



UNIVERSIDAD DE SONORA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
TECNOLÓGICAS**

POSGRADO EN BIOCIENCIAS

**RESPUESTA BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE
Chaetoceros muelleri BAJO DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE NITRÓGENO**

TESIS

que para obtener el grado de:

MAESTRO EN BIOCIENCIAS

presenta:

DAMARISTELMA DE JESÚS CAMPOS

Hermosillo, Sonora, México.

9 de agosto 2019

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

DERECHOS DE AUTOR

El presente trabajo de tesis se presenta como uno de los requisitos parciales para la obtención del grado de **Maestra en Biociencias** de la Universidad de Sonora.

Se deposita en la biblioteca de Ciencias Biológicas y de la Salud para ponerla a disposición de los interesados. Se permiten citas breves del material contenido en la tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para reproducir, o en su caso referirse a este documento en forma parcial o total, se deberá solicitar la autorización al Coordinador del Programa del Posgrado.

Bajo cualquier otra circunstancia se debe solicitar permiso directamente al autor.

Atentamente

Damaristelma De Jesús Campos

Autor

Dra. Nohemí Gámez Meza

Coordinadora del Programa de Maestría en Biociencias

APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis intitulada "Respuesta bioquímica y molecular de *Chaetoceros muelleri* bajo diferentes concentraciones de nitrógeno" presentada por Damaristelma de Jesús Campos, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Biociencias con Especialidad en Biociencias Moleculares.



Dra. Ángela Corina Hayano Kanashiro
Directora



Dra. Diana Fimbres Olivarría
Co-Directora



Dr. José Antonio López Elías
Secretario



Dr. Luis Ángel Medina Juárez
Sinodal interno



Dr. Luis Fernando García Ortega
Sinodal externo

DEDICATORIA

A **mis hijos y a mi esposo**, que forman parte intrínseca del esfuerzo realizado para la materialización de este proyecto.

A **mis hermanos y a mis padres**, los que siempre están, y forman parte del motor que me impulsa.

“Después de escalar una gran montaña, uno solo encuentra que hay muchas más montañas por escalar”

Nelson Mandela

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento a los mexicanos que contribuyen con sus impuestos, al presupuesto de las becas otorgadas por el **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** del cual fui beneficiaria.

A la **Dra. Ángela Corina Hayano Kanashiro**, por darme la confianza y haberme aceptado en su equipo de trabajo.

A todos los que integran mi comité de tesis, **Dra. Diana Fimbres Olivarría, Dr. José Antonio López Elías, Dr. Luis Ángel Medina Juárez y Dr. Luis Fernando García Ortega** por sus acertados comentarios y sugerencias en cada seminario de presentación de avances del proyecto.

A los técnicos académicos del Laboratorio de Acuicultura, **José Luis Niebla y Álvaro Murguía** por el apoyo para la realización con éxito de los cultivos de microalgas.

A la **M.C. Gisela Carvallo Ruiz** del Laboratorio de Bioquímica y Calidad de Productos Pesqueros del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, AC (CIAD) por su apoyo para la realización del perfil de ácidos grasos.

A mis compañeros de laboratorio que hicieron mas amenas las largas jornadas de trabajo

Marielena, Pablo, Fernando, Carlos, Encinas, Norma, Lucía, Jonathan, Karla y Yeimi.

¡¡¡GRACIAS!!!

RESUMEN

Las microalgas tienen un gran potencial como fábricas biológicas para producir una amplia variedad de productos valiosos. Se sabe que en condiciones de estrés las microalgas acumulan compuestos orgánicos. Sin embargo, existe escasa información sobre la respuesta a diferentes concentraciones de nitrógeno en el medio de cultivo en la diatomea *Chaetoceros muelleri*. En el presente estudio se evaluaron 4 concentraciones de nitrógeno (NaNO_3) (medio de cultivo f: mM, f / 4: 0.44 mM, f / 10: 0.176 mM y 2F: 3.53 mM) para comparar la respuesta química, cambios en el perfil de ácidos grasos y análisis de RT-PCR semicuantitativos de los genes *AMT1*, *PTD9*, *GltD*, *DGAT2* y *NRT2* para determinar sus niveles de expresión relativa bajo estas condiciones. Los resultados mostraron que no hay diferencias significativas en el contenido de biomasa entre los tratamientos. El tratamiento 0.18 mM (f/10) aumentó significativamente la acumulación de lípidos y carbohidratos, pero disminuyó la cantidad de proteínas. Las concentraciones de nitrógeno analizadas en el presente trabajo (0.44 a 3.53 mM) no afectaron el contenido de biomasa ni su composición química por lo que se sugiere el medio con 0.44mM de NaNO_3 (medio f/4) como ideal para la acuicultura, avicultura o consumo humano. Los ácidos grasos de cadena relativamente corta y el bajo porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados observados en perfil lipídico obtenido en el tratamiento 0.18 mM (f/10) hacen de éste, un medio de cultivo potencial para el cultivo de microalgas con perfil lipídico adecuado para la producción de biodiesel. Los genes *DGAT2* y *NRT2* mostraron los niveles más altos de expresión a concentraciones más bajas de nitrógeno sugiriendo que estos genes podrían ser un punto de control para modular la biosíntesis de lípidos en respuesta a la limitación de nitrógeno.

ABSTRACT

Microalgae have a great potential as bio-factories to produce a wide variety of valuable products. It is well known that microalgae under stress conditions accumulate organic compounds. However, there is scarce information about the response under different concentrations of nitrogen in the culture medium in the diatom *Chaetoceros muelleri*. In the present study different concentrations of nitrogen (NaNO₃) were evaluated (culture medium f:1.76mM, f/4:0.44mM, f/10:0.176mM and 2F:3.53mM) to compare the chemical response, fatty acid profile changes and semiquantitative RT-PCR analyses using *AMT1*, *PTD9*, *GltD*, *DGAT2* and *NRT2* genes for determining relative expression levels at these conditions. The results showed that there are not significant differences in cellular growth among treatments in the diatom *Chaetoceros muelleri*. The f/10 treatment increased the accumulation of lipids and carbohydrates significantly but with lower concentration of proteins. The nitrogen concentrations analyzed in the present work (0.44 to 3.53 mM) did not affect either the biomass content or its chemical composition, being an ideal concentrations for aquaculture or poultry consumption purposes. Shorter-chain fatty acids and low percentage of polyunsaturated fatty acids found in the f/10 treatment showed this treatment as a potential culture medium to grow microalgae with suitable fatty acid profile to biodiesel production. The *DGAT2* and *NRT2* genes showed the highest expression levels at lower concentrations of nitrogen suggesting that these genes could be a checkpoint in modulating lipid biosynthesis in response to nitrogen limitation.

ÍNDICE GENERAL

	Página
APROBACIÓN	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
INDICE DE FIGURAS	viii
INDICE DE TABLAS	x
INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES	4
I.1 Uso potencial de las microalgas	4
I.2 Metabolismo del carbono y del nitrógeno	5
I.3 Respuesta de las microalgas a estrés por nutrientes	7
I.4 Factores que inducen la acumulación de lípidos	8
I.4.1 Luz	9
I.4.2 Temperatura	9
I.4.3 Salinidad	10
I.4.4 Limitación de nutrientes	11
I.5 Mecanismos moleculares asociados a la acumulación de lípidos	13
I.5.1 Biosíntesis de ácidos grasos y triacilglicéridos	14
I.6 La diatomea <i>Chaetoceros muelleri</i> como organismo de estudio	18
II. JUSTIFICACIÓN	21
III. HIPÓTESIS	22
IV. OBJETIVOS	23
IV.1 Objetivo general	23
IV.2 Objetivos específicos	23
V. MATERIALES Y MÉTODOS	24
V.1 Material biológico	24
V.2 Condiciones de cultivo y diseño experimental	24
V.3 Composición proximal	25
V.3.1 Determinación de biomasa	25
V.3.2 Determinación de carbohidratos	26
V.3.3 Determinación de lípidos	26
V.3.4 Determinación de proteínas	27
V.3.5 Perfil de ácidos grasos	28
V.4 Análisis de expresión diferencial de los genes relacionados con la asimilación de nitrógeno y biosíntesis de lípidos	29
V.4.1 Preparación de la muestra para extracción de ARN total	29
V.4.1.1 Obtención de ARN total	30
V.4.1.2 Cuantificación e integridad del ARN total	30
V.4.1.3 Purificación del ARN total.....	31
V.4.2 RT-PCR semicuantitativo	31

V.4.2.1	Secuencias de los genes seleccionados	31
V.4.3	Síntesis de cDNA	32
V.4.3.1	Mezcla de reacción para PCR	33
V.4.3.2	Determinación de los parámetros de ciclos y temperaturas .	33
V.4.3.3	Análisis de los productos de RT-PCR semicuantitativo	33
V.5	Análisis estadístico	34
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
VI.1	Crecimiento celular y biomasa	35
VI.2	Composición proximal	37
VI.2.1	Perfil de ácidos grasos	38
VI.3	Análisis de expresión diferencial por medio de RT-PCR semicuantitativo ...	40
VI.3.1	Integridad del ARN total	40
VI.3.2	RT-PCR semicuantitativo	46
VI.3.2.1	Determinación de los parámetros de ciclos y temperaturas	46
VI.3.2.2	Análisis de los productos de RT-PCR semicuantitativo ...	48
VII.	CONCLUSIONES	53
VIII.	RECOMENDACIONES	54
IX.	LITERATURA CITADA	55
X.	ANEXOS	62

INDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Conexión entre las rutas metabólicas del carbono y nitrógeno. 3-PGA: 3-fosfoglicerato; OPPP: ruta oxidativa de las pentosas fosfato; PEP: fosfoenolpiruvato; PK: Piruvato quinasa; PPdK: Piruvato ortofosfato quinasa; RuBP: Ribulosa-1,5-bifosfato. (Adaptado de Alipanah <i>et al.</i> , 2015).	7
2	Biosíntesis de lípidos. Las enzimas que catalizan las reacciones son 1) Acetil-CoA carboxilasa. 2) Malonil-CoA: ACP tranferasa. 3) β -cetoacil-ACP sintasa. 4) 3-cetoacil-ACP reductasa 5) 3-hidroxiacil-ACP deshidrasa. 6) Enoil-ACP reductasa. 7) Cilos de elongacion hasta la obtención de ácidos grasos saturados C16 y C18 (Castillo <i>et al.</i> , 2017).	15
3	Biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados en microalgas. E: Elongasas; D: Desaturasas PSK: policétido sintasa (Castillo <i>et al.</i> , 2017).	15
4	Síntesis de triacilglicerol (TAG). PEPC: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, ME: Malato deshidrogenasa, CS: Citrato sintasa, ACL: acetil-CoA citrato liasa, ACC: acetil-CoA carboxilasa, ACS: ATP-citrato liasa, FAS: ácido graso sintasa, ACP: proteína portadora de acilo, GPAT: glicerol-3-fosfato aciltransferasa, LPAT: Lisofosfatidato aciltransferasa, DGAT: Diacilglicerol aciltransferasa (Adaptado de Courchesne <i>et al.</i> , 2009).	17
5	Imagen de <i>Chaetoceros muelleri</i> (Connolly <i>et al.</i> , 2008).	19
6	Curva de crecimiento de la microalga <i>C. muelleri</i> cultivada en cuatro concentraciones de nitrógeno (NaNO ₃). La gráfica muestra la media del número de células (Log ₂ No. Celúlas mL ⁻¹) \pm desviación estándar de tres réplicas técnicas.	36
7	Electroforesis en gel de agarosa al 1% de ARN total extraído con TRIzol (Thermo Fisher Scientific) y purificado con Rneasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen). Carril 1-4, réplica biológica 1 (RB1). Carril 5-8, réplica biológica 2 (RB2). Carril 1) 0.18 mM_RB1, Carril 2) 0.44 mM_RB1, Carril 3) 1.76 mM_RB1, Carril 4) 3.53 mM_RB1, Carril 5) 0.18 mM_RB2, Carril 6) 0.44 mM_RB2, Carril 7) 1.76 mM_RB2, Carril 8) 3.53 mM_R.	40
8	Optimización de la temperatura de alineamiento para PCR. Primer: Gen <i>GltD</i> . Carril 1: Marcador molecular. Carril 2: Control negativo. Carril 3: 57°C. Carril 4: 59°C. Carril 5: 61°C. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con GelRed TM .	47
9	Optimización de los ciclos de alineamiento para PCR. Primer: Gen <i>TBP</i> . Carril 1: Marcador molecular. Carril 2: 25 ciclos. Carril 3: 30 ciclos. Carril 4: 35 ciclos. Carril 5: Control negativo. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con GelRed TM .	47

10	Productos de RT-PCR del gen <i>EFL</i> (factor de elongación de la traducción) utilizando 1% de agarosa teñido con GelRed™. Carriles T1 a T4 corresponden a los tratamientos analizados. T1: 0.18 mM. T2:0.44 mM. T3: 1.73 mM. T4: 3.53 mM.	48
11	Productos de RT-PCR. Carriles T1 a T4 corresponden a los tratamientos analizados. T1: 0.18 mM. T2:0.44 mM. T3: 1.73 mM. T4: 3.53 mM. <i>TBP</i> (gen endógeno): proteína de unión a la caja TATA. transportador de amonio 1. <i>PTD9</i> : delta-9-desaturasa. <i>GltD</i> : glutamina oxoglutarato aminotransferasa. <i>DGAT2</i> : diacilglicerol O-aciltransferasa 2. <i>NRT2</i> : Transportador de nitrato de alta afinidad. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed™.	49
12	Comparación de la expresión relativa de los genes de <i>C.muelleri</i> cultivada en cuatro concentraciones de nitrógeno (NaNO ₃). Los datos representan la media de la expresión relativa de los genes ± la desviación estándar de dos réplicas biológicas y tres réplicas técnicas ($n = 6$). <i>AMT1</i> : transportador de amonio 1. <i>PTD9</i> : delta-9-desaturasa. <i>GltD</i> : glutamina oxoglutarato aminotransferasa. <i>DGAT2</i> : diacilglicerol O-aciltransferasa. <i>NRT2</i> : Transportador de nitrato de alta afinidad (T1 no determinado). *Diferencias significativas respecto del control (1.76mM) ($p \leq 0.05$).	50
13	Sitios de acción de la <i>PTD9</i> . Tomada de: http://parts.igem.org/Part:BBa_K1472612 (Sitio visitado el 04 de Julio 2019).	50
14	Biosíntesis de glutamato catalizada por la enzima glutamina-oxoglutarato aminotransferasa (NADPH-GOGAT). GS: Glutamina sintasa; GDH: Glutamato dehidrogenasa (adaptado de Levitán <i>et al.</i> , 2014).	51
15	Modelo hipotético para el rol intracelular de DGAT1 y DGAT2. (Yen, 2008).	52

INDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	Concentración de nitrato de sodio en los tratamientos utilizados.	24
2	Secuencias de los primers de los genes seleccionados para realizar el RT-PCR semicuantitativo.	32
3	Peso seco, cenizas y contenido de materia orgánica de <i>C. muelleri</i> cultivada en cuatro concentraciones de nitrógeno (NaNO ₃).	36
4	Composición proximal de la microalga <i>C. muelleri</i> cultivada en 4 concentraciones de NaNO ₃ .	37
5	Perfil de ácidos grasos de la microalga <i>C. muelleri</i> cultivada en diferentes concentraciones de nitrógeno (NaNO ₃).	39
6	Concentración de ARN total de las muestras estudiadas.	45
7	Condiciones definidas para el PCR de los genes seleccionados.	46

INTRODUCCIÓN

Las microalgas conforman un grupo diverso de microorganismos eucariotas fotosintéticos y se les puede encontrar tanto en agua dulce como en agua salada. Tienen una mayor eficiencia fotosintética que las plantas terrestres, llegando a producir más de la mitad del oxígeno del planeta, logran convertir entre el 3 y el 8 % de la energía solar en biomasa, en comparación con el resto de plantas que solo proporcionan el 0.5%. Su capacidad de crecimiento de forma autótrofa, la elevada tasa crecimiento y la gran diversidad de compuestos de interés farmacológico, alimenticio y energético que producen, hacen que su cultivo sea considerado de gran atracción para su explotación (Bahadar y Khan, 2013; Reijnders *et al.*, 2014; Valenzuela *et al.*, 2015).

Entre los compuestos bioactivos analizados en las microalgas se encuentran polihidroxiácidos, ficobilinas, polisacáridos, aminoácidos, toxinas y proteínas; otros de naturaleza lipídica como carotenoides y fitoesteroles (Borowitzka, 2013). Otra área de interés, para el estudio de las microalgas, es la producción de ácidos grasos de alto valor para la industria alimenticia, tal es el caso de la producción de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's), como el ácido γ -linolénico, el ácido araquidónico, el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA). Los cuales son reconocidos por su capacidad cardioprotectora, antitumorigénica, hipocolesterolémicas, además de prevenir riesgos de presión arterial alta, intervenir en el desarrollo normal del cerebro y promover la respuesta inmune en el ser humano (Borowitzka, 2013; El Ridi y Das, 2018).

Entre las fuentes de PUFA's, destacan los aceites de pescados marinos; sin embargo, el descenso de peces de captura, obliga a buscar otras alternativas al aceite de pescado en un futuro; entre las especies más prometedoras se encuentran las microalgas pertenecientes a las *Bacillariophyta*, *Chlorophyta*, *Cryptophyta*, *Haptophyta* y *Rhodophyta*. Los aceites de las microalgas poseen propiedades antioxidantes más altas que el aceite de pescado debido a su contenido de carotenoides y polifenoles lo que le confiere al aceite de las microalgas una mayor estabilidad a la oxidación a diferencia del aceite de pescado (Borowitzka, 2013; Leu y Boussiba, 2014; Ryckebosch *et al.*, 2014; Valenzuela *et al.*, 2015). Por otro lado, debido a la alta demanda

de productos cárnicos con un alto contenido de omega-3 (como el EPA y el DHA), se ha incrementado el uso de las microalgas como componente esencial en el alimento animal como suplemento alimenticio (Ryckebosch *et al.*, 2012, Borowitzka, 2013).

Adicionalmente, se ha reportado que el perfil lipídico en varias microalgas puede ser usado para la producción de biodiesel, lo cual ha despertado el interés por el uso de microalgas como fuente alternativa para la producción de este combustible. El biodiesel está formado por los ésteres metílicos de ácidos grasos derivados de una reacción de transesterificación entre los triglicéridos y el metanol; las cualidades químicas y físicas del biodiesel están estrechamente relacionadas con las propiedades de su aceite matriz. De todos los sustratos considerados para la producción de biodiesel, las microalgas son las más prometedoras, debido a que, los lípidos derivados de las microalgas, a diferencia de los aceites vegetales, que son las fuentes actuales para el petrodiesel, no compiten por tierras de interés agronómico; además, se ha observado que algunas especies de microalgas pueden utilizar nitrógeno y fósforo orgánicos e inorgánicos de las aguas residuales lo que reduce la necesidad de agua dulce (Gao *et al.*, 2012; Bellou *et al.*, 2014; Bertozzini *et al.*, 2013). No obstante, a pesar de que actualmente la producción a escala de microalgas no es económicamente competitiva con los cultivos tradicionales, siguen siendo una herramienta prometedora para las necesidades energéticas futuras (Bahadar y Khan, 2013; Reijnders *et al.*, 2014).

