

Monitoreo de biomarcadores como indicadores de crecimiento de *Chlorella vulgaris*  
utilizando MALDI MS

Maicol Andrés Avellaneda Arciniegas

Trabajo de Grado para Optar al Título de Químico

Director

Inés Hernández Celi

Magister en Ciencias Básicas Biomédicas

Codirector

Luis Miguel Díaz Sánchez

Magister en Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2023

## Agradecimientos

A mis padres, Martha Arciniegas Díaz y Miguel Avellaneda Díaz, por todo el sacrificio, dedicación, cuidados, consejos, amor e infinidad de experiencias y enseñanzas que me han brindado a lo largo de toda mi vida y me han convertido en el hombre que soy.

A la profesora Inés Hernández Celi, MSc, directora de mi proyecto de grado, por toda la confianza que deposito en mí, motivándome durante todo mi proceso, haciendo de mí una mejor persona tanto académica como personalmente, GRACIAS TOTALES.

A Luis Miguel Díaz Sánchez, MSc, codirector de mi trabajo de grado, por todo el acompañamiento brindado a lo largo de mi proceso de investigación. Compartiendo su conocimiento y consejos cada día.

A la profesora Clara Inés Sánchez, por permitirme trabajar en el laboratorio 404 y brindarme sus consejos, ayuda y palabras de aliento durante todo mi proceso y al semillero de investigación Funga y a todas los integrantes que lo conforman, Lucia, David, John, Fabio, Felipe, Harrison y demás por todo lo que ayudaron.

A mis más sinceros amigos y a quienes puedo llamar hermanos Diego Mauricio Sánchez Chaparro, por todos y cada uno de los 19 años de hermandad y Sneider Alexander Pinzón Alean, por convertirse en un gran consejero y guía.

A mis compañeros del laboratorio, Bryan, Carlos P, Juanes, Laura C, Laura P, Jesús y demás por todos los momentos vividos durante la realización de nuestros trabajos, brindándonos apoyo en todo momento.

A los amigos que me brindó la universidad, “Valerrou”, “Danielaaaa”, Dallanita”, “Ehh ave maria Lilian” y “mmmñero” por todas las aventuras, risas, lágrimas, festejos, derrotas y en general, por todos los momentos que vivimos juntos durante nuestra estadía por la universidad.

A Nico y Angie por su cercanía y amistad a lo largo de estos últimos años brindándome su compañía, consejos y buenas energías siempre.

A Alicia, por su incondicionalidad durante la finalización de mi trabajo de grado, brindándome su apoyo y amor en todo momento.

**Tabla de Contenido**

	<b>Pág.</b>
Introducción .....	10
1 Marco referencial.....	12
1.1 Microalgas .....	12
1.2 <i>Chlorella vulgaris</i> .....	13
1.3 Proceso de fotosíntesis .....	17
1.4 Pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores .....	19
1.4.1 Derivados de clorofilas en procesos biológicos.....	21
1.5 Espectrometría de masas MALDI .....	24
1.5.1 Matrices MALDI .....	25
1.6 Espectrofotometría de absorción atómica .....	26
2 Objetivos.....	28
2.1 Objetivo general .....	28
2.2 Objetivos específicos .....	28
3 Metodología.....	29
3.1 Cultivo celular .....	31
3.2 Determinación de concentración celular .....	32
3.3 Determinación de biomasa .....	33
3.4 Estimación de pigmentos.....	34
3.5 Determinación de oxígeno disuelto y tasa fotosintética .....	35
3.6 Determinación de magnesio disuelto, extracelular e intracelular.....	35
3.7 Análisis MALDI.....	36
4 Discusión de resultados .....	38
4.1 Biomasa .....	38
4.2 Concentración celular .....	40
4.3 Estimación de pigmentos.....	44
4.4 Resultados de oxígeno disuelto y tasa fotosintética .....	46
4.5 Resultados de magnesio disuelto, extracelular e intracelular .....	49
4.6 Análisis MALDI.....	53
5 Conclusiones.....	64
6 Recomendaciones .....	65
7 Referencias bibliográficas .....	66
8 Apéndices .....	77

**Lista de Tablas**

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Preparación del Medio Basal de Bold.....	30

**Lista de Figuras**

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Morfología de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> .....	14
Figura 2. Modelo teórico de un crecimiento celular en un sistema discontinuo.....	17
Figura 3. Proceso de fotosíntesis .....	18
Figura 4. Pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores presentes en <i>Chlorella vulgaris</i> .....	21
Figura 5. Rutas para la obtención de derivados de clorofila.....	23
Figura 6. Esquema general de un espectrómetro de masas MALDI-TOF.....	25
Figura 7. Esquema metodológico. ....	29
Figura 8. Montaje de los 36 Erlenmeyer.....	31
Figura 9. Conteo en cámara de Neubauer.....	33
Figura 10. Determinación de biomasa de <i>Chlorella vulgaris</i> , durante el periodo de fermentación. .....	39
Figura 11. Determinación de la concentración celular de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> , durante el periodo de fermentación.....	41
Figura 12. Registro fotográfico de <i>Chlorella vulgaris</i> en el periodo de fermentación.....	43
Figura 13. Cuantificación de pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores de la especie <i>Chlorella vulgaris</i> .....	44
Figura 14. Oxígeno disuelto durante el periodo de fermentación de un cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> . ....	47
Figura 15. Resultados determinación de tasas fotosintética .....	48
Figura 16. Curva de calibración para la cuantificación de magnesio .....	51
Figura 17. Resultados determinación de contenido de magnesio .....	52

Figura 18. Espectro de masas MALDI para el extracto de pigmentos de <i>Chlorella vulgaris</i> pre-inóculos, modo de ionización positivo. Matriz MALDI DCTB, 5 mM, proporción, 1:1000 A:M. .....	54
Figura 19. Espectro de masas MALDI para el extracto de pigmentos de <i>Chlorella vulgaris</i> , modo de ionización positivo. Matriz MALDI DHB, 5 mM, proporción, 1:1000 A:M. ....	55
Figura 20. Espectro de masas MALDI para el extracto de pigmentos de <i>Chlorella vulgaris</i> , modo de ionización positivo. Matriz MALDI DCTB, 5 mM, proporción, 1:1000 A:M. ....	57
Figura 21. Cambios composicionales de derivados de clorofilas de las señales obtenidas en los extractos de acetona de <i>Chlorella vulgaris</i> en intervalos de tiempo de fermentación.....	58
Figura 22. Cambios composicionales en la familia de pigmentos fotoprotectores de las señales obtenidas de los extractos de <i>Chlorella vulgaris</i> en los intervalos de tiempo de fermentación. ..	60
Figura 23. Espectro de masas MALDI para el extracto de pigmentos de <i>Chlorella vulgaris</i> tomado de los pre-inóculos día 0, día 10 y día 25 modo de ionización positivo. Matriz MALDI DCTB, 5 mM, proporción, 11:1000A:M. ....	62

**Abreviaturas y acrónimos**

ASS	<i>Atomic Absorption Spectrometry</i> (Espectrometría de absorción atómica)
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> (Trifosfato de adenosina)
BBM	<i>Bold's Basal Medium</i> (Medio basal de Bold)
CEIAM	Centro de Estudios e Investigaciones Ambientales
CHCA	<i>α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid</i> (matrix MALDI ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico)
CIP	<i>Ciprofloxacin</i> (Ciprofloxacina)
DCTB	<i>trans-2-[3-(4-tert-butylphenyl)-2-methyl-2-propenylidene] malononitrile</i> (matriz MALDI 2-[(2E)-3-(4-terc-butilfenil)-2-metilprop-2-eniliden] malonitrilo)
DHB	<i>2,5-Dihydroxybenzoic acid</i> (matriz MALDI ácido 2,5-dihidroxibenzoico)
DO	Densidad óptica
EI	Energía de ionización
ESI	<i>Electrospray ionization</i> (ionización por electrospray)
FD	Factor de dilución
GC-MS	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases-masas)
LC-MS	<i>Liquid chromatography-mass spectrometry</i> (Cromatografía de Líquidos acoplada a la Espectrometría de masas)
m/z	Relación Masa/carga
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i> (Ionización/desorción con láser asistida por matriz)
NADPH <sub>2</sub>	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> (Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato)
ODS	Objetivos de desarrollo sostenible
ONU	Organización de las Naciones Unidas
PIE	Extracción pulsada de iones
PSI	<i>Photosystem I</i> (Fotosistema I)
PSII	<i>Photosystem II</i> (Fotosistema II)
SBBM	Solid Bold's Basal Medium (Medio basal de Bold solido)
UFC	Unidades formadoras de colonia
UV-Vis	<i>Ultraviolet Visible Spectroscopy</i> (Espectroscopía Ultravioleta-Visible)

## Resumen

**Título:** Monitoreo de biomarcadores como indicadores de crecimiento de *Chlorella vulgaris* mediante MALDI MS\*

**Autor:** Maicol Andrés Avellaneda Arciniegas\*\*

**Palabras Clave:** *Chlorella vulgaris*; Espectrometría de masas; MALDI; Pigmentos; Curva de crecimiento; Clorofilas; Carotenoides.

### Descripción:

Actualmente, las microalgas se han convertido en microorganismos de gran interés en diversos campos de aplicaciones industriales, tales como: energético, alimenticio y cosmético. La especie *Chlorella vulgaris* destaca por ser una fuente de lípidos, proteínas, carbohidratos y pigmentos fotosintéticos. La implementación de estos bioprocesos requiere de un monitoreo de crecimiento con el objetivo de garantizar la viabilidad del microorganismo y optimizar la producción. Con base a lo anterior, el presente trabajo de investigación plantea realizar el monitoreo de crecimiento de *C. vulgaris*, por medio de la técnica analítica MALDI MS. Para ello, se realizó una fermentación por lotes durante 96 días; se realizaron pruebas de viabilidad celular, tales como: conteo en cámara de Neubauer y caja Petri, densidad óptica, peso seco; y analíticas como: estimación de pigmentos fotosintéticos, cuantificación de magnesio y determinación de biomarcadores celulares de *C. vulgaris* por medio de espectrometría de MALDI MS. Las pruebas biológicas evidenciaron una curva de crecimiento propia al tipo de fermentación empleada, tipo Bach, observándose cuatro fases de desarrollo celular. Por otro lado, las pruebas analíticas permitieron correlacionar la variación de la cantidad de clorofilas a con la cantidad de magnesio empleada durante cada etapa de crecimiento. Por último, se logran identificar pigmentos como feofitina a y feoforbidas así como la presencia de  $\beta$ -caroteno y luteína los cuales presentaron un comportamiento que permiten dilucidar la fase de crecimiento en la cual se encontraba, permitiendo correlacionar dichas señales a la fase de vida de la microalga. En conclusión, la técnica analítica de espectrometría de masas MALDI puede ser empleada para realizar el seguimiento de desarrollo fisiológico durante cada etapa de crecimiento de la especie *C. vulgaris*. Lo anterior, gracias a la caracterización molecular y a la variabilidad de abundancia de los diversos biomarcadores durante el periodo de fermentación.

---

\* Trabajo de Grado

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Química. Director: Inés Hernández Celi. Magister en Ciencias Básicas Biomédicas. Codirector: Luis Miguel Díaz Sánchez. Magister en Química.

## Abstract

**Title:** Monitoring of biomarkers as indicators of growth of *Chlorella vulgaris* by MALDI MS

\*

**Author(s):** Maicol Andrés Avellaneda Arciniegas\*\*

**Key Words:** *Chlorella vulgaris*; Mass spectrometry; MALDI; Pigments; Growth curve; Chlorophylls; Carotenoids.

### Description:

Currently, microalgae have become microorganisms of great interest in various fields of industrial applications, such as energy, food, and cosmetics. The species *Chlorella vulgaris* is a good source of lipids, proteins, carbohydrates, and photosynthetic pigments. These bioprocesses require growth monitoring to guarantee the viability of the microorganism and optimize production. Based on the above, the present research work proposes to monitor the growth of *C. vulgaris* using the analytical technique MALDI MS. For this purpose, a batch fermentation was carried out for 96 days; microbiological tests were performed, such as: counting in Neubauer chamber and Petri dish, optical density, dry weight; and analytical tests such as: Photosynthetic pigment estimation, magnesium quantification and determination of cellular biomarkers of *C. vulgaris* by MALDI MS spectrometry. The biological tests evidenced a growth curve typical of the type of fermentation used, Bach type, showing four phases of cellular development. On the other hand, the analytical tests allowed correlating the variation in the amount of chlorophyll a with the amount of magnesium used during each growth stage. Finally, pigments such as pheophytin a and pheophorbides were identified, as well as the presence of  $\beta$ -carotene and lutein, which presented a behavior according to the growth stage in which they were found, thus allowing correlating these signals to the life stage of the microalgae. In conclusion, MALDI mass spectrometry can be used to monitor the physiological development during each growth stage of *C. vulgaris* species. This, thanks to the molecular characterization and abundance variability of the different biomarkers during the fermentation.

---

\* Bachelor Thesis

\*\* Faculty of Science. School of Chemistry. Director: Inés Hernández Celi. M.Sc Basic Biomedical Science. Codirector: Luis Miguel Díaz Sánchez. M.Sc. in Chemistry.

## Introducción

Uno de los principales intereses mundiales a nivel científico es contrarrestar las consecuencias de la sobreexplotación de los recursos naturales, por ello en el 2015 se crean los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) por parte de la Organización de Naciones Unidas (ONU), con el fin de dar solución a 17 problemáticas de interés ambiental, económico y social. En los últimos años, a raíz de la implementación de los ODS, el pilar de la investigación es la búsqueda y aprovechamiento de materiales y organismos renovables que permitan una sostenibilidad entre el ambiente y la vida humana.

Entre los organismos de investigación actual se encuentran las microalgas, dada su aplicación en diversas áreas industriales como: alimenticia, energética y cosmética debido a las características que estas poseen; alta tasa de fijación de CO<sub>2</sub> atmosférico, rápida tasa de reproducción, elevadas concentraciones de pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores, entre otras. (Abalde et al., 1995; Spolaore et al., 2006).

En particular, la especie algal *Chlorella vulgaris* es una microalga unicelular eucariota de núcleo definido sin presencia de flagelo que pertenece al grupo protista (Prieto, 2020; Safi et al., 2014). Desde su descubrimiento en el año 1890 por el científico holandés Martinus Willem Beijerinck (Prieto, 2020; Safi et al., 2014) la microalga *C. vulgaris* se ha utilizado activamente en numerosos campos de aplicación entre los de mayor auge la producción de biocombustibles (Wong et al., 2017).

La especie *Chlorella vulgaris* destaca por tener adaptabilidad a diversos factores extrínsecos, como variaciones de temperatura, concentraciones de (CO<sub>2</sub>), cambios de pH, disponibilidad de nutrientes, entre otros (Chia et al., 2013). Debido a esto, *C. vulgaris* puede

presentar diversos perfiles bioquímicos con base a la cantidad de nutrientes presentes y las condiciones en las cuales se encuentra (Safi et al., 2014). Por tal motivo, realizar un monitoreo composicional de crecimiento para determinar la producción de metabolitos en relación con los parámetros previamente establecidos para su crecimiento, se convierte en una necesidad en los diversos campos industriales en los cuales se implementa la microalga.

Actualmente, existen muchas variables a tener en cuenta al momento de realizar un monitoreo de crecimiento, destacando los ensayos de peso seco, densidad óptica (DO), recuento en cámara de Neubauer (Mohammed Ali et al., 2012; Vonshak, 1993). En simultáneo con un monitoreo de crecimiento celular cuantificando pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores, *i.e.*, dado que *C. vulgaris* sintetiza clorofilas, compuestas por un anillo tetrapirrol unido a un átomo de magnesio central y una cadena hidrofóbica (Masojídek et al., 2013), y carotenoides, los cuales se asocian directamente con la etapa de vida en la que se encuentra el microorganismo (Elisabeth et al., 2021). Aparte de las técnicas tradicionales para realizar un seguimiento de microorganismos se ha empleado el análisis de pigmentos mediante la técnica de espectroscopia UV-Vis y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés)(Silveira et al., 2018; Soto-Ramírez et al., 2021). Los reportes de (Al Dayel & El Sherif, 2021; Zahedi Dizaji et al., 2021) muestra la efectividad de la técnica de HPLC para realizar el seguimiento de pigmentos a través de los días de cultivo tanto en *S. trochoidea* y *C. vulgaris*, llegando a caracterizar 10 tipos de pigmentos y composición fotoquímica, respectivamente. De igual manera, (Pantami et al., 2020) implementó las técnicas de cromatografía de gases (GC, por sus siglas en inglés) y cromatografía líquida (LC, por sus siglas en inglés) acoplada a espectrometría de masas (MS) empleando ionización por electroespray (ESI, por sus siglas en inglés), obteniendo un perfil pigmentario, lipídico, proteínico de la especie *Chlorella vulgaris*. Es de importancia destacar que a pesar de que

las técnicas mencionadas son altamente confiables presentan tiempos largos de muestreo o una preparación extenuante de las muestras, lo que puede degradar la muestra o formar derivados del compuesto a analizar. Por tal motivo, en el presente trabajo de investigación se busca implementar espectrometría de masas MALDI, técnica de ionización suave que permite la caracterización de moléculas de alto peso molecular para evaluarla como estrategia de monitoreo en *C. vulgaris* bajo condiciones controladas, mediante la detección de biomarcadores fotosintéticos y fotoprotectores.

## 1 Marco referencial

### 1.1 Microalgas

Las microalgas son un amplio conjunto de microorganismos que pueden habitar diversos tipos de hábitats, desde ecosistemas acuáticos, terrestres, áridos, tundra, entre otros (Connelly, 2014; Rizwan et al., 2018; Singh & Saxena, 2015). Se estima que existen como mínimo 100,000 especies de microalgas (Connelly, 2014) pero se cree que la variedad de especies puede ascender hasta varios miles o millones (Figuroa-torres et al., 2020; Singh & Saxena, 2015). No hay una forma general de clasificar a las microalgas debido a las numerosas características metabólicas y bioquímicas. Sin embargo, los parámetros más aceptados para categorizarlas se basan en la composición metabólica -perfiles metabólicos- (Johansen, 2012; Liang et al., 2015; Singh & Saxena, 2015)

Las microalgas presentan características que las convierten en el objetivo principal de numerosas investigaciones en diferentes campos de la industria, *e.g.*, la producción de biocombustibles, tratamiento de aguas residuales, fijación de CO<sub>2</sub>, alimentación humana y animal,

productos cosméticos, producción de pigmentos y biofertilizantes, entre otros (Abalde et al., 1995; Johansen, 2012; Rizwan et al., 2018).

Las microalgas son organismos que crecen en tres tipos de cultivos; a saber, foto autotrófico, heterotrófico y mixotrófico (de Andrade & de Andrade, 2017; J. Wang et al., 2014). En los cultivos foto autotróficos se utiliza CO<sub>2</sub>, radiación solar y nutrientes disueltos para promover el crecimiento de las microalgas gracias al proceso de fotosíntesis, este tipo de cultivos es ampliamente utilizado y típicamente se realiza en sistemas abiertos o biorreactores (Connelly, 2014; de Andrade & de Andrade, 2017; Safi et al., 2014; J. Wang et al., 2014).

Por otra parte, los cultivos heterotróficos son independientes de la luz, *i.e.*, no es necesario que ocurra fotosíntesis para que crezca el microorganismo, en este tipo de cultivos se requiere una fuente de carbono disponible en el medio (Connelly, 2014; de Andrade & de Andrade, 2017; Safi et al., 2014; J. Wang et al., 2014). Por último, los cultivos mixotróficos, se caracterizan por ser una mezcla de los cultivos foto autótrofos y heterótrofos. Los cultivos mixotróficos obtienen energía para su proliferación tanto del proceso de la fotosíntesis como de las fuentes de carbono disponibles en el medio (de Andrade & de Andrade, 2017; Safi et al., 2014; J. Wang et al., 2014).

