



SECRETARÍA DE EDUCACION PÚBLICA  
TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO  
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE BOCA DEL RÍO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

"MEJORAMIENTO DE LA COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE MICROALGAS CON  
POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO PARA SU APROVECHAMIENTO  
EN LA ACUACULTURA"  
TESIS

QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN ACUACULTURA

PRESENTA

JOSÉ ÁNGEL VALENCIA MOLINA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. IGNACIO ALEJANDRO PÉREZ LEGASPI

CO-DIRECTOR

DR. LUIS ALFREDO ORTEGA CLEMENTE

ASESOR

DRA. MARÍA DE LA LUZ MERINO CONTRERAS

OCTUBRE DEL 2023

BOCA DEL RÍO, VERACRUZ.





Boca del Río, Ver **22/SEPTIEMBRE/2023**

ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

**JOSÉ ÁNGEL VALENCIA MOLINA  
PASANTE DEL PROGRAMA MAESTRÍA EN  
CIENCIAS EN ACUACULTURA  
PRESENTE**

De acuerdo con el fallo emitido por los integrantes del Comité Revisor de la TESIS PARA OBTENCIÓN DE GRADO, desarrollada por usted cuyo título es:

“MEJORAMIENTO DE LA COMPOSICION BIOQUIMICA DE MICROALGAS CON POTENCIAL BIOTECNOLOGICO PARA SU APROVECHAMIENTO EN LA ACUACULTURA”

Esta División de Estudios de Posgrado e Investigación le concede AUTORIZACIÓN para que proceda a su impresión.

ATENTAMENTE

*Excelencia en Educación Tecnológica®  
Por nuestros mares responderemos*

DR. JUAN DAVID GARAY MARIN  
JEFE DE LA DIVISION DE  
ESTUDIOS DE POSGRADO E  
INVESTIGACIÓN



c.c.p. Coordinación del Programa MCA  
c.c.p. Expediente



**LICENCIA DE USO OTORGADA POR** *José Ángel Valencia Molina*, de nacionalidad mexicana mayor de edad, con domicilio ubicado en Boca Del Río, Col. El Morro, Morelos 3, en mi calidad de titular de los derechos patrimoniales y morales y autor de la tesis denominada Mejoramiento de la composición bioquímica de microalgas con potencial biotecnológico para su aprovechamiento en la acuacultura en adelante “**LA OBRA**” quien para todos los fines del presente documento se denominará “**EL AUTOR Y/O EL TITULAR**”, a favor del Instituto Tecnológico de Boca Del Río perteneciente al Tecnológico Nacional de México, la cual se registrá por las clausulas siguientes:

**PRIMERA –OBJETO:** “**EL AUTOR Y/O TITULAR**”, mediante el presente documento otorga al Instituto Tecnológico de Boca Del Río del Tecnológico Nacional de México, licencia de uso gratuita e indefinida respecto de “**LA OBRA**”, para almacenar, preservar, publicar, reproducir y/o divulgar la misma, con fines académicos, por cualquier medio en forma física y a través del repositorio institucional y del repositorio nacional, éste último consultable en la página: (<https://www.repositorionacionalcti.mx/>).

**SEGUNDA - TERRITORIO:** La presente licencia se otorga, de manera no exclusiva, sin limitación geográfica o territorial alguna, de manera gratuita e indefinida.

**TERCERA -ALCANCE:** La presente licencia contempla la autorización para formato uso de “LA OBRA” en cualquier formato o soporte material y se extiende a la utilización, de manera enunciativa más no limitativa a los siguientes medios: óptico, magnético, electrónico, virtual (red), mensaje de datos o similar conocido por conocerse. En medio óptico, magnético, electrónico, en red, mensajes de datos o similar, conocido o por conocerse.

**CUARTA – EXCLUSIVIDAD:** La presente licencia de uso aquí establecida no implica exclusividad en favor del Instituto Tecnológico de Boca Del Río ; por lo tanto, “**EL AUTOR Y/O TITULAR**” conserva los derechos patrimoniales y morales de “**LA OBRA**”, objeto del presente documento.

**QUINTA – CRÉDITOS:** El Instituto Tecnológico de Boca Del Río y/o el Tecnológico Nacional de México reconoce que el “**AUTOR Y/O TITULAR**” es el único, primigenio y perpetuo titular de los derechos morales sobre “**LA OBRA**”; por lo tanto, siempre deberá otorgarle los créditos correspondientes por la autoría de la misma.

**SEXTA – AUTORÍA:** “**EL AUTOR Y/O TITULAR**” manifiesta ser el único titular de los derechos de autor que derivan de “**LA OBRA**” y declara que el material objeto del presente fue realizado por él, sin violentar o usurpar derechos de propiedad intelectual de terceros; por lo tanto, en caso de controversia sobre los mismos, se obliga a ser el único responsable. Dado en la Ciudad de Boca Del Río, a los 20 días del mes de Octubre de 2023.

“**EL AUTOR Y/O TITULAR**”

“**EL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE Boca Del Río**”



José Angel Valencia Molina

---



**ACTA DE REVISIÓN DE TESIS**

**Número Registro: AC5-20-100122**

En la ciudad de Boca del Río, Ver., siendo las 10:00 horas del día 16 del mes de octubre de 2023 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Consejo del Posgrado de la Maestría en Ciencias en Acuicultura del ITBOCA, para examinar la Tesis de Grado titulada:

**"MEJORAMIENTO DE LA COMPOSICION BIOQUIMICA DE MICROALGAS CON POTENCIAL BIOTECNOLOGICO PARA SU APROVECHAMIENTO EN LA ACUACULTURA"**

Que presenta el (la) alumno(a):

**José Ángel Valencia Molina**

Aspirante al Grado de:  
**Maestro en Ciencias en Acuicultura**

Después de escuchar las opiniones sobre el documento escrito e intercambiar puntos de vista, los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes para su defensa ante el jurado correspondiente.

**LA COMISIÓN REVISORA:**

  
DR. IGNACIO ALEJANDRO PEREZ LEGASPI  
Director

  
DR. LUIS ALFREDO ORTEGA CLEMENTE  
Co-Director

  
DRA. MARIA DE LA LUZ MERINO CONTRERAS  
Asesor

  
DRA. VERONICA VALADEZ ROCHA  
Asesor



## Carta de originalidad y no plagio

El (La) que suscribe José Ángel Valencia Molina, alumno(a) de la Maestría en Ciencias en Acuicultura, de la División de Estudios Posgrado e Investigación, del Instituto Tecnológico de Boca del Río y autor(a) de la tesis o titulada: "Mejoramiento de la composición bioquímica de microalgas con potencial biotecnológico para su aprovechamiento en la acuicultura",

Declaro que:

1. La tesis que presento ante la Maestría en Ciencias en Acuicultura, para lo obtención del grado de Maestro (a) en Ciencias es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autorial y/o fuente correspondiente.
3. La tesis ha sido revisada con la herramienta TURNITIN para certificar que no constituye un plagio, el reporte de Similitud del documento es del 26 % de coincidencia.
4. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad al Instituto Tecnológico de Boca del Río y al TNM, de cualquier demanda o reclamación, que llegara a formular alguna persona física o moral, que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de Boca del Río, a los 18 días de del mes de Octubre del 2023.

Atentamente

José Angel Valencia Molina

Nombre y firma del estudiante

Vo.Bo.

Dr. Ignacio Alejandro Pérez Legaspi

Director de tesis

## RESUMEN

Las microalgas son esenciales como alimento vivo para las primeras fases de desarrollo en la mayoría de moluscos, crustáceos y peces en cultivo; debido a su tamaño, fácil manejo y calidad nutricional, también presentan la capacidad de producir biomoléculas de alto valor como pigmentos y ácidos grasos esenciales. *Scenedesmus obliquus* es una microalga rica en lípidos y proteínas con alto contenido de lisina, *Phaeodactylum tricornutum* es rica en ácidos grasos como ácido Eicosapentanoico y ácido Docosahexaenoico además de pigmentos como fucoxantina. El objetivo fue evaluar el efecto de las condiciones de cultivo y del estrés en las microalgas mencionadas para su mejoramiento en la composición bioquímica y su aprovechamiento biotecnológico. En este estudio se evaluaron las fases de crecimiento (cel/ml) así como la biomasa (peso seco) y composición bioquímica (proteínas, carbohidratos, pigmentos, inhibición antioxidante, lípidos totales y ácidos grasos) de las microalgas *S. obliquus* y *P. tricornutum* (0, 3 y 30 ups) en fase logarítmica y estacionara, en condiciones controladas de laboratorio. Posteriormente, se aplicaron condiciones de estrés a las microalgas mediante tres tratamientos en las dos fases de crecimiento: 1) sin nutrientes (2 klx), 2) sin nutrientes más alta irradiansa (14 klx) y 3) con nutrientes y alta irradiansa (14 klx). Se tomaron muestras a las 72 h de exposición y se realizó el análisis de su composición bioquímica. Los datos se procesaron mediante análisis multivariado de una vía (ANOVA) y pruebas de comparación múltiple de Tukey ( $p < 0.05$ ). Los resultados muestran diferencias significativas entre los tratamientos con respecto al control, en *S. obliquus* se obtuvo hasta 3 veces más lípidos totales en los tratamientos, de proteínas 14.8% en el tratamiento 1 en fase log con diferencias significativas con T3, en carbohidratos un 23% en el tratamiento 2 en fase estacionaria, los pigmentos mas altos se encontraron en el control y capacidad antioxidante un 40% en el control en fase est con diferencias significativas con el tratamiento T1; mientras que en *P. tricornutum* el doble de lípidos totales se registró en los tratamientos 1 y 2 con respecto al control, un 21% de proteínas en fase log a 0 ups y un 25% de carbohidratos en la fase log a 30 ups, los pigmentos más altos se encontraron en el control, en el tratamiento 3 a 30 ups se registro hasta un 80% de inhibición antioxidante. Los cambios metabólicos presentes en las células

microalgales fueron controlados a partir de factores físicos y nutricionales durante su cultivo, con lo cual se cumple el objetivo de este estudio al generar un cambio en la composición bioquímica de ambas microalgas para su posible aplicación en acuicultura, nutraceútica o biorrefinerías.