Entre los diferentes grupos de las microalgas, el grupo de las diatomeas son particularmente ricas en triglicéridos y son de los grupos más prometedores para la producción de biodiesel; la viabilidad de las especies de microalgas como materia prima depende de la optimización de la biomasa y la productividad de los lípidos neutros. Se ha demostrado que las condiciones de estrés afectan el crecimiento y el contenido lipídico; específicamente, la limitación de nitrógeno influye de manera importante en el metabolismo de lípidos afectando su biosíntesis y acumulación. (Li *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2008; Bertozzini *et al.*, 2013; Bellou *et al.*, 2014). Una comprensión profunda de las rutas biosintéticas de los TAG es clave para mejorar el contenido lipídico de las microalgas a través de la ingeniería genética (Bertozzini *et al.*, 2013; Reijnders *et al.*, 2014, Imam *et al.*, 2015; Du and Benning, 2016; Schubotz *et al.*, 2019).

A pesar de los estudios que se tienen hasta el momento sobre el efecto del nitrógeno en la acumulación de lípidos, aún no ha sido posible la obtención de cepas que contengan un alto contenido lipídico sin que se vea afectado su crecimiento celular. Es por ello, que el objetivo de este trabajo es profundizar en el estudio de la respuesta bioquímica de *C. muelleri* a la limitación de nitrógeno y ampliar el conocimiento sobre la regulación de genes involucrados en las rutas metabólicas y procesos moleculares utilizados por esta diatomea en la biosíntesis y acumulación de lípidos.

I. ANTECEDENTES

I.1 Uso potencial de las microalgas

Las microalgas tienen un gran potencial como bio-fábricas para la producción de biocombustibles renovables, lípidos poliinsaturados de cadena larga (importantes por su efecto beneficioso sobre la salud humana), y una amplia variedad de otros productos valiosos debido a su relativamente alta eficiencia fotosintética, capacidad para la captura de dióxido de carbono (CO₂) y una tasa de crecimiento rápido (Reijnders *et al.*, 2014; Valenzuela *et al.*, 2015).

Debido a sus componentes nutricionales como los ácidos grasos, proteínas, polisacáridos, minerales, vitaminas y compuestos bioactivos; las microalgas, desempeñan un papel fundamental en la acuicultura al ser la fuente principal de alimento para organismos de interés comercial; entre las microalgas que destacan en este rubro se encuentran las diatomeas. Asimismo, poseen una fuente esencial de ácidos grasos; los cuales tienen un papel cada vez más importante como nutracéuticos y alimentos funcionales (Borowitzka, 2013; Gangl *et al.*, 2015); ejemplo de ello es el alga verde *Chlorella vulgaris* utilizada como alimento que, se ha demostrado, estimula la respuesta inmune y antiinflamatoria en humanos (Borowitzka, 2013).

Los pigmentos son otros de los compuestos de alto valor obtenido de las microalgas, como ejemplo se encuentra el β-caroteno, el cual, fue el primer pigmento derivado de las microalgas en ser comercializado y se obtiene en grandes cantidades de la microalga halófila *Dunaliella salina* (Ambati *et al.*, 2014, Borowitzka, 2013). Otro pigmento es el denominado astaxantina, el cual es obtenido del alga verde de agua dulce *Haematococcus pluvialis*, que es usado como suplemento alimenticio y fuente de pigmentación para el cultivo de salmón y camarón, además, debido a sus altas propiedades antioxidantes, tiene muchas aplicaciones en el área farmacéutica y cosmética ya que se ha demostrado que previene la infección bacteriana, la insuficiencia vascular y el cáncer (Borowitzka, 2013, Ambati *et al.*, 2014). Pigmentos como la ficobilina, ficocianina, ficoeritrina y aloficocianina, fibra dietética insoluble y antioxidantes, provenientes de las algas rojas, tienen una amplia gama de aplicaciones como colorantes, estabilizantes o emulsificantes en la industria alimenticia (Borowitzka, 2013; Uribe *et al.*, 2018).

Las microalgas también producen una gran gama de polisacáridos, entre ellos, los polisacáridos de algas rojas unicelulares como *Porphyridium* y *Rhodella* que, aunque no compiten con los polisacáridos obtenidos de macroalgas (ej. carragenina) han encontrado algunas aplicaciones en el área de la cosmética (Borowitzka, 2013). Los polisacáridos sulfatados de *Navícula sp.*, con actividad antioxidante (Fimbres *et al.*, 2018) y los polisacáridos con actividad bioestimulante con aplicación en la agricultura como el caso de dos especies de *Chlorella*: *C. vulgaris* y *C. sorokiniana* cuyos extractos crudos de polisacáridos estimularon en *Solanum lycopersicum* la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) y la β -1,3-glucanasa; ambas enzimas relacionadas con el mecanismo de defensa de la planta a estrés biótico y abiótico (Farid *et al.*, 2019).

Otro de los sectores donde las microalgas tienen relevante interés es en el energético. En estudios pilotos de cultivo de microalgas se ha demostrado que, a partir de la biomasa o de los lípidos extraídos, se pueden producir un amplio espectro de productos combustibles: hidrógeno, a través de biofotólisis directa e indirecta, biometano a través de digestión anaeróbica, bioetanol por fermentación, bio-aceite a través de conversión termoquímica, biodiesel y gasolina a través de licuefacción hidrotermal catalítica (Bahadar y Khan, 2013; Bertozzini *et al.*, 2013).

La optimización de la biomasa y la productividad de los lípidos neutros, son parámetros clave para la utilización de microalgas como materia prima. La limitación de nutrientes, como el nitrógeno, se ha demostrado que influye de manera importante en la acumulación de lípidos direccionando el metabolismo del carbono y nitrógeno hacia un aumento en el almacenamiento lipídico intracelular (Bertozzini *et al.*, 2013; Alipanah *et al.*, 2015).

I.2 Metabolismo del carbono y del nitrógeno

Las reacciones metabólicas son iguales en la mayoría de los organismos fotosintéticos. El primer paso del metabolismo del carbono es la incorporación del grupo fosfato a la glucosa que se encuentra dentro de la célula, lo que da como resultado la glucosa-6-fosfato. Se ha observado que la ruta de las pentosas fosfatos (OPPP), es la que tiene un mayor flujo de carbono (Enamala

et al., 2018). En la ruta OPPP, la glucosa-6-fosfato se utiliza para sintetizar ribulosa-5-fosfato (necesaria para la síntesis de nucleótidos) y se reduce la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato ($\text{NADP}^+ \rightarrow \text{NADPH}$) necesaria para los procesos anabólicos de la célula. Por otro lado la glucosa, siguiendo la ruta de la glicólisis, origina 2 moléculas de piruvato que, por oxidación, se convierten en acetil CoA las cuales ingresan al ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Este ciclo provee agentes reductores como la nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) y precursores para la biosíntesis de aminoácidos (Hockin *et al.*, 2012).

El nitrógeno, ya sea en su forma orgánica o inorgánica, es transportado del exterior al interior de la célula mediante transportadores trans-membranales como los transportadores de amonio, de urea o de nitrato. La asimilación del nitrógeno ocurre a través de la ureasa, en el caso de urea, para producir amonio. En su forma inorgánica, como nitrato (NO_3^-), es reducido a nitrito y posteriormente a amonio que, a su vez, es sustrato de las enzimas glutamato sintasa (GOGAT) y glutamina sintasa (GS) para la biosíntesis de aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos; estas reacciones liberan energía en forma de ATP (Bertozzini *et al.*, 2013; Alipanah *et al.*, 2015, Enamala *et al.*, 2018).

El metabolismo del nitrógeno y el carbono muestran una estrecha relación debido a que, ambas vías, requieren esqueletos carbonados provenientes del ciclo de los ácidos tricarboxílicos además de especies reductoras provenientes de la fotosíntesis (Figura 1) (Hockin *et al.*, 2012, Bertozzini *et al.*, 2013; Alipanah *et al.*, 2015, Goncalves *et al.*, 2016; Enamala *et al.*, 2018).

En las diatomeas, el carbono se almacena en forma de 1,3- β -d-glucano (crisolaminarina) o lípidos (Kroth, 2007, Alipanah *et al.*, 2015). La crisolaminarina es un polisacárido que se almacena principalmente bajo condiciones óptimas de crecimiento; sin embargo, esto cambia bajo condiciones de estrés por limitación de nutrientes; ya que se favorece la acumulación de lípidos neutros en lugar del polisacárido. Otros compuestos que contienen nitrógeno, como las proteínas y los ácidos nucleicos, también se ven afectados por una disminución en el contenido de nitrógeno (Alipanah *et al.*, 2015).

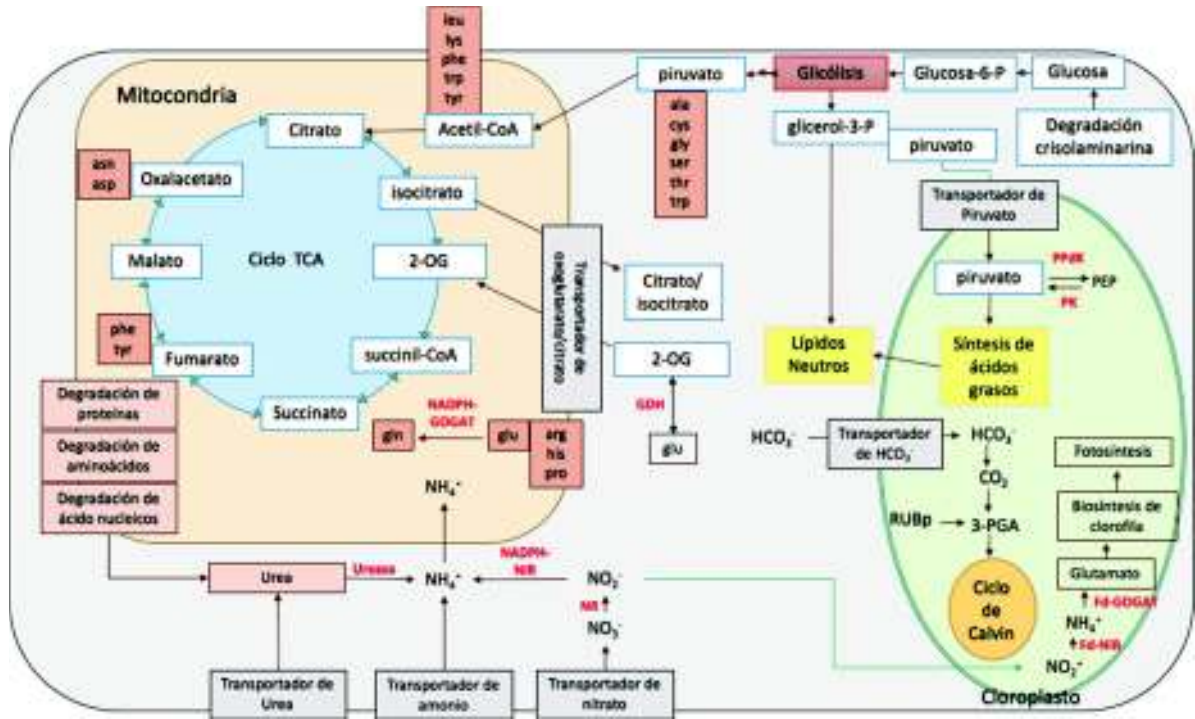


Figura 1. Conexión entre las rutas metabólicas del carbono y nitrógeno. 3-PGA: 3-fosfoglicerato; OPPP: ruta oxidativa de las pentosas fosfato; PEP: fosfoenolpiruvato; PK: Piruvato quinasa; PPdK: Piruvato ortofosfato quinasa; RuBP: Ribulosa-1,5-bifosfato. (Adaptado de Alipanah *et al.*, 2015).

I.3 Respuesta de las microalgas a estrés por nutrientes

Los cambios que se generan en el ambiente son sentidos por proteínas especializadas, que, a su vez activan cascadas de señalización que regulan la expresión génica de respuesta a estrés para la adaptación de la célula a su nuevo entorno (Paliwal *et al.*, 2017). Se ha observado que existen metabolitos de nitrógeno que pueden actuar como señales de estrés. En *Phaeodactylum tricornutum* se encontró un transportador de ácido- γ -aminobutírico (GABA) que está involucrado en la percepción del estrés biótico y abiótico y la transducción de señales de comunicación intercelular (Allen *et al.*, 2006).

En plantas y algas verdes, se ha reportado la presencia de óxido nítrico (NO), el cual está involucrado en la percepción de situaciones de estrés biótico y abiótico y la activación de

respuestas de defensa (Huang *et al.*, 2002). La producción de NO se lleva a cabo por la nitrato y nitrito reductasa a través de la óxido nítrico sintasa (NOS). En las diatomeas *Talassiosira pseudonana* y *P. tricornutum*, se han encontrado ortólogos a los genes que codifican para la enzima NOS y una oxidasa alternativa (AOX), sugiriendo que las microalgas pueden responder a una situación de estrés produciendo NO que activan los canales de calcio e inducen el AOX como medida para contrarrestar la toxicidad de NO (Huang *et al.*, 2002; Allen, 2006).

En *P. tricornutum*, en el caso de estrés por limitación de nutrientes como el nitrógeno, el AOX incrementó su expresión una vez agotado el nitrato (NO_3^-) (Allen *et al.*, 2006). La deficiencia de nitrógeno afecta severamente a la célula debido a que constituye parte fundamental de las proteínas, ya que son parte esencial de la estructura celular y el funcionamiento de los procesos celulares (enzimas) afectando su crecimiento (Sajjadi *et al.*, 2018).

En estudios transcriptómicos realizados en la microalga roja *Cyanidioschyzon merolae*, se reportó el factor de transcripción MYB1, de la familia MYB, como el regulador central de la asimilación de nitrógeno (Imamura y Tanaka, 2017). Este tipo de proteínas están implicadas en la regulación de la proliferación celular, del metabolismo y en la respuesta a estímulos externos (Arratia y Aguirre, 2013).

Entre las estrategias desarrolladas por diferentes especies de microalgas para enfrentar las bajas concentraciones de nitrógeno se encuentran, la modificación de las tasas de recambio proteico, la reorganización de las reservas al interior de la célula, la regulación del suministro de nitrógeno y la regulación del suministro de energía canalizándola al almacenamiento de lípidos y carbohidratos (Sajjadi *et al.*, 2018).

I.4 Factores que inducen la acumulación de lípidos

Los lípidos pueden clasificarse de acuerdo a sus funciones: estructurales, de almacenamiento (TAG) y de señalización. Los lípidos estructurales llegan a representar hasta el 70% del peso seco total, siendo los fosfoglicéridos y glicosilglicéridos los principales lípidos en algas. Los TAG se acumulan en el citosol en forma de gotas lipídicas (Li-Beisson *et al.*, 2016; Paliwal *et al.*, 2017). Esta acumulación puede modularse en respuesta a las condiciones de cultivo. Las

microalgas pueden modificar su contenido lipídico bajo distintas situaciones de estrés, como la intensidad de luz, la temperatura, la salinidad y la limitación de nutrientes (Nascimento *et al.*, 2013; Paliwal *et al.*, 2017; Enamala *et al.*, 2018).

1.4.1 Luz

La luz es una fuente esencial para el crecimiento autótrofo y la actividad fotosintética. La tasa fotosintética aumenta conforme aumenta la intensidad lumínica hasta alcanzar un punto máximo de saturación de luz. Al aumentar la intensidad lumínica sobre el punto de saturación se inhibe la fotosíntesis (punto de fotoinhibición), tras lo cual, se presenta la muerte celular. Las bajas intensidades de luz inducen la formación de lípidos polares mientras que, altas intensidades de la luz, induce la acumulación de lípidos neutros y disminuyen los polares (Hu *et al.*, 2008; Allen *et al.*, 2006; Hernández y Labbé, 2014).

Las microalgas tienen una gran capacidad fotosintética, en estudios recientes, se observó que la diatomea *P. tricornutum* posee una mayor eficiencia de conversión de energía en cultivos con luz fluctuante que la microalga verde *C. vulgaris*. Esta mayor eficiencia fue atribuida a estrategias de disipación de energía y al mecanismo de extinción de fotoquímicos que poseen las diatomeas (Allen *et al.*, 2006). En especies de *Nannochloropsis* se observó que el contenido de PUFA (EPA y DHA) de las microalgas está inversamente relacionado con la irradiación de la luz (Paliwal *et al.*, 2017).

Por otro lado, en *P. tricornutum* se demostró que en condiciones de oscuridad, por un periodo de 4 días, aumenta el estrés oxidativo y la producción de ácidos grasos insaturados de cadenas largas, donde los ácidos grasos podrían servir como antioxidante mitigando la acumulación de ROS (Bai *et al.*, 2016).

1.4.2 Temperatura

La temperatura del medio de cultivo de las microalgas tiene efecto sobre la producción de biomasa y la composición de los ácidos grasos. La temperatura óptima de cultivo varía de especie a especie y se ha observado que al aumentar o disminuir la temperatura se modifica el

perfil lipídico; por lo que, se ha sugerido, que estas modificaciones permiten a la microalga aclimatarse además de mantener la integridad y la fluidez de la membrana celular. La insaturación de ácidos grasos aumenta con la disminución de las temperaturas y aumentan los ácidos grasos saturados con el aumento de temperatura (Ördög *et al.*, 2016; Paliwal *et al.*, 2017). Por otro lado, al aumentar la temperatura aumenta la producción de biomasa, si la temperatura supera el óptimo para la especie que se esté cultivando, se pueden causar daños al interior de la célula debido a que aumenta la respiración y la fotorespiración; esto conlleva a una disminución en la acumulación de lípidos y en el crecimiento celular (Hernández y Labbé, 2014; Enamala *et al.*, 2018).

En *Acutodesmus dimorphus*, sometida a condiciones de estrés por temperatura (de 25°C a 35°C), se mostró un aumento en el contenido total de lípidos y una mayor proporción de lípidos neutros (Chokshi *et al.*, 2015; Paliwal *et al.*, 2017). Por otro lado, en *Chaetoceros* sp., *Nannochloropsis* sp. y *Tetraselmis suecica*, el aumento de la temperatura en un rango de 25 a 40 °C provocó una disminución en la tasa de crecimiento, en la biomasa y en el contenido total y el perfil de los lípidos obtenidos, observándose un aumento en la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados y una disminución de ácidos grasos saturados (Chaisutyakorn *et al.*, 2018). En *Scenedesmus quadricauda*, cultivada a 40°C, se observó un aumento en la cantidad de lípidos un día después de finalizada la fase logarítmica; sin embargo, al aumentar la situación de estrés (día 2 al 6) disminuyó la productividad (Han *et al.*, 2016).

Por otro lado, la disminución de la temperatura en el cultivo está relacionada con el aumento en la producción de EPA y PUFA's. En *Pavlova lutheri*, *Isochrysis galbana* y *P. tricornutum*, cultivadas en un rango de temperaturas de 10 a 25°C, mostraron un aumento de EPA y, en *Chlamydomonas* sp., cultivada a 0°C, mostró un aumento en el contenido de PUFA's debido a que este tipo de lípidos modifican el punto de congelación actuando como crioprotectores (Chen *et al.*, 2017).