## 1.2 *Chlorella vulgaris*

La especie *Chlorella vulgaris* es una microalga unicelular esférica de un tamaño que oscila entre 2 y 10 µm de diámetro perteneciente al dominio eucariota y reino protista (Daliry et al., 2017; de Andrade & de Andrade, 2017; Safi et al., 2014). Morfológicamente, *C. vulgaris* presenta una estructura muy similar a las células vegetales, cuenta con una membrana celular formada de una bicapa lipídica, la cual se encarga de darle protección y rigidez. Además, que presenta una pared celular formada por la unión β 1-4 de varios monómeros de glucosa formando el polisacárido de

celulosa. En el interior de la célula se encuentran todos los organelos celulares *i.e.*, mitocondria, vacuola, núcleo, aparato de Golgi, entre otros. De igual manera, presenta un único cloroplasto en el cual se sintetizan los pigmentos necesarios para el proceso de fotosíntesis. Las clorofilas son sintetizadas en mayor proporción con respecto a los carotenoides (Safi et al., 2014).

### Figura 1.

Morfología de la microalga *Chlorella vulgaris*.

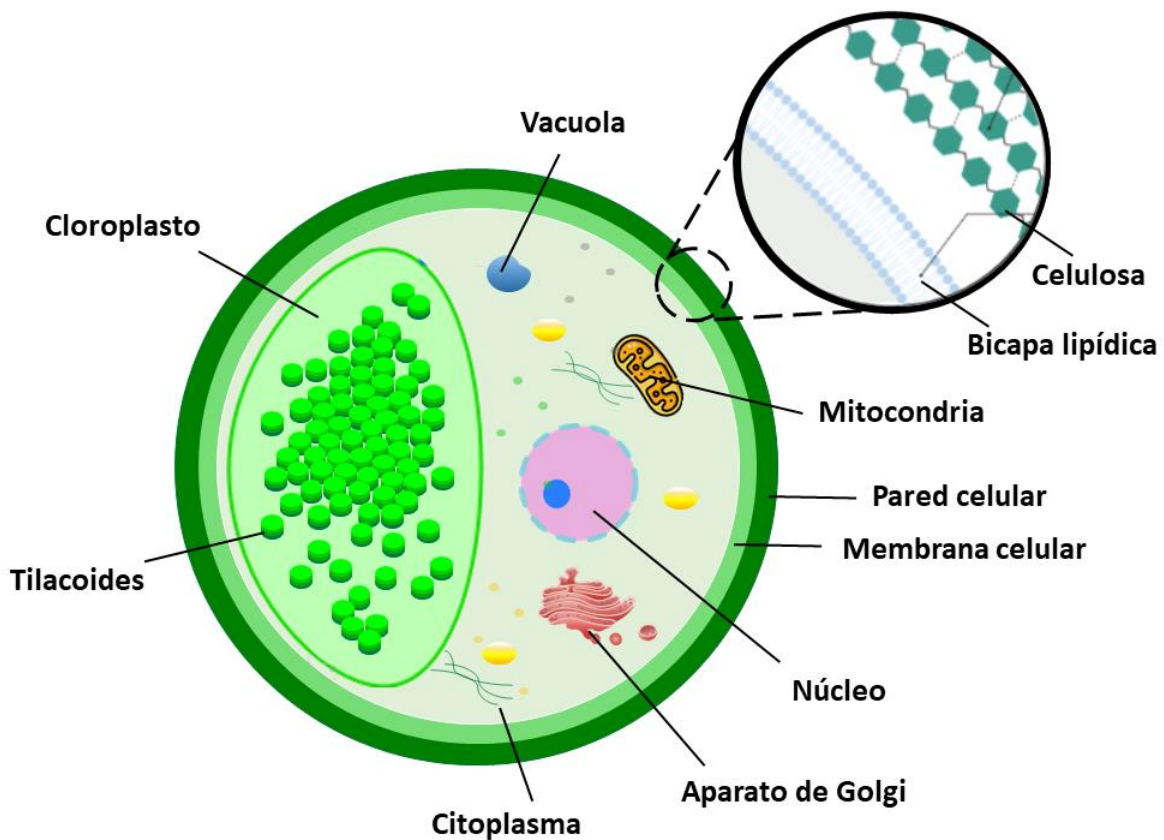


Imagen basada de (Blanco, 2021; Safi et al., 2014).

*Chlorella vulgaris* es una de las microalgas verdes más estudiadas por sus diversas aplicaciones y cultivo fácil (Silveira et al., 2018; Soto-Ramírez et al., 2021). Una de las características principales por la cual destaca esta microalga es la alta producción de biomasa, gracias a la capacidad de reproducirse asexualmente por medio de la técnica de esporulación, *i.e.*, de una célula madre se generan cuatro células hijas (Daliry et al., 2017; Safi et al., 2014). La microalga *C. vulgaris* presenta aplicaciones en diversos campos *e.g.*, ambiental; utilizada en el tratamiento de aguas residuales, gracias a la capacidad en la remoción de metales pesados (Cu, Zn, Ni, Cd, Pb y U) y de compuestos nitrogenados y fosforados. Asimismo, *C. vulgaris* es capaz de fijar hasta un 74% de dióxido de carbono en ambientes cerrados y reducir la demanda química de oxígeno de un 61% a un 86% (Safi et al., 2014; Silva et al., 2022).

Por otro lado, la composición química de la especie *Chlorella vulgaris* la otorga un atractivo a diversos sectores industriales *e.g.*, cosmético, alimenticio tanto animal como humano, farmacéutico y energético, debido a que su composición química rica en proteínas (~56,8%), lípidos (~16,9%), carbohidratos (~5,9%), pigmentos fotosintéticos (~1-2%) y vitaminas (B1, B2, B3, B12, E, K, D) (de Andrade & de Andrade, 2017; Silva et al., 2022).

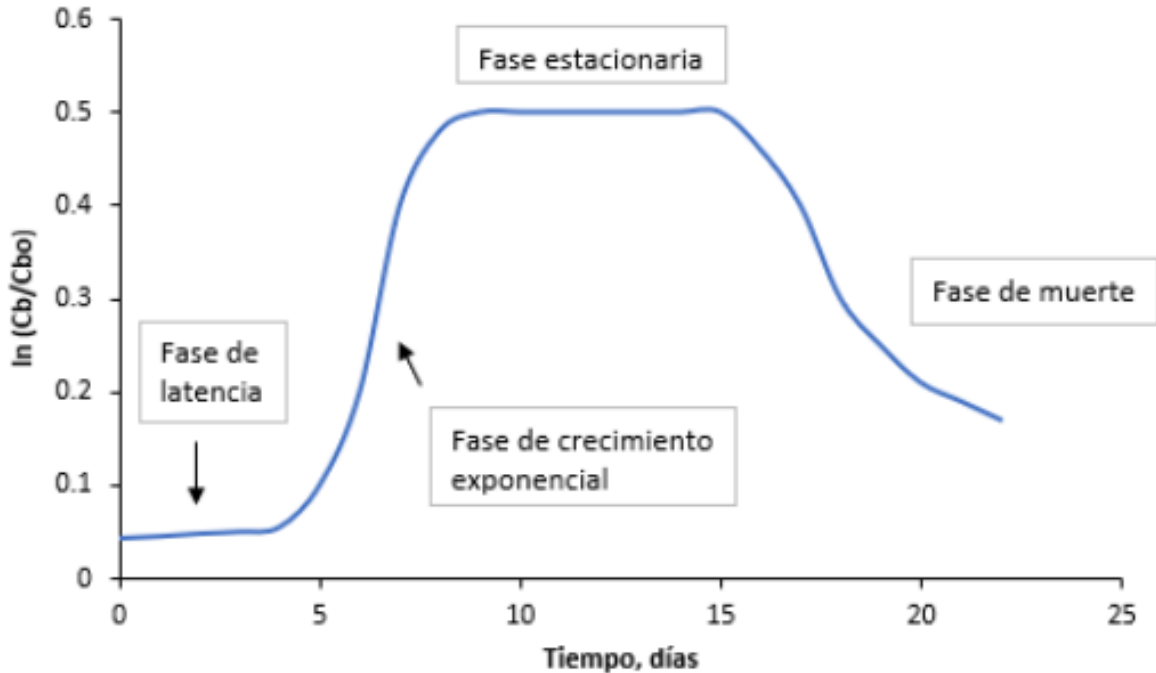
En el sector energético, la especie *Chlorella vulgaris* ha sido ampliamente estudiada para la producción de biocombustible de tercera generación, obtenido a partir de la biomasa de microorganismos. *C. vulgaris* es catalogado como una especie con una alta tasa de reproducción, pero presenta unos bajos niveles de producción de lípidos para su posterior transformación en biocombustible; por ello, se ha venido estudiando las condiciones óptimas para que la producción de lípidos en este microorganismo llegue hasta un 40% en relación con su peso seco y así lograr una mejor optimización al momento realizar de la síntesis de biocombustibles (Daliry et al., 2017; Safi et al., 2014; Silva et al., 2022).

Así mismo, en el sector alimenticio, las microalgas han tenido un alto impacto llegando a destinar hasta un 30% de su producción mundial para fines de alimentación animal (Becker, 2007). Así como, el área de la acuicultura; destacando la piscicultura, crianza de peces, como una de las más usadas para esta práctica, debido a los altos valores nutricionales que ofrece como alimento tanto a peces pequeños como a larvas, moluscos y camarones (de Andrade & de Andrade, 2017; Safi et al., 2014).

Durante el crecimiento celular de *C. vulgaris* se pueden identificar cuatro fases, gracias a al método de fermentación en lote (véase **Figura 2**). Primeramente, se presenta la fase de latencia, crecimiento exponencial, estacionaria y muerte. La fase de latencia se presenta inmediatamente después de la inoculación de la microalga en el caldo de cultivo, *i.e.*, no se evidencia proceso de reproducción. Seguidamente, en la fase de crecimiento exponencial, las células de la microalga se reproducen a la velocidad máxima dependiendo de las condiciones del medio. Luego, el cultivo llega a una fase estacionaria en donde ocurre una disminución en la reproducción celular, obteniendo una población constante de microalgas y, por último, se presenta la fase de muerte, como consecuencia del déficit de nutrientes en el medio (Prieto, 2020).

**Figura 2.**

Modelo teórico de un crecimiento celular en un sistema discontinuo



Tomada de (Prieto, 2020).

### 1.3 Proceso de fotosíntesis

La especie *Chlorella vulgaris* es un organismo foto autótrofo, *i.e.*, tiene la capacidad de realizar el proceso de fotosíntesis que se da en el cloroplasto, más específicamente en la membrana de los tilacoides y estroma (Elisabeth et al., 2021). La fotosíntesis es un proceso único en el cual compuestos inorgánicos, con ayuda de energía solar, son transformados en materia orgánica. Este proceso se lleva principalmente en dos fases: reacciones en fase de luz y en fase de oscuridad (véase **figura 3**) (Masojídek et al., 2013).

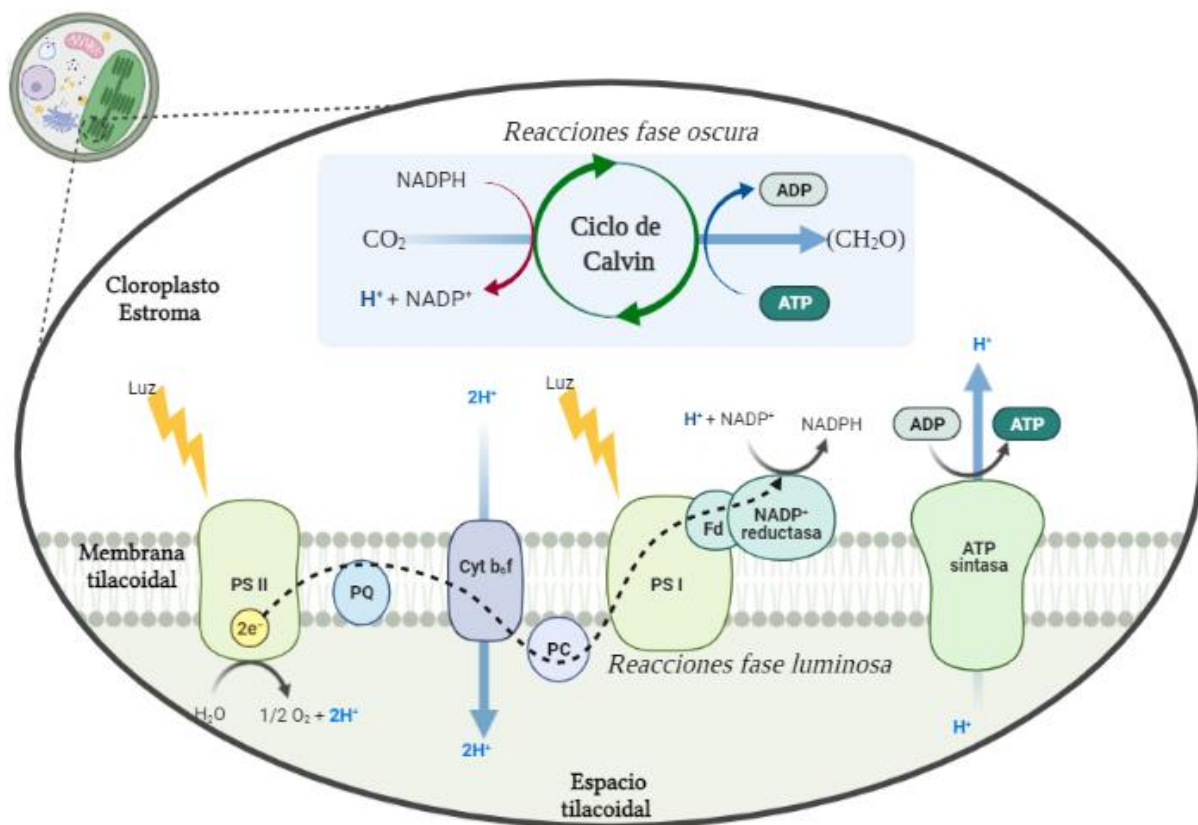
Durante la primera fase de la fotosíntesis -fase luminosa-, se lleva a cabo el proceso de captación de la radiación electromagnética, el cual ocurre en la membrana de los tilacoides. En

esta primera fase, los fotones son captados por los complejos antena, conformados en gran parte por pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores, y ocurre la conversión de energía lumínica en energía química produciendo  $NADPH_2$  y ATP.

Una vez la microalga se encuentre en un entorno ausente de luz, a nivel del estroma, se da inicio a la segunda fase de la fotosíntesis. En esta segunda fase, las especies químicas previamente sintetizadas cumplen la función de sustratos y, junto con las fuentes de carbono inorgánico ( $CO_2$ ) captadas del medio, se da inicio al proceso de síntesis de compuestos orgánicos (Kliphuis, 2010; Masojídek et al., 2013).

**Figura 3.**

Proceso de fotosíntesis



*Nota:* Etapas del proceso de fotosíntesis en la microalga *Chlorella vulgaris*. Imagen tomada y adaptada de “*Light Dependent Reactions of Photosynthesis*” BioRender.com (2022).

[BioRender.com](https://www.biorender.com)

#### 1.4 Pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores

Los pigmentos fotosintéticos son indispensables para el proceso de fotosíntesis, se encuentran concentrados en su mayoría en estructuras denominadas complejos antena, propios de los fotosistemas (PSI y PSII), cuya función principal es la captación de energía proveniente del Sol. Los pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores pueden alcanzar entre 1% y 2% del peso seco de la microalga (Safi et al., 2014; Silva et al., 2022). Estos pigmentos, aparte de su labor fotosintética, tienen diversas aplicaciones *e.g.*, en la industria cosmética, en clínicas y farmacéuticas, debido a su actividad antioxidante que les permite actuar como agente protector contra la degradación por especies reactivas de oxígeno y reacciones de fotoinhibición (de Andrade & de Andrade, 2017; Safi et al., 2014). Además, los pigmentos fotosintéticos son empleados como indicadores del crecimiento de microalgas, debido a que se asocian directamente con la cantidad de biomasa presente en el cultivo (Elisabeth et al., 2021; Mohammed Ali et al., 2012).

Entre los pigmentos fotosintéticos tenemos las clorofilas; moléculas de tonalidad verde estructuralmente, se componen por un anillo tetrapirrol (véase **figura 4**); donde, los átomos de nitrógeno orientados hacia el interior del anillo están en coordinación con el ion metálico divalente de magnesio (Mg). Además, las clorofilas poseen una cadena lateral denominada fitol (alcohol terpenoide C<sub>20</sub>). Existen varios tipos de clorofila, que se diferencian debido a variaciones en los sustituyentes del anillo tetrapirrol (véase **figura 4**). El anillo tetrapirrol actúa como cromóforo y permite la absorción de luz y la cadena fitol se encarga de mantener la molécula de clorofila fija

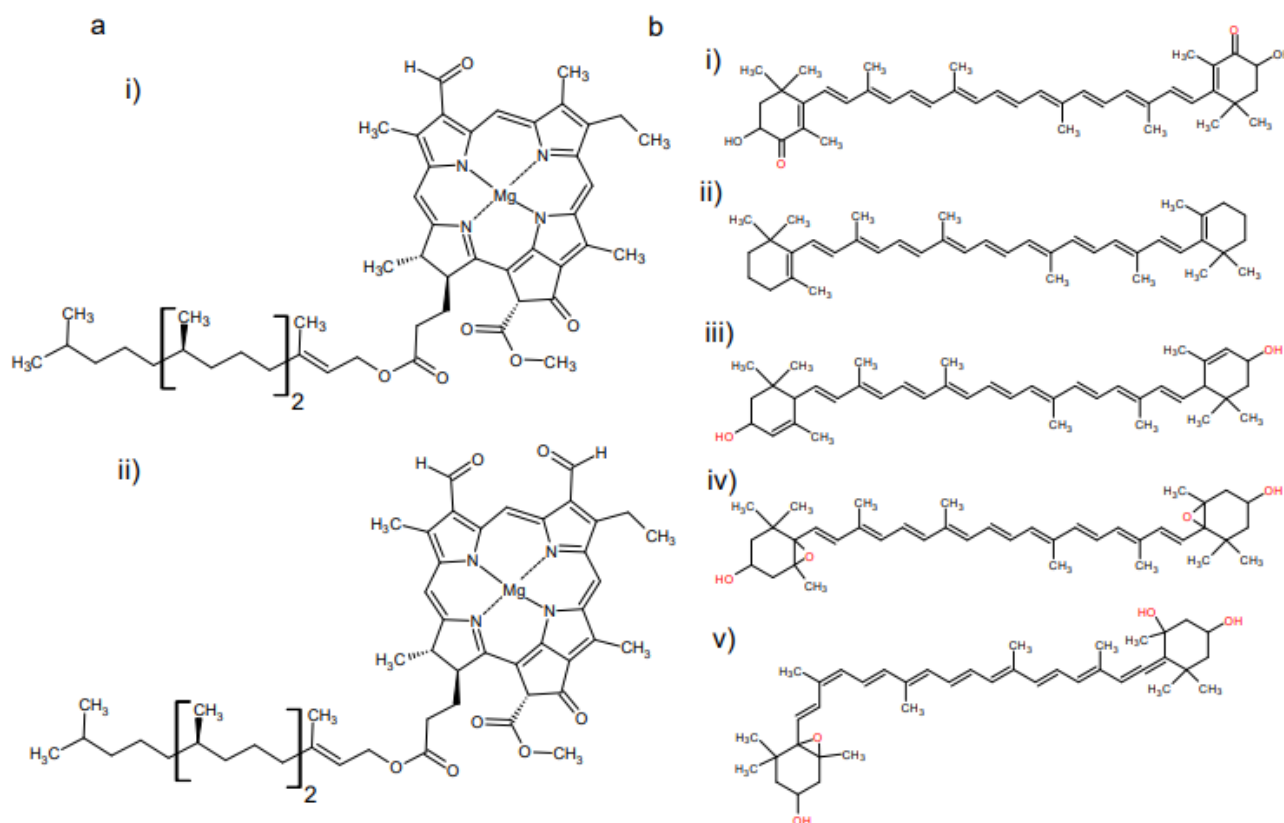
en la membrana de los tilacoides, para llevar a cabo su función biológica (Masojídek et al., 2013; Scheer, 2013).

De igual manera se pueden encontrar los carotenoides; compuestos de tonalidad roja, naranja o amarilla, que se pueden encontrar en un amplio número de organismos, son tanto estructural como funcionalmente más diversos que las clorofilas. La mayoría de los carotenoides presentan una estructura formada por tetraterpenos, tienen una cadena de 20 carbonos de carbono denominada geranylgeraniol, la cual se encuentra en la mayoría de los carotenoides. Los carotenoides se unen cola con cola a otra cadena de 32 átomos de carbono con ocho cadenas laterales de metilo en su ruta biosintética (véase **figura 4**) (Gong & Bassi, 2016; Scheer, 2013).