**Palabras clave:** acuicultura, cultivo, alimento vivo, optimización, microalgas

## ABSTRACT

Microalgae are essential as live food for the early stages of development in most molluscs, crustaceans and fish in culture; Due to their size, easy handling and nutritional quality, they also have the ability to produce high-value biomolecules how pigments and essential fatty acids. *Scenedesmus obliquus* is a microalgae rich in lipids and proteins with high lysine content, *Phaeodactylum tricornutum* is rich in fatty acids such as Eicosapentaenoic acid and Docosahexaenoic acid, in addition to pigments such as fucoxanthin. The objective was to evaluate the effect of the cultivation conditions and stress on the microalgae mentioned for their improvement in the biochemical composition and their biotechnological use. In this study, the growth phases (cell/ml) as well as the biomass (dry weight) and biochemical composition (proteins, carbohydrates, pigments, antioxidant inhibition, total lipids and fatty acids) of the microalgae *S. obliquus* and *P. tricornutum* (0, 3 and 30 psu) in logarithmic and stationary phase were evaluated under controlled laboratory conditions. Subsequently, stress conditions were applied to the microalgae by three treatments in the two growth phases: 1) without nutrients (2klx), 2) without nutrients plus high irradiance (14klx) and 3) with nutrients and high irradiance (14klx). Samples were taken at 72 h of exposure and analysis of their biochemical composition was performed. Data were processed using multivariate one-way analysis (ANOVA) and Tukey's multiple comparison tests ( $p < 0.05$ ). The results show significant differences between the treatments with respect to the control, in *S. obliquus* was obtained up to 3 times more total lipids in the treatments, of proteins 14.8% in the treatment 1 in log phase with significant differences with T3, in carbohydrates 23% in treatment 2 in log phase, the highest pigments were found in the control and antioxidant capacity 40% in the control phase est with significant differences with T1 treatment; while in *P. tricornutum* twice the total lipids were recorded in treatments 1 and 2 with respect to the control, 21% of proteins in phase Log at 0 psu and 25% of carbohydrates in the phase log at 30 psu, the highest pigments were found in the control, in treatment 3 to 30 psu was recorded up to 80% antioxidant inhibition. The metabolic changes present in the microalgal cells were controlled from physical and nutritional factors during their cultivation, which fulfills

the objective of this study by generating a change in the biochemical composition of both microalgae for their possible application in aquaculture, nutraceuticals or biorefineries.

Keywords: aquaculture, cultivation, live feed, optimization, microalgae

## AGRADECIMIENTOS

A Dios quien provee de espacio, razón y tiempo a toda la existencia.

De manera general a todas las personas que han colaborado en mi formación académica, profesional y personal, legándome sus conocimientos y saberes, a mis padres y hermanos por darme el tiempo y el espacio para realizar las actividades necesarias en la labor de todo estudiante, a mis amigos por su comprensión, escucha y consejos, al Instituto Tecnológico de Boca del Río, A CONAHCYT por la beca de manutención durante la maestría a nombre de José A. Valencia M. No. 805282, a mis maestros y profesores por su paciencia, esmero y dedicación a la enseñanza con la cual han legado y dado forma a gran parte de los conocimientos que conforman mi saber académico y profesional.

Al Dr. Alejandro por la confianza, apoyo y guía constante en esta ardua labor que implica la investigación e influir en la búsqueda de la mejora que es la excelencia, por darme un espacio donde llevar a cabo gran parte de este proyecto al igual por la enseñanza para trazar los primeros trazos que nos guiaron a la infraestructura, esencia y posteriormente materialización de lo que es este proyecto, muchas gracias Dr.

Al M. en C. Eugenio por mostrarme y enseñarme los métodos y la forma correcta de utilizar los instrumentos además de prestar consejo ante tantas dudas que surgen en la experimentación, procesamiento de datos e investigación muchas gracias profe.

Al Dr. Alfredo por el conocimiento, consejos y equipo prestado para dar forma a este proyecto y llevarlo a cabo.

A la Dra. Marilú por la paciencia, escucha y apoyo prestado a lo largo de este proyecto, el cual afortunadamente ha sido concretado.

A la Dra. Verónica por las observaciones y consejos, muchas gracias Dra.

A la Dra. Isabel por escucharnos y apoyarnos en nuestros proyectos y mostrarnos tantos aspectos de la sanidad acuícola.

A la Dra. Paty por las clases de nutrición y las observaciones prestadas en los seminarios.

Al Dr. Carlos Iván por las clases de Introducción a la Acuicultura, por ser mi tutor a lo largo de la maestría y las observaciones prestadas en los seminarios.

Al Dr. Carlos Alfonso por la clase de Bíoquímica enzimática y el apoyo prestado en el transcurso de la maestría.

Al Dr. Curiel por las clases de cultivo de Moluscos.

A mis queridos compañeros de laboratorio por la convivencia, consejos y apoyo moral prestado. A mis compañeros de maestría por la amistad, pláticas y confianza prestada a lo largo de la maestría.

## CONTENIDO (ÍNDICE)

|  | Pág. |
|--|------|
| RESUMEN .....  | i    |
| ABSTRACT .....   | iii  |
| AGRADECIMIENTOS .....                                      | v    |
| ÍNDICE DE TABLAS .....                                     | x    |
| ÍNDICE DE FIGURAS .....                                    | xi   |
| 1.-Introducción .....                                      | 1    |
| 1.1 Acuicultura .....                                      | 1    |
| 1.2 Generalidades e importancia del Alimento vivo .....    | 1    |
| 1.3 Importancia del alimento vivo.....                     | 2    |
| 1.4 Tipos de alimento vivo .....                           | 2    |
| 1.5 Microalgas.....  | 3    |
| 1.6 Importancia de las microalgas en la acuicultura .....  | 4    |
| 2. Antecedentes .....                                      | 5    |
| 2.1 Microalgas.....  | 5    |
| 2.1.1 Descripción e información general.....               | 5    |
| 2.2 Biología .....   | 6    |
| 2.3 Técnicas de cultivo .....                              | 7    |
| 2.4 Medios de cultivo .....                                | 8    |
| 2.5 Componentes benéficos de las microalgas.....           | 10   |
| 2.5.1 <i>Scenedesmus obliquus</i> .....                    | 11   |
| 2.5.2 <i>Phaeodactylum tricornutum</i> .....               | 14   |
| 2.6 Efectos de las condiciones de estrés.....              | 16   |
| 3. Justificación.....                                      | 26   |
| 4. Hipótesis .....   | 26   |
| 5. Objetivos .....   | 28   |
| 5.1 Objetivo General .....                                 | 28   |
| 5.2 Objetivos específicos .....                            | 28   |
| 6. Materiales y métodos .....                              | 29   |
| 6.1 Lugar donde se realizará el estudio .....              | 29   |
| 6.2 Cultivo de microalgas en condiciones controladas. .... | 30   |

|   |    |
|---|----|
| 6.2.1 Condiciones normales de cultivo para microalgas y posterior selección por su crecimiento y biomasa.....   | 30 |
| 6.2.2 Recuento celular.....   | 31 |
| 6.2.3 Determinación de Peso seco .....  | 32 |
| 6.3 Determinación de composición bioquímica .....   | 34 |
| 6.3.1 Determinación de Proteínas.....   | 34 |
| 6.3.2 Determinación de Carbohidratos por el Metodo ácido sulfúrico-UV .....   | 35 |
| 6.3.3 Determinación de Lípidos.....   | 36 |
| 6.3.4 Método de sulfo-fosfovainillina para determinación de lípidos saturados e insaturados .....   | 37 |
| 6.3.5 Determinación de ácidos grasos .....  | 38 |
| 6.3.6 Determinación de pigmentos, clorofilas (Jeffrey y Humphey, 1975), carotenoides totales (Anderson <i>et al.</i> , 2006) y fucoxantinas (Motten, 2004)..... | 38 |
| 6.3.7 Capacidad de inhibición antioxidante por el metodo de Zahin et al., (2013)  | 40 |
| 6.4 Análisis estadístico de resultados .....  | 40 |
| 6.5 Condiciones de cultivo estresantes.....   | 41 |
| 6.6 Diseño Experimental.....  | 41 |
| 7.Resultados .....  | 43 |
| 7.1 Curvas de crecimiento evaluadas para la selección de cepas y medio de cultivo.....  | 43 |
| 7.2 <i>Scenedesmus obliquus</i> .....   | 47 |
| 7.2.1 Curva de crecimiento .....  | 47 |
| 7.2.2 Peso Seco.....  | 48 |
| 7.2.3 Contenido de proteínas.....   | 49 |
| 7.2.4 Contenido de carbohidratos .....  | 49 |
| 7.2.5 Contenido de lípidos totales.....   | 50 |
| 7.2.6 Contenido de lípidos Insaturados.....   | 50 |
| 7.2.7 Contenido de ácidos grasos ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) .....  | 51 |
| 7.2.8 Contenido de pigmentos $\mu\text{g}/\text{mL}$ .....  | 52 |
| 7.2.9 Capacidad de Inhibición antioxidante .....  | 53 |
| 7.3 <i>Phaeodactylum tricorutum</i> .....   | 54 |
| 7.3.1 Curvas de crecimiento .....   | 54 |
| 7.3.2 Peso seco .....   | 56 |

|  |     |
|--|-----|
| 7.3.3 Contenido de proteínas (%) .....                           | 57  |
| 7.3.4 Contenido de carbohidratos (%) .....                       | 58  |
| 7.3.5 Contenido de lípidos totales (%) .....                     | 58  |
| 7.3.6 Contenido de lípidos Insaturados.....                      | 59  |
| 7.3.7 Contenido de ácidos grasos.....                            | 60  |
| 7.3.8 Pigmentos totales (µg/mL) .....                            | 62  |
| 7.3.9 Contenido de capacidad de inhibición antioxidante (%)..... | 64  |
| 9. Discusión.....  | 65  |
| 10. Conclusiones.....  | 73  |
| 11. Literatura citada.....                                       | 74  |
| 12. Anexo .....  | 107 |
| Anexo (1).....   | 107 |
| Anexo (2) .....  | 108 |
| Anexo (3) .....  | 109 |
| Anexo (4) .....  | 110 |