1.4.3 Salinidad

La salinidad del medio afecta la función osmoreguladora de las microalgas que responden al estrés por salinidad, mediante la acumulación de solutos osmoprotectores; ejemplo de ello es

la producción de sacarosa, glicerol y prolina producidas por la microalga *Dunaliella salina*. Otro mecanismo de respuesta, es la inducción de genes que codifican para proteínas de membrana como las transportadoras de iones y acuaporinas, genes de síntesis de carotenoides como la cantaxantina y la astaxantina (como respuesta a la formación de ROS) (Paliwal *et al.*, 2017; Sajjadi *et al.*, 2018).

El estrés osmótico provocado por la salinidad en el medio de cultivo puede provocar un aumento de los lípidos neutros al interior de la célula microalgal como una estrategia de resistencia fisiológica. Las microalgas tienen un óptimo de salinidad para su crecimiento que depende de la especie y poseen su propio sistema de adaptación a las condiciones salinas (Hernández y Labbé, 2014; Sajjadi *et al.*, 2018).

En el caso de *Nannochloropsis gaditana*, un aumento de hasta 40 g/L de salinidad no produce una pérdida significativa en el contenido de lípidos y de biomasa; sin embargo, los ácidos grasos poliinsaturados como el C20: 4n6 y el C20: 5n3 disminuyen conforme la salinidad se aleja del valor óptimo, ya sea concentraciones superiores o inferiores a 35g/L. En el caso de los ácidos grasos saturados, el contenido aumenta a medida que aumenta la salinidad a diferencia de los ácidos grasos monoinsaturados que disminuyen su contenido (Mitra *et al.*, 2015). En *Dunaliella tertiolecta* se observó una acumulación de lípidos y de TAG bajo condiciones de alta salinidad (de 0.5 M a 2 M) (Paliwal *et al.*, 2017). En adición, Duan (2012) reportó un aumento de la concentración de lípidos en la microalga de agua dulce *C. vulgaris* hasta un 67.2% bajo un esquema de estrés salino múltiple (de 2gL⁻¹ a 10gL⁻¹) aunque, se observó una inhibición en el crecimiento celular al incrementar la salinidad en una concentración superior a 6gL⁻¹.

1.4.4 Limitación de nutrientes

Los nutrientes son un parte clave del crecimiento del fitoplancton, entre ellos el C, O₂, H₂, N, K, Mg, Ca, Fe, S, P y minerales traza. Las microalgas obtienen la mayoría de estos nutrientes a partir del agua y del aire atmosférico a excepción del nitrógeno, el potasio y el fósforo que debe extraerlos de la formulación del medio de cultivo. De los nutrientes mencionados, el C, el P y el N afectan la producción de lípidos y su tasa de crecimiento (Enamala *et al.*, 2018).

El fósforo es fundamental en muchos procesos celulares, como la formación de ácidos nucleicos, desempeña un papel clave en los procesos metabólicos celulares como la transducción de señales, la transferencia de energía y la fotosíntesis (Wang *et al.*, 2008). En condiciones de limitación de fósforo inorgánico (Pi), el fósforo orgánico es convertido por las fosfatasa en ortofosfatos (PO_4^{3-}), el cual es absorbido por las microalgas. El exceso de fósforo se almacena en forma de gránulos de polifosfato para soportar el crecimiento microalgal cuando hay ausencia del mismo (Sajjadi *et al.*, 2018). Liang *et al.* (2013) reportaron que la microalga *Chlorella* sp. reduce los fosfolípidos de la membrana y los reemplaza por glucolípidos y sulfolípidos en ausencia de fósforo en el medio de cultivo. Por otro lado, Courchesne *et al.* (2009) reportaron que la microalga *C. vulgaris* aumentó la concentración de TAG (de 6.5 a 39.3% de los lípidos totales) en condiciones limitantes de fósforo y la cantidad de fosfolípidos se redujo de 8.3 a 1.4%.

Por otro lado, el nitrógeno en forma de nitrato (NO_3^-), es la mejor fuente de nitrógeno para el crecimiento de las microalgas. Courchesne *et al.* (2009) observaron que el crecimiento y producción de lípidos en *Neochloris oleoabundans* fue mejor cuando se utilizó NO_3^- como fuente de nitrógeno en lugar de urea y bicarbonato. Por otro lado, diversos estudios han demostrado que la limitación de este nutriente tiene una mayor influencia en el proceso de acumulación de lípidos que la limitación de otros nutrientes (Li *et al.*, 2008; Courchesne *et al.*, 2009; Hernández y Labbé, 2014; Park *et al.*, 2015). Reportes muestran que en condiciones limitantes de nitrógeno la cantidad de lípidos puede aumentar hasta en un 40% o más; sin embargo, esto disminuye la tasa de crecimiento microalgal (Hernández y Labbé, 2014; Enamala *et al.*, 2018).

Las diatomeas son capaces de reprogramar varias vías metabólicas en respuesta a la privación de nitrógeno. Las diatomeas almacenan carbono en forma de 1,3- β -d-glucano (crisolaminarina) o lípidos. En condiciones óptimas, la crisolaminarina es el principal compuesto de almacenamiento de carbono en las vacuolas. Bajo condiciones de estrés, en particular la falta de nitrógeno, las proteínas y los ácidos nucleicos se ven disminuidos mientras que el almacenamiento de carbono se direcciona en favor de la acumulación de lípidos neutros en lugar de crisolaminarina (Bertozzini *et al.*, 2013).

A nivel molecular, el análisis transcriptómico en la diatomea *P. tricornutum* mostró que en limitación de nitrógeno disminuye la expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en la biosíntesis de compuestos nitrogenados, fotosíntesis y la biosíntesis de clorofila. Por el contrario, se observa un incremento en la expresión de genes relacionados con el transporte, la asimilación y la utilización de los recursos de nitrógeno orgánico, asimismo, se incrementa la expresión de genes relacionados con el reciclaje de compuestos nitrogenados como aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos. Adicionalmente, el análisis funcional de los genes expresados diferencialmente muestra que en condiciones limitantes de nitrógeno la microalga *P. tricornutum* reestructura el metabolismo del carbono, canalizando las fuentes de carbono hacia el metabolismo de los lípidos, a través de la regulación descendente del ciclo de Calvin, la biosíntesis de crisolaminarina, la regulación aumentada coordinada de la glucólisis, el ciclo del ácido tricarbóxico y el metabolismo del piruvato. Finalmente, la reasignación de los lípidos de la membrana y la inducción de la biosíntesis *de novo* de triacilglicerol dirigieron a las células a la acumulación de lípidos neutros (Alipanah *et al.*, 2015).

De acuerdo con lo anterior, podríamos mencionar que el cultivo de las microalgas manipulando las concentraciones de la fuente de nitrógeno promete incrementar el contenido de lípidos además de modificar su perfil de lípidos, no obstante, esta estrategia tiene una desventaja, la limitación del nutriente compromete el crecimiento celular y la fotosíntesis de las células algáceas (Courchesne *et al.*, 2009, Hernández y Labbé, 2014; Enamala *et al.*, 2018).

I.5 Mecanismos moleculares asociados a la acumulación de lípidos

Debido a su historia evolutiva, las diatomeas contienen genes y rutas metabólicas que son novedosas en los eucariotas fotosintéticos, debido a esta diversidad, el estudio de estos organismos brinda una gran oportunidad para identificar nuevos genes y rutas metabólicas de importancia biotecnológica (Reijnders *et al.*, 2014).

Para estudiar el proceso de acumulación de lípidos se ha utilizado la limitación de nutrientes como estrategia para dilucidar los mecanismos moleculares involucrados en la acumulación de éstos. Debido a que el nutriente que más afecta al metabolismo lipídico en las microalgas es el nitrógeno, la mayoría de los esfuerzos se han dirigido a estudiar la respuesta

de las diatomeas a la limitación del nitrógeno. En este sentido, se han obtenido importantes avances en el entendimiento de cómo la limitación de este nutriente influye en la acumulación de lípidos en estos organismos; sin embargo, estudios mostraron que la aparición y la medida en que se produce TAG en respuesta a la limitación de nitrógeno es específico de la especie o de la cepa (Li *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2008, Bellou *et al.*, 2014).

La secuenciación de los genomas de las diatomeas *T. pseudonana* (Armbrust *et al.*, 2004) y *P. tricornutum* (Bowler *et al.*, 2008) proporcionaron datos sobre sus redes metabólicas y regulatorias. Tal es el caso de las rutas involucradas en la absorción de nitrógeno, mostrando que la asimilación de este nutriente, en su forma de nitrato (NO_3^-) consiste en dos pasos de transporte y dos de reducción ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_4^+$), que se desarrollan por separado citosol y el cloroplasto. El amonio finalmente se incorpora a los esqueletos de carbono para la formación de aminoácidos por la vía glutamato sintasa (GOGAT) y glutamina sintetasa (GS). Estas enzimas mencionadas se encuentran tanto en el plástido (Fd-GOGAT/GSII) como en la mitocondria (NADPH-GOGAT/GSIII). El GSIII mitocondrial puede catalizar la asimilación de glutamina a partir de amonio derivado de reacciones catabólicas citosólicas (Allen *et al.*, 2006; Hockin *et al.*, 2012; Bertozzini *et al.*, 2013; Procházková *et al.*, 2014; Alipanah *et al.*, 2015). En este contexto, se ha observado que la asimilación del nitrógeno dentro de la célula algácea puede regularse a través de la regulación post-traducciona l de la enzima nitrato reductasa (NR); en *Cylindrotheca fusiformis*, a pesar de que los niveles de ARNm de nitrato reductasa (NR) fueron sensibles a la disponibilidad de nitrógeno, la proteína NR madura no se procesa y pliega correctamente a menos que haya NO_3^- disponible (Hildebrand, 2005).

1.5.1 Biosíntesis de ácidos grasos y triacilglicéridos

La biosíntesis de ácidos grasos se realiza en los cloroplastos y se generan cadenas de 16 y 18 átomos de carbono como ácidos grasos libres, mismos que son utilizados por la célula para la síntesis de membrana y la síntesis de triacilglicéridos (Figura 2). La elongación y saturación sucesiva se cataliza mediante elongasas y desaturasas que se encuentran en la membrana del retículo endoplásmico y en las mitocondrias. Estas enzimas actúan sobre el palmitato o el estearato, siguiendo las rutas ω -6 y ω -3 (Figura 3) (Castillo *et al.*, 2017).

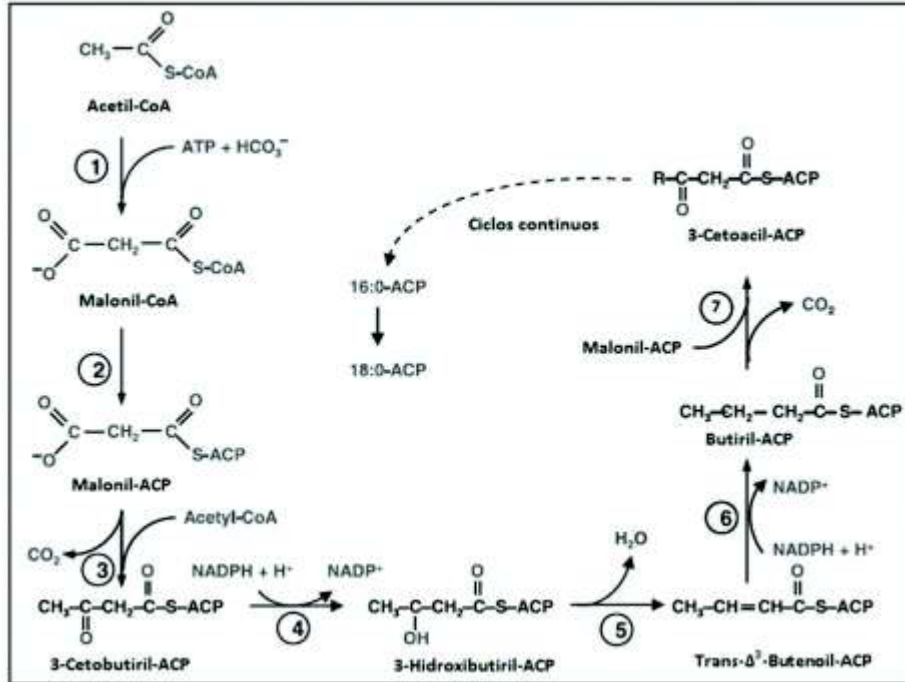


Figura 2. Biosíntesis de lípidos. Las enzimas que catalizan las reacciones son 1) Acetil-CoA carboxilasa. 2) Malonil-CoA: ACP transferasa. 3) β-cetoacil-ACP sintasa. 4) 3-cetoacil-ACP reductasa 5) 3-hidroxiacil-ACP deshidrasa. 6) Enoi-ACP reductasa. 7) Cilos de elongacion hasta la obtención de ácidos grasos saturados C16 y C18 (Castillo *et al.*, 2017).

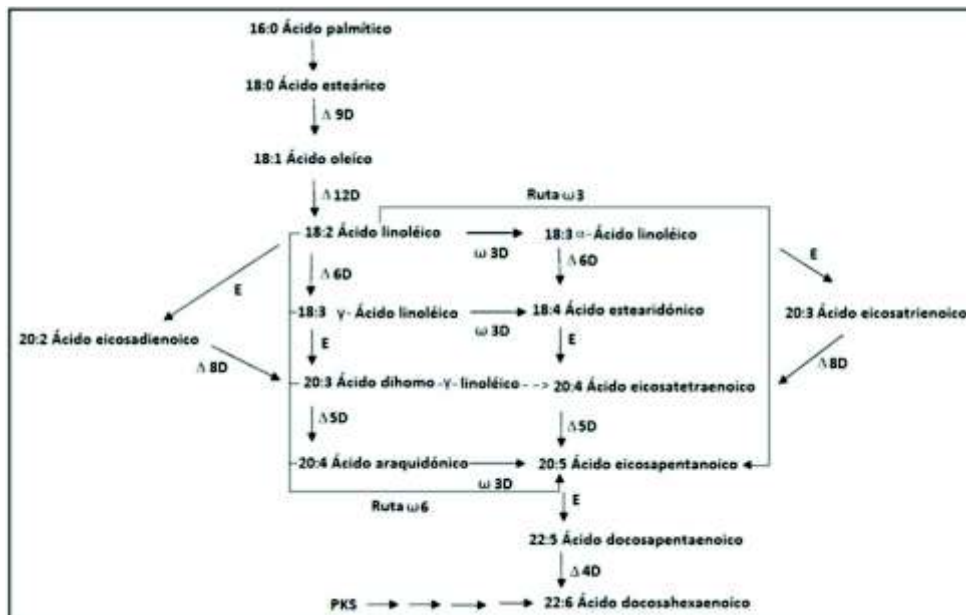


Figura 3. Biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados en microalgas. E: Elongasas; D: Desaturasas PSK: policétido sintasa (Castillo *et al.*, 2017).

Los estudios transcriptómicos de las diatomeas *P. tricornutum* (Alipanah *et al.*, 2015) y *T. pseudonana* (Jian *et al.*, 2017) han permitido identificar aciltransferasas sensibles a la deprivación de nitrógeno que contribuyen a la acumulación de lípidos en forma de TAG; sin embargo, los genes implicados en la regulación de dichas enzimas, especialmente los genes de respuesta temprana, no han sido identificados (Park *et al.*, 2015).

La biosíntesis de lípidos neutros se divide en tres 3 pasos principales (Figura 4): un primer paso que involucra la formación del malonil-CoA, luego tiene lugar la elongación de la cadena acilo y como último paso la formación de TAG (triacilglicéridos). La formación del malonil-CoA se lleva a cabo en el citosol y es mediada por la enzima Acetil-CoA carboxilasa (ACC); una vez formado, este se transfiere por una transacetilasa a la proteína portadora de acilo del complejo multienzimático ácido graso sintasa (FAS) quien cataliza el alargamiento de las cadenas de acilo. La acilación del glicerol-3-fosfato (G3P) con un acil-CoA forma lisofosfatidato (LPA) que se condensa aún más para producir fosfatidato (PA). Este PA se convierte en diacilglicerol para, finalmente formar el triacilglicerol en una reacción catalizada por diacilglicerol acil- transferasa (DGAT). La figura muestra las reacciones y las enzimas que participan en la biosíntesis de TAG (Courchesne *et al.*, 2009).

De las enzimas involucradas en la biosíntesis de TAG, las enzimas ACC y DGAT juegan un papel decisivo en la ruta de biosíntesis puesto que controlan el flujo del carbono (Courchesne *et al.*, 2009). En este sentido, los mecanismos que regulan este flujo de carbono juegan un papel importante en la biosíntesis de lípidos en presencia de limitación de nutrientes, por lo que es importante estudiar la regulación de estas enzimas y determinar su papel en la respuesta al estrés por nutrientes.