Típicamente, en las microalgas están presentes dos tipos de carotenoides; a saber, carotenos, caracterizados por presentar cadenas hidrocarbonadas *e.g.*,  $\alpha$ -caroteno ( $C_{40}H_{56}$ ),  $\beta$ -caroteno ( $C_{40}H_{56}$ ); y las xantofilas, caracterizadas por tener átomos de oxígeno en su estructura, *e.g.*, luteína ( $C_{40}H_{56}O_2$ ), violaxantina ( $C_{40}H_{56}O_4$ ) y astaxantina ( $C_{40}H_{52}O_{21}$ ) (Scheer, 2013). Asimismo, los carotenoides se pueden clasificar en primarios y secundarios. Los primarios, como la luteína, ayudan en la transferencia de energía absorbida por la clorofila; y secundarios que intervienen como agentes antioxidantes para evitar el daño oxidativo (Gong & Bassi, 2016).

**Figura 4.**

Pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores presentes en *Chlorella vulgaris*



*Nota:* a) Las clorofilas presentes en la microalga *Chlorella vulgaris* son: (i) Clorofila-a y (ii) clorofila-b. b) Principales carotenoides sintetizados por la microalga *C. vulgaris*. (i) Astaxantina (ii)  $\beta$ -caroteno (iii) Luteína (iv) violaxantina (v) Neoxantina. Fuente autor.

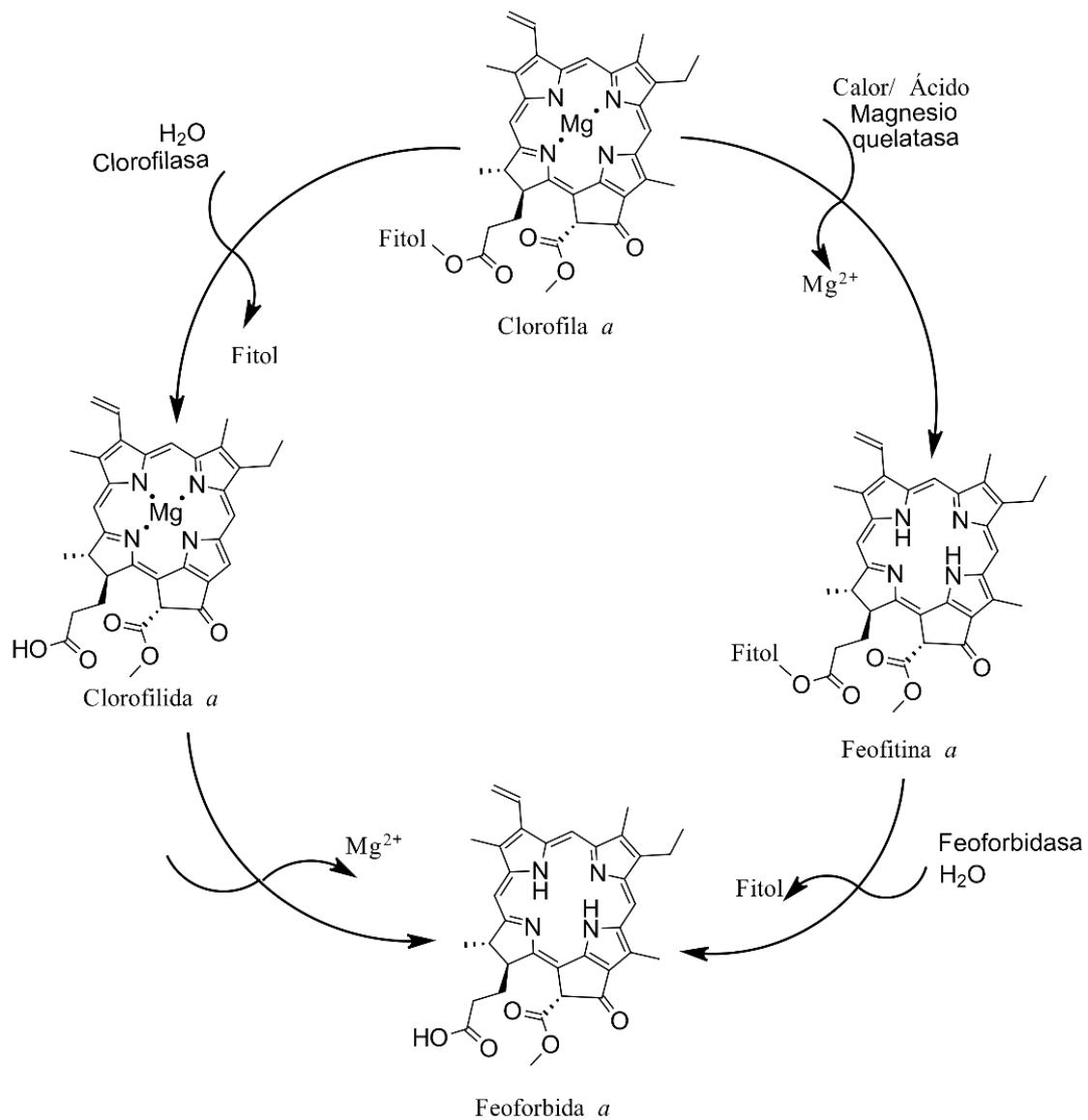
#### 1.4.1 Derivados de clorofilas en procesos biológicos

La degradación de clorofilas es un proceso que se lleva a cabo a medida que los organismos fotosintéticos se acercan hacia la fase de muerte y puede ser causado tanto por factores externos como internos (Takamiya et al., 2000). Los derivados de clorofila se presentan a medida que el

proceso de degradación transcurre en el organismo y las diversas rutas metabólicas o condiciones externas juegan un papel en el catabolismo de esta molécula (**ver figura 5**); en primer lugar, se puede presentar un proceso de des-metalización; pérdida del átomo central de magnesio situado en el centro del anillo tetrapirrol, reacción que ocurre normalmente bajo condiciones ácidas, aumento en la temperatura o por la intervención de la enzima magnesio-quelatasa (Roca et al., 2016; Zhu et al., 2017); en segundo lugar, se puede dar por la pérdida de la cadena hidrofóbica; fitol, como producto de la hidrólisis del grupo funcional éster, este proceso puede ocurrir por un aumento en la alcalinidad del medio o como producto del proceso enzimático de la enzima clorofilasa (Maroneze et al., 2019; Takamiya et al., 2000; Zhu et al., 2017). De igual manera, se puede presentar la pérdida de la cadena hidrofóbica de la feofitina, ya sea, por un aumento en la temperatura o como un producto del proceso enzimático de la feoforbidasasa para dar origen a la molécula de feoforbida (Takamiya et al., 2000). Análogamente, la molécula de clorofilida al someterse a un aumento en la temperatura puede perder su átomo central de magnesio y también dar origen a la molécula de feoforbida. Estas son las rutas comunes por las cuales se degradan los pigmentos fotosintéticos (Roca et al., 2016).

**Figura 5.**

Rutas para la obtención de derivados de clorofila



Nota: Tomado y adaptado de (Roca et al., 2016)

## 1.5 Espectrometría de masas MALDI

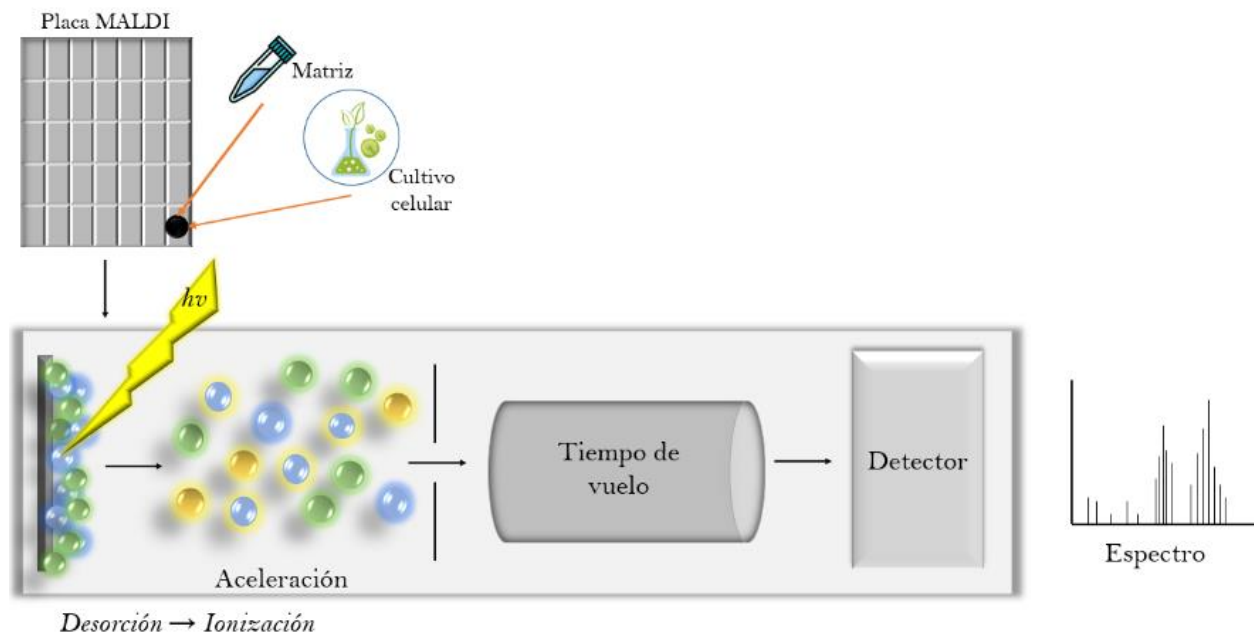
La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica, cuyo principio se basa en la formación, separación y detección de iones en fase gaseosa; separados por su relación masa carga ( $m/z$ ) y detectados cualitativamente (Gross, 2017; Hosseini & Martinez-Chapa, 2017; Jurinke et al., 2004). En la **figura 6**, se muestra el esquema general de un espectrómetro de masas partiendo de la formación de iones, aceleración y separación debido a su relación  $m/z$  para, finalmente, ser detectados y obtener una señal medible (Santos et al., 2016).

Existen diversas formas de llevar a cabo el proceso de ionización de un analito, los métodos como la ionización electrónica (EI) han sido ampliamente utilizados para el análisis de moléculas pequeñas (Jurinke et al., 2004). Sin embargo, para el análisis de biomoléculas, susceptibles a degradación y a múltiple fragmentación, estas técnicas de ionización fuerte no son apropiados (Awad et al., 2015; Hosseini & Martinez-Chapa, 2017; Jurinke et al., 2004).

A raíz de la dificultad al analizar biomoléculas, en 1985, la técnica de ionización suave fue establecida por dos científicos alemanes, después de observar la fácil ionización de alanina mezclada con triptófano, además de la ionización de otros tipos de aminoácidos mezclados con una matriz similar (Hosseini & Martinez-Chapa, 2017). Pero no fue hasta el año 2002 gracias a los trabajos realizados por Koichi Tanaka y John Fenn ganadores del premio nobel, que se estableció la técnica de MALDI (El-Aneed et al., 2009; Hosseini & Martinez-Chapa, 2017).

**Figura 6.**

Esquema general de un espectrómetro de masas MALDI-TOF



*Nota:* Representación esquemática del proceso llevado a cabo por el equipo de MALDI MS. Basado y adaptado de (El-Aneed et al., 2009; Hosseini & Martinez-Chapa, 2017).

La ionización por desorción con láser asistida por una matriz (MALDI) es una de las técnicas suaves empleadas para el proceso de formación de iones, llamada así por sus siglas en inglés (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*). El fundamento de MALDI se basa en la desorción y ionización del analito de interés de manera indirecta gracias a la intervención de una matriz (Hosseini & Martinez-Chapa, 2017).

### 1.5.1 Matrices MALDI

Las matrices MALDI, generalmente, son compuestos orgánicos cristalinos de bajo peso molecular (Gross, 2017) que cumplen con dos funciones principales; a saber, el primero, actuar

como disolvente para el analito debilitando las fuerzas intermoleculares; y segundo, absorber el haz de luz incidente del láser (ultravioleta o infrarrojo). Posteriormente, se ioniza el analito de interés como producto de la colisión entre las moléculas neutras del analito y los iones de la matriz ya formados (Hosseini & Martínez-Chapa, 2017).

Las matrices más utilizadas en UV MALDI son ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA), ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB), ácido sinapínico (SA), 2,6-dihidroxiacetofenona (DHAP), 2-[(2E)-3-(4-tert-butylphenyl)-2-methylprop-2-enylidene]malononitrile (DCTB), además de fullerenos y porfirinas (Gross, 2017). Una vez se realiza el montaje de la matriz y la posterior muestra de interés, se presenta un fenómeno de co-cristalización que permite el posterior análisis (Awad et al., 2015; Hosseini & Martínez-Chapa, 2017; Zenobi & Knochenmuss, 1999). Por ello, el proceso de selección de matriz y la longitud de onda del láser adecuada juegan un papel importante al momento de llevarse a cabo la medición (Awad et al., 2015).

El proceso de formación de iones se manifiesta en dos etapas. Primero, ocurre la ionización de la matriz dando origen a un catión radical (**ecuación 1**). Seguidamente, debido al bajo potencial de ionización del analito se cede un electrón a la matriz y queda cargado positivamente (**ecuación 2**). El proceso de ionización del analito se puede manifestar de diversas maneras, bien sea por transferencia catiónica, protónica o electrónica (Awad et al., 2015; Zenobi & Knochenmuss, 1999).



## 1.6 Espectrofotometría de absorción atómica

La espectrofotometría de absorción atómica (AAS) es una técnica analítica basada en la absorción de radiación para la determinación cualitativa y cuantitativa de elementos en estado

fundamental presentes en soluciones acuosas (García & Báez, 2012; Gary, 2009). AA fue desarrollada desde inicios del siglo XIX gracias a la obtención del espectro de absorción proveniente del Sol por el científico alemán Fraunhofer y ha sido ampliamente empleada en diversas áreas de rigor científico (Gary, 2009; Van Loon, 1980; Zettner, 1964).

La técnica de AAS obedece a la ley de Lambert Beer (**ecuación 3**). Por lo cual, se fundamenta en la capacidad que tiene un elemento en su estado fundamental de absorber radiación de una longitud de onda específica (Gary, 2009). El proceso comienza con la atomización de la muestra, partiendo por una nebulización que dispersa la solución; seguido de un proceso de desolvatación el cual transforma la solución en aerosol, i.e., fase sólida/gas. Posteriormente, se presenta una volatilización en donde se generan moléculas en estado gaseoso y para finalizar ocurre una disociación que dan como producto los cúmulos de átomos. Por último, los átomos se exponen a una longitud de onda específica con la cual se excitan y ocurre el proceso de relajación, emitiendo fotones que son capturados por el detector del equipo arrojando una señal proporcional a la cantidad de átomos presentes en la muestra (García & Báez, 2012; SKOOG et al., 2008).

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc \quad (\text{ecuación 3})$$

El proceso de absorción es muy específico debido a que las transiciones electrónicas son exclusivas para cada uno de los elementos y las líneas de absorción son muy estrechas (0,002 a 0,005 nm). Por lo cual, las fuentes de emisión en su gran mayoría son lámparas de cátodo hueco hecho con el elemento propio que se va a detectar con el objetivo de obtener un haz de luz de la longitud de onda específica (Gary, 2009; SKOOG et al., 2008).

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo general

Evaluar la producción de pigmentos, lípidos y biomasa durante las fases de crecimiento de *Chlorella vulgaris*.

### 2.2 Objetivos específicos

Determinar la concentración de pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores durante cada etapa de crecimiento en la microalga *Chlorella vulgaris* utilizando MALDI MS

Monitorear la concentración de magnesio absorbido por parte de *Chlorella vulgaris* durante su crecimiento.

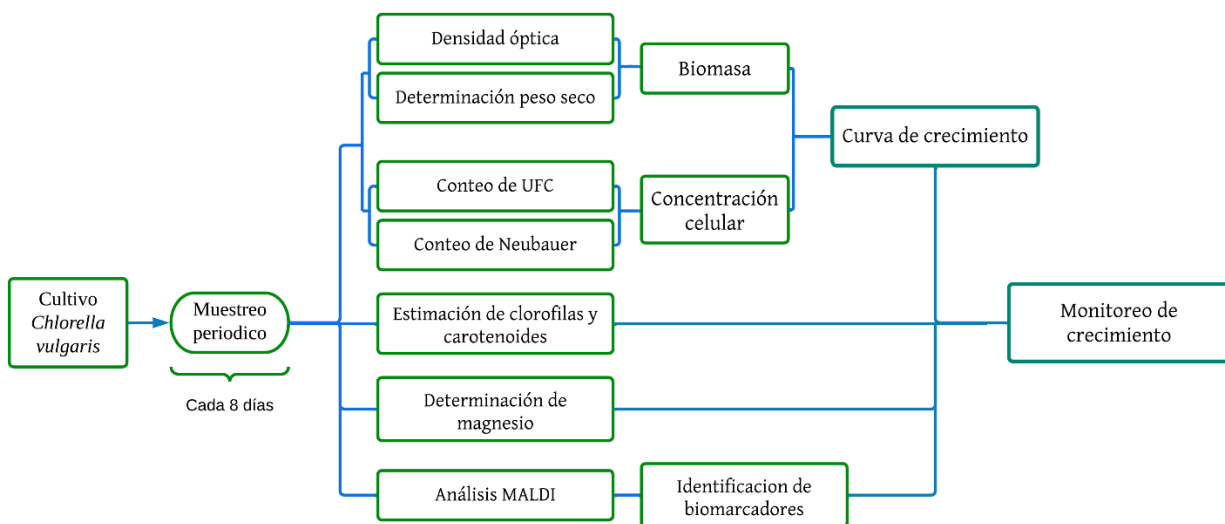
Asociar la caracterización molecular realizada mediante MALDI MS con los resultados obtenidos a partir de técnicas convencionales como absorción atómica y espectrofotometría UV-Vis.

### 3 Metodología

La metodología que se llevó a cabo para la realización del presente trabajo de investigación se resume en la **figura 7**.

#### Figura 7.

Esquema metodológico.



*Nota:* Pruebas efectuadas para la realización del trabajo de investigación. Fuente autor.

En primer lugar, se realizó el montaje de los medios de cultivos de *Chlorella vulgaris* en medio líquido. Se llevó a cabo una fermentación en lote durante 96 días efectuando muestreos periódicos por triplicado cada 8 días con el objetivo de determinar el comportamiento de las siguientes variables: densidad óptica, número de células, peso seco, cantidad de magnesio disuelto extra e intracelular, concentración de pigmentos fotosintéticos (clorofilas) y fotoprotectores (carotenoides) y análisis de biomarcadores tipo pigmentos y lípidos por medio de MALDI MS.

Se empleó un medio basal modificado de Bold (BBM) con el objetivo de proporcionar los nutrientes esenciales y necesarios para el crecimiento de la especie de microalga *Chlorella vulgaris*. El BBM se realizó con base en las cantidades expresadas en la Tabla 1 (Berges & Harrison, 2004; Blanco, 2021). Se preparó un total de 36 biorreactores; cada uno con 100 mL de BBM y 1 mL de solución Ciprofloxacina 15.49 mg/mL con el objetivo de controlar población de bacterias presentes en el cultivo. Por otro lado, se preparó un medio sólido basal modificado de Bold (por sus siglas en inglés, SBBM) adicionando 15,0 g de polvo de agar marca Sigma Aldrich por cada 1000 mL de BBM para servir 25 mL por cada caja de Petri.