## ÍNDICE DE TABLAS

| Tabla  | Página |
|--|--------|
| Tabla 1. Condiciones generales para cultivo de microalgas .....  | 8      |
| Tabla 2. Medio Guillard f/2 .....  | 9      |
| Tabla 3. Medio Basald Bold.....  | 9      |
| Tabla 4. Componentes beneficios de las microalgas . .....  | 10     |
| Tabla 5. Antecedentes de microalgas sometidas a diferentes condiciones de estrés .....   | 19     |
| Tabla 6. Contenido total de peso seco (g/L) en <i>S. obliquus</i> en dos fases de cultivo .....  | 48     |
| Tabla 7. Contenido total de ácidos grasos en <i>S. obliquus</i> en dos fases de crecimiento .....  | 51     |
| Tabla 8. Contenido total de peso seco en <i>P. tricornutum</i> a 0, 3 y 30 ups en dos fases de cultivo.....  | 56     |
| Tabla 9. Contenido de cada ac. graso encontrado en muestras de lípidos totales de <i>P. tricornutum</i> a 0, 3 y 30 partes de salinidad en fase logarítmica y estacionaria ..... | 60     |
| A. 1. Curva de calibración para la determinación de proteínas .....  | 107    |
| A. 2. Curva de calibración de carbohidratos con Glucosa anhidra .....  | 108    |
| A. 3. Curva de calibración determinación de Inhibición antioxidante con ABT'S.....   | 109    |
| A. 4. Curva de calibración para determinación de lípidos por sulfosfosvainillina.....  | 110    |

## ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura |   | Página |
|--------|---|--------|
|        | Figura 1. Componentes benéficos de <i>S. obliquus</i> y su morfología a 400x .....  | 12     |
|        | Figura 2. Componentes benéficos de <i>P. tricornutum</i> y su morfología a 400x. 15   | 15     |
|        | Figura 3. Fotografía de la primera entrada al ITBOCA .....  | 29     |
|        | Figura 4 Imagen satelital del ITBOCA e instalaciones .....  | 29     |
|        | Figura 5. Diagrama representativo de la curva de crecimiento.....   | 32     |
|        | Figura 6. Modelo Experimental y análisis bioquímico.....  | 41     |
|        | Figura 7. Curva de crecimiento entre medio guillard f/2 y medio Basal Bold<br><i>D. salina</i> .....  | 43     |
|        | Figura 8. Curva de crecimiento entre medio guillard f/2 y medio Basal Bold<br><i>D. tertiolecta</i> .....   | 43     |
|        | Figura 9. Curva de crecimiento entre medio guillard f/2 y medio Basal Bold<br><i>Tetraselmis s.</i> .....   | 44     |
|        | Figura 10. Curva de crecimiento entre medio guillard f/2 y medio Basal Bold<br><i>P. tricornutum</i> 30 ups .....   | 44     |
|        | Figura 11. Curva de crecimiento entre medio guillard f/2 y medio Basal old<br><i>P. tricornutum</i> 3 ups.....  | 45     |
|        | Figura 12. Curva de crecimiento entre medio guillard f/2 y medio Basal old<br><i>P. tricornutum</i> 0 ups.....  | 45     |
|        | Figura 13. Curva de crecimiento entre medio guillard f/2 y medio Basal Bold<br>en <i>S. obliquus</i> .....  | 46     |
|        | Figura 14. Curva de crecimiento entre medio guillard f/2 y medio Basal Bold<br>en <i>C. sorokiniana</i> . .....   | 46     |
|        | Figura 15. <i>S. obliquus</i> Curva de Crecimiento y aplicación de Tratamientos en<br>fase Log y Est.....   | 47     |
|        | Figura 16. Contenido total de proteínas en <i>S. obliquus</i> comparándose las<br>condiciones control con los tratamientos en ambas fases de cultivo.. ....                     | 49     |
|        | Figura 17. Contenido total de carbohidratos en <i>S. obliquus</i> en condiciones<br>control y los tratamientos con diferencias significativas entre fases de<br>cultivo.. ..... | 49     |
|        | Figura 18. Lípidos totales en <i>S. obliquus</i> en condiciones normales y tres<br>tratamientos encontrándose diferencias significativas en cada fase de<br>cultivo.. .....     | 50     |

|  |    |
|--|----|
| Figura 19. Contenido de lípidos insaturados por el método de sulfosfosvainillina en <i>S. obliquus</i> bajo condiciones control y tratamientos en dos fases de cultivo con diferencias significativas..... | 50 |
| Figura 20. Clorofilas totales en <i>S. obliquus</i> en condiciones control y tratamientos en dos fases de cultivo con diferencias significativas. ....   | 52 |
| Figura 21. Carotenos y fucoxantinas totales de <i>S. obliquus</i> en condiciones control, tratamientos en dos fases de cultivo con diferencias significativas. ....  | 52 |
| Figura 22. Capacidad total de inhibición antioxidante en <i>S. obliquus</i> en condición control y tratamientos en dos fases de cultivo con diferencias significativas. ....                               | 53 |
| Figura 23. Curva de crecimiento <i>P. tricornutum</i> (0 ups ) en condiciones control definiendo las fases de cultivo para la aplicación de tratamientos.. ....  | 54 |
| Figura 24. <i>P. tricornutum</i> (3 ups) en condiciones control definiendo las fases de cultivo para la aplicación de los tratamientos.. ....  | 55 |
| Figura 25. <i>P. tricornutum</i> (30 ups) Curva de crecimiento en condiciones control seleccionando las fases de cultivo donde se aplicaran los tratamientos.....  | 55 |
| Figura 26. Contenido de proteínas Totales en <i>P. tricornutum</i> (0,3 y 30 ups) en dos fases de cultivo con diferencias significativas .....   | 57 |
| Figura 27. Carbohidratos totales en <i>P. tricornutum</i> (0,3 y 30 ups) en dos fases de cultivo con diferencias significativas.....   | 58 |
| Figura 28. Lípidos totales en <i>P. tricornutum</i> (0,3 y 30 ups) en condiciones control y tratamiento en diferentes fases de cultivo con diferencias significativas.....                                 | 58 |
| Figura 29. Determinación de lípidos insaturados por el método de sulfosfosvainillina en <i>P. tricornutum</i> (0,3 y 30 ups) bajo condiciones control y tratamientos en dos fases de cultivo. ....         | 59 |
| Figura 30. Clorofila a en <i>P. tricornutum</i> (0,3 y 30 ups) en condiciones control y tratamientos en dos fases de cultivo con diferencias significativas. ....  | 62 |
| Figura 31. Contenido total de clorofila b en <i>P. tricornutum</i> (0,3 y 30 ups) en condiciones control y tratamientos en dos fases de cultivo con diferencias significativas. ....                       | 62 |
| Figura 32. Contenido total de clorofila c en <i>P. tricornutum</i> (0,3 y 30 ups) bajo condiciones control y tratamientos en dos fases de cultivo con diferencias significativas. ....                     | 63 |

|  |     |
|--|-----|
| Figura 33. Contenido de carotenos totales en <i>P. tricornutum</i> (0,3 y 30 ups) bajo condiciones control y tratamientos en dos fases de cultivo con diferencias significativas. ....           | 63  |
| Figura 34. Contenido total de fucoxantina en <i>P. tricornutum</i> (0,3 y 30 ups) bajo condiciones control y tratamientos en dos fases de cultivo con diferencias significativas.....            | 64  |
| Figura 35. Capacidad de inhibición antioxidante en <i>P. tricornutum</i> (0,3 y 30 ups) en condiciones control y tratamientos en distintas fases de cultivo con diferencias significativas. .... | 64  |
| Figura 36. Curva de Calibración proteínas .....  | 108 |
| Figura 37. Curva de calibración carbohidratos .....  | 109 |
| Figura 38 Curva de calibración Inhib Antioxidante.....   | 110 |
| Figura 39. Curva de calibración para lípidos totales .....   | 111 |

## **1. Introducción**

### **1.1 Acuicultura**

La Acuicultura consiste en la producción de cualquier ser vivo en el medio acuático, es un sector productivo primario paralelo a la agricultura y ganadería, presenta el mayor crecimiento en desarrollo de los últimos 10 años incluyendo a la electrónica y a la cibernética (Platas y Vilaboa, 2014). A la acuicultura también se le denomina Acuicultura, dentro de sus actividades se adaptan las presas, lagos y lagunas en lugares viables para el uso de los recursos naturales acuáticos. Dentro de las especies acuáticas que se incluyen están cuatro categorías: algas, moluscos, crustáceos y peces (FAO, 2003). La acuicultura contribuye al crecimiento y estabilidad del sistema alimentario (Msangi et al., 2013; FAO, 2016), conservación de especies acuáticas (OESA - Fundación Biodiversidad., 2018), incremento de niveles de nutrición, disminución de impactos ambientales (FAO, 2018), manufactura de materias primas de uso industrial y farmacéutico (Iñarra *et al.*, 2018), fomento del autoempleo y erradicación de la pobreza (Cuéllar-Lugo *et al.*, 2018: Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2019).

### **1.2 Generalidades e importancia del Alimento vivo**

Un aspecto de gran importancia en la acuicultura es la nutrición (Luna-Figueroa, 2007), pero con frecuencia se observa que los alimentos no contienen los nutrientes que las especies requieren para su óptimo crecimiento, principalmente en su primera etapa de vida, que es la crítica, debido a que es en la cual se presenta la mayor mortalidad (Muñoz-Gutiérrez, 2006). Dicho periodo crítico en la larvicultura de peces es el inicio de la alimentación exógena posterior a la absorción del saco vitelino (Luna-Figueroa et al., 2010), por lo que el alimento vivo es esencial para el crecimiento y la sobrevivencia (Coman y Connolly., 2003). El alimento vivo tiene cualidades que no tiene un alimento inerte, como es el movimiento, color, calidad nutritiva, además de tener propiedades que no afectan la calidad del agua (Castro et al., 2003). Otras características importantes del alimento vivo son sus propiedades

atractantes, que actúan como estimulantes de la actividad alimenticia (Kolkovski et al., 1997) y su composición nutricional (Aragão et al., 2004; David-Ruales et al., 2018).

### **1.3 Importancia del alimento vivo**

Desde hace ya varias décadas, la importancia del alimento natural ha sido documentada. Diferentes autores han encontrado que la biota generada en estanques acuícolas puede aportar hasta el 70-77% de los requerimientos nutricionales de los organismos en cultivo (Martínez et al., 2008).