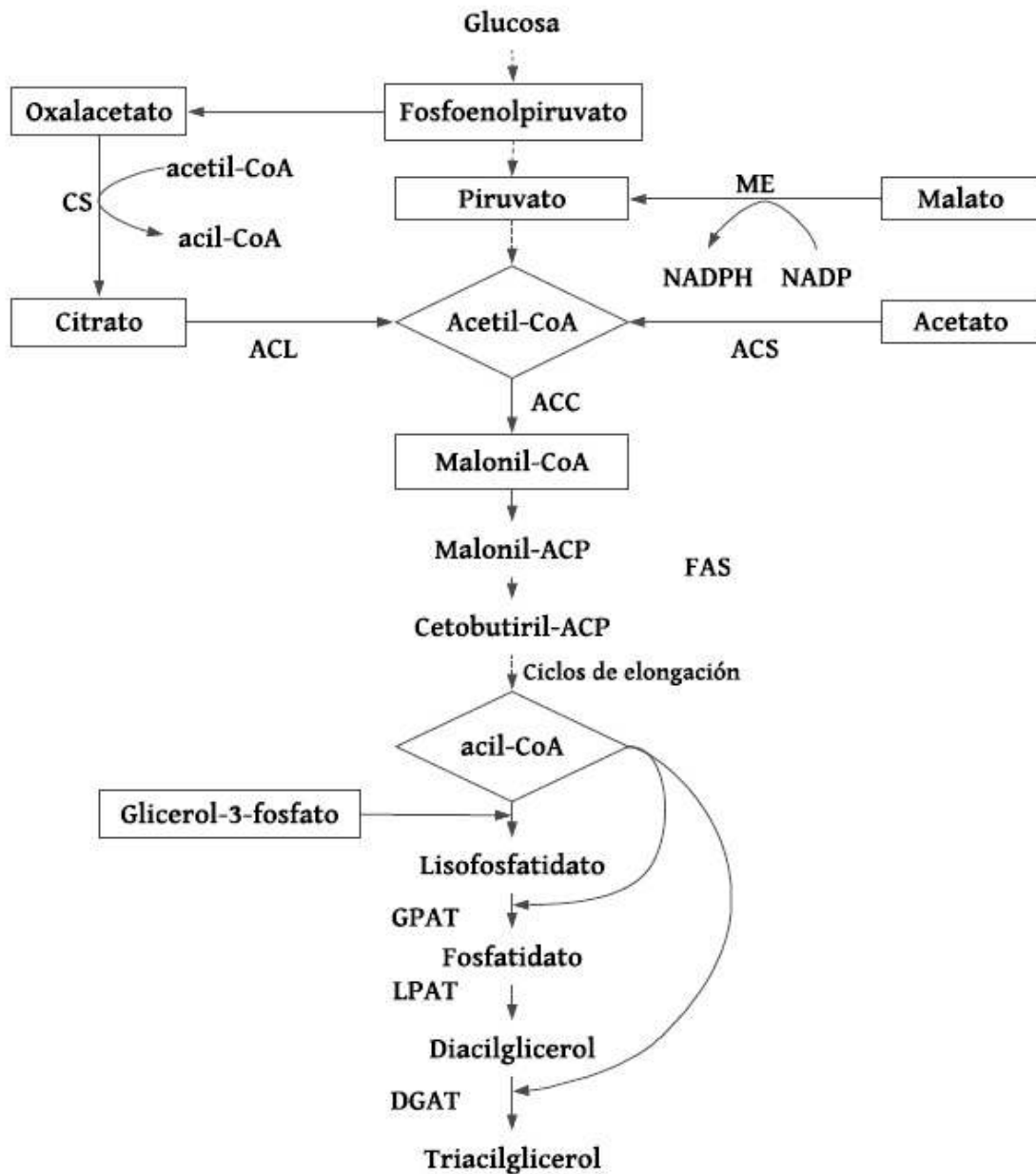


Figura 4. Síntesis de triacilglicerol (TAG). PEPC: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, ME: Malato deshidrogenasa, CS: Citrato sintasa, ACL: acetil-CoA citrato liasa, ACC: acetil-CoA carboxilasa, ACS: ATP-citrato liasa, FAS: ácido graso sintasa, ACP: proteína portadora de acilo, GPAT: glicerol-3-fosfato aciltransferasa, LPAT: Lisofosfatidato aciltransferasa, DGAT: Diacilglicerol aciltransferasa (Adaptado de Courchesne *et al.*, 2009)

La alteración de los nutrientes causa un cambio en la expresión génica; en la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, se ha observado que esta alteración provoca una respuesta bifásica, una gluconeogénica (a los 30 min de privación de nitrógeno) y otra glucolítica (de 4 a 6 horas de privación de nitrógeno); esta última etapa conduce a: reducción de la asimilación del carbono, reducción en la biosíntesis de la clorofila, aumento del metabolismo del nitrógeno y aumento de la biosíntesis lipídica (Park *et al.*, 2015).

En la fase de privación de nitrógeno, las enzimas involucradas en los procesos de asimilación del nitrógeno, las involucradas en el catabolismo de aminoácidos, ácidos nucleicos y proteínas, así como las enzimas involucradas en la ruta de síntesis de TAG tuvieron una mayor abundancia respecto del control. En el proteoma de *C. reinhardtii* se identificaron 259 proteínas relacionadas con la formación de las gotas lipídicas de reserva, de éstas, 16 estaban relacionadas con la biosíntesis de TAG. La reorganización de las vías metabólicas parece obedecer a mecanismos de detección específicos que pueden involucrar factores de transcripción y reguladores de la transcripción, muchos de los cuales mostraron cambios significativos en la expresión génica (Park, 2015, Goncalves, *et al.*, 2016).

Entre las microalgas marinas, las diatomeas conforman un grupo abundante y muy diverso que se caracterizan por almacenar lípidos en forma de gotas o cuerpo lipídicos intracelulares, esto aunado a la diversidad de genes que presenta, debido a su proceso evolutivo, hace que las diatomeas, sean un grupo interesante por analizar desde el punto de vista biotecnológico.

I.6 La diatomea *Chaetoceros muelleri* como organismo de estudio

La microalga *C. muelleri* pertenece al filo *Bacillariophyta*, al igual que un tercio de todas las especies de fitoplancton marino, lo conforman aproximadamente unas 10,000 especies conocidas. El filo lo componen exclusivamente diatomeas, en su mayoría son unicelulares, pero pueden formar colonias de diversos tamaños; se caracterizan por poseer frústulas de sílice y tener clorofila *a* y *c*. Contienen un alto nivel de fucoxantina, pigmento que les confiere un color marrón dorado. Al ser uno de los grupos de fitoplancton más prominentes de los océanos, tienen una importancia crucial en los sistemas marinos desde un punto de vista

ecológico y biogeoquímico. También son importantes para el reciclaje de elementos como el azufre (S), fósforo (P), carbono (C) y nitrógeno (N), además de elementos trazas presentes en el océano (Allen *et al.*, 2006; Sajjadi *et al.*, 2018; Enamala *et al.*, 2018).

La microalga *C. muelleri* (Figura 5) se caracteriza por tener una forma redondeada o rectangular con lados convexos, presentando cuatro setas en sus extremos; es un alga de color café cuya pared celular está constituida por frústulas de sílice. Llega a medir entre 3.5 y 8 micras y suele presentarse de forma individual y raramente formando cadenas de 2-3 células. Crece adecuadamente a temperaturas entre 15 y 30 °C y salinidades de 35 UPS (Unidades Prácticas de Salinidad) (Johansen y Rushforth, 1985).

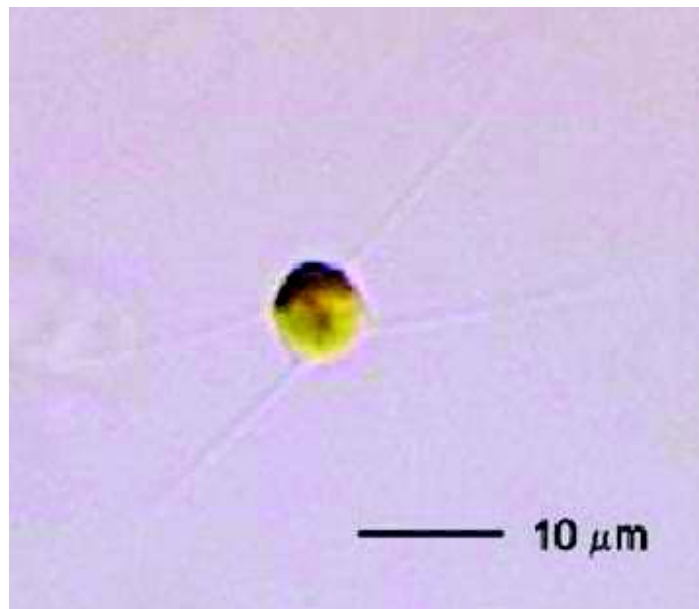


Figura 5. Imagen de *Chaetoceros muelleri* (Connolly *et al.*, 2008).

Las frústulas de sílice a menudo están muy ornamentadas y muestran estructuras específicas de la especie lo que sirve para su clasificación, aunque actualmente su taxonomía se basa principalmente en la identificación de las secuencias ribosómicas. Las estructuras que presentan las valvas silíceas las hace altamente interesantes para aplicaciones nanotecnológicas. Las diatomeas están fuertemente involucradas en el ciclo de los silicatos

solubles, debido a la naturaleza de sus valvas al integrarlos a sus frústulas y al liberarlos por descomposición en el lecho marino (Kroth, 2007).

Evolutivamente, el genoma de las diatomeas tiene una naturaleza quimérica derivada de al menos 3 procesos de endosimbiosis; en consecuencia, existe una transferencia de la mayoría de los genes del endosimbionte al núcleo de la célula huésped, por lo que, es posible que muchas redes y vías metabólicas novedosas puedan ser descubiertas en estos organismos (Allen *et al.*, 2006; Kroth, 2007; Bowler *et al.*, 2008; Sajjadi *et al.*, 2018).

La secuenciación y el análisis del genoma de la diatomea *T. pseudonana* confirmó la complejidad genética esperada de las diatomeas, observando en sus resultados que solo la mitad de los genes codifican proteínas similares a las algas rojas, verdes y plantas, mientras que aproximadamente el 7% de los genes codifican para proteínas de origen animal, como proteínas que pueden derivarse de la célula huésped secundaria. Los genomas de cloroplastos de diatomeas tienen menos genes que los genomas de cloroplastos de algas rojas, lo que indica que una cantidad de genes de cloroplastos se transfirieron al núcleo después de una endosimbiosis secundaria. Por otro lado, se encontró que la transferencia horizontal de genes entre bacterias y diatomeas es generalizada y es mucho más alta de lo que se ha encontrado en otros eucariotas secuenciados, representan al menos el 5% de sus repertorios genéticos (Bowler *et al.*, 2008).

II. JUSTIFICACIÓN

Una característica de las diatomeas que ha generado interés desde hace décadas es su capacidad de almacenar lípidos en forma de gotas. La caracterización de sus lípidos ha demostrado que producen altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, los cuales son muy importantes para la salud humana, siendo el EPA y el DHA los de mayor relevancia. En adición, el perfil de lípidos obtenido a partir de estas microalgas, las vuelve candidatas potenciales para la producción de triacilglicéridos, los cuales son precursores del biodiesel.

Por otro lado, se ha demostrado que la privación de nutrientes provoca un aumento en la cantidad de TAG, principalmente por limitación de nitrógeno; sin embargo, esto compromete el crecimiento celular. Por tal motivo, con el objetivo de aumentar la producción de lípidos sin comprometer la biomasa, se han realizado transformaciones genéticas de microalgas; sin embargo, no han dado los resultados esperados, evidenciando el poco conocimiento de cómo la microalga responde a la limitación de nutrientes y de las rutas metabólicas involucradas en la biosíntesis y almacenamiento de lípidos. En este contexto, se propuso como objetivo de este proyecto, estudiar el efecto de diferentes concentraciones de nitrógeno en la composición química, proximal y perfil de ácidos grasos de la microalga *C. muelleri* así como en la expresión de genes relacionados con la asimilación del nitrógeno y la biosíntesis de lípidos.

PLANTEAMIENTO DE LAS PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN:

¿Cuál es el efecto de las diferentes concentraciones de nitrógeno en la composición química de la diatomea *Chaetoceros muelleri*?

¿Cuál es el efecto de las diferentes concentraciones de nitrógeno en el perfil de ácidos grasos de la diatomea *Chaetoceros muelleri*?

¿Cuál es el efecto de las diferentes concentraciones de nitrógeno en la expresión de genes relacionados con la asimilación de nitrógeno y biosíntesis de lípidos?

III. HIPÓTESIS

La concentración de nitrógeno en los cultivos de *Chaetoceros muelleri* provoca cambios en la composición química y proximal de la microalga; así como en la expresión de los genes relacionados con la asimilación de nitrógeno y biosíntesis de lípidos.

IV. OBJETIVOS

IV.1 Objetivo general

Analizar la respuesta química y la expresión de genes de la microalga *Chaetoceros muelleri* cultivada bajo diferentes concentraciones de nitrógeno (NaNO₃).

IV.2 Objetivos específicos

- Estudiar el efecto de 4 concentraciones de NaNO₃: 1.76 mM, 0.44 mM, 0.176 mM y 3.53 mM, en el crecimiento, biomasa y composición bioquímica de la microalga *C. muelleri*.
- Estudiar el efecto de 4 concentraciones de NaNO₃: 1.76 mM, 0.44 mM, 0.176 mM y 3.53 mM, en el perfil de ácidos grasos de la microalga *C. muelleri*.
- Evaluar los niveles de expresión de genes asociados con el metabolismo de nitrógeno y la biosíntesis de lípidos en la *C. muelleri* mediante RT-PCR semicuantitativo bajo las 4 concentraciones de NaNO₃: 1.76 mM, 0.44 mM, 0.176 mM y 3.53 mM.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1 Material biológico

La cepa de *Chaetoceros muelleri* fue proporcionada por el cepario del Laboratorio de Análisis Químico y Microbiología, perteneciente al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora.

V.2 Condiciones de cultivo y diseño experimental

La investigación se llevó a cabo bajo condiciones controladas de iluminación ($260 \pm 20 \mu\text{mol photon m}^2 \text{seg}^{-1}$) y temperatura ($20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$). Las microalgas se cultivaron utilizando 4 tratamientos distintos, utilizando NaNO_3 como fuente de nitrógeno; para cada tratamiento se realizaron tres réplicas técnicas, utilizando una concentración celular inicial de $150,000 \text{ células ml}^{-1}$. Los ensayos se llevaron a cabo utilizando el medio f de Guillard y Rhyter (1962) como control (ver en anexos), 2 tratamientos limitantes en nitrógeno (f/4 y f/10) y un tratamiento con exceso de nitrógeno (2f). Los tratamientos utilizados se describen a continuación (Tabla 1):

Tabla 1. Concentración de nitrato de sodio en los tratamientos utilizados.

Medio de Cultivo (Guillard y Rhyter, 1962)	Concentración NaNO_3 mM
2f	3.53
f (control)	1.76
f/4	0.44
f/10	0.18

Cabe mencionar que el resto de los nutrientes (fosfatos, silicatos, metales y vitaminas) se mantuvieron constantes para todos los tratamientos. Se realizaron conteos diarios para establecer la cinética de crecimiento, para ello se fijó 1 mL de cultivo de cada tratamiento utilizando lugol (solución de I₂ al 1% y KI al 2% en agua destilada) (Andersen, 2005). Para llevar a cabo los conteos se utilizó una cámara de Neubauer de 0.1mm de profundidad y un microscopio compuesto, Carl Zeiss Axiostar Plus. Para obtener el número de células por mililitro, se aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{No.} \frac{\text{células}}{\text{ml}} = \frac{\text{Número total de células}}{\text{Total cuadrantes contados}} \times 10^4$$

V.3 Composición proximal

Las muestras para los análisis de biomasa y composición proximal fueron tomadas al cuarto día del inóculo inicial (que corresponde al segundo día de que inicia la fase estacionaria). Para cada determinación se realizaron tres réplicas técnicas por tratamiento.

V.3.1 Determinación de biomasa

La biomasa seca se determinó gravimétricamente por diferencia de peso. Se tomaron 150 mL del medio de cultivo y se filtró con filtros Whatman GFC (47 mm diámetro, 0.45 µm tamaño de poro) previamente calibrados. Los filtros fueron secados en una estufa convencional (CSE Chicago Surgical & Electrical Model 300) por 8 horas a 75 °C y se registró el peso con ayuda de una balanza analítica (Marca METTLER, Modelo AJ100). Una vez obtenido el peso seco, los filtros se sometieron a incineración en una mufla (Terlab™ Modelo TE-M20D) a 480 °C por 8 horas (Sorokin, 1973) para la obtención del peso de las cenizas. Finalmente, la materia orgánica fue obtenida por diferencia de peso, entre el peso seco y el peso de las cenizas (Sorokin, 1973).

V.3.2 Determinación de carbohidratos

La determinación de carbohidratos se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Dubois *et al.* (1956) modificada por López-Elías (1995). Se filtraron 30 mL del medio de cultivo (filtros Whatman GFC, 25 mm diámetro, 0.45 μm tamaño de poro). Las células filtradas se lavaron con formato de amonio (36 g L^{-1}) y fueron conservadas a -80°C hasta su posterior análisis. En un tubo cónico para centrifuga, se maceró el filtro en 5 mL de ácido sulfúrico 1M, se taparon los tubos y se incubaron en baño maría a 100°C por 1 h, una vez centrifugada la mezcla, se colocó 1 mL del sobrenadante en un tubo de ensaye, al cual fue agregado 1 mL de fenol al 5%; se mezcló y se dejó reposar por 40 min. Posteriormente se añadió lentamente 5 mL de ácido sulfúrico, se enfrió y se tomó la lectura a $\lambda = 485 \text{ nm}$ en el espectrofotómetro (Thermo Scientific, Spectronic 20D). La concentración de carbohidratos en la muestra se obtuvo por la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración. El porcentaje de carbohidratos se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Carbohidratos} = \frac{[A_{485}/m + V_e/V_m]}{P_s} \times 100$$

Donde:

A_{485} = Absorbancia a 485 nm

V_e = Volumen del extracto ácido en mL

V_m = Volumen de la alícuota calculada en mL

P_s = Peso de la muestra seca en mg

m = pendiente de la curva

V.3.3 Determinación de lípidos

Para la determinación de lípidos se realizó primero un proceso de extracción utilizando mezclas de cloroformo: metanol (2:1 v/v) según la técnica descrita por Bligh y Dyer (1959) y

modificada por López-Elías (1995). Se filtraron 100 mL del medio de cultivo (filtros Whatman GFC, 47 mm diámetro, 0.45 µm tamaño de poro). Las células filtradas se lavaron con formato de amonio (36 g L⁻¹), las muestras fueron conservadas a -80°C hasta su posterior análisis. En un tubo cónico para centrifuga, se maceró el filtro en 4 mL de metanol posteriormente se adicionaron 2 mL de cloroformo y 0.8 mL de agua destilada. Se procedió a centrifugar la muestra a 4000 rpm durante 25 min. Se extrajo el sobrenadante y se realizó una segunda extracción al residuo. Se juntaron ambos sobrenadantes en tubos de ensaye y se les adicionó 3 mL de cloroformo y 3 mL de agua. Se dejaron reposar por 24 horas en frío para la separación de las fases. Se separó la fase acuosa y se dejó evaporar los solventes en campana de extracción. La determinación de lípidos totales, se realizó según el método descrito por Pande *et al* (1963). Al residuo lipídico obtenido tras la evaporación del solvente, se le adicionaron 3 mL de dicromato de potasio al 2% en ácido sulfúrico al 98%, tapados los tubos, se colocaron en baño maría a 100°C por 15 min; posteriormente se dejaron enfriar. A temperatura ambiente, se le adicionó a cada muestra 4.5 mL de agua destilada, se agitó la mezcla hasta que cambia de coloración a amarillo-naranja, se enfriaron los tubos y se tomó la lectura a λ=590nm en el espectrofotómetro (Thermo Scientific, Spectronic 20D). La concentración de lípidos en la muestra se obtuvo por la ecuación:

$$\% \text{ Lípidos} = \frac{[A_{590} - b]}{m} \times 100$$

Donde:

A₅₉₀ = Absorbancia a 590 nm

m = pendiente de la curva

b = intersección con el eje y

V.3.4 Determinación de proteínas

Para la determinación de proteínas se realizó un procedimiento de extracción, propuesto por López-Elías (1995), en donde se utilizó un tratamiento con hidróxido de sodio 0.1 N, para la

solubilización de las proteínas por medio de la ruptura de la pared celular. La cuantificación se realizó mediante el método descrito por Lowry *et al.* (1951) y modificado por López-Elías (1995). Se procedió de la siguiente manera: se filtraron 30 mL del medio de cultivo (filtros Whatman GFC, 25 mm diámetro, 0.45 μm tamaño de poro). Las células filtradas se lavaron con formato de amonio (36 g L^{-1}), las muestras fueron conservadas a -80°C hasta su posterior análisis. En un tubo cónico para centrifuga, se maceró el filtro en 1 mL de hidróxido de sodio 1N, posteriormente se agregaron 4 mL más de hidróxido de sodio 1N. Una vez tapados los tubos, se sometieron a 100°C por un lapso de 10 min en baño maría. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó la muestra a 3000 rpm durante 30min, se tomó 1 mL del sobrenadante y se le adicionó 5 mL de solución C, se dejó reposar 10 min y seguidamente le fueron añadidos 0.5 mL de solución D, tornándose el color de la solución a azul. Se dejó reposar 1.5 h en oscuridad y posteriormente se tomó la lectura a $\lambda = 750 \text{ nm}$ en el espectrofotómetro (Thermo Scientific, Spectronic 20D). La preparación de las soluciones C y D, se muestran en Anexos. La concentración de proteínas en la muestra se obtuvo por la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Proteínas} = \frac{[A_{750}/m * V_e/V_m]}{P_s} \times 100$$