**Tabla 1.** Preparación del Medio Basal de Bold

<b>Medio Basal de Bold</b>		
Sustancia	Cantidad por litro	Concentración (M)
NaNO <sub>3</sub>	250 mg	2,93x10 <sup>-3</sup>
CaCl <sub>2</sub>	25 mg	1,70x10 <sup>-4</sup>
MgSO <sub>4</sub>	75 mg	3,04x10 <sup>-4</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	75 mg	4,31x10 <sup>-4</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	175 mg	1,29x10 <sup>-3</sup>
NaCl	25 mg	4,28x10 <sup>-4</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11,42 mg	1,85x10 <sup>-3</sup>
Solución	1 mL	
Solución alcalina	1 mL	9,31x10 <sup>-2</sup>
Solución ácida	1 mL	3,43x10 <sup>-3</sup>
<b>Solución micronutrientes</b>		
Sustancia	g/L	Concentración (M)
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	8,82	3,06x10 <sup>-5</sup>
MnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	1,20	7,10x10 <sup>-6</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	8,7	4,44x10 <sup>-5</sup>
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	1,57	6,29x10 <sup>-6</sup>
CoCl <sub>2</sub>	0,41	1,40x10 <sup>-6</sup>

*Nota:* Cantidades empleadas para la preparación del Medio Basal de Bold

### 3.1 Cultivo celular

Se realizaron preinóculos con el objetivo de realizar activación de la especie *Chlorella vulgaris*. Transcurridos 7 días de fermentación, se realizó el montaje de 36 biorreactores inoculando en cada uno de ellos un total de  $1,4 \times 10^6$  células/mL. Se estableció las condiciones de 12 horas de luz led 5,0 kluxi y 12 horas de oscuridad. De igual manera, se incubó a temperatura de 30 °C y agitación de 200 rpm (Blanco, 2021; Daliry et al., 2017) en una incubadora shaker New Brunswick Scientific Excella E24 incubator Shaker Series de eppendorf como se muestra en la **figura 8**.

#### Figura 8.

Montaje de los 36 Erlenmeyer



*Nota:* Montaje día cero de muestreo.

### 3.2 Determinación de concentración celular

El conteo celular se realizó con ayuda de una cámara Neubauer improved. Se tomó 10  $\mu\text{L}$  de cada uno de los biorreactores. Luego, se colocó la muestra bajo el cubreobjetos y se realizó el conteo de 5 cuadrantes en el centro del portaobjetos con el objetivo de 40X como se observa en la **figura 9** con la ayuda de un microscopio OLYMPUS CH20. Una vez se realizó el conteo de las microalgas, se determinó la concentración celular empleando la **ecuación 4**.

$$\text{Concentración celular (células/mL)} = N \times 10^4 \times \text{FD} \quad (\text{ecuación 4})$$

Donde N es el número de microalgas contadas en el instrumento y FD es el factor de dilución aplicado a la muestra (Bastidas, 2013; Blanco, 2021; Ma'mun et al., 2022).

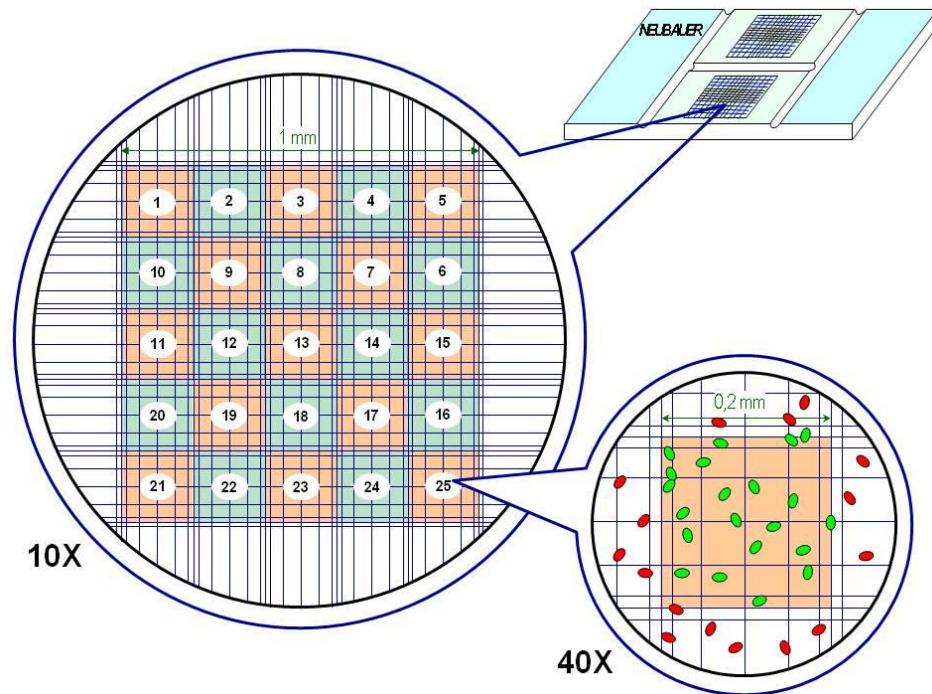
Por otro lado, se realizó un conteo de unidades formadoras de colonias (UFC). Para ello, se tomaron 500  $\mu\text{L}$  del medio de cultivo y se llevaron a un volumen final de 5 mL con una solución salina al 0.005% de esta forma se realizaron diluciones seriadas 1:10 hasta obtener una concentración entre  $10^{-4}$  y  $10^{-6}$ . Seguidamente, se sembraron 100  $\mu\text{L}$  de estas soluciones en el agar del medio basal de Bold por la técnica siembra en superficie (Anderson & Calderon, 2000). Finalmente, se incubaron garantizando las condiciones de luz- oscuridad y temperatura. Pasados 8 días, se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonia y se determinó la concentración con ayuda de la **ecuación 5**.

$$\text{Unidades Formadoras de Colonias (UFC)} = N \text{ de colonias} \times \text{FD} \times 10^4 \quad (\text{ecuación 5})$$

Donde FD es el factor de dilución empleado para la siembra de la caja.

**Figura 9.**

Conteo en cámara de Neubauer



*Nota:* Proceso de conteo de microalgas con ayuda de una cámara de Neubauer improved. Tomado de: (Joseba & San Millan, n.d.) Dpto. Inmunología, Microbiología y Parasitología. Universidad del País Vasco ([UPV/EHU](http://www.upv.es))

**3.3 Determinación de biomasa**

La biomasa producida a lo largo del tiempo de fermentación se monitoreó con ayuda de las técnicas de densidad óptica y peso seco. La densidad óptica se determinó con ayuda de un espectrofotómetro de UV/visible de alta performance para microplacas y cubetas con software interno y monitor gráfico, Multiskan GO UV/Vis de Thermo scientific. Se tomó 200  $\mu$ L del medio de cultivo y se colocó, por duplicado, en una microplaca de 96 pozos. Seguidamente, se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 682 nm (Blanco, 2021; Griffiths et al., 2011).

Por otro lado, para el ensayo de peso seco, la metodología planteada se basó en los trabajos de (H. B. A. Ben Ayed et al., 2016; Kumar et al., 2014). Se comenzó tomando 10 mL del medio de cultivo, se centrifugó a 8000 rpm a 4 °C durante 15 minutos y se descartó el sobrenadante. El pellet obtenido se lavó 3 veces con ayuda de una solución salina 0.85% para posteriormente llevarse a un horno durante 22 horas a 60 °C. Transcurrido el tiempo se determinó el peso con ayuda de una balanza a analítica. Por último, se calculó el peso obtenido con ayuda de la **ecuación 6** (Blanco, 2021).

$$\text{Peso seco (g/mL)} = \frac{(W_f - W_r)}{V_m} \quad (\text{ecuación 6})$$

Donde  $W_f$  es el peso final de la muestra con el recipiente,  $W_r$  es el peso inicial del recipiente vacío y  $V_m$  es el volumen medido de muestra.

### 3.4 Estimación de pigmentos

Para la estimación de la cantidad de pigmentos se basó sobre la metodología reportada por (Stramarkou et al., 2017) con ciertas modificaciones. En primer lugar, se determinó la concentración de pigmentos fotosintéticos (Clorofilas y derivados) y fotoprotectores (carotenoides) con ayuda de la técnica de espectroscopia de ultravioleta visible. Se tomó 2 mL del medio de cultivo y se centrifugó a 8000 rpm a 4 °C durante 15 minutos; se descartó el sobrenadante y al pellet obtenido se le adicionó 6 mL de acetona de grado analítico (Stramarkou et al., 2017). Posteriormente, se realizó tratamiento en baño ultrasonido a temperatura ambiente por 35 minutos y se procedió a realizar la medición en un espectrofotómetro visible Genesys 10 s UV-Vis marca

Thermo Scientific realizando un barrido desde 350 a 850 nm. Por último, se calculó la concentración de pigmentos usando las **ecuaciones 7, 8 y 9** (Lichtenthaler & Wellburn, 1983).

$$C_a(\text{Clorofila A}) = 11,75A_{662} - 2,35A_{645} \quad (\text{ecuación 7})$$

$$C_b(\text{Clorofila B}) = 18,61A_{645} - 3,96A_{662} \quad (\text{ecuación 8})$$

$$\text{Carotenoides} = (100A_{470} - 2,27C_a - 81,4C_b)/227 \quad (\text{ecuación 9})$$

Donde  $C_a, C_b, C_{x+c}$  representan las concentraciones de clorofila a, b y carotenoides en ( $\mu\text{g/mL}$ ) respectivamente.  $A_{662}, A_{645}, A_{470}$  representan la absorbancia obtenida a 662, 645 y 470 nm respectivamente.

### 3.5 Determinación de oxígeno disuelto y tasa fotosintética

La metodología empleada para realizar la medición de oxígeno disuelto presente durante el tiempo de fermentación se basó en los trabajos realizados por (He et al., 2022; Soto-Ramírez et al., 2021). Las mediciones se determinaron con ayuda de medidor de oxígeno disuelto marca HACH LANGE sensION<sup>TM</sup> + DO6 y se realizaron directamente sobre los medios de cultivo agitando los reactores suavemente asegurándose de que la sonda no tocara con los bordes y se encontrara sumergida en el medio de cultivo. Además, se estableció un tiempo de 1 minuto para cada una de las mediciones realizados durante cada uno de los muestreos realizados

### 3.6 Determinación de magnesio disuelto, extracelular e intracelular

Se monitoreó la cantidad de magnesio disuelto, extracelular e intracelular durante cada uno de los muestreos acordados por medio de la técnica de espectrometría de absorción atómica basada

en la metodología del trabajo de (H. B. A.-B. Ayed et al., 2015). Se tomó 40 mL del medio de cultivo, se centrifugó a 8000 rpm a 4 °C durante 15 minutos; se tomó 10 mL del sobrenadante obtenido y se aciduló con 462  $\mu\text{L}$  de  $\text{HNO}_3$  al 65% para realizar el ensayo de magnesio disuelto en el medio de cultivo. Después, se adicionó 15 mL de una solución EDTA 0.02 M al pellet obtenido del paso anterior; se agitó vigorosamente con la ayuda de un vortex y se centrifugó a 8000 rpm a 4 °C durante 15 minutos; finalmente, se separó el sobrenadante para realizar la medición de magnesio extracelular. Por último, el pellet resultante se sometió a una digestión ácida con  $\text{HNO}_3$  al 65% por alrededor de 20 minutos; posteriormente, se calentó la muestra a 90° por alrededor de 12 horas en un horno marca BINDER ED 23. Una vez la muestra se encontró a temperatura ambiente se adicionó 20 mL de agua tipo I, se filtró por gravedad y se realizó la medición de magnesio intracelular. Para realizar la cuantificación de magnesio presente, primero se realizó una curva de calibración 0.5, 5, 10, 15 y 20 ppm a partir de una solución de 100 ppm de nitrato de magnesio ( $\text{MgNO}_3$ ), con el objetivo de correlacionar la señal de intensidad a una concentración. Después, las tres muestras se trataron con ayuda de un Espectrómetro de Absorción Atómica S4 marca Thermo Electron con un ancho de banda de 1.0 nm en un rango de 0.15-20 ppm empleando una mezcla aire acetileno y una lámpara de magnesio de 4 mA a una longitud de onda de 202.6 nm.

### 3.7 Análisis MALDI

Los análisis MALDI se realizaron a partir de las extracciones con acetona grado analítico como se describió previamente en la sección 3.4 basándose en la metodología planteada por (Stramarkou et al., 2017). Se tomó 2 mL del medio de cultivo y se centrifugó a 8000 rpm a 4°C por alrededor de 15 minutos. Luego, al pellet obtenido se le adicionó 6 mL de acetona grado

analítico, se homogeneizó la muestra con ayuda de un vortex y, por último, se realizó un tratamiento con baño de ultrasonido a temperatura ambiente por alrededor de 35 minutos. Las muestras se guardaron en nevera resguardadas a la exposición de todo tipo de luz para evitar su degradación y se conservaron hasta realizar el montaje en la placa de MALDI.

Para la preparación de la placa de MALDI, se tomó 10  $\mu\text{L}$  del extracto de acetona y se mezcló con 10  $\mu\text{L}$  de la matriz (DHB) y se sembró 2  $\mu\text{L}$  de esta solución en el target. De igual forma, nuevamente se tomó 10  $\mu\text{L}$  del extracto de acetona y se mezclaron con 10  $\mu\text{L}$  (DCTB) y se sembró 2  $\mu\text{L}$  de la muestra en el target de MALDI.

Los análisis por MALDI MS se realizaron en un equipo Ultraflex extreme (Bruker Daltonics, Billerica, MA) equipado con un láser Nd:YAG ( $\lambda = 355\text{nm}$ ) Smart Beam con frecuencia de 1 kHz. Los espectros de masas se adquirieron en modo reflectron polaridad positiva en el rango de  $m/z$  100 a 1500 usando voltaje de aceleración de 25 kV, con extracción pulsada de iones (PIE) de 100 ns. El equipo se calibró utilizando clúster de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) y una serie de péptidos estándar: leucina-encefalina, bradiquinina, bombesina y sustrato de renina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO).

## 4 Discusión de resultados

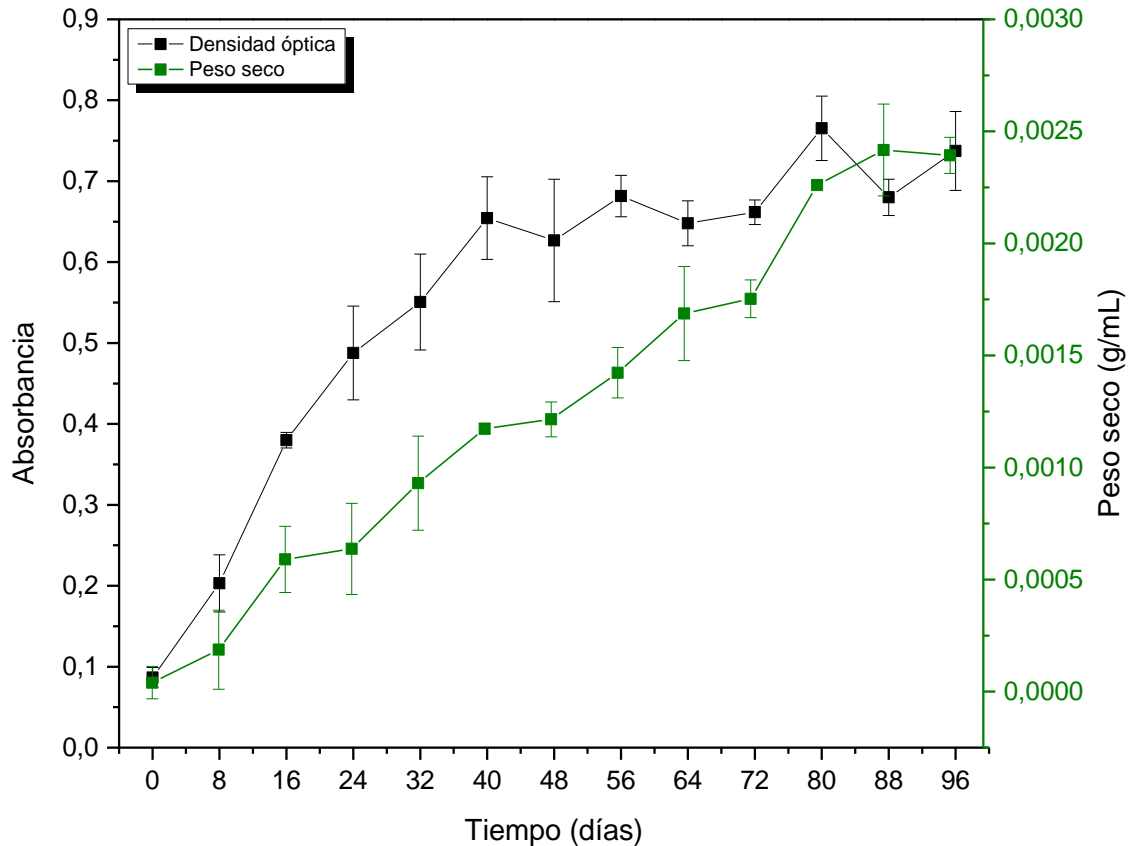
El monitoreo de la microalga *Chlorella vulgaris* inició el día 7 del montaje de los biorreactores, a los cuales se les realizó pruebas para garantizar la axenicidad de los cultivos; en la cual se evidencia presencia de bacilos Gram negativos. De esta manera, fue necesario realizar antibiograma con la finalidad de determinar qué antibiótico inhibe el crecimiento bacteriano. Los resultados obtenidos establecen el uso de la Ciprofloxacina (Cercenado & Saavedra-Lozano, 2009). Una vez se garantizó la obtención de un cultivo axénico, se procedió a realizar los ensayos correspondientes al trabajo de investigación.

### 4.1 Biomasa

El monitoreo de biomasa a lo largo del proceso de fermentación se determinó a partir de las pruebas de peso seco y densidad óptica, y se llevó a cabo el procedimiento previamente descrito en la metodología 3.3. Pasados los 96 días de muestreo, se obtuvieron los datos mostrados en la **figura 10**.

**Figura 10.**

Determinación de biomasa de *Chlorella vulgaris*, durante el periodo de fermentación.



En la **figura 10** se observan los resultados de peso seco; línea verde, y densidad óptica, línea negra. Por un lado, los datos obtenidos por la prueba de peso seco evidencian el comportamiento ascendente de los datos debido al aumento en la cantidad de biomasa dada la reproducción, producida por la microalga *Chlorella vulgaris* en los biorreactores. Estos resultados siguen una tendencia esperada y previamente reportada en la literatura (Daliry et al., 2017; Luangpipat & Chisti, 2017; Silva et al., 2022; Wong et al., 2017).

De igual forma, los datos obtenidos en relación con densidad óptica tomada a 682 nm, (DO682), presentan un comportamiento similar; debido a que es un método cuantitativo que

relaciona el crecimiento de un microorganismo con la turbidez del medio (Brown, 2022). Por tal motivo, el aumento en la (DO682) a lo largo de los días de fermentación es un indicativo del crecimiento celular de la microalga *Chlorella vulgaris*, fenómeno que se evidenció en las evaluaciones realizadas por (Daliry et al., 2017; Wong et al., 2017), donde los valores de densidad óptica aumentan hasta una tercera parte de su valor inicial (Daliry et al., 2017; Wong et al., 2017).

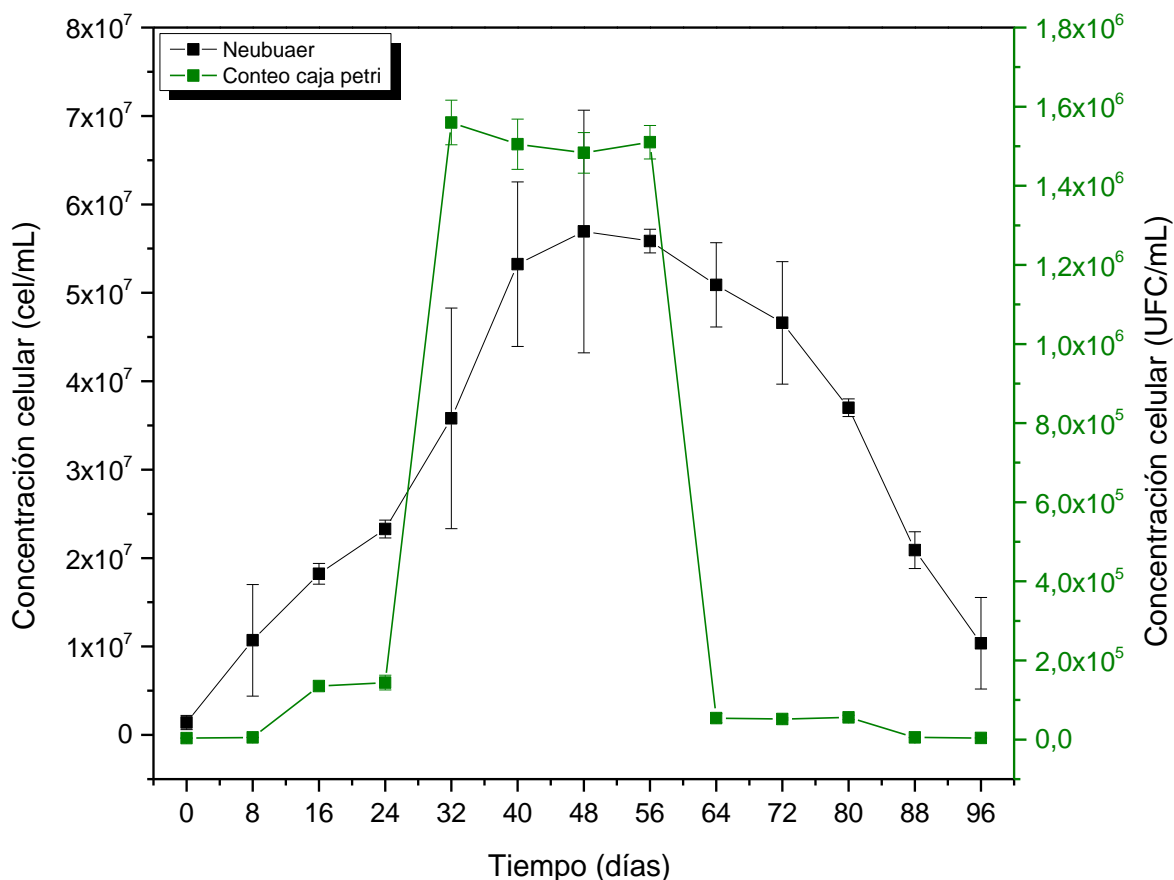
Por último, al realizar el análisis en conjunto de las gráficas se puede dilucidar las etapas de crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris*. Para empezar, una fase de adaptación los primeros 8 días; fase de latencia, seguido de un crecimiento acelerado desde el día 8 hasta el 40, fase de crecimiento exponencial; posteriormente, se observa un periodo estacionario desde que se extiende hasta el día 64-72, fase estacionaria; y, por último, sigue un ligero ascenso hasta alcanzar un equilibrio casi constante que asociamos a la fase de muerte del cultivo.