Entre mayor es la intensificación del cultivo, menor será la contribución del alimento natural, pero esta contribución no debería ser menor del 25%. Varios trabajos indican que el alimento natural no solamente es importante por la cantidad de biomasa que puede aportar, sino además por el aporte de ciertos elementos que por alguna razón no están presentes en el alimento formulado; también, algunos nutrientes del alimento formulado se desnaturalizan con los procesos realizados para su fabricación (Martínez et al., 2010).

El consumo del alimento vivo es mejor debido a que induce estímulos visuales y químicos, las enzimas presentes en los organismos vivos contribuyen a la digestión del alimento cuando son consumidos por las larvas de peces, existen diferencias en la digestibilidad entre los alimentos vivos y artificiales, las cuales son usualmente atribuidas a las diferencias en la digestibilidad de proteína (García, 2000; Prieto et al., 2006). Además, mediante su enriquecimiento es posible hacer llegar nutrientes esenciales a los organismos cultivados como son ácidos grasos para el desarrollo larvario de peces (Rivera y Botero, 2009).

### **1.4 Tipos de alimento vivo**

Existe una diversidad de organismos que reúnen las características apropiadas para utilizarse en la alimentación de peces, por ejemplo: Artemia (*Artemia franciscana*) (García, 2000), microgusano (*Panagrellus redivivus*), pulga de agua (*Daphnia pulex* y *Moina wierzejski*), gusano de fango (*Tubifex tubifex*), lombriz de tierra (*Eisenia*

*foetida*), gusano blanco (*Enchytraeus albidus*), gusano de sangre (*Chironomus tentans*), diferentes especies de microalgas, gusano de harina (*Tenebrio molitor*) y pre-adultos de mosquito (*Culex pipiens* y *C. stigmatosoma*) (Luna, 2009; Luna y Arce, 2017), rotíferos (*Branchionus californicus*: *B. plicatilis*) (Torres-Valencia et al., 2017; Huanacuni y Espinoza, 2018) y copepodos (*Pseudodiaptomus euryhalinus* y *Tisbe monozota*) con perspectivas para su uso a futuro aunque todavía se está estandarizando su producción a gran escala (Puella-Cruz et al., 2011).

## 1.5 Microalgas

Las microalgas y las cianobacterias son microorganismos unicelulares que tienen la capacidad de realizar la fotosíntesis. Esto es, son capaces de generar biomasa orgánica a partir de CO<sub>2</sub> y luz, usando al agua como dador de electrones, oxidándola a O<sub>2</sub> (Fernández, 2014). Son esenciales como alimento para las primeras fases de desarrollo de la mayoría de las especies de moluscos, crustáceos y peces en cultivo (Gómez-Luna, 2007), debido a su tamaño, fácil cultivo y probada calidad nutricional (Mueller-Feuga, 2000; Civera-Cerecedo et al., 2004). Aunque varias especies de microalgas han sido utilizadas como alimento en maricultura, no todas producen un buen crecimiento y supervivencia en todas las especies cultivadas. Algunos de los factores que intervienen en el mayor o menor éxito en su uso son la talla, la digestibilidad y la composición bioquímica (Cordero y Voltolina, 1997). Los componentes más importantes para la nutrición animal son las proteínas, lípidos, carbohidratos y minerales, así como nutrientes específicos tales como aminoácidos y ácidos grasos esenciales, esteroides, azúcares y vitaminas (García-Galano, 2000). En la búsqueda de mejores esquemas de manejo que permitan predecir el valor nutricional de las microalgas bajo condiciones controladas, se han ensayado diferentes estrategias de cultivo entre las que destacan la manipulación de las variables ambientales y los sistemas de cultivo (Lemus et al., 2006). Otros atributos de las microalgas son su elevada eficiencia fotosintética, su capacidad de crecer tanto en aguas marinas, dulces y residuales, así como su velocidad de crecimiento relativamente alta (Martínez-Jiménez, 2012). Las microalgas pueden mitigar las emisiones de CO<sub>2</sub> y producir lípidos, por lo que se

consideran con potencial para la obtención de biocombustibles de tercera generación (Castillo, 2017). El empleo de microalgas para la producción de biodiésel es una alternativa viable por su elevado contenido de lípidos y su perfil idóneo para la obtención de éste (Peñaranda *et al.*, 2013). Las microalgas pueden contribuir significativamente a la bioeconomía por cuanto pueden mejorar la sostenibilidad múltiples procesos relacionados con la actividad humana, desde la producción de alimentos al tratamiento de aguas residuales. Así, la tolerancia de estos microorganismos a diferentes condiciones ambientales y su alta productividad los hacen idóneos para múltiples aplicaciones (Acién *et al.*, 2018).

### **1.6 Importancia de las microalgas en la acuicultura**

Las microalgas se consideran un recurso con un rol crucial en el desarrollo de los organismos dentro de la acuicultura, uno de los aspectos que las hacen tan importantes es su composición bioquímica, en un principio se reconocieron propiedades como: altas concentraciones de proteína con aminoácidos esenciales, carbohidratos con alta digestibilidad, lípidos 1-70%, ácidos grasos esenciales omega 3 y 6 lo cual cambia acorde al tratamiento que se le aplique, vitaminas (A, B1, B2, B6, B12, C, E, nicotínico, biotina, ácido fólico y ácido pantoténico), pigmentos, carotenoides y ficobiliproteínas (Spolaore *et al.*, 2005). Con lo cual, presentan un estado de progreso con distintas aplicaciones como alimento para la dieta de peces, la biomasa de alga puede beneficiar la coloración de los peces, en cultivo de moluscos para aumentar su valor se incorporan en fases previas a la venta para cambiar sabor o color y como complemento para dietas de crustáceos en fases larvales, como enriquecedor de zooplancton dependiendo la especie de microalgas que se emplee los resultados pueden variar (Muller-Feuga, 2000; Pérez-Legaspi *et al.*, 2018). Además de su valor nutricional, presentan propiedades nutraceuticas por lo que las distintas especies de microalgas pueden ser explotadas en la acuicultura y la industria (Spolaore *et al.*, 2005; Sen-Roy *et al.*, 2014). Las microalgas poseen una capacidad ficorremediadora que consiste en la eliminación o biotransformación de contaminantes de un medio líquido o gaseoso. Estos compuestos contaminantes son captados por la biomasa algal y pueden ser recuperados mediante su cosecha

(Hernandez-Perez y Labbé, 2014). El enfoque que se busca actualmente es de sustentabilidad, utilizando la biomasa como: alimento, reductoras de energía en aireación y para la limpieza de las aguas contaminadas, a este concepto se conoce como acuicultura asistida por microalgas (Han et al., 2019).

## **2. Antecedentes**

### **2.1 Microalgas**

#### **2.1.1 Descripción e información general**

Son llamadas microalgas a una gran cantidad de especies, que constituyen el fitoplancton, que abarca desde organismos autótrofos hasta microflagelados y microciliados autótrofos. Su posición taxonómica ha sido de gran polémica entre botánicos y zoólogos, como ejemplo podemos mencionar el grupo de los dinoflagelados (Torrentera y Tacon, 1989; Ynga-Huamán, 2011).

En un sentido amplio y desde el punto de vista biotecnológico, el término microalga se refiere a aquellos microorganismos que contienen clorofila “a” y otros pigmentos fotosintéticos, capaces de realizar fotosíntesis oxigénica (Falkowski, 2002; García-Cañedo, 2017). En este contexto, las cianobacterias o algas verde-azules, procariotas, se han considerado tradicionalmente dentro del grupo de las microalgas (Abalde et al., 1995; Salazar-Pérez, 2012).

El estudio científico de las microalgas comienza en 1890, cuando el microbiólogo holandés Beijerinck establece cultivos puros de una microalga de agua dulce: *Chlorella vulgaris*. Algo más tarde, Otto Warburg (1919) consiguió en laboratorio cultivos densos de *Chlorella*, e introdujo la idea de utilizar estos cultivos como una herramienta de trabajo en el estudio de la fotosíntesis (Abalde et al., 1995; García-Gómez, 2019). El concepto de producción masiva de microalgas se llevó a cabo por primera vez en Alemania durante la II Guerra Mundial, dirigido a la producción de lípidos, para lo que se utilizaron las microalgas *C. pyrenoidosa* y *Nitzschia palea*. Después de la II Guerra Mundial comenzó a considerarse la biomasa microalgal como un suplemento importante e, incluso, capaz de reemplazar a las proteínas

animales o vegetales convencionales para consumo directo del ganado o del hombre, acortando la ineficiente cadena alimenticia proteica. Así, a partir de 1948, un grupo de científicos en la Carnegie Institution de Washington establecen los fundamentos científicos del cultivo masivo de microalgas, publicados en el ya clásico trabajo de Burlew (1953). El consumo local de microalgas en determinadas zonas como fuente de vitaminas y proteínas para el hombre data de tiempo inmemorial. *Spirulina maxima* era empleada por los aztecas en alimentación, en forma de unos bizcochos que denominaban "tecuiltatt". Los nativos del Chad utilizan esta misma microalga en un preparado similar que denominan "dihé. lakeplum" (*Nostoc pruniforme*, *N. edule*) consumida y comercializada en Mongolia, Tartaria, China y en los Andes peruanos. *Nostoc commune*, que forma largas capas correosas sobre suelos calcáreos, fue o es utilizada como alimento en Mongolia, China, Ecuador, Fiji y Okinawa. La producción de biomasa microalgal se orientó en principio a las especies de agua dulce que podrían servir como suplemento en las dietas o para el tratamiento de aguas residuales. Posteriormente, el interés se dirigió también al cultivo masivo de microalgas marinas y de estuarios para alimento de especies animales apreciadas. Las microalgas son fundamentales en la acuicultura marina, en la alimentación de larvas de crustáceos, moluscos y ciertos peces (Abalde et al., 1995; Gómez Luna, 1997; Plasencia, 2012, Cerón, 2013; García-Gómez, 2019).