Donde:

A_{485} = Absorbancia a 485 nm

V_e = Volumen del extracto ácido en mL

V_m = Volumen de la alícuota calculada en mL

P_s = Peso de la muestra seca en mg

m = pendiente de la curva

V.3.5 Perfil de ácidos grasos

Para el perfil de ácidos grasos se siguió la técnica propuesta por Rickebosch *et al.* (2012). Para cada tratamiento se realizaron dos réplicas biológicas constituidas cada una por tres réplicas técnicas. La extracción se realizó en un ambiente de nitrógeno; los lípidos fueron

extraídos a partir de 300 mg de muestra de microalgas liofilizadas con una mezcla 1:1 (v/v) de metanol: cloroformo. Se homogenizó la reacción en vortex por 30 seg y se añadieron 2 mL de agua. Una vez homogenizada, la mezcla fue centrifugada a 2000 rpm por 10 min. Se descartó la fase acuosa y se realizó una extracción adicional al residuo con 4 ml de la mezcla 1:1 (v/v) de metanol: cloroformo. La fase orgánica se transfirió a un tubo de peso conocido utilizando un papel de filtro Whatman No. 1. El disolvente se eliminó por evaporación en un baño de agua a 40°C y se determinó gravimétricamente el contenido lipídico. La derivatización se realizó en medio ácido; por cada 5 mg de lípidos recuperados, se añadió 1 ml de tolueno para su disolución, luego se agregaron 2 ml de ácido sulfúrico al 1% en metanol y la mezcla se dejó incubar en un baño maría durante 8 h a 50°C. Posteriormente, se agregaron 5 ml de cloruro de sodio (5% *p/v*) y 3 ml de hexano para extraer los ésteres metílicos obtenidos. La muestra de los ésteres metílicos se mantuvo a -80°C hasta su posterior análisis. Para la determinación del perfil de ácidos grasos, se inyectó 1 µl de la muestra en un cromatógrafo de gases (Serie Agilent 6890) equipado con una columna analítica de sílice modelo Agilent DB23 (0,25 mm de diámetro, 0.25 µm de espesor y 60 m de longitud) y detector por ionización de llama (FID). Las condiciones de temperatura de la columna fueron las siguientes: 50-175 °C a 25 °C/min, 175-230 °C a 4 °C/min, 230 °C (39.75 min). Se utilizó nitrógeno como gas portador y un estándar de referencia conformado por una mezcla de 37 ésteres metílicos de ácidos grasos (Supelco®37 Component FAME Mix de Sigma-Aldrich).

V.4 Análisis de expresión diferencial de los genes relacionados con la asimilación de nitrógeno y biosíntesis de lípidos

V.4.1 Preparación de la muestra para extracción de ARN total

La biomasa de la microalga se obtuvo por centrifugación de los medios de cultivo a 3000 rpm por 10 min para cada uno de los tratamientos, utilizando tubos Falcon™ estériles. Para cada tratamiento se realizaron dos réplicas biológicas constituidas cada una por tres réplicas técnicas. Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su posterior análisis.

V.4.1.1 Obtención de ARN total

Se extrajo ARN total de la biomasa obtenida utilizando TRIzol[®] Reagent (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. En 1 mL de TRIzol[®] Reagent (Invitrogen) frío contenido en un tubo eppendorf de 1.5 mL, se resuspendieron aproximadamente 200 mg de muestra. Se incubó por 5 min a temperatura ambiente para permitir la disociación completa del complejo de nucleoproteína. La muestra se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a 4°C. Se descartó la fase orgánica y el sobrenadante (fase acuosa) se colocó en un tubo nuevo para dar continuidad al proceso de extracción. Se añadieron 200 µL de cloroformo. Se dejó reposar a temperatura ambiente por 3 min y se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min a 4°C. El sobrenadante (fase acuosa) se colocó en un tubo nuevo al cual se le adicionaron 500 µL de isopropanol al 100 % y se dejó incubar por 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min y se decantó el sobrenadante dejando el pellet precipitado. Se lavó el pellet con 1mL de etanol al 75% y se centrifugó a 7,500 rpm por 5 min. Posteriormente, se eliminó el etanol dejando secar el pellet (ARN precipitado) durante 10 min y se resuspendió en 30 µL agua libre de ARNasas estéril.

V.4.1.2 Cuantificación e integridad del ARN total

El ARN total obtenido de los diferentes tratamientos fue cuantificado mediante el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) utilizando 2 µL de muestra. Para el análisis se consideraron las muestras en las que se obtuvo una relación de absorbancia 260/280 nm y 260/230 en el rango >1.8-2. La integridad del ARN total se analizó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1 % utilizando como tinte 1 µL de GelRedTM (Biotium). Las condiciones de electroforesis fueron 85 volts por 40 min. La visualización del gel de agarosa se realizó en el fotodocumentador Bio-Imaging System MiniBis pro (Bio America Inc).

V.4.1.3 Purificación del ARN total

Se purificaron las muestras de ARN total utilizando el kit RNeasy® MinElute® Cleanup (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se ajustó el volumen de la muestra a 200 µL con agua libre de ARNasas para posteriormente añadir 700 µL del buffer RLT hasta homogenizar. Se añadieron 500 µL de etanol al 96-100%, homogenizando la mezcla. Posteriormente, se transfirió la muestra (≈ 700 µL) a una columna RNeasy MinElute spin column (proporcionada por el fabricante) y se centrifugó a 10,000 rpm por 15 segundos. Se desechó el filtrado. El resto de la muestra sin tratar se colocó en la columna, se centrifugó nuevamente y se desechó el filtrado nuevamente. Posteriormente se colocó la columna RNeasy MinElute spin column en un tubo de colección nuevo. Se adicionaron 500 µL del buffer RPE y se centrifugó a 10,000 rpm por 15 seg y se desechó el filtrado. Se añadieron 500 µL de etanol al 80% a la columna RNeasy MinElute spin column y se centrifugó por 2 min a 10,000 rpm. Se eliminó el filtrado y el tubo de colección. La columna se transfirió a un nuevo tubo para secarse por centrifugación a máxima velocidad (12,000 rpm) por 5 min y eliminar el remanente de etanol presente. Se eliminó el tubo colector y se colocó la columna en un nuevo microtubo estéril de 1.5 mL. Se añadieron 30 µL de agua libre de ARNasas a la columna y se centrifugó por 1 minuto a máxima velocidad. Las muestras de ARN se analizaron de nuevo por NanoDrop 1000 (Thermo Scientific), se corrieron en gel de agarosa al 1% para después visualizarse en el fotodocumentador Bio-Imaging System MiniBis pro (Bio America Inc) y finalmente almacenarse a -80°C hasta su posterior uso.

V.4.2 RT-PCR semicuantitativo

V.4.2.1 Secuencias de los genes seleccionados

Se consideraron los genes relacionados con la biosíntesis de lípidos, con el metabolismo del nitrógeno y dos genes de referencia. Las secuencias de los primers se muestran en la Tabla 2.

V.4.3 Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA se utilizó el kit Quantitect® Reverse Transcription Kit (Qiagen) siguiendo indicaciones del fabricante. Para la eliminación del DNA genómico (gDNA) se preparó una reacción en un tubo libre de nucleasas mezclando 1 µL gDNA Wipeout Buffer, 7x, 1 µg de ARN y agua libre de ARNasa en cantidad suficiente para alcanzar un volumen de reacción de 14 µL. Se dejó incubar por 5 min a 42°C y en seguida se colocó en hielo. Paralelamente a la incubación, se preparó la mezcla de reacción para la transcripción reversa: en un microtubo estéril se mezcló 1 µL de Quantiscript Reverse Transcriptasa, 4 µL Quantiscript RT Buffer, 5x y 1 µL de RT Primer Mix. La mezcla de transcripción reversa (6 µL) fue añadida a la mezcla inicial (reacción de eliminación de gDNA), se mezcló y se mantuvo en hielo, posteriormente se incubó a 42°C por 20 min seguidos de una incubación a 95°C por 3 minutos. El cDNA se almacenó a -20°C hasta su posterior análisis.

Tabla 2. Secuencias de los primers de los genes seleccionados para realizar el RT-PCR semicuantitativo.

Gen		Secuencia nucleotídica (5´-3´)	Referencia
<i>NRT2</i>	Forward	TGGGGAAATCTTGGAGGAGGAG	Song y Ward, 2007
	Reverso	CGATAGATACGGTGCGCCA	
<i>AMT1</i>	Forward	ATTTGCTGCTCCGAGACATAC	Lovio <i>et al.</i> , datos no publicados
	Reverso	TACACGGAACATACCAAGC	
<i>GltD</i>	Forward	CGAAGCATAACGTTGTTGAGG	Lovio <i>et al.</i> , datos no publicados
	Reverso	AGTTATTGCATGATTCGGCG	
<i>PTD9</i>	Forward	TCACGATCTCTTCTAGCACG	Lovio <i>et al.</i> , datos no publicados
	Reverso	TGGCATCACAAAGTACCCATT	
<i>DGAT2</i>	Forward	CAATGCGCCTCCTGAATTAC	Lovio <i>et al.</i> , datos no publicados
	Reverso	CACCACACAACCATTCACTC	
<i>TBP</i>	Forward	CGGCATTGATTTTTGCATCG	Lovio <i>et al.</i> , datos no publicados
	Reverso	CCCAACATCAATCGTCCCTA	
<i>EFL</i>	Forward	CTTGTGCTGTTGATGGAGA	Kang <i>et al.</i> , 2012
	Reverso	AACCTCAAGCCAAAGGTGAA	

NRT2: transportador de nitrato; *AMT1*: transportador de amonio 1; *GltD*: glutamina oxoglutarato aminotransferasa; *PTD9*: delta-9-desaturasa; *DGAT2*: diacilglicerol O-aciltransferasa; *TBP*: proteína de unión a la caja TATA; *EFL*: Factor de elongación de la transcripción.

V.4.3.1 Mezcla de reacción para PCR.

Se utilizó el GoTaq® Green Master Mix (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. En un microtubo estéril se mezclaron los siguientes componentes: 6.2 µL de GoTaq® Green Master Mix, 1 µL de primer reverso, 1 µL de primer forward y 2.3 µL de agua estéril. Se añadieron 2 µL de cDNA para alcanzar un volumen de reacción final de 12.5 µL.

V.4.3.2 Determinación de los parámetros de ciclos y temperaturas.

La temperatura de alineamiento y los ciclos se definieron llevando a cabo un gradiente de PCR utilizando el programa PCR_Gradient en un termociclador SimpliAmp™ (Applied Biosystems™ A24811) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial por 5 min a 95°C, seguida de ciclos bajo las siguientes condiciones: temperatura de desnaturalización de 95°C por 1 min, la temperatura de alineamiento por 30 seg y la temperatura de extensión fue 72°C por 40 seg. El rango de ciclos probados fue de 25 a 35 ciclos.

Para definir la temperatura de alineamiento se consideró un rango entre 50°C y 61°C y para determinar la cantidad de ciclos apropiada para cada gen se tomó un rango entre 25 y 35 ciclos, hasta que la amplificación de los productos de PCR para cada gen, fuera visible en el gel de agarosa al 1%.

V.4.3.3 Análisis de los productos de RT-PCR semicuantitativo

Los productos de PCR se analizaron por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1% utilizando como tinte 1 µL de GelRed™ (Biotium). Se mezclaron 2 µL de muestra y 2 µL de buffer de carga 1X. Se utilizó un marcador de peso molecular (TrackIt™ 100bp DNA Ladder, Invitrogen) para determinar el tamaño de los fragmentos y se adicionó 2 µL de buffer de carga 1X y se colocaron en los pozos correspondientes. Las condiciones de electroforesis fueron 85 volts por 40 min. La visualización del gel de electroforesis se realizó en el fotodocumentador Bio-Imaging System MiniBis pro (Bio America Inc). La intensidad de las bandas de los productos de PCR amplificados se determinaron utilizando el software ImageJ (Java versión 1.7.0_51) y se normalizaron tomando como referencia el gen *TBP* y se expresaron las intensidades relativas en unidades arbitrarias.

V.5 Análisis estadístico.

Los datos químicos, proximales y el perfil de ácidos grasos fueron tratados con estadística descriptiva (media \pm desviación estándar de tres valores); además de un análisis de varianza de una vía para determinar las diferencias entre los tratamientos utilizando el Software RStudio (R Core Team, 20019). En los casos en donde se encontraron diferencias se aplicó la prueba “*a posteriori*” de Tukey ($p \leq 0.05$). En el caso de los datos de niveles de expresión relativa de los genes, se aplicó la prueba t de Student por pares para calcular las diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.1 Crecimiento celular y biomasa

Se evaluó el efecto de las diferentes concentraciones de nitrógeno en el crecimiento celular y producción de biomasa de *C. muelleri*. La cinética de crecimiento de la diatomea *C.muelleri* mostró el típico crecimiento sigmoideal de las microalgas (Figura 6). Al cuarto día del inóculo, la concentración celular observada entre los tratamientos osciló en el rango de 1.3×10^6 y 1.8×10^6 cél/mL, observándose diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en el tratamiento más limitado de nitrógeno (0.18 mM) respecto al control (1.76 mM), obteniendo la densidad celular más baja de los cuatro tratamientos ensayados. El contenido de biomasa de *C. muelleri* permaneció constante sin diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 3). En varias investigaciones se observa una disminución de la biomasa cuando las microalgas son cultivadas en bajas concentraciones de nitrógeno (Vega *et al.*, 2010; Bertozzini *et al.*, 2013; López *et al.*, 2014; Lin 2018), lo que difiere con los resultados obtenidos en el presente ensayo para la mayoría de los tratamientos estudiados; excepto en la concentración más baja probada (0.18 mM de NaNO_3^-); donde se observa una disminución en el crecimiento de las células. En parte, esto podría explicarse por las diferencias de las cepas utilizadas. Por otro lado, se sabe que las microalgas en respuesta a la disminución de nitrógeno, aumentan la captación de luz y dirigen su metabolismo del carbono hacia la síntesis de lípidos y carbohidratos de almacenamiento. En estrés prolongado, se origina una reasignación del nitrógeno intracelular reduciendo el aparato biosintético; en cantidades bajas de nitrógeno disponible, la síntesis de proteínas y el crecimiento celular decae (Doncalves, 2016; Liefer *et al.*, 2018). Los datos de biomasa y concentración celular obtenidos en la presente investigación (Tabla 3) sugieren que las concentraciones de nitrógeno analizadas, junto con el tiempo de la cosecha; no comprometen la cantidad total de biomasa debido a que el tiempo de exposición a estrés es relativamente corto, sobre todo en las concentraciones más bajas que fueron analizadas (0.44 y 0.18 mM).

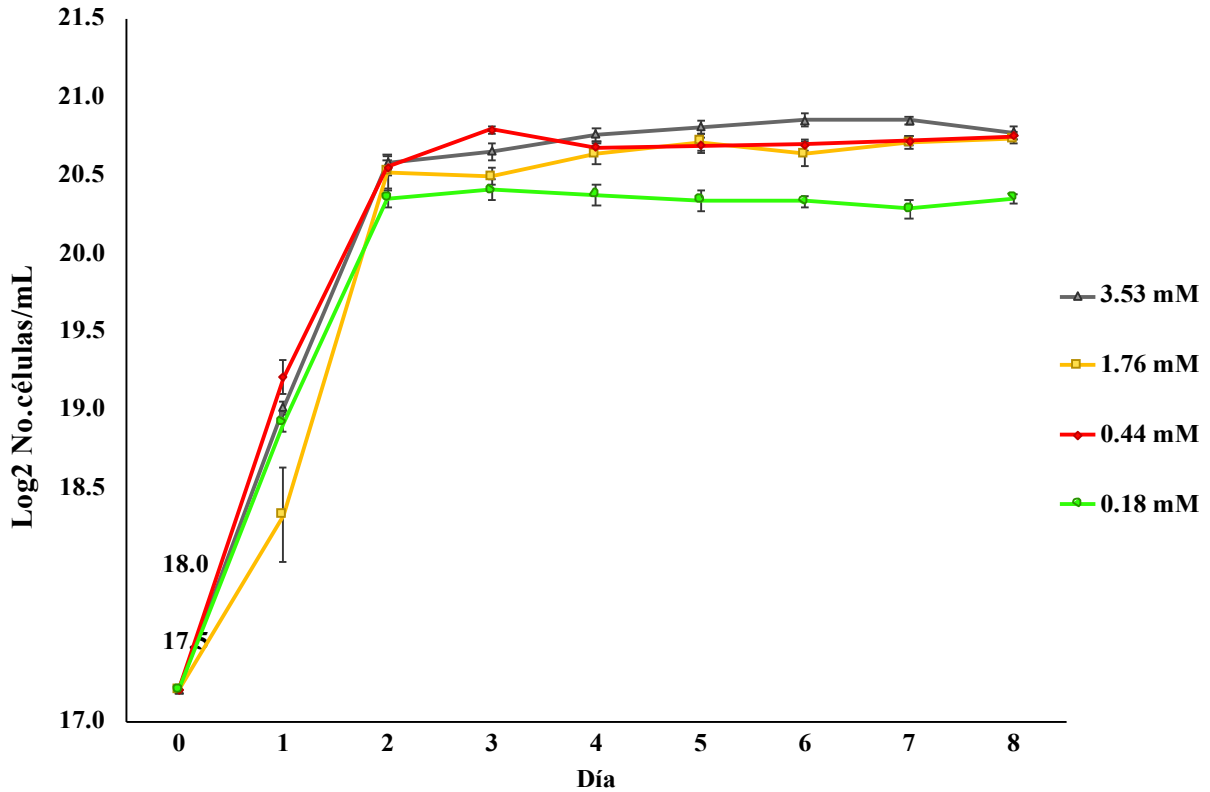


Figura 6. Curva de crecimiento de la microalga *C. muelleri* cultivada en cuatro concentraciones de nitrógeno (NaNO_3). La gráfica muestra la media del número de células ($\text{Log}_2 \text{No. Celulas mL}^{-1}$) \pm desviación estándar de tres replicas técnicas.

Tabla 3. Peso seco, cenizas y contenido de materia orgánica de *C. muelleri* cultivada en cuatro concentraciones de nitrógeno (NaNO_3).