## 4.2 Concentración celular

Otro parámetro para tener en cuenta al momento de observar una curva de crecimiento es la concentración y viabilidad celular del microorganismo. Por lo tanto, se determinó la concentración celular de *Chlorella vulgaris*, por medio del conteo en cámara de Neubauer y conteo de unidades formadoras de colonias, siguiendo la metodología planteada en el apartado 3.2. Los datos obtenidos a lo largo de los 96 días de muestreo se observan en la **figura 11**.

**Figura 11.**

Determinación de la concentración celular de la microalga *Chlorella vulgaris*, durante el periodo de fermentación.



En la **figura 11** se observan los datos obtenidos para la determinación de la concentración celular presenten en los biorreactores. Por un lado, se observan la cuantificación celular realizada por medio de la técnica de conteo en cámara de Neubauer, línea negra. Este parámetro nos permite observar el comportamiento de la población del microorganismo. Partiendo desde el día 0 hasta el 8, se observa un aumento poblacional que asociamos a la primera fase de una fermentación discontinua, fase de latencia, en dicha fase, la microalga se encuentra adaptándose metabólicamente al medio y las condiciones establecidas; posteriormente, se observa una

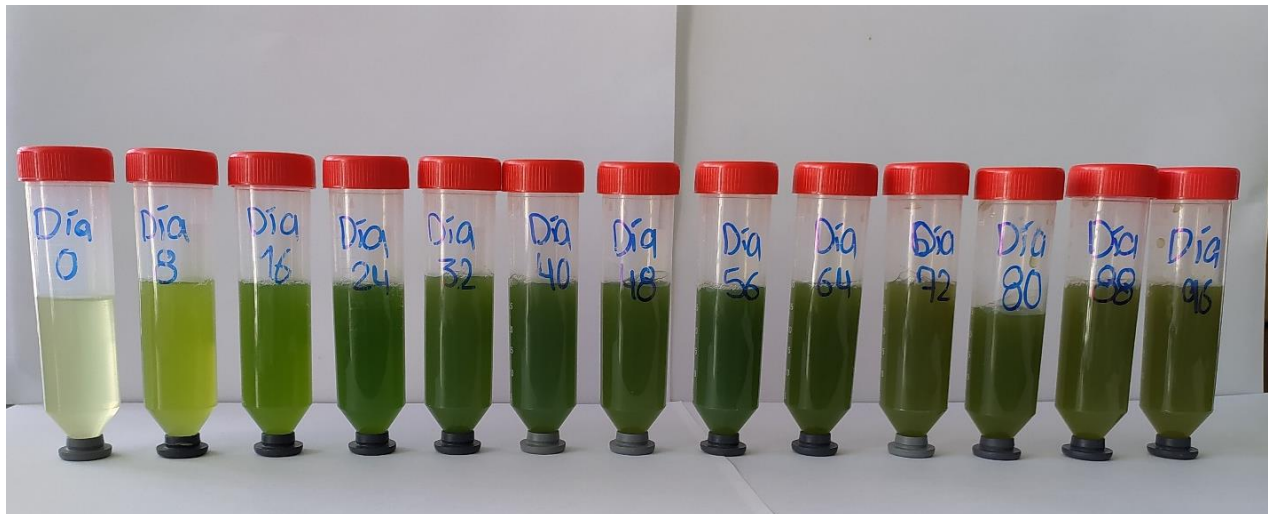
aceleración en el crecimiento desde el día 8 hasta el día 32-40 correspondiente a la fase de crecimiento exponencial en donde se evidencia un aumento de la población celular de *Chlorella vulgaris*; después, durante los días siguientes hasta el 64-72, se observaron cambios mínimos en el crecimiento, comenzando a notar un comportamiento estable con respecto a la cantidad de poblacional de la microalga; por último, durante los días restantes se observa una disminución en la población de microalgas, esto se debe a que se encuentra en la fase final de su crecimiento, fase de muerte (Martinez & García, 2010). De acuerdo con los resultados reportados por (Ma'mun et al., 2022), los datos obtenidos durante nuestro proceso de fermentación se ajustan a los de una curva de crecimiento tipo discontinua del microorganismo *Chlorella vulgaris* bajo las condiciones establecidas durante el periodo de tiempo evaluado.

De igual forma, se realizó la cuantificación de la población metabólicamente viable, i.e., células de *Chlorella vulgaris* con la capacidad de seguir reproduciéndose en el medio de cultivo (Aguirre García, 2012; Tipantuña Chiluisa, 2018). Para realizar este ensayo, se implementó la técnica de recuento en placa realizada a partir del conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) sobre un medio sólido de Bold como se describe en la sección 3.2. Los resultados obtenidos presentaron un comportamiento similar a los reportados en el conteo de Neubauer. Se observó una fase de latencia presente desde el día cero de cultivo hasta el día 24 de fermentación; seguidamente, se evidenció un crecimiento exponencial, en la cual se observó un aumento en la población de microalgas presentes; llegado el día 32, se evidenció la fase estacionaria del cultivo caracterizada por una baja variabilidad con relación a la población de microalgas en el medio; por último, después del día 56 se observa la fase de muerte celular asociada a la última etapa de vida del microorganismo.

Los datos de biomasa y los de concentración celular afirman que la microalga *Chlorella vulgaris* atravesó por todas y cada una de las fases de crecimiento de una fermentación discontinua, Batch o por lotes. Por otro lado, en la **figura 12** se evidencian cada una de las fases. Empezando por la fase de latencia o adaptación de la microalga *Chlorella vulgaris* que va desde el día 0 hasta el día 16. Seguidamente, la fase de crecimiento exponencial se asocia a los días 24 y 32, gracias a la tonalidad verde brillante de las clorofilas. Luego, se observa la etapa de crecimiento estacionario asociado a la poca variación de color observada durante los días 40 a 64 y, por último, se asociamos a los días restantes la fase de muerte en la cual se observa una tonalidad amarillenta, debido a la presencia de carotenos.

### Figura 12.

Registro fotográfico de *Chlorella vulgaris* en el periodo de fermentación.

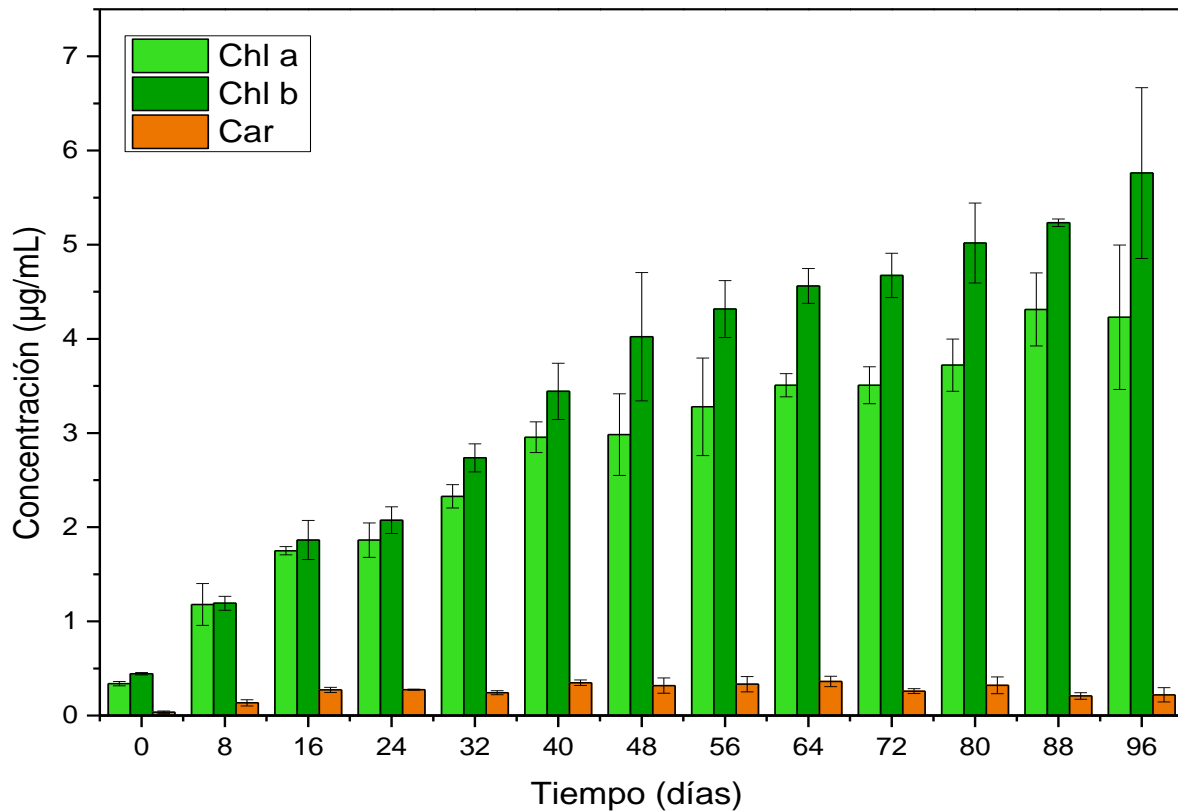


### 4.3 Estimación de pigmentos

Los pigmentos fotosintéticos producidos por las microalgas son empleados como indicadores fisiológicos del estado del cultivo (Elisabeth et al., 2021). Por tal razón, se realizó la cuantificación de estos a lo largo del tiempo de fermentación, con la finalidad de correlacionar la cantidad de pigmentos sintetizados por la microalga *Chlorella vulgaris* durante todo el periodo de evaluación por la metodología planteada por (Stramarkou et al., 2017) descrita en la sección 3.4 (Pagels et al., 2021) Los resultados obtenidos se reportan en la **figura 13**.

**Figura 13.**

Cuantificación de pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores de la especie *Chlorella vulgaris*



Los resultados obtenidos a lo largo del tiempo de fermentación presentan diferencias con respecto a estudios previos. Por un lado, en el trabajo realizado por (Jacob-lopés et al., 2020) afirman que la cantidad de clorofila a se encuentra en una relación 3:1 con respecto a la clorofila b, debido a que la clorofila a es el principal pigmento que interviene en la conversión de fotones a energía química durante el proceso de fotosíntesis, mientras que la clorofila b tiene un papel indirecto transfiriendo la energía que absorbe a las moléculas de clorofila a (Hynstova et al., 2018; Jacob-lopés et al., 2020). Con base en lo anterior, los resultados obtenidos en este estudio durante el periodo de fermentación discrepan con relación a los datos obtenidos por trabajos anteriormente. Los autores (Bazarnova et al., 2022; He et al., 2022; Hynstova et al., 2018) reportan cantidades de clorofila a hasta 2 o 3 veces más que las cantidades obtenidas por clorofila b.

Con base a lo anterior, el comportamiento reflejado en los resultados se puede asociar al uso de Ciprofloxacina (CIP) en el medio de fermentación; la ciprofloxacina es un antibiótico de amplio espectro perteneciente a la clase de fluoroquinolonas con poder bactericida sobre bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (Geiger et al., 2016; Ricky et al., 2022; Xiong et al., 2017). La Ciprofloxacina es un inhibidor débil de la microalga *Chlorella vulgaris* (Nie et al., 2008). Se estableció que el uso de bajas concentraciones del antibiótico genera una condición de estrés que estimula la síntesis de clorofila a (Nie et al., 2008; Ricky et al., 2022). Sin embargo, la exposición a concentraciones por encima de 0.32 mg/L produce una disminución del 37.3% en el contenido de clorofila a, debido a una atenuación parcial en la síntesis de clorofilas a raíz de las especies reactivas de oxígeno que ocasionan una destrucción en las membranas de los tilacoides por estos compuestos tóxicos (Nie et al., 2008). De acuerdo con lo anterior, el motivo por el cual se presentó una disminución en el contenido de clorofila a durante el tiempo de fermentación, se debe a la presencia de concentraciones (154.9 mg/L) del antibiótico ciprofloxacina en el medio de cultivo.

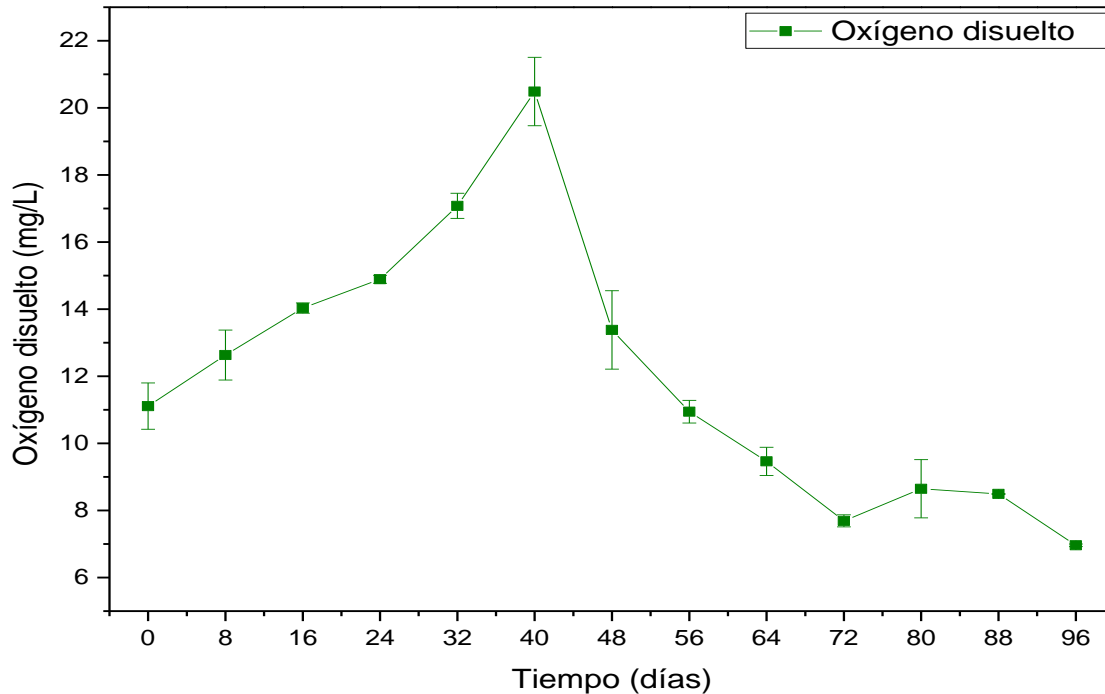
Por otro lado, la tendencia ascendente de los resultados obtenidos se ajusta a resultados previamente reportados en literatura en los cuales se evidencia un aumento en la cantidad de estos pigmentos a medida que van pasando los días de fermentación, este comportamiento se observa en los trabajos de (Benavente-Valdés et al., 2017; Chen et al., 2021; He et al., 2022) en los cuales se realizaron reportes de clorofilas aumentando a medida que transcurre el tiempo de fermentación. Sin embargo, en los trabajos reportados no hay un registro del contenido de pigmentos en los periodos de tiempo evaluados. Dado que la clorofila es una molécula fundamental para que el proceso de fotosíntesis, se encuentra en mayor proporción, pero a medida que el organismo envejece disminuye la cantidad de la misma y el contenido de carotenoides aumenta, debido a su capacidad en prevenir la foto degradación en el complejo fotosintético (Jacob-lopés et al., 2020).

#### **4.4 Resultados de oxígeno disuelto y tasa fotosintética**

Simultáneamente, se monitoreó la cantidad de oxígeno disuelto **figura 14** a lo largo del tiempo de fermentación con la finalidad de determinar la tasa fotosintética de la microalga *C. vulgaris*, como una variable para tener en cuenta al momento de observar el comportamiento de crecimiento.

**Figura 14.**

Oxígeno disuelto durante el periodo de fermentación de un cultivo de *Chlorella vulgaris*.



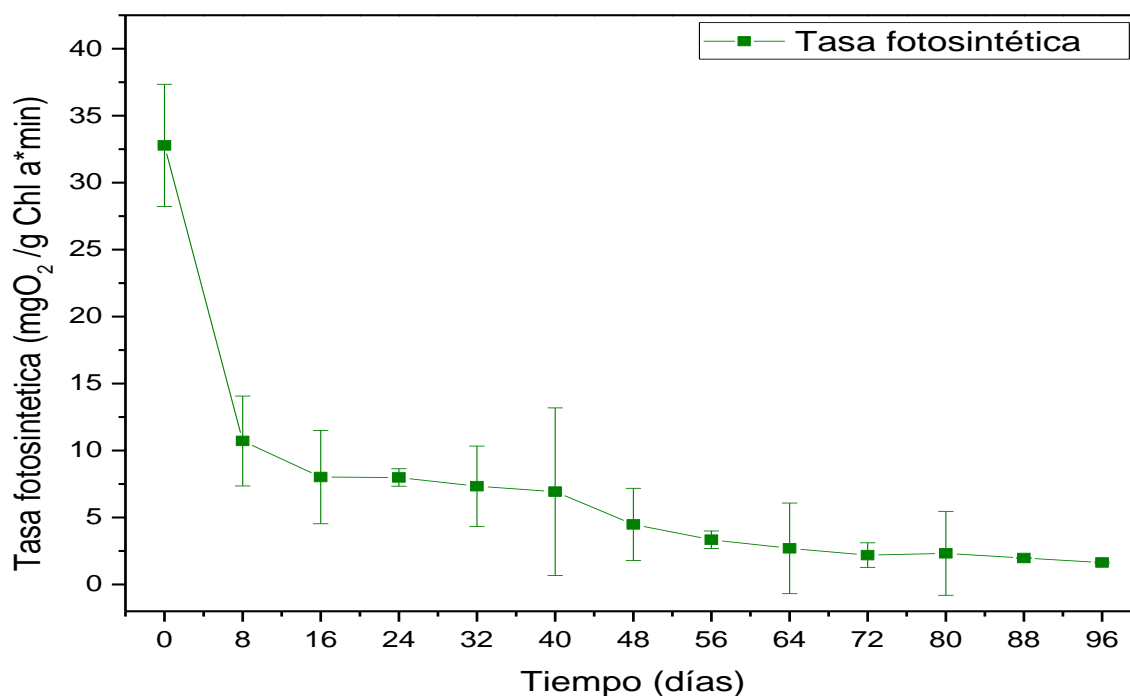
El oxígeno disuelto presente en un biorreactor es un indicativo de que el microorganismo *Chlorella vulgaris* se encuentra realizando el proceso de fotosíntesis, debido a que es un producto de este proceso. En los primeros días de cultivo se observan valores de 15 mg/L de oxígeno disuelto en los medios, lo cual lo asociamos una fase de adaptación del microorganismo a las condiciones que le suministramos. A medida que los días de fermentación transcurren la cantidad de oxígeno disuelto aumenta hasta el máximo de 20 mg/L durante el día 40, día asociado a los últimos días de la fase de crecimiento exponencial e inicios de la fase de latencia en donde la microalga requiere la mayor cantidad de energía para realizar todo el proceso de reproducción celular. Seguidamente, las cantidades de oxígeno disminuyen con el pasar de los días debido a que la población de microalgas comienza a disminuir, debido a la muerte celular que se lleva a cabo en el biorreactor

y, por lo tanto, la cantidad de oxígeno disuelto disminuye como se observa en los resultados. El comportamiento observado en la cantidad de oxígeno disuelto presente en los biorreactores a lo largo del periodo de fermentación presentó una correlación con resultados observados por los autores (He et al., 2022).