## 2.2 Biología

Las microalgas son organismos pertenecientes al reino *plantae*, comprenden un grupo muy diverso de organismos fotosintéticos (Rendón et al., 2013). Se clasifican como talofitas, es decir, plantas inferiores, por presentar una estructura simple no vascularizada con ausencia de raíz, tallo y hojas. Sus estructuras reproductivas están desprotegidas (Criptogamia), son productoras de esporas y están desprovistas de semillas y flores. Tienen similitudes en muchos aspectos con las plantas superiores, como la composición de sus carbohidratos de reserva, proteína y pigmentos fotosintéticos. El término microalga no tiene ningún valor taxonómico, pero es muy práctico ya que incluye microorganismos algales con clorofila "a", "b", y "c"; así como las ficobilinas, carotenoides y otros pigmentos

fotosintéticos, capaces de realizar fotosíntesis oxigénica. Las microalgas presentan una amplia distribución geográfica, se pueden encontrar prácticamente en todas las condiciones ambientales de la Tierra, desde los suelos fértiles hasta los desiertos fríos y calientes. Es en los ambientes acuáticos, tanto marinos como en aguas continentales, donde estas prevalecen (Mimouni et al., 2012; López, 2017). Los ciclos reproductivos de las algas presentan amplia variedad de tipos. En la mayoría de ellos existen dos generaciones que alternan: sexual (gametofítica) y asexual (esporofítica). Ellas tienen, respectivamente, uno o dos juegos de cromosomas por célula. La reproducción asexual en las algas unicelulares suele ser por división simple, originándose dos o más células que pueden estar provistas de flagelo y ser móviles (zoosporas) o bien carecer de él y ser inmóviles (aplanosporas) (Boraso et al., 2003).

### **2.3 Técnicas de cultivo**

Para los cultivos monoalgales muchos factores contribuyen para el desarrollo óptimo de los cultivos de microalgas, algunos de éstos afectan las características del crecimiento. Los recipientes de cultivo más comúnmente usados son de materiales no tóxicos como las cajas de Petri, matraces Erlenmeyer, matraces Fernbach, carboys o garrafas, etc., adecuados para cultivos de laboratorio. Para cultivos a gran escala los recipientes de plástico, madera y concreto son los más recomendables, incluyendo los estanques rústicos en áreas rurales son los sistemas más económicos. Es necesario considerar, la luz (intensidad de luz y fotoperiodo), temperatura, salinidad, la aireación es un factor muy importante para la homogeneización de los nutrientes y para evitar la sedimentación de las microalgas (FAO, 1989). Se considera el tipo de alga que se desea cultivar acorde al medio de donde es recolectada, de agua dulce o agua salada, se aísla y se purifica además se decide si será cultivada en un medio sólido o líquido. Las técnicas de cultivo están principalmente dirigidas a cultivos aislados, dentro de las consideraciones que se tienen para los cultivos están: la obtención de células, el aislamiento (aislamiento con pipeta, diluciones seriadas, aislamiento en placas de agar), purificación (lavado por centrifugación, ultrasonido, bacteriostáticos, antibióticos, dióxido de germanio,

radiación ultravioleta, control de axenicidad), mantenimiento de un cepario (condiciones de cultivo: iluminación, temperatura, aireación y agitación, pH, salinidad) y medios de cultivo (Arredondo y Voltolina, 2007).

De manera general para el cultivo de microalgas se requiere:

Tabla 1. Condiciones generales para cultivo de microalgas

| Conjunto Generalizado de Condiciones para Cultivo de microalgas |   |                                |
|---|---|--------------------------------|
| Parámetros  | Rango   | Óptimo                         |
| Temperatura(°C)   | 16-27   | 18-24                          |
| Salinidad (g.l <sup>-1</sup> )                                  | 12-40   | 20-24                          |
| Intensidad de Luz(lux)  | 1,000-10,000<br>(dependiendo del<br>volumen y densidad) | 2,500-5,000                    |
| Fotoperiodo(Luz:<br>Oscuridad, Horas                            |   | 16:8 (Mínimo)<br>24:0 (Máximo) |
| Ph  | 7-9   | 8.2-8.7                        |

Manual sobre producción y uso de alimento vivo para acuicultura (FAO, 1996)

## 2.4 Medios de cultivo

Se han desarrollado diferentes medios para el cultivo de microalgas que van desde las fórmulas para enriquecer el agua de mar natural, hasta el uso de medios artificiales que permitan resultados constantes en contraste con los resultados tan variables que brinda el uso del agua de mar natural que entre otros factores depende del lugar donde se colecta ésta, y el tiempo de almacenamiento de la misma. En términos generales son los macronutrientes o factores limitantes del crecimiento el carbono, Nitrógeno, Fósforo, Silicio, Magnesio, Potasio y Calcio, que se requieren en cantidades relativamente grandes, mientras que los llamados micronutrientes (Hierro, Manganeso, Cobre, Zinc, Sodio, Molibdeno, Cloro y Cobalto) se necesitan en menores cantidades (FAO,1989). Existen medios de cultivo de agua dulce, medios de agua salada, dependiendo los requisitos de la especie, se ha logrado establecer algunos medios específicos y ofrecer de manera comercial (UTEX, 2021)

Como ejemplo de componentes de cada medio esta el medio Guillard f/2 (tabla 2) y medio Basald Bold (tabla 3).

Tabla 2. Medio Guillard f/2

| <b>Componentes de Medio Guillard</b>  |          |   |
|---|----------|---|
| <b>Macronutrientes</b>  | Cantidad | Nombre Común                                    |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O  | 36.76g/l | Cloruro de Calcio Dhidratado                    |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O  | 36.97g/l | Sulfato de Magnesio                             |
| NaHCO <sub>3</sub>  | 12.60g/l | Bicarbonato de Sodio                            |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>   | 8.71g/l  | Fosfato dipotásico                              |
| NaNO <sub>3</sub>   | 85.01g/l | Nitrato de Sodio                                |
| Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·H <sub>2</sub> O  | 28.42g/l | Silicato de Sodio                               |
| (se utiliza un ml de esta solucion en 1 litro de agua esterilizada)   |          |   |
| <b>Micronutrientes</b>  | Cantidad | Nombre Común                                    |
| Na <sub>2</sub> EDTA=C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> · 2H <sub>2</sub> O            | 4.36g/l  | Sal de Sodio del Acido Etilodiamino Tetracético |
| FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub>  | 3.15g/l  | Cloruro Férrico Hexahidratado                   |
| CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O  | 0.01g/l  | Sulfato de Cobre Pentahidratado                 |
| ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O  | 0.022g/l | Sulfato de Zinc Heptahidratado                  |
| CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O  | 0.01g/l  | Cloruro de Cobalto Hexahidratado                |
| MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O  | 0.18g/l  | Cloruro de ManganesoTetrahidratado              |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O   | 0.006g/l | Molibdato de Sodio Dihidratado                  |
| (se utiliza un ml de esta solucion en 1 litro de agua esterilizada)   |          |   |
| <b>Vitaminas</b>  | Cantidad | Nombre Común                                    |
| Thiamine.HCl  | 0.1mg/l  | Clorhidrato de Cloruro de Tiamina(B1)           |
| Biotina   | 0.5g/l   | B7,B8   |
| Cianocobalamina   | 0.5g/l   | B12   |
| (se utiliza un ml de esta solucion en 1 litro de agua esterilizada)   |          |   |
| <b>Tris</b>   |          |   |
| Tris(Chydroxymethyl)Aminomethano 50.g/200ml H <sub>2</sub> O dest.<br>2 ml en 1 litro de agua destilada ajustar pH al 7.2 con HCl |          |   |

(Andersen, 2005)

Tabla 3. Medio Basald Bold

| <b>Componentes Medio Basal Bold</b>  |              |                              |
|--|--------------|------------------------------|
| Macronutrientes  | Cantidad(mg) | Nombre Comun                 |
| NaNO <sub>3</sub>  | 250          | Nitrato de Sodio             |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O   | 25           | Cloruro de Calcio Dhidratado |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O   | 75           | Sulfato de Magnesio          |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>  | 75           | Fosfato dipotásico           |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 175          | Fosfato Monopotásico         |
| NaCl   | 25           | Cloruro de Sodio             |
| Se agrega a un litro de agua destilada(el agua que se ocupara para el medio) |              |                              |

| Solucion de Vitaminas (1 litro)                             | Cantidad (mg) | Nombre Comun                             |
|---|---------------|--|
| Tiamina   | 200           | B1                                       |
| Biotina   | 10            | B7, B8                                   |
| B12   | 10            | B12                                      |
| Se utilizan 2 ml para 1 litro de medio con macronutrientes  |               |  |
| Trazas de metal   | Cantidad (mg) | Nombre Comun                             |
| NaFeEDTA=C10H12FeN2NaO8                                     | 5             | Etilendiaminotetraacetato ferrico sodico |
| MnCl <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O                        | 180           | Cloruro de Manganeso Tetrahidratado      |
| CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O                        | 10            | Sulfato de Cobre Pentahidratado          |
| ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O                        | 22            | Sulfato de Zinc Heptahidratado           |
| CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O                        | 10            | Cloruro de Cobalto Hexahidratado         |
| NaMoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O                       | 6.4           | Molibdao de sodio                        |
| Se utilizan 2 ml para un litro de medio con macronutrientes |               |  |

(Andersen, 2005)

## 2.5 Componentes benéficos de las microalgas

Tabla 4. Componentes benéficos de las microalgas

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| <b>Proteínas</b>               | Todos los aminoácidos esenciales, alta biodigestibilidad                   |
| <b>Lípidos</b>                 | Ácidos grasos (Omega 3-6), PUFAs (EPA, DHA, ARA), MUFAs, esteroides y TAG. |
| <b>Carbohidratos</b>           | Almidón, glucosa.  |
| <b>Pigmentos</b>               | Clorofilas, β-caroteno, cantaxantina, astaxantina y ficobiliproteínas.     |
| <b>Metabolitos secundarios</b> | Compuestos fenólicos, Isoprenoides.  |
| <b>Vitaminas</b>               | A, B, K, E y C.  |
| <b>Minerales</b>               | K, Ca, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, P, Se, Na y Zn.                                 |

(Guerrero et al., 1999; FAO, 2008; Choix, 2014; Safi et al., 2014; Gómez et al. 2016; Hernández et al., 2019; Olmedo, 2019).

### 2.5.1 *Scenedesmus obliquus*

La primera especie del género *Scenedesmus* se describió por Turpin (1828), el nombre del género fue creado por Meyen (1829), de acuerdo con Komárek y Fott (1983) el género *Scenedesmus* presenta la característica de formar cenobios de 2-32 células, también puede presentar polimorfismo y reproducción sexual por zooesporas, autoesporas. *S. obliquus* genéticamente presenta una relación muy cercana con *Chorella*. (Hegewald. 1997).