Concentración de NaNO_3	Densidad celular ($\times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$)	Peso seco (mg/L)	Cenizas (%)	Materia orgánica (%)
0.18 mM	1.36 ± 0.12^b	198.9 ± 15.87^a	48.41 ± 2.31^a	51.59 ± 2.31^a
0.44 mM	1.68 ± 0.82^a	207.64 ± 11.09^a	45.21 ± 2.30^a	54.79 ± 2.30^a
1.76 mM	1.63 ± 0.16^a	211.14 ± 8.22^a	47.00 ± 2.01^a	53.00 ± 2.01^a
3.53 mM	1.78 ± 0.90^a	198.89 ± 14.29^a	46.74 ± 3.82^a	53.26 ± 3.82^a

Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres réplicas técnicas. Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

VI.2 Composición proximal

Con respecto a la composición proximal, se observó que el medio más limitado de nitrógeno (0.18 mM), presentó un aumento del 60% en carbohidratos y del 35% en lípidos, respecto al medio control (1.76 mM) (Tabla 4). Esto concuerda con reportes en diatomeas marinas, donde se han reportado incrementos en el contenido de lípidos en respuesta a la limitación de nitratos (Griffiths *et al.*, 2012; Bertozzini *et al.*, 2013). Por otro lado, se ha observado que el alga verde

C. reinhardtii, en etapas tempranas de cultivo bajo condiciones de estrés por nutrientes, es capaz de activar la gluconeogénesis dando lugar a un estado glucolítico una vez que se ha agotado el nitrógeno. Bajo estas condiciones, el metabolismo del carbono es regulado de forma negativa lo que provoca un incremento del metabolismo del nitrógeno y la biosíntesis de lípidos (Park *et al.*, 2015). Por lo anterior, los resultados observados en el presente estudio, específicamente en el tratamiento 0.18 mM, sugieren un estado temprano de estrés por nitrógeno, que promueve un incremento significativo en el contenido de lípidos y carbohidratos totales en comparación al tratamiento control analizado.

Tabla 4. Composición proximal de la microalga *C. muelleri* cultivada en 4 concentraciones de NaNO₃.

Concentración de NaNO ₃	Carbohidratos (%)	Lípidos (%)	Proteínas (%)
0.18 mM	8.86 ± 1.11 ^a	8.95 ± 0.99 ^a	10.82 ± 1.48 ^a
0.44 mM	6.03 ± 0.94 ^b	7.16 ± 1.26 ^b	14.25 ± 0.99 ^b
1.76 mM	5.55 ± 0.42 ^b	6.65 ± 1.41 ^b	15.11 ± 0.71 ^{bc}
3.53 mM	5.31 ± 0.73 ^b	6.86 ± 1.22 ^b	16.054 ± 1.3 ^c

Los datos representan la media ± desviación estándar de tres réplicas técnicas. Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

En el caso del contenido de proteínas, solo el tratamiento más limitado (0.18 mM) mostró una disminución significativa ($p \leq 0.05$) en comparación al control (1.76mM); el resto de los tratamientos no mostraron diferencias significativas respecto al control (Tabla 4). Hockin *et al.* (2012) reportaron un comportamiento similar en la diatomea *T. pseudonana*, donde el análisis de proteínas mostró una disminución de la biosíntesis proteica y un aumento

en las proteínas que forman parte del complejo multienzimático de la piruvato deshidrogenasa (FAS), lo cual es indicativo de un proceso glucolítico, ya que FAS es necesario para la formación de ácidos grasos a partir de acetyl-CoA. Estos resultados concuerdan con la información reportada por Park *et al.* (2015), en donde la microalga *C. reinhardtii*, en condiciones de ausencia de nitrógeno mostró clorosis y degradación proteica resultante del reciclaje intracelular del nitrógeno. El valor obtenido en el tratamiento 0.18 mM de NaNO₃ mostró una marcada disminución en el contenido proteico, lo que sugiere un reasignamiento del nitrógeno intracelular, pero sin afectar significativamente la cantidad de biomasa obtenida respecto del control (1.76 mM).

VI.2.1 Perfil de ácidos grasos

Se lograron identificar 17 ácidos grasos presentes en los lípidos obtenidos a partir de *C. muelleri* (Tabla 5). Los porcentajes de ácido palmítico (C16:0) y ácido γ -linoleico (C18:3n6) observados en el medio más limitado (0.18 mM de NaNO₃) fueron significativamente más altos ($p \leq 0.05$) que los valores observados en el resto de los tratamientos. Por otro lado, el ácido pentadecanoico (C15:0) y el ácido lignocérico (C24:0) presentaron valores menores comparados con el tratamiento control ($p \leq 0.05$).

En el medio más limitado en nitrógeno, se obtuvieron los valores más altos de ácidos grasos saturados (SFA's, siglas en inglés) y los valores más bajos de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's, por sus siglas en inglés). Los valores de PUFA observados en la presente investigación (19.03% a 22.17%) fueron más bajos a los valores reportados para *C. muelleri* por Pacheco *et al.* (2010) comparando el medio f y f/4 (1.73 mM y 0.44 mM, respectivamente), en donde reportaron valores de 32.7% y 77.4% respectivamente. No obstante, los valores totales de SFA, MUFA y PUFAS (41.05%, 39.91% and 19.03%) obtenidos en nuestro estudio fueron similares a los reportados por Lin *et al.* (2018) para la microalga *C. muelleri* utilizando mayores concentraciones de nitrógeno (medio f/2). A pesar de que, en estos trabajos, se utilizó la misma especie, las diferencias en los valores puede atribuirse a las condiciones de cultivo de las microalgas y al origen de la cepa (Griffiths, 2012).

Tabla 5. Perfil de ácidos grasos de la microalga *C. muelleri* cultivada en diferentes concentraciones de nitrógeno (NaNO₃).

Ácido graso	Tratamiento			
	0.18mM	0.44mM	1.76mM	3.53mM
C14:0_ Ácido mirístico	13.89 ± 0.86 ^a	14.3 ± 1.18 ^a	14.43 ± 0.93 ^a	14.6 ± 0.67 ^a
C14:1_ Ácido miristoleico	0.11 ± 0.03 ^a	0.13 ± 0.03 ^a	0.12 ± 0.04 ^a	0.13 ± 0.03 ^a
C15:0_ Ácido Pentadecílico	0.67 ± 0.07 ^b	0.75 ± 0.07 ^a	0.79 ± 0.05 ^a	0.80 ± 0.06 ^a
C16:0_ Ácido palmítico	20.48 ± 2.48 ^a	18.31 ± 1.42 ^{bc}	17.91 ± 1.19 ^{bc}	18.5 ± 1.08 ^{ab}
C16:1_ Ácido pamitoleico	38.39 ± 1.76 ^a	37.71 ± 1.69 ^a	37.64 ± 2.1 ^a	36.62 ± 1.43 ^a
C17:0_ Ácido margárico	3.26 ± 0.69 ^a	3.29 ± 0.7 ^a	3.39 ± 0.88 ^a	2.99 ± 0.38 ^a
C18:0_ Ácido esteárico	1.8 ± 0.65 ^a	1.53 ± 0.38 ^a	1.27 ± 0.24 ^a	1.49 ± 0.35 ^a
C18:1n9c_ Ácido oleico	1.42 ± 0.55 ^a	1.52 ± 0.75 ^a	1.05 ± 0.32 ^a	1.4 ± 0.31 ^a
C18:2n6c_ Ácido linoleico	1.60 ± 0.29 ^a	1.33 ± 0.42 ^a	1.19 ± 0.37 ^a	1.38 ± 0.34 ^a
C18:3n6_ Ácido γ -linoleico	1.70 ± 0.15 ^a	1.18 ± 0.36 ^b	1.20 ± 0.37 ^b	1.08 ± 0.29 ^b
C20:0_ Ácido araquídico	Nd	0.12 ± 0.02 ^{ab}	0.10 ± 0.03 ^b	0.14 ± 0.03 ^a
C20:3n6_ Ácido dihomo- γ - linoleico	0.24 ± 0.02 ^a	0.23 ± 0.04 ^a	0.22 ± 0.03 ^a	0.21 ± 0.04 ^a
C20:4n6_ Ácido araquidónico	5.87 ± 1.55 ^a	7.66 ± 2.03 ^a	7.85 ± 1.97 ^a	7.90 ± 2.13 ^a
C22:0_ Ácido behénico	0.29 ± 0.05 ^a	0.33 ± 0.06 ^a	0.32 ± 0.06 ^a	0.34 ± 0.05 ^a
C20:5n3_EPA	8.58 ± 1.39 ^a	9.57 ± 1.44 ^a	10.55 ± 2.48 ^a	10.37 ± 1.57 ^a
C24:0_ Ácido lignocérico	0.59 ± 0.18 ^b	0.72 ± 0.07 ^{ab}	0.69 ± 0.06 ^a	0.73 ± 0.08 ^{ab}
C22:6n3_DHA	1.04 ± 0.31 ^a	1.17 ± 0.25 ^a	1.21 ± 0.25 ^a	1.23 ± 0.18 ^a
SFA's ¹	41.05 ± 1.75 ^a	39.50 ± 1.30 ^{ab}	38.96 ± 0.83 ^b	39.68 ± 1.16 ^{ab}
MUFA's ²	39.91 ± 1.50 ^a	39.36 ± 1.37 ^a	38.81 ± 1.91 ^a	38.15 ± 1.20 ^a
PUFA's ³	19.03 ± 1.80 ^b	21.14 ± 0.47 ^a	22.23 ± 1.32 ^a	22.17 ± 0.80 ^a

¹Ácidos grasos saturados, ²Ácidos grasos monoinsaturados, ³Ácidos grasos poliinsaturados. Los datos representan la media ± la desviación estándar del porcentaje relativo del total de ácidos grasos de dos réplicas biológicas y tres réplicas técnicas ($n = 6$). Letras distintas en las columnas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Por otro lado, para que los lípidos de un organismo puedan ser considerados para la producción de biodiesel, es necesario que en su composición predominen, las cadenas carbonadas relativamente cortas, entre 14 y 18 átomos de carbono, además de un valor bajo de PUFA's (Wang, 2014). Interesantemente, estas dos características fueron observadas en el perfil de ácidos grasos de la microalga *C. muelleri*, cultivada en la concentración de nitrato más baja analizada (0.18 mM de NaNO_3) sugiriendo el potencial de los componentes de este perfil para la biosíntesis de biodiesel.

VI.3 Análisis de expresión diferencial por medio de RT-PCR semicuantitativo

VI.3.1 Integridad del ARN total.

Se obtuvo ARN de buena calidad de cada uno de los tratamientos para la síntesis de cDNA. En la Figura 7 se muestra su integridad en gel de agarosa al 1% y las concentraciones obtenidas se muestran en la Tabla 6.

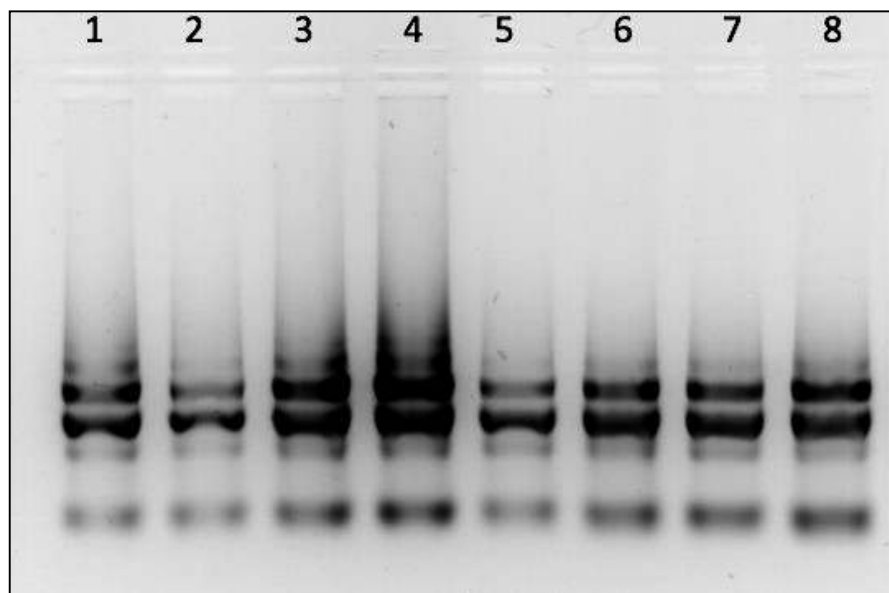


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de ARN total extraído con TRIzol (Thermo Fisher Scientific) y purificado con Rneasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen). Carril 1-4, réplica biológica 1 (RB1). Carril 5-8, réplica biológica 2 (RB2). Carril 1) 0.18 mM_{RB1}, Carril 2) 0.44 mM_{RB1}, Carril 3) 1.76 mM_{RB1}, Carril 4) 3.53 mM_{RB1}, Carril 5) 0.18 mM_{RB2}, Carril 6) 0.44 mM_{RB2}, Carril 7) 1.76 mM_{RB2}, Carril 8) 3.53 mM_R

Tabla 6. Concentración de ARN total de las muestras estudiadas

Concentración	Concentración (ng/μl)	Relación A260/A280	Relación A260/A230
0.18mM_RB1_1	545.5	2.15	2.48
0.18mM_RB1_2	736.9	2.17	2.27
0.18mM_RB1_3	355	2.15	2.23
0.18mM_RB2_1	323	2.16	2.22
0.18mM_RB2_2	214.4	2.17	1.97
0.18mM_RB2_3	674.9	2.21	2.11
0.44mM_RB1_1	234.13	2.18	1.61
0.44mM_RB1_2	989.7	2.13	2.25
0.44mM_RB1_3	251.5	2.17	2.10
0.44mM_RB2_1	302.2	2.15	1.80
0.44mM_RB2_2	489	2.21	2.45
0.44mM_RB2_3	727.5	2.19	2.37
1.76mM_RB2_1	461.2	2.09	2.05
1.76mM_RB2_2	508.8	2.19	2.11
1.76mM_RB2_3	558	2.10	2.135
1.76mM_RB1_1	406.3	2.11	2.20
1.76mM_RB1_2	1013	2.18	2.50
1.76mM_RB1_3	897	2.10	2.18
3.53mM_RB1_1	636.8	2.17	2.10
3.53mM_RB1_2	781.6	2.14	2.51
3.53mM_RB_3	819.9	2.11	2.10
3.53mM_RB2_1	389.4	2.12	1.99
3.53mM_RB2_2	860.4	2.19	2.50
3.53mM_RB2_3	1026	2.17	2.45

*RB: Réplica biológica

VI.3.2 RT-PCR semicuantitativo

VI.3.2.1 Determinación de los parámetros de ciclos y temperaturas

Para estandarizar las condiciones de las reacciones de RT-PCR se consideraron las recomendaciones de Hernández y colaboradores (1994) para la selección del rango del ciclo a probar, el gradiente de temperatura (Figura 8) y el gradiente de ciclos (Figura 9). Esto permitió obtener las condiciones adecuadas para el PCR, considerando que alinearan los primers y no se generaran productos inespecíficos. Además, se tuvo cuidado de que no se saturara la reacción (*plateau*). Las condiciones para la amplificación de cada gen se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Condiciones definidas para el PCR de los genes seleccionados

Gen	No. Ciclos	Temperatura de alineamiento (°C)
Transportador de amonio 1 (<i>AMT1</i>)	30	57
Glutamin oxoglutarato aminotransferasa (<i>GltD</i>)	30	52
Delta-9-desaturasa (<i>PTD9</i>)	30	59
Diacylglycerol O-acyltransferasa (<i>DGAT2</i>)	3	57
Transportador de nitrato de alta afinidad (<i>NRT2</i>)	30	57
Factor de elongación de la transcripción (<i>EFL</i>)	30	54
Gen que codifica a la proteína de unión a la caja TATA (<i>TBP</i>)	30	59

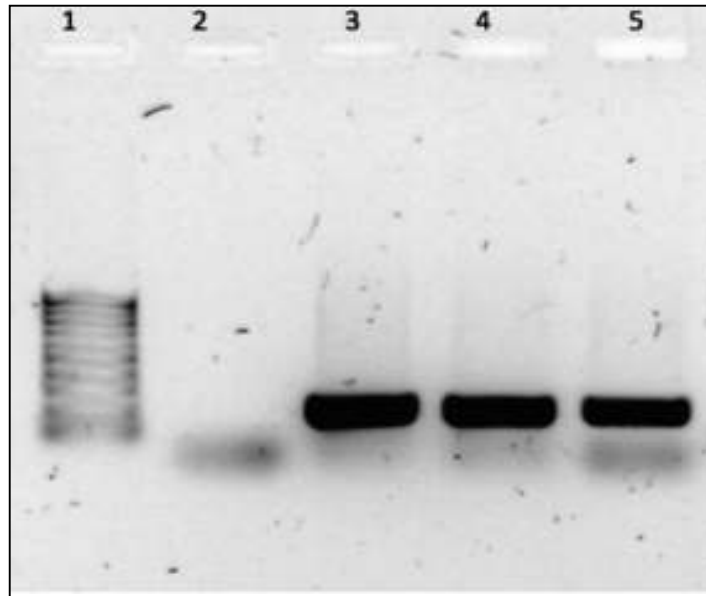


Figura 8. Optimización de la temperatura de alineamiento para PCR. Primer: Gen *GltD*. Carril 1: Marcador molecular. Carril 2: Control negativo. Carril 3: 57°C. Carril 4: 59°C. Carril 5: 61°C. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con GelRed™.

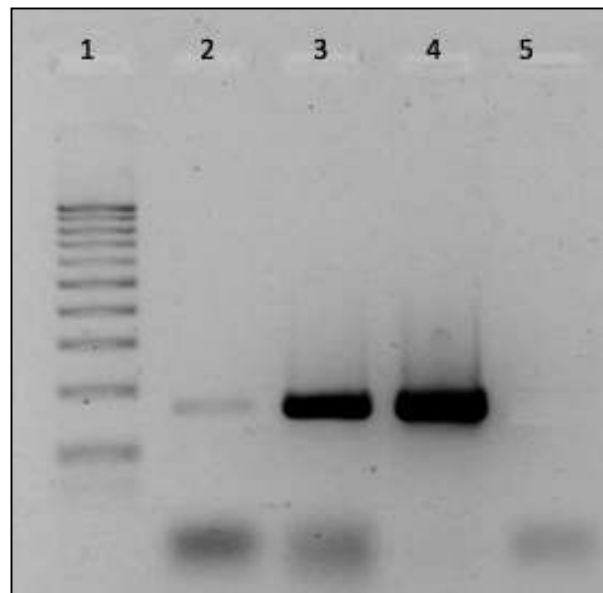


Figura 9. Optimización de los ciclos de alineamiento para PCR. Primer: Gen *TBP*. Carril 1: Marcador molecular. Carril 2: 25 ciclos. Carril 3: 30 ciclos. Carril 4: 35 ciclos. Carril 5: Control negativo. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con GelRed™.

Los amplicones de los productos de PCR obtenidos fueron del tamaño esperado de acuerdo al diseño de los primers en un rango de 167 a 199 bp. Se eligieron 30 ciclos para el PCR, de manera que todos los genes tuvieran igual número de ciclos que el gen endógeno (*TBP*) utilizado.

VI.3.2.2 Análisis de los productos de RT-PCR semicuantitativo

Los niveles de expresión relativa fueron analizados por RT-PCR semicuantitativo. De los genes considerados como de referencia (*TBP* y *EFL*), se eligió el *TBP* debido a que el *EFL* mostró variación en su expresión bajo los diferentes tratamientos (Figura 10).