De igual forma, se determinó la tasa fotosintética de acuerdo con las definiciones de (He et al., 2022; Soto-Ramírez et al., 2021) donde se establece como la masa de oxígeno liberado por cantidad de microalgas presentes en unidad de tiempo, con el objetivo de determinar la actividad de producción de oxígeno por unidad de clorofila producida por la microalga y conocer el rendimiento de la especie *Chlorella vulgaris* en el medio de cultivo (He et al., 2022; López-Tolentino et al., 2016). Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 15**.

**Figura 15.**

Resultados determinación de tasas fotosintética



*Nota.* El gráfico representa los datos obtenidos respecto al cálculo realizado para determinar la tasa fotosintética, durante cada uno de los muestreos a lo largo del periodo de fermentación de la especie de microalga *Chlorella vulgaris*.

Los resultados obtenidos evidencian una mayor producción de oxígeno durante el primer día. Sin embargo, el valor obtenido se debe a la presencia de oxígeno disuelto en el medio y no propiamente al efecto de fotosíntesis de la microalga (He et al., 2022), debido a que el punto de muestreo corresponde al día cero, i.e., el día en el cual se inoculó el microorganismo en el medio. Ahora bien, el comportamiento decreciente observado en la **figura 15** se ajusta a previos resultados encontrados en la literatura (He et al., 2022; Mullor, 2021). Por un lado, el decrecimiento de la tasa fotosintética con respecto al tiempo es de esperarse debido al incremento relacionado a la cantidad de clorofila producida con el pasar de los días. Por lo cual, según la definición otorgada por (He et al., 2022; Soto-Ramírez et al., 2021). Se observa que los valores de tasa fotosintética se mantienen oscilando alrededor de los  $7\text{mgO}_2/\text{gChla} * \text{min}$  hasta el día 40, día asociado a la fase estacionaria del cultivo realizado según lo establecido en la sección 4.2. Después de este día se observa un decaimiento en los resultados obtenidos, debido al aumento en la cantidad de biomasa producida. Además, a medida que transcurre el tiempo, las microalgas metabólicamente viables comienza a disminuir e inicia la fase de muerte, con lo cual la población de microorganismos capaces de realizar fotosíntesis se ve disminuida.

#### **4.5 Resultados de magnesio disuelto, extracelular e intracelular**

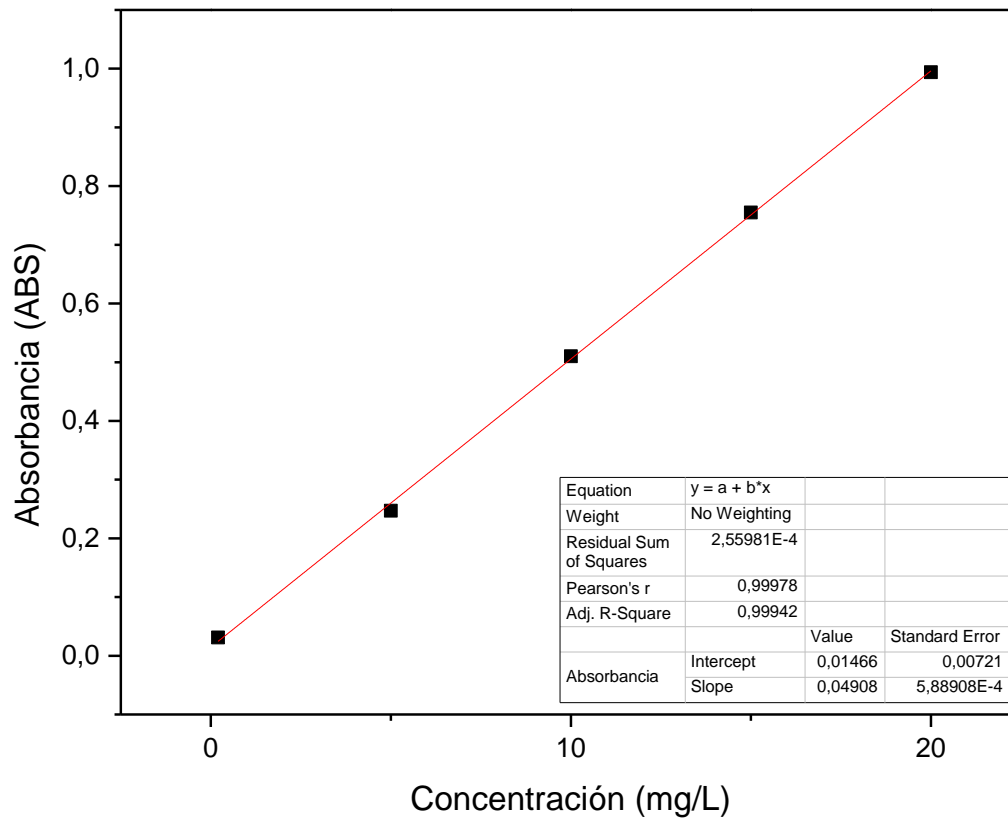
El magnesio es un elemento indispensable para el crecimiento de las microalgas. Por un lado, es el átomo principal de la molécula de clorofila, principal pigmento involucrado en el

proceso de fotosíntesis. Además, juega un papel importante en numerosas reacciones metabólicas, actuando como cofactor dentro de numerosos procesos bioquímicos (Abo-State et al., 2019; H. B. A. Ben Ayed et al., 2016; Ermis et al., 2020; S. Wang et al., 2014). Por tal motivo, se realizó el monitoreo de este elemento a lo largo del periodo de fermentación y se correlacionó el contenido de magnesio disuelto, extracelular e intracelular en cada una de las fases de crecimiento del cultivo (H. B. A.-B. Ayed et al., 2015).

La cuantificación de magnesio se realizó por medio del método de curva de calibración. Las concentraciones empleadas para la fabricación de la creación de la curva de calibración fueron las siguientes: 0.5 ppm, 5.0 ppm, 10.0 ppm, 15.0 ppm y por último 20.0 ppm. Las cuales se realizaron a partir de una solución de 100 ppm de nitrato de magnesio ( $MgNO_3$ ). Las diluciones para la fabricación de los patrones empleados se realizaron con ayuda de agua tipo 1 acidulada con HCl en valores aforados y la curva de calibración final se muestra en **figura 16**.

**Figura 16.**

Curva de calibración para la cuantificación de magnesio



*Nota:* Curva de calibración realizada con una solución de 100 ppm de  $MgNO_3$

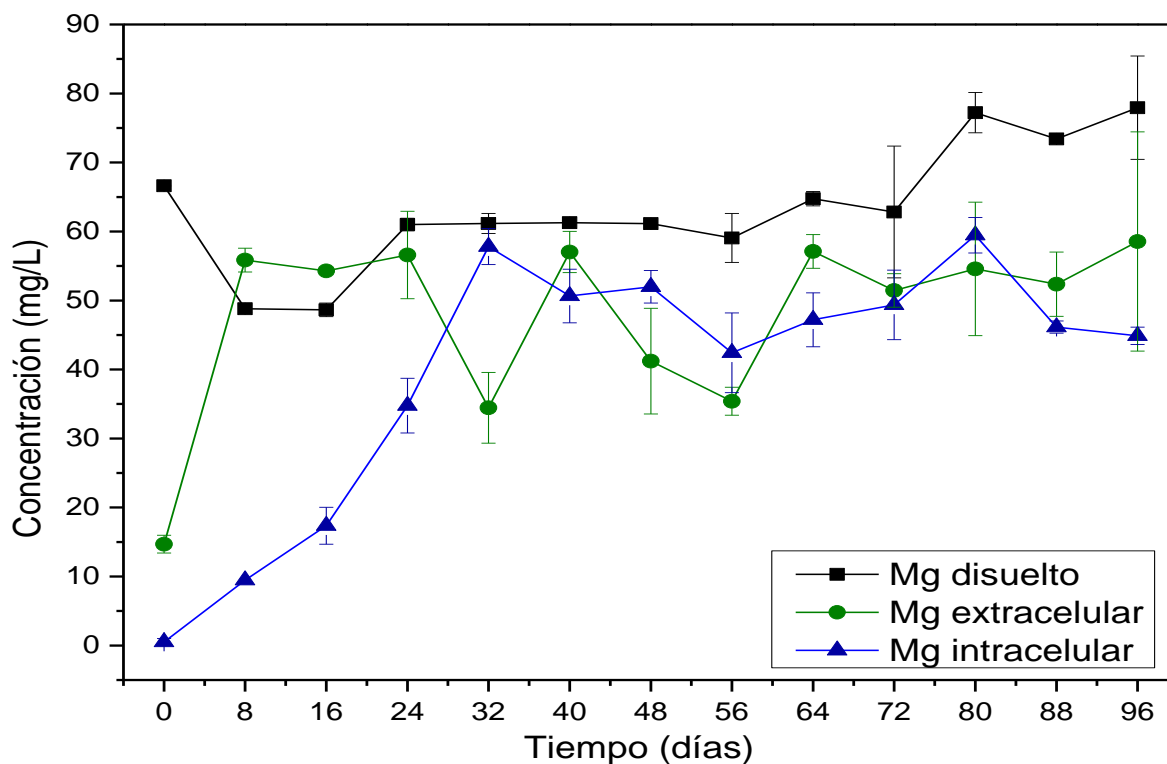
Una vez con la curva de calibración ya construida, se procedió a realizar la toma de muestras y se calculó la concentración presente con ayuda de la ecuación 10. Los resultados obtenidos se muestran graficados en la figura 17.

$$y = 0.0491x + 0.015$$

(ecuación 10)

**Figura 17.**

Resultados determinación de contenido de magnesio



*Nota.* Cuantificación de magnesio disuelto, extracelular e intracelular, por medio de la técnica de espectrometría de absorción atómica, en células de *Chlorella vulgaris*, durante el periodo de fermentación.

Los resultados obtenidos muestran tres tipos de comportamientos asociados a cada una de las variables evaluadas. En primer lugar, se observa una disminución en el contenido de magnesio disuelto a medida que la cantidad extracelular e intracelular aumenta, comportamiento que se asocia a la fase de latencia. Al llegar el día 32 se observa el mayor registro de magnesio intracelular a lo largo de toda la fermentación, afirmando la hipótesis de asociar la fase de crecimiento exponencial a estos días. Lo anterior se debe a que cualquier microorganismo que se encuentre en este punto de fermentación tendrá su mayor actividad metabólica, debido a la alta tasa de

reproducción celular (Tipantuña Chiluisa, 2018). Por tal motivo, es de esperarse una alta cantidad de magnesio intracelular, ya que el magnesio es el átomo principal de la molécula de clorofila y funciona como cofactor de múltiples reacciones bioquímicas (Abo-State et al., 2019; S. Wang et al., 2014). Seguidamente, hasta el día 72 los valores de magnesio intracelular se mantuvieron estables oscilando alrededor de los 50 mg/L y con resultados de concentración celular discutidos anteriormente en la sección 4.2 este periodo de tiempo se asocia a la fase estacionaria, la cual se caracteriza por presentar un cese en la reproducción y muerte de la población celular (Tipantuña Chiluisa, 2018). Por último, pasado el día 72 se observa un aumento en las cantidades de magnesio disuelto alrededor de los 80 mg/L lo que indica que las células de *Chlorella vulgaris* ya han llegado a su fase de muerte y, por lo tanto, el magnesio presente retorna nuevamente al medio de cultivo.

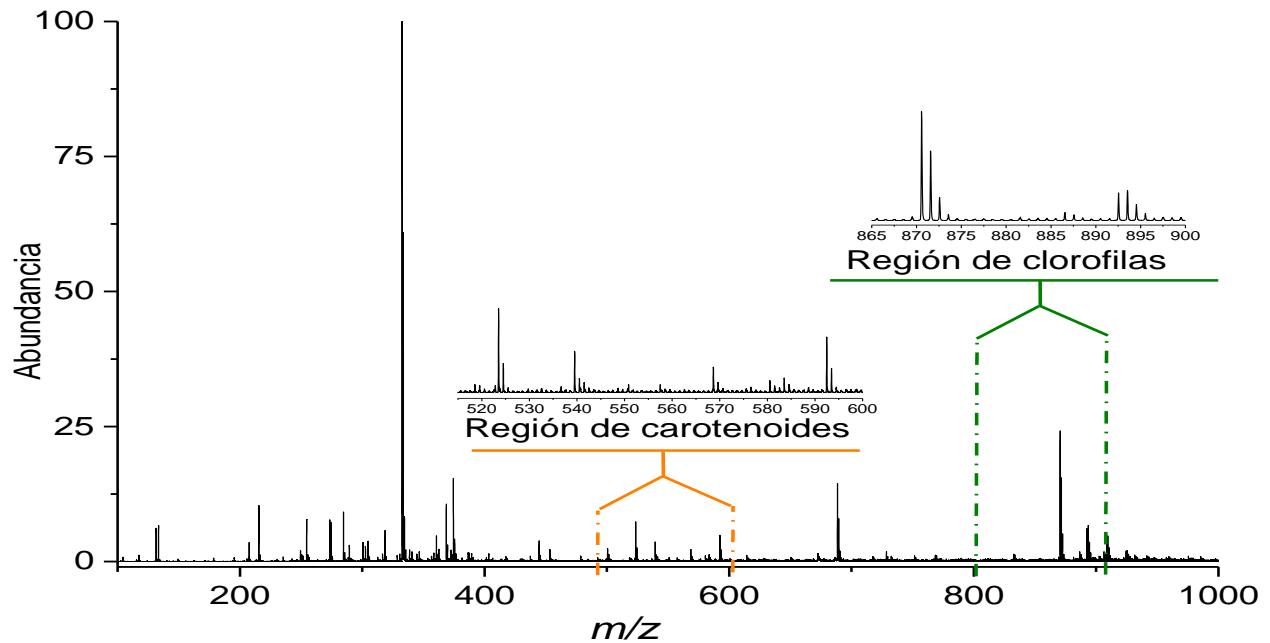
#### 4.6 Análisis MALDI

Los ensayos de MALDI se realizaron a los extractos obtenidos mediante ultrasonido utilizando acetona, como solvente de extracción, como se describe en la sección 3.6, de la metodología. Las muestras se preservaron en ausencia de luz a 4 °C. La metodología empleada para estos procesos se describe en la sección 3.6. Los espectros se tomaron con las matrices 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) y 2-[(2E)-3-(4-tert-butylphenyl)-2-methylprop-2-enylidene]malononitrile (DCTB). Una vez se tomaron los espectros se procesaron los datos en el *software* de análisis FlexAnalysis 3.3 de Bruker Daltonik GmbH y se reportaron los resultados mostrados a continuación.

En primer lugar, en la **figura 18** se muestra un espectro MALDI del extracto de pigmentos de *Chlorella vulgaris*, en el cual se observan las regiones asociadas a metabolitos de interés para la realización del presente trabajo de investigación.

**Figura 18.**

Espectro de masas MALDI para el extracto de pigmentos de *Chlorella vulgaris* pre-inóculos, modo de ionización positivo. Matriz MALDI DCTB, 5 mM, proporción, 1:1000 A:M.

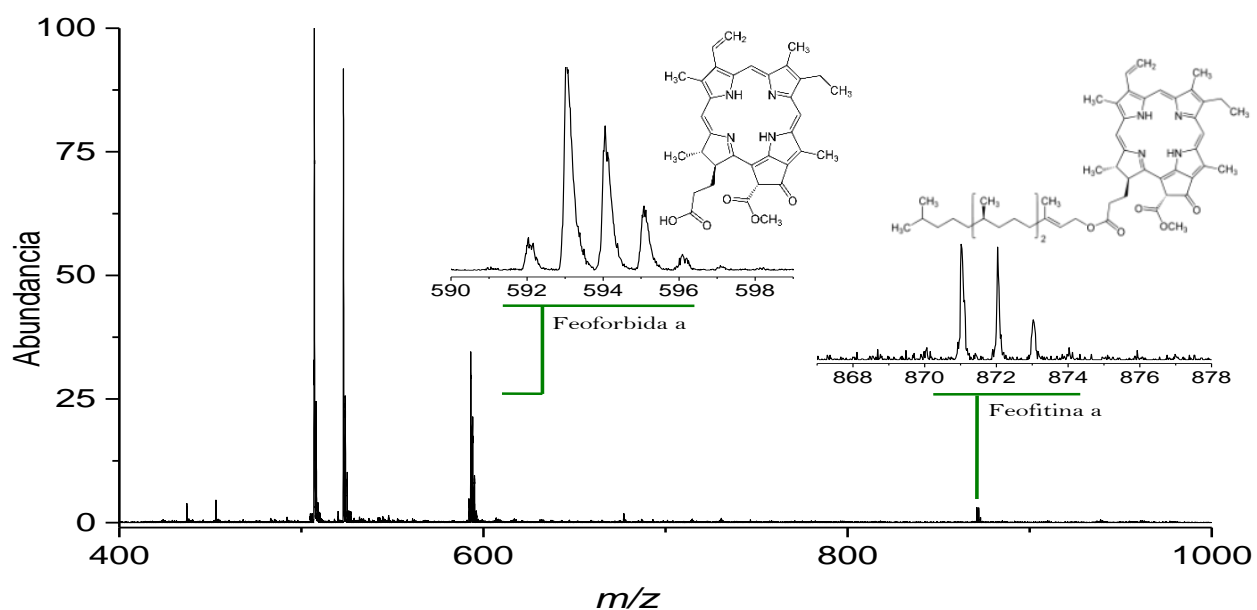


Por un lado, se observa que entre  $m/z$  800 y 900 se encuentran pigmentos tipo clorofila. Sin embargo, algunos derivados tipo feoforbida se encuentran cerca de la región entre  $m/z$  500 a 600 (T. Suzuki et al., 2009). Asimismo, los pigmentos fotoprotectores como carotenoides y xantofilas generalmente se encuentran en el rango  $m/z$  500 a 600 (Fraser et al., 2007; Kaufmann et al., 1996; Rivera et al., 2014).

Como se mencionó anteriormente en la metodología, se realizaron mediciones con dos tipos de matrices. La **figura 19** muestra la identificación de algunas señales correspondientes al extracto de acetona- de *Chlorella vulgaris* mezclado con la matriz de DHB.

**Figura 19.**

Espectro de masas MALDI para el extracto de pigmentos de *Chlorella vulgaris*, modo de ionización positivo. Matriz MALDI DHB, 5 mM, proporción, 1:1000 A:M.