Esta microalga se considera oleaginosa, por que las células tienden a acumular cuerpos lipídicos cuando se encuentra bajo condiciones de estrés ambiental (Neofotis et al., 2016).

Taxonomía:

Reino: *Plantae*

Filo: *Chlorophyta*

Clase: *Chlorophyceae*

Orden: *Sphaeropleales*

Familia: *Scenedesmaceae*

Género: *Scenedesmus*

Especie: *Scenedesmus obliquus*

(Hegewald, 1997; Neofotis et. al., 2016)

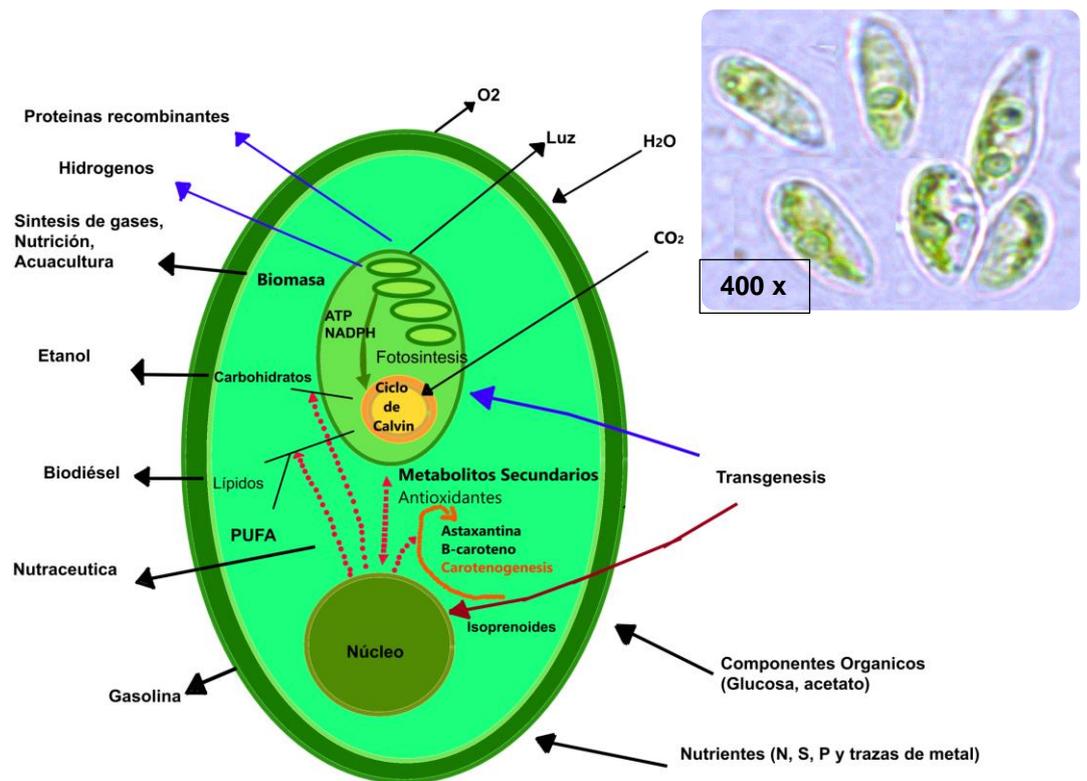


Figura 1. Componentes benéficos de *S. obliquus* y su morfología a foto a 400x tomada en el Laboratorio de Investigación en Biotecnología Acuícola (LIBA).

### Componentes benéficos

*S. obliquus* presenta una composición bioquímica muy amplia y usos distintos desde fitorremedición, biocombustibles, alimentos y farmacéutica por que ofrece:

Proteínas: 24.87-35.18% (Quevedo et al. 2008), 19-24 % (Fernandez, 2013), 31.07±0.09% (El- Chaghaby et al. 2019), 38.06±1.25 % (Trivedi et al. 2020), 13.56-33.53% (Hlaing, et al.2020), 5.95±0.22 mg/g (Zapata et al. 2020), 24.50-60.75 %, (Londoño-Lopera, 2021), proteínas totales 7.09±0.23 mg/g, (Zapata et al., 2022).

Carbohidratos: 30 %, (Fernandez, 2013), carbohidratos 14.9%, (Trivedi et al. 2020), 3- 23 % (Hlaing, et al.2020) y 7.58-39.36%(Londolo-Lopera, 2021).

Lípidos: 30.9- 43.6 %, (Us- Vazquez, 2011) 9-12 % (Fernandez, 2013),  $15.13 \pm 0.12\%$ (El- Chaghaby et al. 2019), 33%(Trivedi et al. 2020), 15-28% (An et al., 2020), lípidos 13.75- 24.14% (Hlaing, et al.2020), 50-6.50%(Londolo-Lopera, 2021).

Ac. grasos: palmitico(c16:0), palmitoleico (c16:1), estearico (c18:0), oleico (c18:1) y linoleico (c18:2) (Us- Vazquez, 2011), C16:0 58%,c18:1 24,6%, insaturados 34%(An et al., 2020), mirístico (c14:0) 0.33%, palmitico (c16:0) 21.58 %, estearico ( c18:0) 1.15%, behénico (c24:0) 0.49%, lignocérico (c24:0) 0.33%, palmitoleico (c16:1 n7) 0.99 %, cis-9-9 oleico (c18: 1 n9) 10.71%, Nervónico (c24:1 n9) 0.99%, cis-9,12-linoleico (c18:2 n6) 12.03%, gamma-linoleico (c18:3 n6) 0.49 %, alpha-linolenico (c18:3 n3) 50.91% (Hlaing, et al.2020).

Cenizas  $15.07 \pm 0.09$  (El- Chaghaby et al. 2019), cenizas  $9.09 \pm 0.35\%$ , (Trivedi et al. 2020), 10-19.30%(Londolo-Lopera, 2021)

Carotenoides totales  $410.34 \pm 34.34$  mg/g (Zapata et al. 2020),  $473.85 \pm 11$  mg/g (Zapata et al., 2022).

Fenoles totales:  $2.51 \pm 0.18$  mg/g(Zapata et al. 2020),  $16.78 \pm 0.84$  mg/g (Zapata et al., 2022)

### 2.5.2 *Phaeodactylum tricornutum*

El género *Phaeodactylum* fue descrito por primera vez por Bohlin (1897), como un nuevo género de alga unicelular con su única especie *P. tricornutum*, con la característica de una valvula de sílice, una estructura que no se había observado, presenta polimorfismo, las dos formas típicas de las células son: Una motil donde posee una valvula de sílice y una no motil fusiforme carente de valvula de sílice, raramente se encuentra en su forma trirradiado, cruciforme, semilunar etc). Presenta reproducción clonal, es encontrada en zonas costeras cerca de las rocas en áreas intersticiales (Lewin, 1958).

Esta microalga puede presentar perfiles ricos de ácidos grasos con posible uso en biocombustibles (He et al., 2014), también se puede inducir la producción de distintos perfiles de pigmentos secundarios Carotenoides (Kuczynska et al. 2020).

Taxonomía

Clase: *Bacillariophyceae*

Orden: *Bacillariales*

Suborden: *phaeodactylinae*

Familia: *Phaeodactylaceae*

Género: *Phaeodactylum*

Especie: *Phaeodactylum tricornutum*

(Lewin, 1958; He et al., 2014)

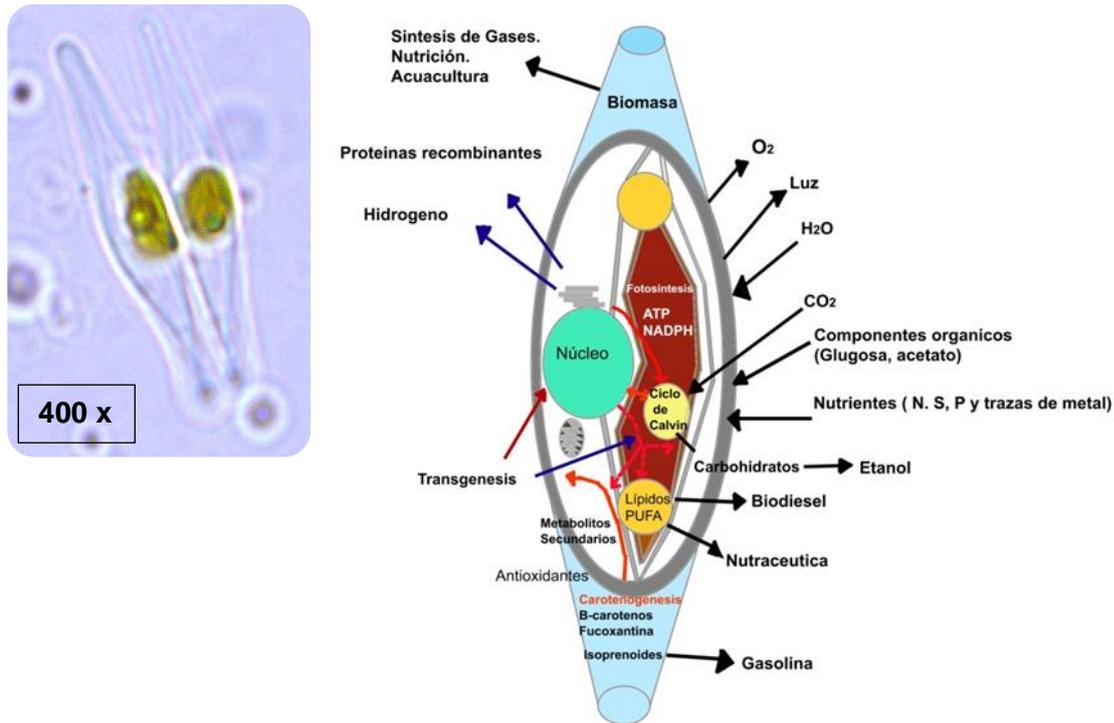


Figura 2. Componentes benéficos de *P. tricornutum* y su morfología foto a 400x tomada en el Laboratorio de Investigación en Biotecnología Acuícola (LIBA).