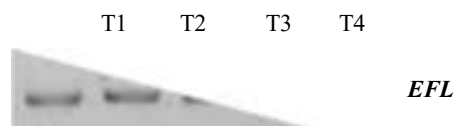


Figura 10. Productos de RT-PCR del gen *EFL* (factor de elongación de la traducción) utilizando 1% de agarosa teñido con GelRed™. Carriles T1 a T4 corresponden a los tratamientos analizados. T1: 0.18 mM. T2: 0.44 mM. T3: 1.73 mM. T4: 3.53 mM.

El resultado del RT-PCR semicuantitativo de los genes relacionados con la asimilación de nitrógeno (*AMT1*, *NRT2* y *GltD*) y con la biosíntesis de lípidos (*DGAT2*, *PTD9*) (Figura 11) fue normalizado con *TBP* lo cual se presentó como expresión relativa (Figura 12).

Para el gen *AMT1*, que codifica para un transportador de amonio, no se mostraron diferencias en la expresión entre los tratamientos limitantes y el control; en cambio, se observó una disminución de la expresión en el tratamiento con la mayor concentración de nitrógeno (3.53 mM, exceso). De acuerdo a lo señalado por Alipanah y colaboradores (2015), los transportadores de amonio aumentan su expresión en condiciones de privación de nitrógeno, considerando que sugerimos una etapa temprana de estrés en el tratamiento más limitado, el hecho de que no haya cambios en la expresión respecto del control refuerza esta sugerencia. Por otro lado, la disminución de la expresión observada en el medio más concentrado (3.53 mM) sugiere una represión en la expresión génica.

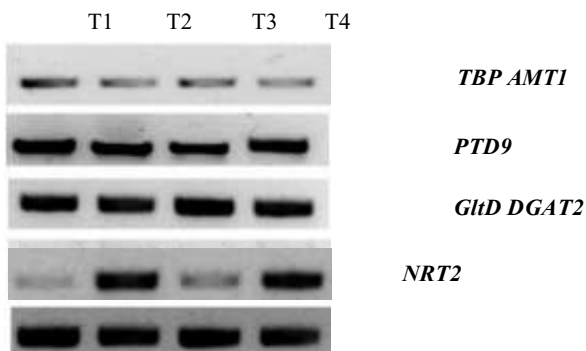


Figura 11. Productos de RT-PCR. Carriles T1 a T4 corresponden a los tratamientos analizados. T1: 0.18 mM. T2:0.44 mM. T3: 1.73 mM. T4: 3.53 mM. *TBP* (gen endógeno): proteína de unión a la caja TATA. *AMT1*: transportador de amonio 1. *PTD9*: delta-9-desaturasa. *GltD*: glutamina oxoglutarato aminotransferasa. *DGAT2*: diacilglicerol O-aciltransferasa 2. *NRT2*: Transportador de nitrato de alta afinidad. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed™.

El gen *PTD9*, codifica para la delta-9-desaturasa, esta enzima es esencial para que se lleve a cabo la biosíntesis del ácido palmitoleico a través de la desaturación del ácido palmítico en la posición 9 (Figura 13). Si bien, en el perfil de ácidos grasos se muestra un aumento significativo en el contenido de ácido palmítico, no se observa una diferencia significativa en las cantidades obtenidas de ácido palmitoleico para los cuatro tratamientos. Acorde con esto, el análisis de expresión del gen, no mostró diferencias significativas en el nivel de expresión entre los tratamientos con limitación de nitrógeno y el control.

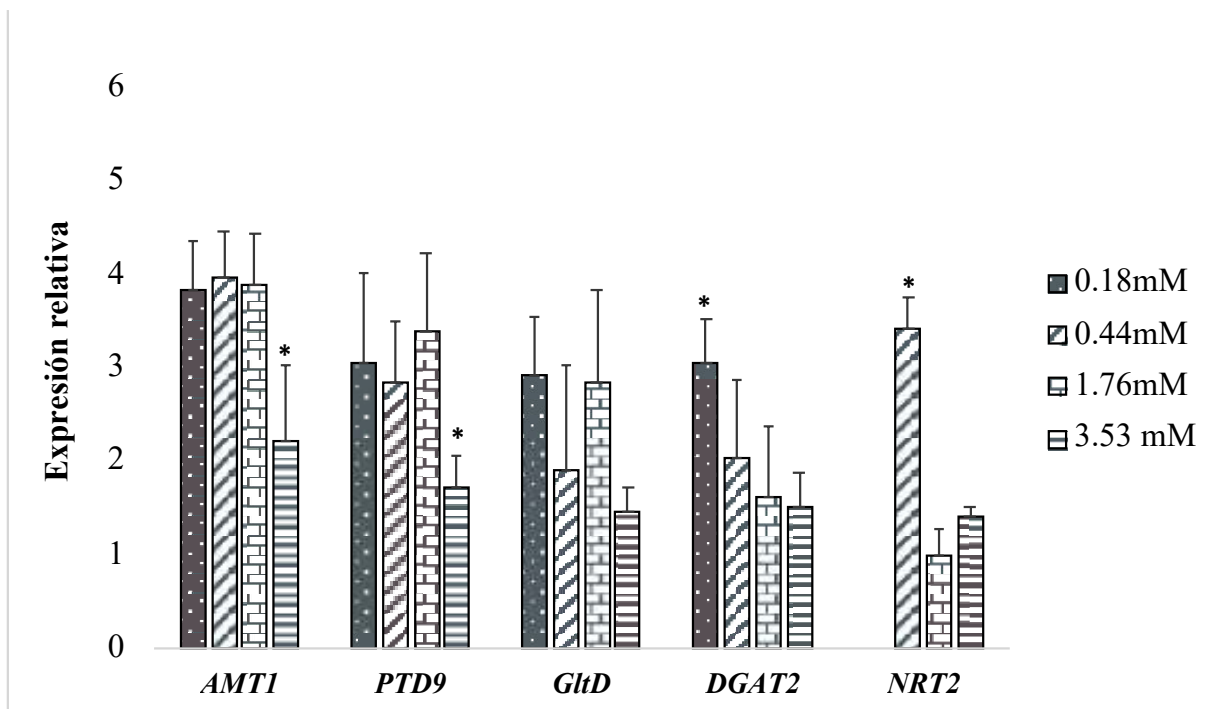


Figura 12. Comparación de la expresión relativa de los genes de *C.muelleri* cultivada en cuatro concentraciones de nitrógeno (NaNO_3). Los datos representan la media de la expresión relativa de los genes \pm la desviación estándar de dos réplicas biológicas y tres réplicas técnicas ($n = 6$). *AMT1*: transportador de amonio 1. *PTD9*: delta-9-desaturasa. *GltD*: glutamina oxoglutarato aminotransferasa. *DGAT2*: diacilglicerol O-aciltransferasa. *NRT2*: Transportador de nitrato de alta afinidad (T1 no determinado). *Diferencias significativas respecto del control (1.76mM) ($p \leq 0.05$).

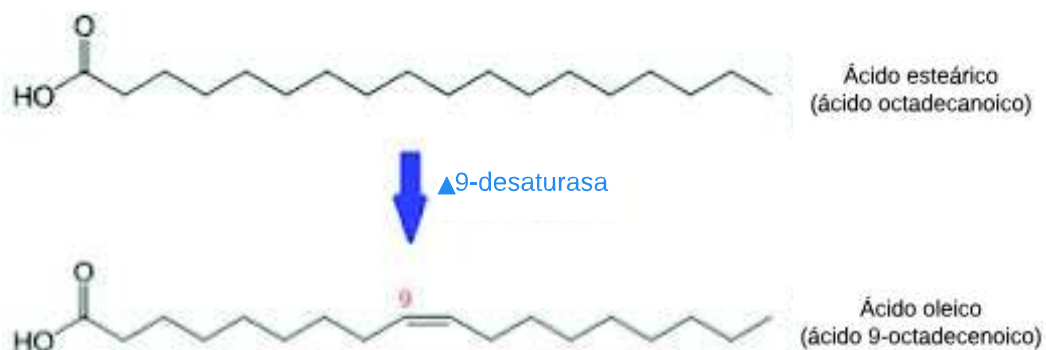


Figura 13. Sitios de acción de la PTD9. Tomada de: http://parts.igem.org/Part:BBa_K1472612 (Sitio visitado el 04 de Julio 2019).

El gen *GltD* codifica para la glutamina-oxoglutarato aminotransferasa (NADPH-GOGAT), enzima que cataliza la biosíntesis de glutamato a partir de amonio, estas reacciones están involucradas en el metabolismo del nitrógeno (Figura 14); de acuerdo a lo observado, no hubo cambios significativos en los niveles de expresión diferencial relativa de *GltD* en *C. muelleri* bajo ninguno de los tratamientos a diferencia de lo reportado por Alipanah *et al.* (2015); donde se observó un aumento de los transcritos de *GltD* en *P. tricornutum* crecida en condiciones de deprivación de nitrógeno. Esto sugiere que, la concentración de nitrógeno ensayada (0.18mM) no afecta la expresión de *GltD* y que, la asimilación de amonio provenientes de la degradación de aminoácidos y proteínas no solo depende de *GltD*.

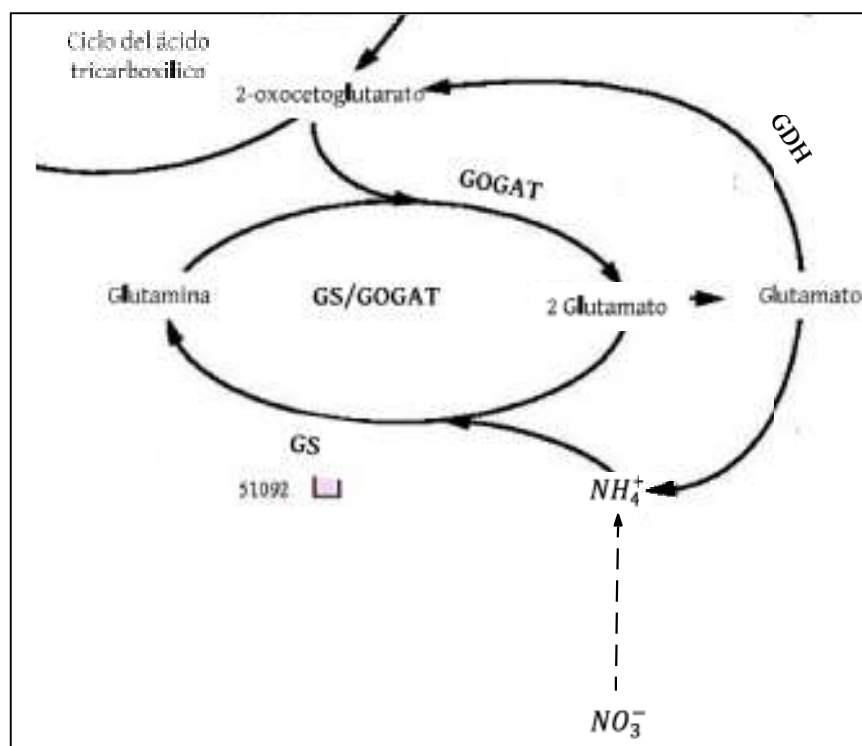


Figura 14. Biosíntesis de glutamato catalizada por la enzima glutamina-oxoglutarato aminotransferasa (NADPH-GOGAT). GS: Glutamina sintasa; GDH: Glutamato dehidrogenasa (adaptado de Levitán *et al.*, 2014).

Para la enzima diacylglycerol O-acyltransferasa codificada por el gen *DGAT2*, está involucrada en la síntesis de triacilglicéridos (TAG) (Figura 15). El análisis de este gen, mostró un incremento de casi dos veces en la expresión en el tratamiento limitante (0.18 mM)

respecto al tratamiento control (3.04 contra 1.6); estos datos concuerdan con los obtenidos en el análisis químico de la biomasa, puesto que en el medio más limitado se obtuvo un aumento significativo de lípidos; lo que sugiere una mayor actividad de la enzima y que este podría ser un punto de control para la modulación de la biosíntesis de lípidos en respuesta a la limitación de nitrógeno. Finalmente, para el caso del transportador de nitrato de alta afinidad (*NRT2*) la expresión relativa del gen que se obtuvo en uno de los medios limitados (0.44 mM), es claramente superior que el tratamiento control (3.4 contra 0.98 del tratamiento control). Esto confirma lo propuesto por Alipannah y colaboradores (2015), quienes señalan que una respuesta a la privación de nitrógeno es que la célula microalgal aumenta su capacidad celular para la absorción del nitrógeno del medio.

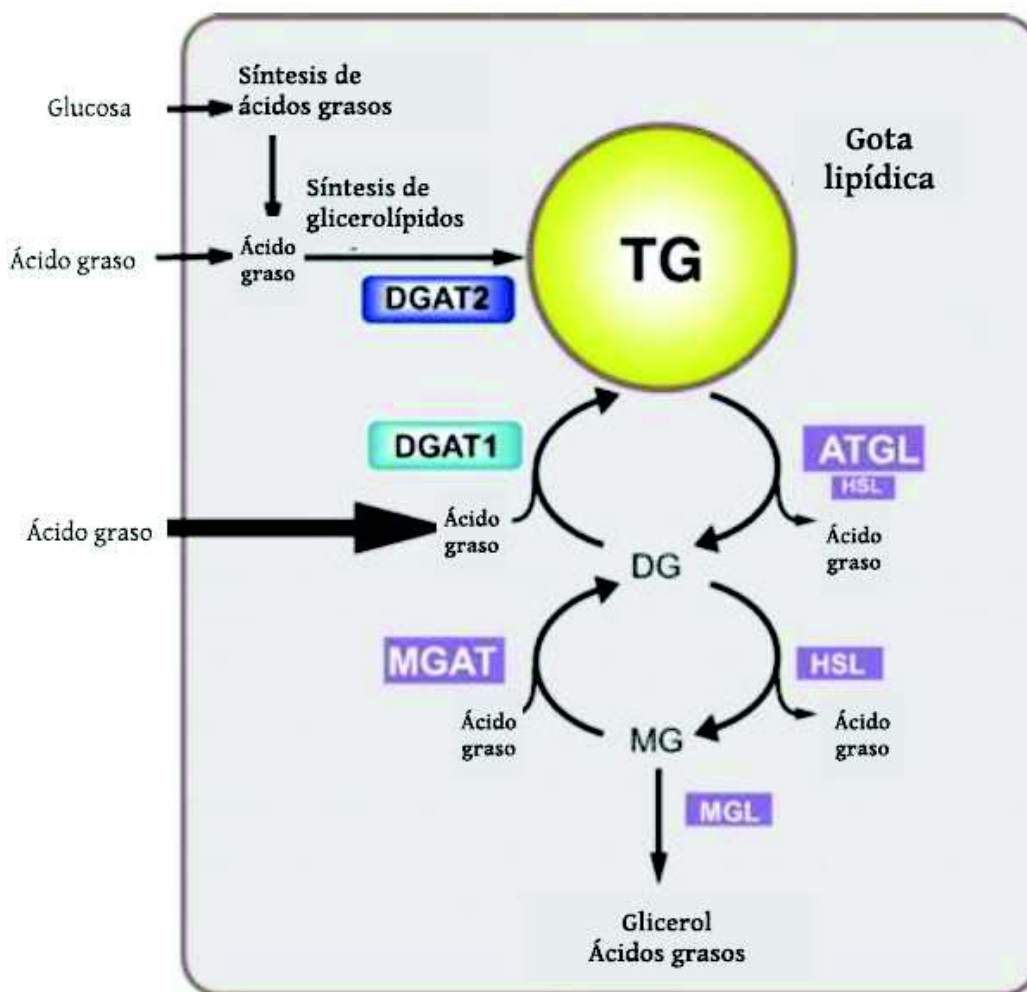


Figura 15. Modelo hipotético para el rol intracelular de DGAT1 y DGAT2. (Yen, 2008).

VII. CONCLUSIONES

La biomasa obtenida de *Chaetoceros muelleri* tiene el potencial de proveer productos de alto valor nutricional dada su composición proximal. En situaciones tempranas de estrés y periodos de exposición relativamente cortos a bajas concentraciones de nitrógeno (4 días/ 0.18 mM) disminuye la proliferación celular sin llegar a afectar la cantidad de biomasa.

La composición proximal de *C. muelleri* se mantiene constante en concentraciones de NaNO_3 , que van de 0.44 mM a 3.53 mM, por lo que se sugiere, optar por la concentración más baja para la producción de *C. muelleri* con propósitos acuícolas, avícolas o de nutrición humana, debido a que el perfil proximal y lipídico obtenido bajo estas condiciones es igual al obtenido en concentraciones mayores (0.88 mM a 2.53 mM) con la ventaja que al disminuir uno de los nutrientes disminuye el costo de la producción.

La limitación de nitrógeno impacta primordialmente la cantidad de proteínas, disminuyendo la cantidad proteica conforme disminuye la concentración de NaNO_3 . La cantidad de lípidos y carbohidratos en *C. muelleri* aumentan significativamente a una concentración de NaNO_3 de 0.18 mM.

Los valores de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (araquidónico, EPA y DHA) no se ven afectados por la limitación del nitrógeno en concentraciones de 0.18 mM a 3.53 mM. Por otro lado, la composición de los lípidos de la microalga *C. muelleri* cultivada en una baja concentración de nitrógeno (0.18mM) la vuelve una candidata potencial para la producción de lípidos adecuados para la producción de biodiesel. Lo anterior, debido a un alto porcentaje de ácidos grasos constituidos por cadenas de 14 a 18 átomos de carbono aunado a un bajo contenido de PUFA's.

El aumento de la expresión relativa de los genes *DGAT2* y *NRT2* en los medios más limitados, sugieren una mayor actividad de la enzima, mismos que podrían ser un punto de control para regular la biosíntesis de lípidos en respuesta a la limitación de nitrógeno.

VIII. RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se recomienda lo siguiente:

- Realizar RT-qPCR (PCR en tiempo real) para la expresión de genes de la diatomea *C. muelleri* bajo los diferentes tratamientos de nitrógeno analizados con el fin de incrementar la sensibilidad para detectar cambios en la expresión génica.
- Valorar la pertinencia de un análisis transcryptómico y/o o proteómico que permita integrar la información bioquímica obtenida en el presente estudio y obtener un análisis global de los genes y proteínas involucrados en la respuesta a la limitación de nitrógeno y biosíntesis de lípidos.
- Realizar un análisis metabolómico para identificar nuevos metabolitos que se producen en respuesta a la limitación de nutrientes.
- Optimizar las condiciones de cultivo que permitan la obtención máxima de lípidos en la diatomea *C. muelleri* considerando fotoperiodos e integrando un monitoreo de la concentración de la cantidad de nitratos y fosfatos en el medio de cultivo durante la cinética de crecimiento.