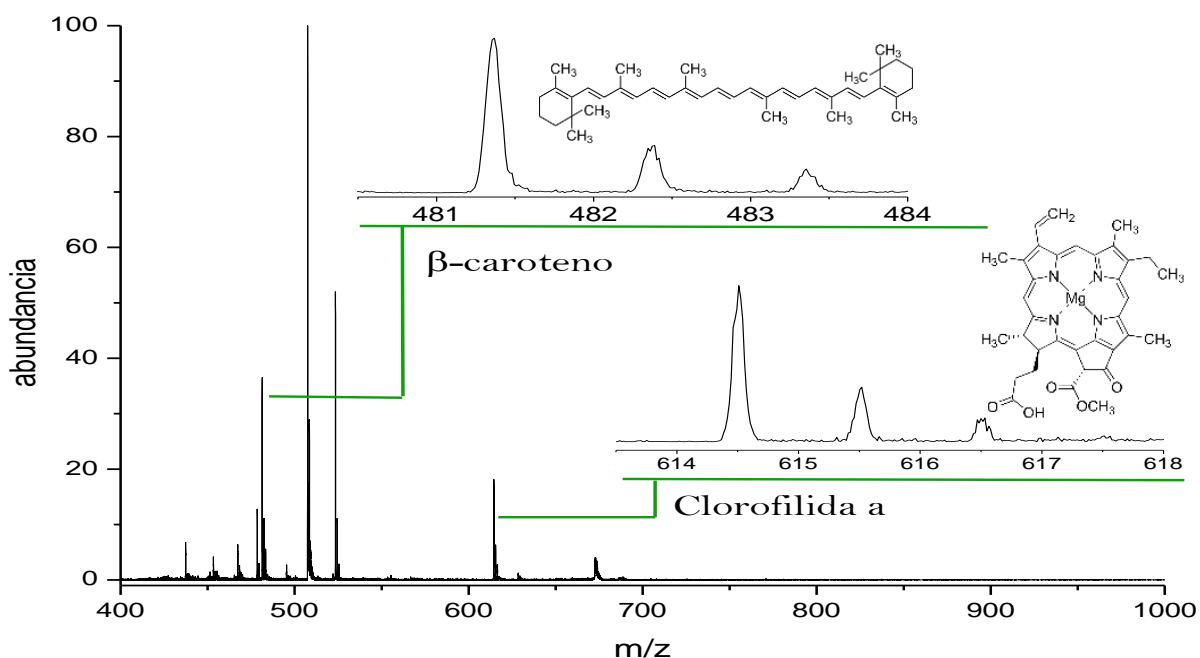
Las señales corresponden a derivados de clorofila. En primer lugar, se encontró una señal en  $m/z$  593, la cual corresponde a moléculas protonadas de feoformida *a*  $[M + H]^+$  ( $C_{35}H_{36}N_4O_5$ ). En segundo lugar, se logró asociar la señal  $m/z$  871 a la molécula protonada de feofitina *a*  $[M + H]^+$  ( $C_{55}H_{74}N_4O_5$ ); en tercer lugar, se relacionó la señal de  $m/z$  607 que corresponde a una molécula protonada  $[M + H]^+$  de feoformida *b* ( $C_{35}H_{34}N_4O_6$ ). También, se encontró una señal sobre los  $m/z$  520 asociada a un fragmento de la molécula de violaxantina  $520 [M - 80]^+$  y, por último, una señal a  $m/z$  533 perteneciente a un fragmento de la molécula de luteína  $[M + H - 18]$ . Todas las señales encontradas confirmaron lo presentado en estudios similares con este organismo en trabajos realizados por (Bender & Barry, 2008; Jacob-lopés et al., 2020; Pantami et al., 2020; Rivera et al., 2014) La feoformida *a* y *b* son moléculas derivadas de la degradación de clorofilas, ya que carecen

de su cadena hidrofóbica y el átomo central de magnesio (Y. Suzuki et al., 2002; Takamiya et al., 2000). De igual forma, la feofitina es un derivado de clorofila que carece de la presencia de su átomo de magnesio central producto de una des metalización del átomo de magnesio a la molécula de clorofila (Roca et al., 2016). La feofitina es una molécula fundamental en la primera reacción fotoquímica del fotosistema II (PSII), ya que sirve como medio de transporte de electrones en el proceso de fotosíntesis (Whitmarsh & Govindjee, 2002). De igual forma, la feofitina sirve como un posible fotoprotector otorgando soporte estructural lo cual la convierte en una molécula poco susceptible a los cambios por el impacto de fotones (Hou, 2014)

Por otro lado, en la **figura 20** se muestran algunas señales obtenidas a partir de los extractos de acetona con la matriz de DCTB. Se lograron identificar señales en  $m/z$  615 asociadas a las moléculas protonadas  $[M + H]^+$  de clorofilida *a* ( $C_{35}H_{34}MgN_4O_5$ ) según los reportes de (Jacob- lopes et al., 2020; T. Suzuki et al., 2009). Igualmente, se asoció la señal obtenida en  $m/z$  481 que corresponde a una fracción de  $\beta$ -caroteno  $[M + H - 56]^+$  según el trabajo de (Rivera et al., 2014).

**Figura 20.**

Espectro de masas MALDI para el extracto de pigmentos de *Chlorella vulgaris*, modo de ionización positivo. Matriz MALDI DCTB, 5 mM, proporción, 1:1000 A:M.

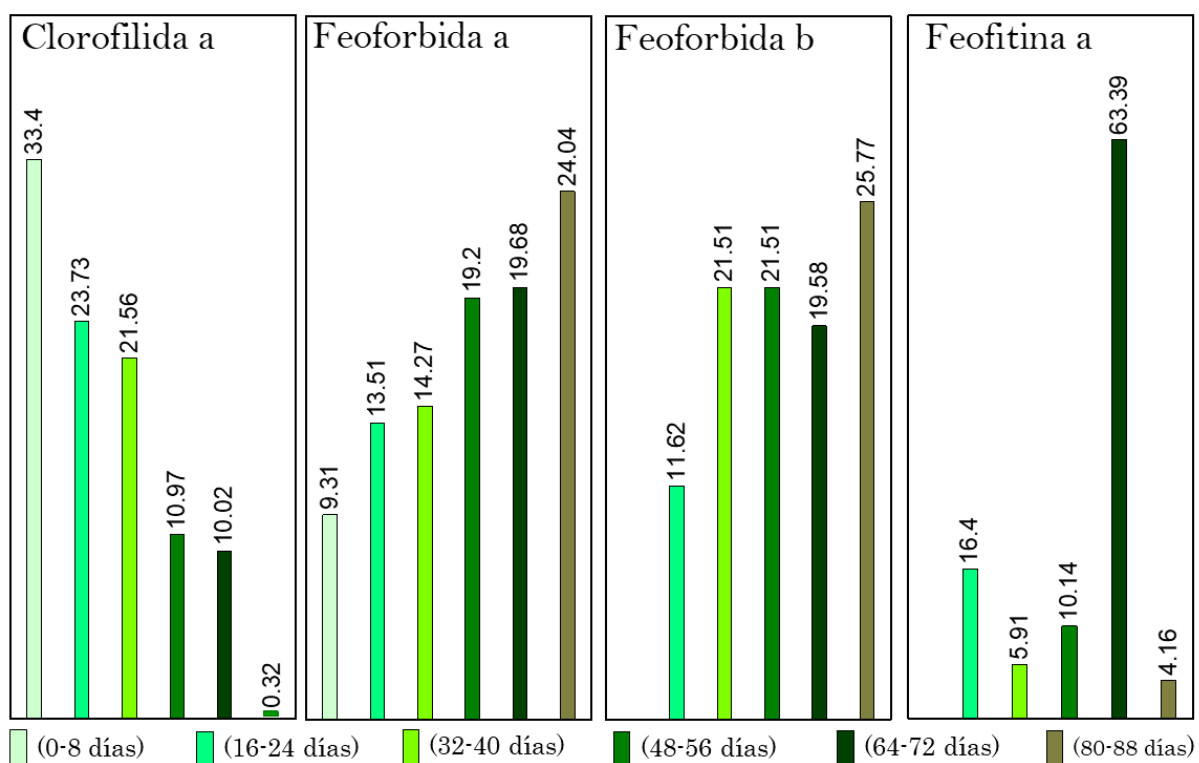


Para realizar el monitoreo de las señales correspondientes, se realizó la normalización de los espectros de masas por medio de la técnica de análisis parcial de la corriente iónica, que tiene como principio agrupar señales correspondientes a una misma familia de compuestos, relacionados estructuralmente. Con base a ello, la normalización se realizó con la corriente iónica parcial, es decir, la sumatoria de las abundancias del grupo de señales (Blanco, 2021). Dicha técnica, no es de carácter cuantitativo. Sin embargo, para realizar el monitoreo de señales es una aproximación válida, ya que la toma de los espectros se realizó el mismo día, bajo las mismas condiciones operativas.

La **figura 21** muestra los datos asociados a las señales previamente encontradas, observando tendencias a lo largo del tiempo de fermentación de los espectros de MALDI del grupo de clorofilas y derivados.

**Figura 21.**

Cambios composicionales de derivados de clorofilas de las señales obtenidas en los extractos de acetona de *Chlorella vulgaris* en intervalos de tiempo de fermentación



De manera general, las señales de feofoforbida *a*, *b* y feofitina *a* evidencian un comportamiento ascendente con el pasar de los días, siendo el de feofoforbida *a* la molécula que se encuentra en mayor proporción con respecto a las todas. Este comportamiento era de esperarse, ya que tanto la feofoforbida como la feofitina son producto de la degradación de clorofilas (Maroneze

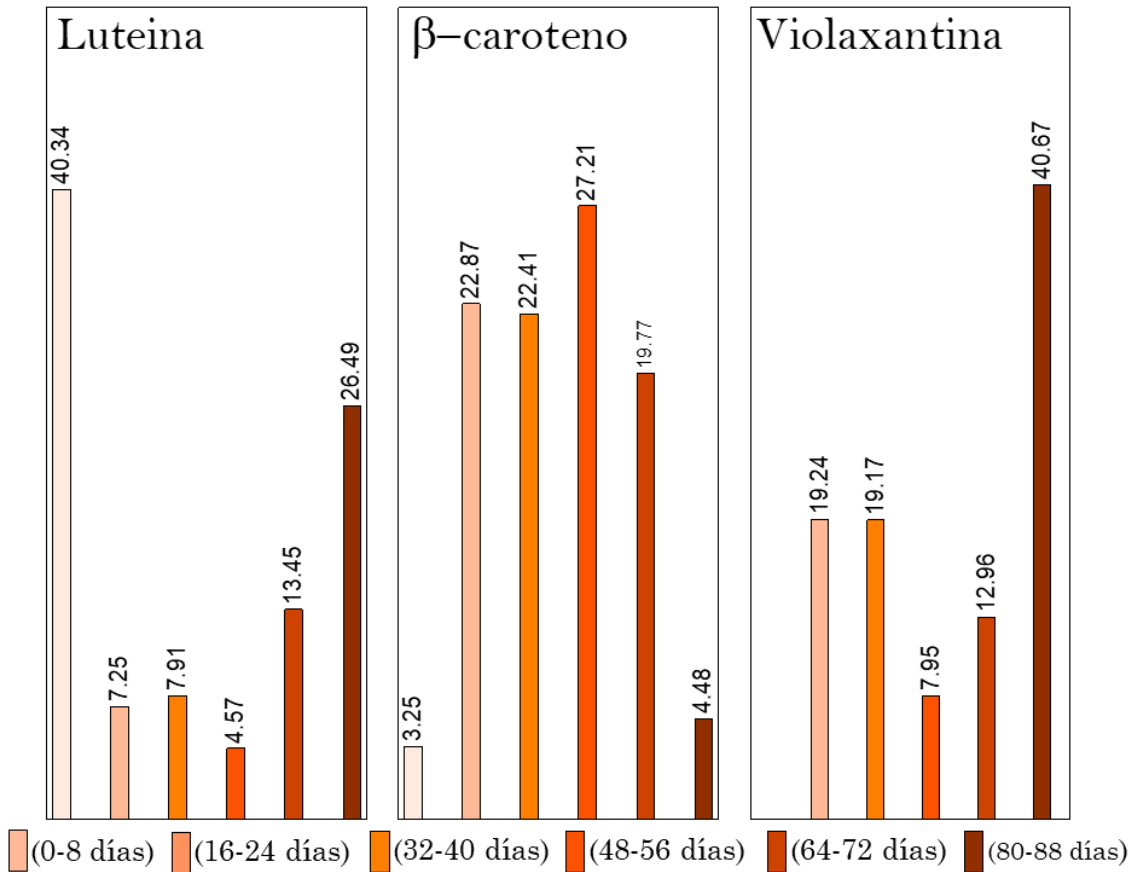
et al., 2019; Roca et al., 2016; Y. Suzuki et al., 2002). Por lo cual, a medida que el cultivo de microalgas *Chlorella vulgaris* envejece la presencia de derivados de clorofilas aumentaba (Zhu et al., 2017). Además, estudios demuestran que la feofitina forma parte del complejo antena PSII actuando como aceptor primario de electrones (Saga & Tamiaki, 2012). Por lo tanto, para el objetivo del trabajo, estos pigmentos funcionan como indicadores biológicos para asociarlos especialmente a las fases de crecimiento de la microalga *C. vulgaris*.

Por otro lado, se observa una disminución con respecto a la abundancia de los iones de la molécula de clorofilida *a* en relación con el tiempo de fermentación. Al igual que las moléculas anteriormente descritas, la clorofilida *a* es un derivado de la molécula de clorofila que carece de la presencia de su cadena fitol, la cual puede perder bien sea por procesos enzimáticos (clorofilasa) o por una variación en el pH, favoreciéndose en entornos alcalinos (Maroneze et al., 2019; Roca et al., 2016). El comportamiento de la clorofilida *a* es de esperarse, ya que según (Saga & Tamiaki, 2012) este fenómeno es el primer paso en la degradación de clorofilas. En resumen, a medida que el cultivo envejece la cantidad de clorofila presente en el interior de la microalga tiende a degradarse, así como algunos de sus derivados, para evitar daño celular por acción fotodinámica (Takamiya et al., 2000).

Por otro lado, en la **figura 22** se muestran los datos de MALDI correspondientes al grupo de los carotenoides. Los carotenoides son compuestos lipofílicos que poseen tonalidades rojas, naranjas y amarillas e intervienen como agentes antioxidantes para evitar el daño oxidativo (Gong & Bassi, 2016).

**Figura 22.**

Cambios composicionales en la familia de pigmentos fotoprotectores de las señales obtenidas de los extractos de *Chlorella vulgaris* en los intervalos de tiempo de fermentación



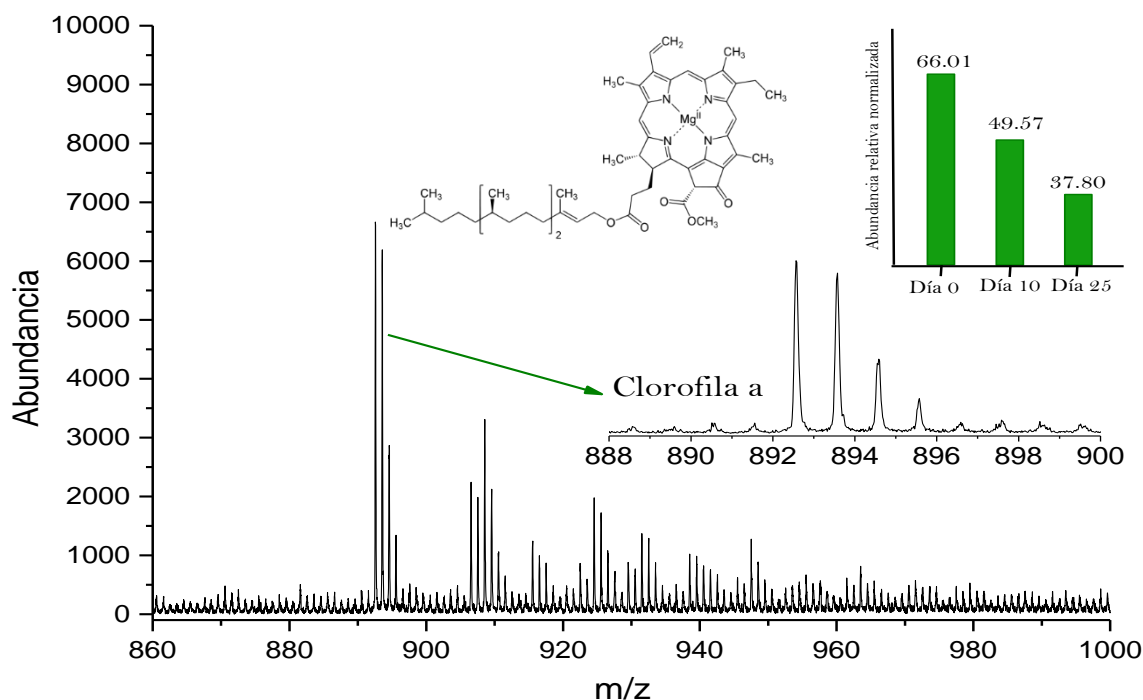
De esta manera, en las señales de luteína y violaxantina se observa un aumento en la proporción de las señales a medida que transcurre el tiempo, este comportamiento era de esperarse, y puede correlacionarse con la ruta biosintética de los carotenoides, dado que se activa a medida que los organismos se acercan a las etapas finales de su vida, debido a que la presencia de carotenoides actúa como pigmentos fotoprotectores disminuyendo los cambios por el daño oxidativo (Gong & Bassi, 2016; Masojídek et al., 2013; Silveira et al., 2018). Por otro lado, las

señales del  $\beta$ -caroteno; un carotenoide primario, componente estructural y funcional en el aparato fotosintético de las microalgas (Fernández Cordero, 2013), aumenta considerablemente durante casi todo el tiempo de fermentación, con lo cual podemos asociar a que la presencia de este compuesto cumple una función fotosintética a lo largo de toda la curva de crecimiento. También se puede resaltar que durante los últimos días de muestreo la proporción tiende a disminuir, pero la de luteína aumenta, con lo cual ambos compuestos se relacionan complementándose y cumpliendo las funciones fotosintéticas y fotoprotectores de la microalga. Lo anterior se puede explicar, ya que el precursor de la luteína en la biosíntesis de carotenoides es el isómero de  $\beta$ -caroteno (Fernández Cordero, 2013; Gong & Bassi, 2016; Jacob-lopés et al., 2020).

De igual manera cabe destacar que no se observaron señales asociadas a la presencia de moléculas de clorofila, el cual se logró atribuir a la presencia del antibiótico ciprofloxacina como se discutió anteriormente. Sin embargo, cabe resaltar que el organismo fue monitoreado en los días de pre-inóculo sin antibiótico y se logró evidenciar la presencia de clorofilas en los extractos y se realizó tratamiento a estos datos (ver **figura 23**) con el fin de evaluar la viabilidad del organismo, sin embargo, se evidencia la pérdida de la síntesis en el transcurso de la fermentación.

**Figura 23.**

Espectro de masas MALDI para el extracto de pigmentos de *Chlorella vulgaris* tomado de los pre-inóculos día 0, día 10 y día 25 modo de ionización positivo. Matriz MALDI DCTB, 5 mM, proporción, 11:1000 A:M.



Los datos observados en los tres puntos de las pruebas preliminares nos muestran la evidencia en el decaimiento de la proporción de señales asociadas a clorofila a. Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación junto con los realizados previamente en el grupo CEIAM en el cual se reportan la detección de clorofilas y mayor diversidad de pigmentos fotoprotectores (Blanco, 2021) permiten evidenciar la necesidad de seguimiento de los organismos en procesos biológicos al momento de implementarlos en las diferentes industrias de interés, de esta manera se postula la técnica MALDI como estrategia que permite monitorear las

diferencias en síntesis de moléculas o cambios metabólicos del organismo bajo las condiciones empleadas en los diferentes estudios.

## 5 Conclusiones

Las técnicas tradicionales permitieron elucidar el comportamiento de la microalga *Chlorella vulgaris* en relación a biomasa y concentración celular durante el tiempo de fermentación. Esto permitió determinar cada una de las etapas de vida del microorganismo: fase de latencia (días 0 al 16), fase de crecimiento exponencial (días 24 al 32), fase estacionaria (días 40 al 64) y fase de muerte (días 64 al 96).

El seguimiento realizado sobre las concentraciones de magnesio intracelular permitió correlacionar como la microalga *Chlorella vulgaris* absorbe el metal para realizar los procesos fotosintéticos y metabólicos. De esta manera durante la fase de latencia, se observó una menor cantidad de magnesio intracelular, debido al proceso de adaptación a las condiciones de cultivo. En el día 32, fase de crecimiento exponencial, la cantidad de magnesio intracelular se encontraba en aumento debido al proceso de división celular. Por último, durante la fase de muerte se observó una mayor cantidad de magnesio disuelto en el medio como indicador del proceso de lisis celular de la microalga.

La técnica de MALDI MS permitió realizar el monitoreo de biomarcadores, tales como: feoforbida a, clorofilida a, Luteína y  $\beta$ -caroteno, pigmentos que se sintetizan durante el proceso de crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris*, dependiendo de las condiciones y el estrés oxidativo del proceso de fermentación. Por lo anterior, la técnica de espectrometría de MALDI MS se postula como una herramienta sencilla y de rápida respuesta que brinda información molecular robusta sobre el estado de desarrollo de microalgas.

## 6 Recomendaciones

En futuros estudios se recomienda realizar un estudio previo sobre la influencia de antibióticos y antifúngicos empleados para el tratamiento de organismos externos a las microalgas, ya que pueden afectar significativamente el normal desarrollo del estudio.