*P. tricornutum* presenta una composición bioquímica favorable para la industria alimenticia, médica, farmacéutica, cosmética y en biorrefinerías, debido a que cuenta con un perfil bioquímico muy amplio:

Proteínas: 15.78-32.20% (KaiXian y Borowitzka., 1992), 31.05±0.1%(Ak et al., 2015), 36.67±0.43%, (German-Báez et al., 2017), 8.85% (Stack et al., 2018), 15-23 % (Ding et al., 2023)

Carbohidratos: 14.60- 18.50% (KaiXian y Borowitzka., 1992), 46.78±0.47%(German-Báez et al., 2017), 9-22.5 % (Ding et al. .2023).

Lípidos: 28.46-41.30% (KaiXian y Borowitzka., 1992), 16.93±0.1%, ( Ak et al., 2015), 1.07± 0.01% (German-Báez et al., 2017), 32.18 % (Yang, et al. 2017), 16-33% (Ding et al., 2023)

Ácidos grasos: 11.83% de la biomasa total de los cuales son de EPA el 28% ( Yongmanitchai y Ward, 1991) TAG 33.33%, MUFAs 62.01 %, EPA 14.83 % (Yang,

et al. 2017), EPA 33 mg/rat, fucoxantina 5 mg/rat (Mayer et al., 2019), AGS 45.6 %, PUFA 23.92-40.51% (Conceicao et al., 2020), AGS  $23.63 \pm 2.76$ -  $39.17 \pm 9.64$  mg/L, MUFA  $22.33 \pm 3.78$ - $37.14 \pm 6.11$  mg/L y PUFA  $14.71 \pm 1.01$ -  $52.78 \pm 9.19$  (Kim et al. 2023) y TAG 1-17 % (Ding et al., 2023).

Pigmentos: clorofila a  $178 \pm 3$ - $415 \pm 2$   $\mu\text{g/L}$ -1, (Ak et al., 2015),  $15.37 \pm 3.54$ -  $67.19 \pm 6.18$  mg/g (Conceicao et al., 2020),  $2.3 \pm 0.6$ -  $7.65 \pm 0.56$ % Kim et al. 2023) y  $1$ - $53$   $\text{mg/g}^{-1}$ (Ding et al., 2023)

Carotenos:  $0.225 \pm 0.001$ - $620 \pm 0.002$   $\mu\text{g/L}$ -1(Ak et al., 2015) y  $0.3$ - $2.3$   $\text{mg/g}^{-1}$  (Ding et al., 2023)

Fucoxantina: 1.6 %(Sang et al., 2011), 0.44 %(Yang, et al. 2017)  $6.58 \pm 1.25$ -  $26.79 \pm 4.36$   $\text{mg/g}^{-1}$ (Conceicao et al., 2020), fucoxantina  $0.73 \pm 0.018$ -  $1.53 \pm 0.06$ % (Kim et al. 2023) y  $2$ - $15$   $\text{mg/g}^{-1}$  y diatoxantina  $0.5$ -  $1.3$   $\text{mg/g}^{-1}$  y diadinoxantina  $1.5$ - $5$   $\text{mg/g}^{-1}$  (Ding et al., 2023)

Cenizas:  $15.46 \pm 0.03$ % (German-Báez et al., 2017).

## 2.6 Efectos de las condiciones de estrés

Se obtiene al implementar una estrategia, ya sea nutricional o física, para así, generar una condición de estrés, y que la microalga como mecanismo de respuesta empiece a producir el compuesto de alto valor agregado a nivel industrial (Manrique-Ruiz y Corzo Piñeros, 2019), algunos de los factores que se implementan en el cultivo son: luz, temperatura, pH,  $\text{CO}_2$ , limitación de nitrógeno o fósforo, agitación, salinidad, entre otros (Hernández-Pérez y Labbé, 2014).

El contenido de lípidos de las microalgas se ve afectado por las condiciones ambientales, como la intensidad de la luz, la limitación de nutrientes (principalmente nitrógeno), la salinidad, la temperatura, el pH y la edad del cultivo. En condiciones desfavorables, el crecimiento de microalgas se detiene, la actividad fotosintética disminuye y el exceso de energía puede almacenarse en forma de lípidos y/o carbohidratos. Las especies de algas oleaginosas pueden modificar sus rutas de biosíntesis de lípidos hacia la formación y acumulación de lípidos neutros mediante el secuestro de restos de ácidos grasos producidos *de novo* (sufre una mutación) en

forma de TAG (triacilglicéridos). El TAG puede llegar al 40-70% de la biomasa seca total en algunas especies oleaginosas (Pal *et al.*, 2011).

Diversos autores han demostrado la complejidad y diversidad de las reacciones de las microalgas ante estímulos físicos o químicos, algunos ejemplos son los siguientes:

La limitación de nitrógeno en el medio de cultivo provoca un incremento en la concentración de biomasa y materia orgánica de la microalga *Dunaliella tertiolecta*, además López- Elías *et al.*, (2013) demostró que afecta de manera negativa el contenido de  $\beta$ -caroteno e incluso un aumento en la salinidad favorece el incremento de este pigmento. También se pueden generar pigmentos de alto valor nutricional, como es el caso de la Astaxantina en microalgas principalmente se obtiene de *Haematococcus pluvialis*, al ser expuesta a condiciones adversas como es el incremento de luz, o un cambio en la salinidad genera su enquistamiento y comienzo de la carotenogénesis (Panis *et al.*, 2016). Se ha encontrado, una mayor concentración de astaxantina al utilizar agua destilada con adición de dióxido de carbono y exposición de luz de 546  $\mu\text{mol}$  fotones  $\text{m}^2$  por segundo (Imamoglu *et al.*, 2009). Mediante modificaciones en el medio y adición de vitaminas (cianocobalamina) se obtuvo una mayor cantidad de EPA y DHA en cultivo de *Isochrysis galbana* (Saoudi-Helis *et al.*, 1994). Al igual la intensidad lumínica y el tiempo de exposición, poseen influencia sobre el alga, de tal manera que, genera cambios significativos en su crecimiento. Es posible concluir que, al haber un aumento en la intensidad de luz y el tiempo de exposición, va a haber un decrecimiento en el tamaño de *Neochloris cohaerens* (Mora *et al.*, 2015).

La densidad celular de *Isochrysis galbana* depende en forma directa de la intensidad lumínica, a su vez interactúa con la temperatura provocando diferente densidad algal, en condiciones de alta luminosidad (1.024 lux), temperatura elevada (28 °C) se promueve un aumento de la densidad microalgal, una baja luminosidad (24 lux) la hace decrecer, mientras que las salinidad de 27 y 35 ‰, no afectan el crecimiento (Velasco *et al.*, 2009). Se ha observado, una mayor concentración y composición de ácidos grasos en tratamientos donde el fotoperiodo es de 12:12, tras observar el desarrollo de tres microalgas en cultivo bach *C. calcitrans*, *Chlorella sp.* y *Nannochloropsis sp.* (Lim y Zaleha, 2013).

Se comparó en un cultivo de *Chlorella peruviana*, su desarrollo bajo distintas salinidades, donde se obtuvieron los siguientes resultados: La microalga nativa *C. peruviana* demostró factibilidad de cultivo y capacidad de crecimiento entre 38 y 176 ‰ de salinidad, con una óptima a 38 ‰, mientras que el contenido celular de biomasa seca y de clorofila presenta un máximo en el nivel de 38 ‰ de salinidad. Sin embargo, es necesario probar salinidades en menores concentraciones para fines comparativos. La salinidad alta influye negativamente sobre el crecimiento, biomasa y contenido de clorofila de la microalga (Astocondor *et al.*, 2017).

Se ha demostrado que, *P. tricornutum* realiza cambios en su estrategia de supervivencia ante la carencia de fosfatos, aumentando el contenido de lípidos (Dell'Aquila y Maier, 2020), El dióxido de carbono influye en la composición bioquímica de *S. obliquus* encontrándose benéfica la adición de un 20 % (Castañeda-Hernandez, 2020). Kuczynska *et al.* (2020) con el objetivo de comprobar la respuesta ante el estrés lumínico para la obtención de diversos pigmentos (carotenoides), se encontró una relación entre la cantidad de luz, y el tiempo de exposición con un rango de 3 días, para la obtención de un aumento en las xantofilas, cambiando las propiedades físicas de las membranas tilacoides. Mateucci R. (2018) cultivó *S. platensis* en diferentes condiciones de cultivo, suministrando distintas fuentes de N y P, en distintas concentraciones, demostrando la influencia sobre la composición bioquímica y crecimiento de esta microalga.

**Tabla 5. Antecedentes de microalgas sometidas a diferentes condiciones de estrés.**

| Especie de microalga   | Objetivo   | Principal resultado  | Referencia                   |
|--|--|--|------------------------------|
| <p><i>Chaetoceros gracilis</i>,<br/> <i>C. calcitrans</i>,<br/> <i>Chroomonas salina</i>,<br/> <i>Tetraselmis suecica</i>,<br/> <i>Dunaliella tertiolecta</i>,<br/> <i>Pavlova lutheri</i>,<br/> <i>Nannochloris atomus</i>,<br/> <i>Isochrysis sp.</i><br/> <i>Skeletonema costatum</i>,<br/> <i>Thalassiosira pseudonana</i></p> | <p>Determinar la composición bioquímica bajo condiciones de cultivo.</p>   | <p>Tres de las algas verdes <i>N. atomus</i>, <i>D. tertiolecta</i> y <i>T. suecica</i>, no contienen altas concentraciones de poliinsaturados C20 y C22.</p> <p><i>D. tertiolecta</i> contiene altas concentraciones de ácidos grasos (n-3) C18, <i>C. calcitrans</i> es abundante en 20:5 (n-3), <i>C. salina</i> contiene gran proporción de ácidos grasos poliinsaturados. Los estudios de laboratorio generan un cambio en la composición de los ácidos grasos resultado de las condiciones modificadas de cultivo. Estas variaciones pueden ser exploradas para maximizar las cualidades nutricionales de las algas.</p> | <p>Volkman et al. (1989)</p> |
| <p><i>Isochrysis galbana</i></p>   | <p>Determinar la influencia del estado físico de la biomasa y los métodos para medir biomasa algal</p>                             | <p>Realizar análisis a partir de masa húmeda es la mejor opción.<br/> Determinar la cantidad de biomasa algal da resultados precisos</p>   | <p>García et al. (1993)</p>  |
| <p><b>Bacillariophyceae:</b><br/> <i>Asterionella glacialis</i><br/> <i>C. finis</i>,<br/> <i>Nitzschia closterium</i>,<br/> <i>Phaeodactylum tricornutum</i>,<br/> <i>Thalassiosira sp.</i><br/> <i>T. weissflogii</i><br/> <b>Dinophyceae:</b><br/> <i>Amphidinium sp.</i></p>   | <p>Evaluar la composición de ácidos grasos (PUFA) de cada microalga y la relación que se presenta acorde a su clase taxonómica</p> | <p>Presentan composiciones diferentes de ácidos grasos esenciales entre especies de microalgas, lo que las hace propensas a ser mezcladas para generar alimentos para especies animales en la maricultura.</p>   | <p>Viso y Marty (1993)</p>   |

