (2020). Extraction of chlorophylls and carotenoids from dry and wet biomass of isolated *Chlorella thermophila*: Optimization of process parameters and modelling by artificial neural network. *Process Biochemistry*, 96, 58–72. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.05.025>
- Shaikh, R., Rizvi, A., Pandit, S., Desai, N., & Patil, R. (2022). Microalgae: Classification, bioactives, medicinal properties, industrial applications, and future prospectives. En *An Integration of Phycoremediation Processes in Wastewater Treatment* (pp. 451–486). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823499-0.00004-3>
- Sun, D., Wu, S., Li, X., Ge, B., Zhou, C., Yan, X., ... & Cheng, P. (2024). The structure, functions and potential medicinal effects of chlorophylls derived from microalgae. *Marine Drugs*, 22(2), 65. <https://doi.org/10.3390/md22020065>
- Tapia-López, L., Chairez, I., Guerrero-Barajas, C., & Fernandez-Linares, L. C. (2024). Effect of nitrogen source and its concentration on *Scenedesmus dimorphus* productivity under photoautotrophic growth conditions. *Authorea Preprints*. <https://doi.org/10.22541/au.170664855.50804907/v1>
- Thakur, N., Gurav, R., Yang, Y. H., & Bhatia, S. K. (2022). Microalgal consortia and their biotechnological applications. En *Algal Biorefineries and the Circular Bioeconomy* (pp. 277–301). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003195429-8>
- Udayan, A., Pandey, A. K., Sirohi, R., Sreekumar, N., Sang, B. I., Sim, S. J., ... & Pandey, A. (2023). Production of microalgae with high lipid content and their potential as sources of nutraceuticals. *Phytochemistry Reviews*, 22(4), 833–860. <https://doi.org/10.1007/s11101-021-09784-y>
- Pandey, A., Shah, R., Yadav, P., Verma, R., & Srivastava, S. (2020). Harvesting of freshwater microalgae *Scenedesmus* sp. by electro-coagulation–flocculation for biofuel production: Effects on spent medium recycling and lipid extraction. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 3497–3507. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06897-y>
- Verduga, M. E. (2020). *Cultivo en batch de Scenedesmus spp. en aguas residuales de industrias lácteas: Crecimiento, productividad y composición bioquímica* [Tesis doctoral, Universidad de Guayaquil]. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/48682>
- Vázquez, C. G., & Ayala, I. A. (2017). Aislamiento, identificación y curva de crecimiento de la microalga *Scenedesmus obliquus* con fines biotecnológicos. *Jóvenes en la Ciencia*, 3(1), 144–148. <https://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/860>
- Vázquez-Romero, B., Perales, J. A., Vree, J. H., Böpplé, H., Steinrücken, P., Barbosa, M. J., Kleinegris, D. M. M., & Ruiz, J. (2022). Techno-economic analysis of microalgae production for aquafeed in Norway. *Algal Research*, 64, 102679. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102679>
- Wibisono, Y., Agung Nugroho, W., Akbar Devianto, L., Adi Sulianto, A., & Roil Bilad, M. (2019). Microalgae in food–energy–water nexus: A review on progress of forward osmosis applications. *Membranes*, 9(12), 166. <https://doi.org/10.3390/membranes9120166>
- Yadav, K., Nikalje, G. C., Pramanik, D., Suprasanna, P., & Rai, M. P. (2023). Screening of the most effective media for bioprospecting three indigenous freshwater microalgae species. *International Journal of Plant Biology*, 14(3), 558–570. <https://doi.org/10.3390/ijpb14030044>
- Zhang, Y., Ren, L., Chu, H., Zhou, X., Yao, T., & Zhang, Y. (2019). Optimization for *Scenedesmus obliquus* cultivation: The effects

- of temperature, light intensity and pH on growth and biochemical composition. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 47(4), 614–620. <https://doi.org/10.4014/mbl.1906.06005>
- Ziganshina, E. E., Bulynina, S. S., Yureva, K. A., & Ziganshin, A. M. (2023). Optimization of photoautotrophic growth regimens of Scenedesmaceae alga: The influence of light conditions and carbon dioxide concentrations. *Applied Sciences*, 13(23), 12753. <https://doi.org/10.3390/app132312753>
- Zhao, B., Zhang, Y., Xiong, K., Zhang, Z., Hao, X., & Liu, T. (2011). Effect of cultivation mode on microalgal growth and CO₂ fixation. *Chemical Engineering Research and Design*, 89(9), 1758–1762. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2011.02.018>