Con el objetivo de recopilar más información sobre los diferentes posibles biomarcadores que pueden ser empleados para el monitoreo de *Chlorella vulgaris*, por medio de la técnica de espectrometría de masas MALDI, se recomienda realizar el mismo estudio con diferentes medios de cultivo y modificando las condiciones de crecimiento, con la finalidad de explorar la mayor cantidad de escenarios posibles en el que la microalga puede crecer y de esta forma relacionar qué tipo de biomarcador es el que se presenta en mayor medida en todos los escenarios posibles.

## 7 Referencias bibliográficas

- Abalde, J., CID, A., FIDALGO, P., Torres, E., & Herrero, C. (1995). *Microalgas: Cultivo y Aplicaciones* (Univerdida). <https://doi.org/https://doi.org/10.17979/spudc.9788497497695>
- Abo-State, M. A. M., Shanab, S. M. M., & Ali, H. E. A. (2019). Effect of nutrients and gamma radiation on growth and lipid accumulation of *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 12(1), 332–342. <https://doi.org/10.1080/16878507.2019.1662216>
- Aguirre García, J. S. (2012). Variabilidad de la inactivación microbiana y de la fase de latencia de los microorganismos supervivientes a diferentes tratamientos conservantes de alimentos [UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID FACULTAD]. In *La teisis doctoral en teorico y empirico* (Vol. 4, Issue 3). <http://marefateadyan.nashriyat.ir/node/150>
- Al Dayel, M. F., & El Sherif, F. (2021). Evaluation of the effects of *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis salina*, and *Enterobacter cloacae* on growth, yield and active compound compositions of *Moringa oleifera* under salinity stress. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(3), 1687–1696. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.12.007>
- Anderson, M. . del R., & Calderon, V. (2000). *Microbiología alimentario: metodología analítica para alimentos y bebidas* (E. D. de Santos (ed.); 2nd ed.). <https://www.ptonline.com/articles/how-to-get-better-mfi-results>
- Awad, H., Khamis, M. M., & El-Aneed, A. (2015). Mass spectrometry, review of the basics: Ionization. *Applied Spectroscopy Reviews*, 50(2), 158–175. <https://doi.org/10.1080/05704928.2014.954046>
- Ayed, H. B. A. Ben, Taidi, B., Ayadi, H., Pareau, D., & Stambouli, M. (2016). Magnesium uptake

- by the green microalga *Chlorella vulgaris* in batch cultures. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(3), 503–510. <https://doi.org/10.4014/jmb.1507.07039>
- Ayed, H. B. A.-B., Taidi, B., Ayadi, H., Pareau, D., & Stambouli, M. (2015). Effect of magnesium ion concentration in autotrophic cultures of *Chlorella vulgaris*. *Algal Research*, 9, 291–296. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.03.021>
- Bastidas, O. (2013). Neubauer Chamber Cell Counting -. In *Technical Note-Neubauer Chamber Cell Counting*. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2012.11.002>
- Bazarnova, J., Smyatskaya, Y., Shlykova, A., Balabaev, A., & Đurović, S. (2022). Obtaining Fat-Soluble Pigments—Carotenoids from the Biomass of *Chlorella* Microalgae. *Applied Sciences (Switzerland)*, 12(7), 2–12. <https://doi.org/10.3390/app12073246>
- Becker, E. W. (2007). Microalgae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, 25(2), 207–210. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.11.002>
- Benavente-Valdés, J. R., Méndez-Zavala, A., Morales-Oyervides, L., Chisti, Y., & Montañez, J. (2017). Effects of shear rate, photoautotrophy and photoheterotrophy on production of biomass and pigments by *Chlorella vulgaris*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 92(9), 2453–2459. <https://doi.org/10.1002/jctb.5256>
- Berges, J. A., & Harrison, P. J. (2004). *Appendix A-recipes for freshwater and seawater media*. [www.pasteur.fr/recherche/banques/PCC](http://www.pasteur.fr/recherche/banques/PCC)
- Blanco, C. (2021). *Estudio de la evolución de pigmentos y lípidos en células intactas de Chlorella vulgaris*. Universidad Industrial de Santader.
- Brown, H. L. (2022). Microbial Growth. *Encyclopedia of Infection and Immunity*, 1, 324–335. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818731-9.00190-7>
- Cercenado, E., & Saavedra-Lozano, J. (2009). El antibiograma. Interpretación del antibiograma:

- conceptos generales (I). *Anales de Pedriatría Continuada*, 7(4), 214–217.  
<https://doi.org/10.1016/b978-84-458-1845-9.50012-8>
- Chen, X., Wang, S., Sun, X., & Lu, Q. (2021). Cultivation of energy microalga *Chlorella vulgaris* with low-toxic sludge extract. *Water Science and Technology*, 83(4), 818–830.  
<https://doi.org/10.2166/wst.2021.020>
- Chia, M. A., Lombardi, A. T., & Melão, M. da G. G. (2013). Growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* in different growth media. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 85(4), 1427–1438. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201393312>
- Connelly, R. (2014). Second-Generation Biofuel from High-Efficiency Algal-Derived Biocrude. In *Bioenergy Research: Advances and Applications* (pp. 153–170). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59561-4.00010-3>
- Daliry, S., Hallajisani, A., Mohammadi Roshandeh, J., Nouri, H., & Golzary, A. (2017). Investigation of optimal condition for *Chlorella vulgaris* microalgae growth. *Global Journal of Environmental Science and Management*, 3(2), 217–230.  
<https://doi.org/10.22034/gjesm.2017.03.02.010>
- de Andrade, C. J., & de Andrade, L. M. (2017). An overview on the application of genus *Chlorella* in biotechnological processes. *Journal of Advanced Research in Biotechnology*, 2(1), 1–9.  
<https://doi.org/10.15226/2475-4714/2/1/00117>
- El-Aneed, A., Cohen, A., & Banoub, J. (2009). Mass spectrometry, review of the basics: Electrospray, MALDI and commonly used mass analyzers. In *Applied Spectroscopy Reviews* (Vol. 44, Issue 4, pp. 210–218). <https://doi.org/10.1080/05704920902970646>
- Elisabeth, B., Rayen, F., & Behnam, T. (2021). Microalgae culture quality indicators: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 41(4), 457–473.

<https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1854672>

Ermis, H., Guven-Gulhan, U., Cakir, T., & Altinbas, M. (2020). Effect of iron and magnesium addition on population dynamics and high value product of microalgae grown in anaerobic liquid digestate. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60622-1>

Fernández Cordero, B. (2013). *PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES POR MICROALGAS Y CARACTERIZACIÓN DE LA RUTA CAROTENOGÉNICA EN Chlorella zofingiensis*.

Figueroa-torres, G. M., Pittman, J. K., & Theodoropoulos, C. (2020). *Microalgae strain catalogue A strain selection guide for microalgae users : cultivation and chemical characteristics for high added-value products*. May, 1–86. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3780067>

Fraser, P. D., Enfissi, E. M. A., Goodfellow, M., Eguchi, T., & Bramley, P. M. (2007). Metabolite profiling of plant carotenoids using the matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Plant Journal*, *49*(3), 552–564. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02949.x>

García, R., & Báez, A. P. (2012). Atomic Absorption Spectrometry (AAS). In *Atomic Absorption Spectroscopy* (pp. 1–9). INTECH. <https://doi.org/10.5772/27564>

Gary, C. D. (2009). Química analítica. In *Química Analítica* (6th ed.). MCGRAW-HILL/INTERAMERICANA EDITORES, S. A.

Geiger, E., Hornek-Gausterer, R., & Saçan, M. T. (2016). Single and mixture toxicity of pharmaceuticals and chlorophenols to freshwater algae *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *129*, 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.03.032>

Gong, M., & Bassi, A. (2016). Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnology Advances*, *34*(8), 1396–1412.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.10.005>

Griffiths, M. J., Garcin, C., van Hille, R. P., & Harrison, S. T. L. (2011). Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *Journal of Microbiological Methods*, 85(2), 119–123. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.02.005>

Gross, J. H. (2017). Mass spectrometry. In *Journal of Chromatography A* (3rd ed., Vol. 1040, Issue 2). Springer.

He, Z., Qu, Y., Jin, W., Zhou, X., Han, W., Song, K., Gao, S., Chen, Y., Yin, S., & Jiang, G. (2022). Effect of microwave on biomass growth and oxygen production of microalgae *Chlorella pyrenoidosa* cultured in real wastewater. *Process Safety and Environmental Protection*, 161, 22–33. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2022.03.015>

Hosseini, S., & Martinez-Chapa, S. O. (2017). Principles and mechanism of MALDI-ToF-MS analysis. In *SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology* (Issue 9789811023552, pp. 1–10). [https://doi.org/10.1007/978-981-10-2356-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-10-2356-9_1)

Hynstova, V., Sterbova, D., Klejdus, B., Hedbavny, J., Huska, D., & Adam, V. (2018). Separation, identification and quantification of carotenoids and chlorophylls in dietary supplements containing *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* using High Performance Thin Layer Chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 148, 108–118. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.09.018>

Jacob-lobes, E., Queiroz, M. I., & Queiroz Zepka, L. (2020). Pigments from Microalgae Handbook. In *Pigments from Microalgae Handbook*. Springer Nature. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-50971-2>

Johansen, M. N. (2012). *MICROALGAE Biotechnology, Microbiology and Energy*. <https://www.ptonline.com/articles/how-to-get-better-mfi-results>

- Joseba, B., & San Millan, R. (n.d.). *Recursos de microbiología*. Dpto. Inmunología, Microbiología y Parasitología Universidad Del País Vasco. <http://www.testak.org/microbiologia/>
- Jurinke, C., Oeth, P., & Van den Boom, D. (2004). MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Molecular Biotechnology*, 26(2), 147–148.
- Kaufmann, R., Wingerath, T., Kirsch, D., Stahl, W., & Sies, H. (1996). Analysis of carotenoids and carotenol fatty acid esters by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) and MALDI-Post-Source-Decay Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 238, 117–128. [papers2://publication/uuid/B34D7341-C6C6-482A-901F-4A00C4FAD7B0](https://publication/uuid/B34D7341-C6C6-482A-901F-4A00C4FAD7B0)
- Kliphuis, A. M. J. (2010). *Modeling of microalgal metabolism*. Wageningen University.
- Kumar, K., Dasgupta, C. N., & Das, D. (2014). Cell growth kinetics of *Chlorella sorokiniana* and nutritional values of its biomass. *Bioresource Technology*, 167, 358–366. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.118>
- Liang, Y., Kashdan, T., Sterner, C., Dombrowski, L., Petrick, I., Kröger, M., & Höfer, R. (2015). Algal Biorefineries. In *Industrial Biorefineries and White Biotechnology* (pp. 35–90). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63453-5.00002-1>
- Lichtenthaler, H. K., & Wellburn, A. R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 11(5), 591–592. <https://doi.org/10.1042/bst0110591>
- López-Tolentino, G., Lira-Saldivar, R. H., & Méndez-Argüello, B. (2016). Medición de intercambio gaseoso, área foliar e índice de clorofila en plantas elicidadas con nanopartículas. *Agronano Tecnología*, 112–126. [https://ciqa.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1025/338/1/Medición de Intercambio Gaseoso%2C Área Foliar e Índice de Clorofila en Plantas Elicidadas con Nanopartículas.pdf](https://ciqa.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1025/338/1/Medición%20de%20Intercambio%20Gaseoso%20Área%20Foliar%20e%20Índice%20de%20Clorofila%20en%20Plantas%20Elicidadas%20con%20Nanopartículas.pdf)

- Luangpipat, T., & Chisti, Y. (2017). Biomass and oil production by *Chlorella vulgaris* and four other microalgae — Effects of salinity and other factors. *Journal of Biotechnology*, 257, 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.11.029>
- Ma'mun, S., Wahyudi, A., & Raghdanesa, A. S. (2022). Growth rate measurements of *Chlorella vulgaris* in a photobioreactor by Neubauer-improved counting chamber and densitometer. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 963(1), 7. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/963/1/012015>
- 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), 15. <https://doi.org/10.3390/antiox8120600>
- Martinez, V. L., & García, R. E. (2010). Implementación de bioprocesos continuos estables para la producción de hidrógeno por fermentación oscura. *Implementación de Bioprocesos Continuos Estables*, July, 1–10. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3988.8489>
- Masojídek, J., Torzillo, G., & Koblížek, M. (2013). Photosynthesis in Microalgae. In *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology: Second Edition* (Issue April, pp. 21–27). <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch2>
- Mohammed Ali, S., Shafeek Nasr, H., & Tawfok Abbs, W. (2012). Enhancement of *Chlorella vulgaris* Growth and bioremediation ability of aquarium wastewater using diazotrophs. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 16(15), 775–782. <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.3923/pjbs.2012.775.782>
- Mullor, A. E. (2021). *EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA, LUZ Y TIEMPO DE EXPOSICIÓN EN LA ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA DE LAS MICROALGAS*. Universidad de Almería.

- Nie, X., Wang, X., Chen, J., Zitko, V., & An, T. (2008). Response of the freshwater alga *Chlorella vulgaris* to trichloroisocyanuric acid and ciprofloxacin. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(1), 168–173.
- Pagels, F., Pereira, R. N., Vicente, A. A., & Guedes, A. C. (2021). Extraction of pigments from microalgae and cyanobacteria—a review on current methodologies. *Applied Sciences (Switzerland)*, 11(11), 2–20. <https://doi.org/10.3390/app11115187>
- Pantami, H. A., Bustamam, M. S. A., Lee, S. Y., Ismail, I. S., Faudzi, S. M. M., Nakakuni, M., & Shaari, K. (2020). Comprehensive GCMS and LC-MS/MS metabolite profiling of *Chlorella vulgaris*. *Marine Drugs*, 18(7). <https://doi.org/10.3390/MD18070367>
- Prieto, I. (2020). Estudio Del Crecimiento De La Capacidad De Depuración De Agua Residual. In *Universidad de Almería*. Universidad de almería.
- Ricky, R., Chiampo, F., & Shanthakumar, S. (2022). Efficacy of Ciprofloxacin and Amoxicillin Removal and the Effect on the Biochemical Composition of *Chlorella vulgaris*. *Bioengineering*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/bioengineering9040134>
- Rivera, S. M., Christou, P., & Canela-Garayoa, R. (2014). Identification of carotenoids using mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 33, 1–20. <https://doi.org/10.1002/mas>
- Rizwan, M., Mujtaba, G., Memon, S. A., Lee, K., & Rashid, N. (2018). Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 92(March 2017), 394–404. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.034>
- Roca, M., Chen, K., & Pérez-Galvez, A. (2016). Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages. In R. Carle & R. M. Schweiggert (Eds.), *Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages* (pp. 125–158). <https://doi.org/10.1016/c2014-0-03842-7>

- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35(July), 265–278. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>
- Saga, Y., & Tamiaki, H. (2012). Demetalation of chlorophyll pigments. *Chemistry and Biodiversity*, 9(9), 1659–1683. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201100435>
- Santos, I. C., Hildenbrand, Z. L., & Schug, K. A. (2016). Applications of MALDI-TOF MS in environmental microbiology. *Analyst*, 141(10), 3–7. <https://doi.org/10.1039/c6an00131a>
- Scheer, H. (2013). Chlorophylls and Carotenoids. In W. J. Lennarz & M. D. Lane (Eds.), *Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition* (2nd ed., pp. 498–505). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00134-1>
- Silva, D. A., Cardoso, L. G., de Jesus Silva, J. S., de Souza, C. O., Lemos, P. V. F., de Almeida, P. F., Ferreira, E. de S., Lombardi, A. T., & Druzian, J. I. (2022). Strategy for the cultivation of *Chlorella vulgaris* with high biomass production and biofuel potential in wastewater from the oil industry. *Environmental Technology and Innovation*, 25(102204), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.102204>
- Silveira, Y., Gómez, L., & Kufundala, M. D. (2018). Variación de la composición de pigmentos de *Chlorella vulgaris* Beijerinck, con la aplicación del campo magnético estático. *Revista Cubana de Química*, 30(1), 55–67.
- Singh, J., & Saxena, R. C. (2015). An Introduction to Microalgae: Diversity and Significance. In *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances* (pp. 11–24). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00002-9>
- SKOOG, D. A., HOLLER, F. J., & CROUCH, S. (2008). *Principios de análisis instrumental* (6th

ed.). cengage learning.

- Soto-Ramírez, R., Tavernini, L., Zúñiga, H., Poirrier, P., & Chamy, R. (2021). Study of microalgal behaviour in continuous culture using photosynthetic rate curves: The case of chlorophyll and carotenoid production by *Chlorella vulgaris*. *Aquaculture Research*, 52(8), 3639–3648. <https://doi.org/10.1111/are.15208>
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87–96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Stramarkou, M., Papadaki, S., Kyriakopoulou, K., & Krokida, M. (2017). Effect of drying and extraction conditions on the recovery of bioactive compounds from *Chlorella vulgaris*. *Journal of Applied Phycology*, 29(6), 2947–2960. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1181-8>
- Suzuki, T., Midonoya, H., & Shioi, Y. (2009). Analysis of chlorophylls and their derivatives by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 390(1), 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.04.005>
- Suzuki, Y., Doi, M., & Shioi, Y. (2002). Two enzymatic reaction pathways in the formation of pyropheophorbide a. *Photosynthesis Research*, 74(2), 225–233. <https://doi.org/10.1023/A:1020919929608>
- Takamiya, K. I., Tsuchiya, T., & Ohta, H. (2000). Degradation pathway(s) of chlorophyll: What has gene cloning revealed? *Trends in Plant Science*, 5(10), 426–431. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01735-0](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01735-0)
- Tipantuña Chiluisa, N. V. (2018). Cinética del crecimiento de microorganismos durante el proceso de fermentación de una bebida ancestral elaborada a partir de chonta (*Bactris gasipaes*)

- [Universidad Técnica De Cotopaxi]. In *Universidad Técnica De Cotopaxi* (Vol. 1). <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/4501/1/PI-000727.pdf>
- Van Loon, J. C. (1980). Analytical Atomic Absorption Spectroscopy: Selected Methods. *University of Toronto*, 1–343. <https://books.google.es/books?id=c8UId82ZCG0C>
- Vonshak, A. (1993). Microalgae: laboratory growth techniques and the biotechnology of biomass production. *Photosynthesis and Production in a Changing Environment*, 337–355. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-1566-7\\_21](https://doi.org/10.1007/978-94-011-1566-7_21)
- Wang, J., Yang, H., & Wang, F. (2014). Mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production: Status and prospects. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(7), 3307–3329. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0729-1>
- Wang, S., Zhao, S.-X., Wei, C.-L., Yu, S.-Y., Shi, J.-P., & Zhang, B.-G. (2014). Effect of magnesium deficiency on photosynthetic physiology and triacylglyceride (TAG) accumulation of *Chlorella vulgaris*. *Huan Jing Ke Xue= Huanjing Kexue*, 4(35), 1462–1467.
- Wong, Y., Ho, Y., Co, K., Leung, H., & Tung, K. (2017). Growth Medium Screening for *Chlorella vulgaris* Growth and Lipid Production. *Journal of Aquaculture & Marine Biology*, 6(1), 6–12. <https://doi.org/10.15406/jamb.2017.06.00143>
- Xiong, J. Q., Kurade, M. B., Kim, J. R., Roh, H. S., & Jeon, B. H. (2017). Ciprofloxacin toxicity and its co-metabolic removal by a freshwater microalga *Chlamydomonas mexicana*. *Journal of Hazardous Materials*, 323, 212–219. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.04.073>
- Zahedi Dizaji, S., Attaran Fariman, G., & Zahedi, M. M. (2021). Pigment content analysis in two HAB forming dinoflagellate species during the growth period. *Journal of Applied Phycology*, 33(2), 807–817. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02331-w>
- Zenobi, R., & Knochenmuss, R. (1999). Ion formation in MALDI Mass Spectrometry.

*MassSpectrometryReviews*, 17(5), 337–366.

Zettner, A. (1964). Principles and Applications of Atomic Absorption Spectroscopy. *Advances in Clinical Chemistry*, 7(C), 1–62. [https://doi.org/10.1016/S0065-2423\(08\)60372-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2423(08)60372-8)

Zhu, X., Chen, J., Qiu, K., & Kuai, B. (2017). Phytohormone and light regulation of chlorophyll degradation. *Frontiers in Plant Science*, 8(November), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01911>

## 8 Apéndices