IX. LITERATURA CITADA

- Alipanah, L., Rohloff, J., Winge, P., Bones, A. M., & Brembu, T. (2015). Whole-cell response to nitrogen deprivation in the diatom *P. tricornutum*. *Journal of experimental botany*, 66(20), 6281-6296.
- Allen, A. E., Vardi, A., & Bowler, C. (2006). An ecological and evolutionary context for integrated nitrogen metabolism and related signaling pathways in marine diatoms. *Current opinion in plant biology*, 9(3), 264-273.
- Ambati, R., Phang, S. M., Ravi, S., & Aswathanarayana, R. (2014). Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications-a review. *Marine drugs*, 12(1), 128-152.
- Andersen, R. A. (Ed.). (2005). *Algal culturing techniques*. Elsevier. USA. 578 p.
- Armbrust, E. V., Berges, J. A., Bowler, C., Green, B. R., Martinez, D., Putnam, N. H., Zhou, S., Allen A.E., Apt K.E., Bechner M., Brzezinski, M. A., Chaal B. K., Chiovitti, A., Davis, A. K., Demarest, M. S., Detter, J. C., Glavina, T., Goodstein, D., Hadi, M. Z., Hellsten, U., Hildebrand, M., Jenkins, B. D., Jurka, J., Kapitonov, V. V., Kröger, N., Lau, W. W. Y., Lane T. W. Larimer, F.W., Lippmeier J. C., Lucas, S., Medina, M., Montsant, A., Obornik, M., Parker, M. S., Palenik, B., Pazour, G. J., Richardson, P. M., Ryneerson, T. A., Saito, M. A., Schwartz D. C., Thamatrakoln, K., Valentin, K., Vardi A., Wilkerson F. P. & Rokhsar D. S. (2004). The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism. *Science*, 306(5693), 79-86.
- Arratia, J., & Aguirre, J. (2013). Los factores de transcripción tipo Myb, una familia de reguladores de la diferenciación celular conservada en los organismos eucariontes. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16(2), 98-108.
- Bai, X., Song, H., Lavoie, M., Zhu, K., Su, Y., Ye, H., Chen, S., Fu, Z., & Qian, H. (2016). Proteomic analyses bring new insights into the effect of a dark stress on lipid biosynthesis in *Phaeodactylum tricornutum*. *Scientific reports*, 6, 25494.
- Bahadar, A., & Khan, M. B. (2013). Progress in energy from microalgae: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 128-148.
- Bertozzini, E., Galluzzi, L., Ricci, F., Penna, A., & Magnani, M. (2013). Neutral lipid content and biomass production in *Skeletonema marinoi* (Bacillariophyceae) culture in response to nitrate limitation. *Applied biochemistry and biotechnology*, 170(7), 1624- 1636.
- Bellou, S., Baeshen, M. N., Elazzazy, A. M., Aggeli, D., Sayegh, F., & Aggelis, G. (2014). Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives. *Biotechnology*

advances, 32(8), 1476-1493

- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37(8), 911-917.
- Borowitzka, M. A. (2013). High-value products from microalgae-their development and commercialization. *Journal of applied phycology*, 25(3), 743-756.
- Bowler, C., Allen, A. E., Badger, J. H., Grimwood, J., Jabbari, K., Kuo, A., Maheswari, U., Martens, C., Maumus, F., Otilar, R.P., Rayko, E.(2008). The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature*, 456(7219), 239-2.
- Castillo, O. S., Torres-Badajoz, S. G., Nunez-Colin, C. A., Pena-Caballero, V., Herrera Mendez, C. H., & Rodriguez-Nunez, J. R. (2017). Biodiesel production from microalgae: progress and biotechnological prospects. *Hidrobiológica*, 27(3), 337-352.
- Chaisutyakorn, P., Praiboon, J., & Kaewsuralikhit, C. (2018). The effect of temperature on growth and lipid and fatty acid composition on marine microalgae used for biodiesel production. *Journal of applied phycology*, 30(1), 37-45.
- Chen, B., Wan, C., Mehmood, M. A., Chang, J. S., Bai, F., & Zhao, X. (2017). Manipulating environmental stresses and stress tolerance of microalgae for enhanced production of lipids and value-added products—a review. *Bioresource technology*, 244, 1198-1206.
- Chokshi, K., Pancha, I., Trivedi, K., George, B., Maurya, R., Ghosh, A., & Mishra, S. (2015). Biofuel potential of the newly isolated microalgae *Acutodesmus dimorphus* under temperature induced oxidative stress conditions. *Bioresource technology*, 180, 162- 171.
- Connolly, J. A., Oliver, M. J., Beaulieu, J. M., Knight, C. A., Tomanek, L., & Moline, M. A. (2008). Correlated evolution of genomw size and cell volume in diatoms (*Bacillariophyceae*). *Journal of Phycology*, 44(1), 124-131.
- Courchesne, N. M. D., Parisien, A., Wang, B., & Lan, C. Q. (2009). Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. *Journal of biotechnology*, 141(1-2), 31-41.
- Duan X. Salt-induced osmotic stress for lipid overproduction in batch culture of *Chlorella vulgaris*. *Afr J Biotechnol*. 2012;11:7072–8.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
- Du Z-Y, Benning C (2016) Triacylglycerol accumulation in photosynthetic cells in plants and algae. In: Nakamura Y, Li-Biesson Y (eds) *Lipids in plant and algae development*. Springer, Cham, pp 179–205
- El Ridi, R., & Das, U. N. (2018). Arachidonic acid in health and disease. *Journal of advanced*

research, 11, 1.

- Enamala, M. K., Enamala, S., Chavali, M., Donepudi, J., Yadavalli, R., Kolapalli, B., ... & Kuppam, C. (2018). Production of biofuels from microalgae-A review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 94, 49-68.
- Farid, R., Mutale-joan, C., Redouane, B., Najib, E. M., Abderahime, A., Laila, S., & Hicham, E. A. (2019). Effect of Microalgae Polysaccharides on Biochemical and Metabolomics Pathways Related to Plant Defense in *Solanum lycopersicum*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 188(1), 225-240.
- Fimbres-Olivarria, D., Carvajal-Millan, E., Lopez-Elias, J. A., Martinez-Robinson, K. G., Miranda-Baeza, A., Martinez-Cordova, L. R., Enríquez-Ocaña F., & Valdez-Holguin, J. E. (2018). Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharides from *Navicula* sp. *Food Hydrocolloids*, 75, 229-236.
- Gao, Y., Yang, M., & Wang, C. (2013). Nutrient deprivation enhances lipid content in marine microalgae. *Bioresource technology*, 147, 484-491.
- Gangl, D., Zedler, J. A., Rajakumar, P. D., Martinez, E. M. R., Riseley, A., Włodarczyk, A., Purton, S., Sakuragi, Y., Howe C.J., Jensen, P.E. & Robinson, C. (2015). Biotechnological exploitation of microalgae. *Journal of Experimental Botany*, 66(22), 6975-6990.
- Goncalves, E. C., Wilkie, A. C., Kirst, M., & Rathinasabapathi, B. (2016). Metabolic regulation of triacylglycerol accumulation in the green algae: identification of potential targets for engineering to improve oil yield. *Plant biotechnology journal*, 14(8), 1649-1660.
- Griffiths, M. J., van Hille, R. P., and Harrison, S. T. (2012). Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. *Journal of Applied Phycology*, 24(5), 989-1001.
- Guillard, R. R., & Ryther, J. H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian journal of microbiology*, 8(2), 229-239.
- Han, F., Pei, H., Hu, W., Han, L., Zhang, S., & Ma, G. (2016). Effect of high-temperature stress on microalgae at the end of the logarithmic phase for the efficient production of lipid. *Environmental technology*, 37(20), 2649-2657.
- Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de biología marina y oceanografía*, 49(2), 157-173.
- Hildebrand M (2005) Cloning and functional characterization of ammonium transporters from the marine diatom *Cylindrotheca fusiformis* (Bacillariophyceae). *J Phycology*. 41:105-113.
- Hockin, L., Mock, T., Mulholland, F., Kopriva, S., and Malin, G. (2012). The response of

- diatom central carbon metabolism to nitrogen starvation is different from that of green algae and higher plants. *Plant physiology*, 158(1), 299-312.
- Huang, X., von Rad, U., & Durner, J. (2002). Nitric oxide induces transcriptional activation of the nitric oxide-tolerant alternative oxidase in *Arabidopsis* suspension cells. *Planta*, 215(6), 914-923.
- Imam, S., Schauble, S., Valenzuela, J., López García de Lommana, A., Carter, W., Price, N.D., & Baliga, N.S. (2015). A refined genome-scale reconstruction of *Chlamydomonas* metabolism provides a platform for systems-level analyses. *Plant J.* 2015;84(6):1239–56. <https://doi.org/10.1111/tpj.13059>
- Imamura S., and Tanaka K. (2017) Nitrogen Metabolism. In: Kuroiwa T. et al. (eds) *Cyanidioschyzon merolae*. Springer, Singapore
- Jian, J., Zeng, D., Wei, W., Lin, H., Li, P., & Liu, W. (2017). The combination of RNA and protein profiling reveals the response to nitrogen depletion in *Thalassiosira pseudonana*. *Scientific reports*, 7(1), 8989.
- Johansen, J. R., & Rushforth, S. R. (1985). A contribution to the taxonomy of *Chaetoceros muelleri* Lemmermann (Bacillariophyceae) and related taxa. *Phycologia*, 24(4), 437-447.
- Kang, L. K., Tsui, F. H., & Chang, J. (2012). Quantification of diatom gene expression in the sea by selecting uniformly transcribed mRNA as the basis for normalization. *Applied Environmental Microbiology*. 78(17), 6051-6058.
- Kroth, P. (2007). Molecular biology and the biotechnological potential of diatoms. In *Transgenic Microalgae as Green Cell Factories* (pp. 23-33). Springer, New York, NY.
- Leu, S., & Boussiba, S. (2014). Advances in the production of high-value products by microalgae. *Industrial Biotechnology*, 10(3), 169-183.
- Levitan, O., Dinamarca, J., Zelzion, E., Lun, D. S., Guerra, L. T., Kim, M. K., Kim, J., Mooy, V., Bhattacharya D., & Falkowski, P. G. (2015). Remodeling of intermediate metabolism in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* under nitrogen stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(2), 412-417.
- Li-Beisson, Y., Nakamura, Y., & Harwood, J. (2016). Lipids: from chemical structures, biosynthesis, and analyses to industrial applications. In *Lipids in plant and algae development* (pp. 1-18). Springer, Cham.
- Liang, K., Zhang, Q., Gu, M., & Cong, W. (2013). Effect of phosphorus on lipid accumulation in freshwater microalga *Chlorella* sp. *Journal of Applied Phycology*, 25(1), 311-318.

- López, J.A., Ruiz, G., Estrada, L.A., Martínez, L.R., Martínez, M., Miranda, A., and Ramírez
- J.C. (2014). Evaluation of culture media limited in nitrogen and silicates on the production response and lipid content of the diatom *Chaetoceros muelleri*. *Research Journal of Biological Sciences*, 6(4), 145-149.
- López-Eliás, J. A., Dueñas, C. B., & Aldaz, N. H. (1995). Manual de técnicas analíticas aplicadas al cultivo de microalgas. *Publicaciones académicas CICTUS*, (5), 47.
- Liefer, J. D., Garg, A., Campbell, D. A., Irwin, A. J., & Finkel, Z. V. (2018). Nitrogen starvation induces distinct photosynthetic responses and recovery dynamics in diatoms and prasinophytes. *PloS one*, 13(4), e0195705.
- Lin, Q., Zhuo, W. H., Wang, X. W., Chen, C. P., Gao, Y. H., & Liang, J. R. (2018). Effects of fundamental nutrient stresses on the lipid accumulation profiles in two diatom species *Thalassiosira weissflogii* and *Chaetoceros muelleri*. *Bioprocess and biosystems engineering*, 41(8), 1213-1224.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193, 265-275.
- Muto, M., Kubota, C., Tanaka, M., Satoh, A., Matsumoto, M., Yoshino, T., & Tanaka, T. (2013). Identification and functional analysis of delta-9 desaturase, a key enzyme in PUFA synthesis, isolated from the oleaginous diatom *Fistulifera*. *PLoS One*, 8(9), e73507.
- Nascimento I.A., Marques S.S.I., Cabanelas I.T.D., Pereira S.A., Druzian J.I., de Souza C.O., Vich V.D., de Carvalho C.G., Nascimento M.A. (2013). Screening microalgae strains for biodiesel production: lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria. *Bioenergy Res* 2013;6:1–13.
- Ördög, V., Stirk, W. A., Bálint, P., Aremu, A. O., Okem, A., Lovász, C., Molnár Z. & van Staden, J. (2016). Effect of temperature and nitrogen concentration on lipid productivity and fatty acid composition in three *Chlorella* strains. *Algal research*, 16, 141-149.
- Pacheco, J. M., Cadena, M.A., Sánchez, M.P., Tovar, D. and Rangel, C. (2010). Effect of culture medium and nutrient concentration on fatty acid content of *Chaetoceros muelleri*. *Rev Latinoam Biotechnol Amb Algal*, 1(1), 6-15.
- Paliwal, C., Mitra, M., Bhayani, K., Bharadwaj, S. V., Ghosh, T., Dubey, S., & Mishra, S. (2017). Abiotic stresses as tools for metabolites in microalgae. *Bioresource Technology*, 244, 1216-1226.
- Pande, S. V., Khan, R. P., & Venkitasubramanian, T. A. (1963). Microdetermination of lipids and serum total fatty acids. *Analytical Biochemistry*, 6(5), 415-423.

- Park, J.J., Wang, H., Gargouri, M., Deshpande, R.R., Skepper, J.N., Holguin, F.O., Juergens, M.T., Shachar-Hill, Y., Hicks L.M., Gang D. R. (2015). The response of *Chlamydomonas reinhardtii* to nitrogen deprivation: a systems biology analysis. *Plant Journal*. 81, 611–624.
- Procházková, G., Brányiková, I., Zachleder, V., & Brányik, T. (2014). Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae. *Journal of applied phycology*, 26(3), 1359-1377.
- R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Reijnders, M. J., van Heck, R. G., Lam, C. M., Scaife, M. A., dos Santos, V. A. M., Smith, A. G., & Schaap, P. J. (2014). Green genes: bioinformatics and systems-biology innovations drive algal biotechnology. *Trends in biotechnology*, 32(12), 617-626.
- Ryckebosch, E., Muylaert, K., & Foubert, I. (2012). Optimization of an analytical procedure for extraction of lipids from microalgae. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89(2), 189-198.
- Ryckebosch, E., Bruneel, C., Termote-Verhalle, R., Goiris, K., Muylaert, K., & Foubert, I. (2014). Nutritional evaluation of microalgae oils rich in omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids as an alternative for fish oil. *Food Chemistry*, 160, 393- 400.
- Sajjadi, B., Chen, W. Y., Raman, A. A. A., & Ibrahim, S. (2018). Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 97, 200-232.
- Schubotz, F. (2019). Membrane Homeostasis upon Nutrient (C, N, P) Limitation. *Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes*, 823-847.
- Sing, S. F., Isdepsky, A., Borowitzka, M. A., & Moheimani, N. R. (2013). Production of biofuels from microalgae. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 18(1), 47- 72.
- Song, B., & Ward, B. B. (2007). Molecular cloning and characterization of high-affinity nitrate transporters in marine phytoplankton. *Journal of Phycology*, 43(3), 542-552.

- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed volume and optical density. En Stein. J. R. Handbook of Physiological Methods. Culture Methods and Growth Measurement. Cambridge University, Press. Cambridge. 448 p.
- Uribe, E., Vega-Gálvez, A., Heredia, V., Pastén, A., & Di Scala, K. (2018). An edible red seaweed (*Pyropia orbicularis*): influence of vacuum drying on physicochemical composition, bioactive compounds, antioxidant capacity, and pigments. *Journal of applied phycology*, 30(1), 673-683.
- Valenzuela, A., Sanhueza, J., & Valenzuela, R. (2015). Las microalgas: una fuente renovable para la obtención de ácidos grasos omega-3 de cadena larga para la nutrición humana y animal. *Revista chilena de nutrición*, 42(3), 306-310.
- Vega, M. P., Roa, A. C., Saavedra, P. S., Ramírez, D. T., and Dávalos, R. (2010). Effect of culture medium and nutrient concentration on fatty acid content of *Chaetoceros muelleri*. *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal*, 1(1), 6-15.
- Wang, X. W., Liang, J. R., Luo, C. S., Chen, C. P., & Gao, Y. H. (2014). Biomass, total lipid production, and fatty acid composition of the marine diatom *Chaetoceros muelleri* in response to different CO₂ levels. *Bioresource technology*, 161, 124-130.
- Yen, C. L. E., Stone, S. J., Koliwad, S., Harris, C., & Farese, R. V. (2008). Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *Journal of lipid research*, 49(11), 2283-2301.

X. ANEXOS

Anexo I. Soluciones madre para preparar el medio de cultivo f/2.

Para preparar un litro de medio, agregar 1 mL de cada una de las soluciones 1, 2.2 y 3.2 a 1 litro de agua de mar filtrada. (Guillard y Ryther, 1962).

Constituyentes	Cantidad
1. Nutrientes mayores	g/L de agua destilada
1.1. Nitrato de sodio, granulado y refinado	75
1.2. Fosfato de sodio monobásico	5
1.3. Silicato de sodio metasoluble	30
2. Metales traza	g/100 mL de agua destilada
2.1. <u>Solución primaria</u>	
2.1.1. Sulfato cúprico, cristales finos	0.98
2.1.2. Sulfato de zinc, cristales finos	2.2
2.1.3. Cloruro de cobalto, cristales finos	1.0
2.1.4. Cloruro manganoso, cristales finos	18.0
2.1.5. Molibdato de sodio, cristales finos	0.63
2.2. <u>Solución secundaria</u>	g/L de agua destilada
2.2.1. Cloruro férrico	3.15
2.2.2. EDTA disódico	4.36
2.2.3. Metales traza o alternativamente	1 mL de c/u de las sol. 2.1.1. a 2.1.5.
2.2.1. EDTA férrico	5.0
2.2.2. Metales traza	1 mL de c/u de las sol. 2.1.1. a 2.1.5.
3. Vitaminas	
3.1. <u>Solución primaria</u>	g/L de agua destilada
3.1.1. Biotina cristalizada	0.1
3.1.2. Cianocobalamina	1.0
3.2. <u>Solución secundaria</u>	Cantidad en 100 mL de agua destilada
3.2.1. Biotina	1 mL de la sol. 3.1.1
3.2.2. Cianocobalamina (B12)	1 mL de la sol. 3.1.2
3.2.3. Tiamina clorhídrica (B1)	20 mg

Anexo 2. Soluciones para la determinación de proteínas

Las soluciones involucradas en la determinación de proteínas se listan a continuación (López-Elías *et al.*, 1995).

Solucion A.

Carbonato de sodio al 2% en hidróxido de sodio 0.1 N

Solución B1.

Sulfato de cobre pentahidratado al 5 % en agua destilada

Solución B2.

Tartrato de sodio y potasio al 1% en agua destilada.

Solución C.

Mezclar 100 mL de la solución A, 1 mL de solución B1 y 1 mL de solución B2

Solución D.

Mezclar 1 volumen de reactivo Folin-CioCalteu comercial y 1 volumen de agua destilada.

NOTAS:

Las soluciones A, B1 y B2, se conservan en refrigeración hasta por 2 meses Las soluciones C y D se preparan en el momento de usarse.