|  |   |   |                                   |
|--|---|---|-----------------------------------|
| <p><i>Prorocentrum micans</i><br/> <i>Scrippsiella trochoidea</i><br/> Chlorophyceae<br/> <i>Dunaliella bioculata</i><br/> <i>D. minuta</i><br/> <i>D. primolecta</i><br/> <i>Nannochloris</i> sp.<br/> Prasinophyceae<br/> <i>T. marina</i><br/> <i>T. suecica</i><br/> <b>Prymnesiophyceae</b><br/> <b>(Haptophyceae)</b><br/> <i>Chrysothila stipitata</i><br/> <i>C. lamellosa</i><br/> <i>Hymenomonas elongata</i><br/> <i>Emiliana huxleyi</i><br/> <i>Paolora pinguis</i><br/> Cryptophyceae<br/> <i>Chroomonas fragarioides</i><br/> <i>Rhodomonas lens</i><br/> Raphidophyceae <i>Heterosigma</i><br/> <i>akashii</i></p> |   |   |                                   |
| <p><i>I. galbana</i></p>   | <p>Demostrar la influencia del medio de cultivo en la composición de lípidos (ácidos grasos) principalmente DHA</p> | <p>Se demostró que es posible ajustar la cantidad de ácidos grasos en la microalga mediante el contenido del medio de cultivo, la biomasa de microalga siendo rica en ácidos grasos (DHA)</p> | <p>Saoudi-Helis et al. (1994)</p> |

|  |   |   |                              |
|--|---|---|------------------------------|
| <i>Chaetoceros muelleri</i>  | Evaluar el crecimiento de la diatomea <i>C. muelleri</i> en cada nivel del escalamiento del cultivo estático desde el nivel de tubo de ensayo hasta columna de 300 l y relacionar las fases de crecimiento de esta diatomea en el nivel carboy con su respectiva composición bioquímica | La temperatura y el potencial de Hidrogeno (pH) influyen en el desarrollo del cultivo.<br><br>Describir un manejo típico y su consecuencia en la calidad bioquímica de una microalga, como indicador de su valor nutricional. | Medina y Cordero (1998)      |
| <i>D. salina</i>   | Encontrar la proporción de $\beta$ -caroteno que beneficia a las dietas de <i>Penaeus monodon</i>   | La dieta suministrada genera cambios en la coloración del <i>P. monodon</i> , a mayor concentración de $\beta$ -caroteno más rápido se realiza este cambio (125-175 p.p.mm). Lo que le da mayor supervivencia.                | Boonyaratpalin et al. (2001) |
| <i>Neochloris oleoabundans</i> ,<br><i>Bracteacoccus grandis</i><br><i>P. tricornutum</i>  | Determinar la composición bioquímica de 3 especies de alga de agua dulce para alimento de moluscos  | Se analizó el contenido nutricional de Lípidos (PUFA, UFA y, esteroides), carbohidratos y proteínas. Para generar posibles dietas a partir de estas algas, en la alimentación de moluscos                                     | Gatenby et al .(2003)        |
| <i>Nannochloropsis oceanica</i><br><i>Tribonema sp.</i><br><i>Chroococcus sp.</i><br><i>Synechococcus sp.</i><br><i>I. galbana</i><br><i>Pavlova sp.</i><br><i>Phaeodactylum tricornutum</i><br><i>Porphyridium cruentum</i><br><i>Rhodomonas baltica</i><br><i>Oocystis sp.</i> | Se determinó e identificó el contenido de Ácidos grasos PUFA (DHA, EPA y AA) de 12 microalgas pertenecientes al Norwegian Institute for Water Research (NIVA)   | Las condiciones de cultivo influyen directamente en el contenido de Lípidos de la microalga. El contenido de lípidos (PUFAS ) es requerido en la acuicultura como alimento vivo para larvas de bivalvos                       | Patil et al. (2007)          |

|  |   |   |                              |
|--|---|---|------------------------------|
| <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i><br><i>Tetraselmis suecica</i> |   |   |                              |
| <i>D. salina</i><br><i>D. viridis</i><br><i>D. bardawil</i>          | Determinar el valor nutricional de estas cepas y las diferencias en su contenido nutricional  | Se evaluó el contenido de carbohidratos, proteínas y lípidos (ácidos grasos) para determinar su perfil nutricional. Presentan potencial para cultivarlas.   | Vázquez-Suárez et al. (2007) |
| <i>Hematococcus pluvialis</i>  | Comparar los efectos de la intensidad de luz como estrés en la obtención de astaxantina.      | La mejor condición para la acumulación de astaxantina en este estudio 546 micro mol fotón m-s, para reducir los costos de producción bajo techo.  | Imamoglu et al. (2009)       |
| <i>Scenedesmus sp.LX1</i><br><i>Nannochloropsis sp.</i>              | Evaluaron propiedades de crecimiento y absorción de N y P.                                    | Demostrar la relación entre N y P como factores limitantes. Estableciendo una proporción ideal en cultivo de: 5:1 y 8:1   | Xin et al. (2010)            |
| <i>Dunaliella sp.</i>  | Evaluar la producción de biomasa de <i>Dunaliella sp.</i> en medios limitantes en nitrógeno   | Ocurrió un incremento en el tamaño debido a la carencia de nitrógeno en el medio de cultivo.<br><br>En los medios limitantes de nitrógeno, las células incrementan su biomasa en comparación con el control (medio f/2 rico en nutrientes). Además del incremento en el tamaño de la célula, debe existir una variación en los compuestos bioactivos, que deben ser estudiados a detalle. | Fimbres et al. (2010)        |
| <i>Nannochloropsis sp.</i>   | Optimización de la producción de triglicéridos mediante exposición a luz fluorescente para la | Las células tienden a acumular una mayor cantidad de lípidos durante 100 generaciones demostrando su utilidad para la   | Doan y Obbard (2010)         |

|                             |   |  |                        |
|-----------------------------|---|--|------------------------|
|                             | obtención de biocombustibles como biodiesel   | producción de biocombustibles  |                        |
| <i>Nannochloropsis sp.</i>  | Investigar los efectos de la intensidad de luz y el nivel de salinidad en la producción de lípidos mediante cultivos por lotes de laboratorio de <i>Nannochloropsis sp.</i> cultivada en medios repletos de nitrógeno y empobrecidos en nitrógeno | Pigmentos<br><br>Determinar la proporción necesario en relación nitrógeno, luz, salinidad con la cual se desarrolle mejor el alga y se obtenga mayor biomasa con un contenido alto de lípidos TAG (EPA y DHA)  | Pal et al. (2011)      |
| <i>Scenedesmus sp.</i>      | Promover la acumulación de carotenoides exponiendo la microalga a limitación de nitrógeno y acetato en cultivo  | Se determinaron los niveles de astaxantina, cantaxantina al ser expuesta a diferentes concentraciones de nitrógeno y acetato de sodio.   | Pirastru et al. (2012) |
| <i>H. pluvialis</i>         | Comprobar los costos de producción de astaxantina natural con las tecnologías de bajo costo en China  | La producción de astaxantina a gran escala es barata, se prevé que con el avance tecnológico se reduzca aún más su costo de producción.<br><br>Informar sobre el desarrollo de procesos de producción de biocombustibles en cultivos de microalga a gran escala. | Jian et al. (2011)     |
| <i>Scenedesmus sp.</i> R-16 | Aislar, cultivar una microalga oleaginosa comprobando los efectos del dióxido de carbono, el nitrógeno y el pH, para su crecimiento.  | Se obtuvo un total de lípidos de 52.6% , la microalga presenta gran potencial en la producción de lípidos para la producción renovable de biodiesel  | Hong-Yu et al. (2013)  |
| <i>H. pluvialis</i>         | Identificar la influencia de factores de estrés para la carotenogénesis   | Los estudios usando varios inhibidores indican que la carotenogénesis en general y la inducción de carotenoides secundarios está regulada a nivel transcripcional y transduccional,  | Camacho et al. (2013)  |

|   |   |   |                        |
|---|---|---|------------------------|
|   |   | y se constituye en un tema de interés a investigar para entender los genes involucrados, las proteínas y la actividad enzimática durante la inducción de acumulación de carotenoides secundarios, en especial astaxantina.          |                        |
| <i>C. calcitrans</i><br><i>Chlorella sp.</i><br><i>Nannochloropsis sp.</i>  | Comparar los efectos del fotoperiodo en la optimización de la producción de total ácidos grasos y ácidos grasos poliinsaturados contenidos en las microalgas. | Se identificaron 29 ácidos grasos el tratamiento de luz y oscuridad 12:12 fue el más efectivo en la optimización de ácidos grasos totales. Demostrándose mayor eficiencia que en cultivos de luz continúa que no son tan rentables. | Lim y Zaleha (2013)    |
| <i>T. suecica</i>   | Estudiar la cinética de crecimiento en medios limitados por nitrógeno   | Producción y extracción de lípidos con ultrasonido y solventes para establecer los parámetros básicos de cultivo para la producción lipídica de biomasa residual  | Soto-León et al.(2014) |
| <i>Chlorella vulgaris</i><br><i>Nannochloropsis oculata</i> ,<br><i>T. pseudonana</i> ,<br><i>P.tricornutum</i> ,<br><i>I. galbana</i> ,<br><i>T. suecica</i><br><i>T. chuii</i> ,<br><i>C. muelleri</i> ,<br><i>Thalassiosira fluviatilis</i><br><i>Isochrysis sp.</i> | Conocer la composición bioquímica de estas microalgas en especial su contenido de lípidos.  | Se obtuvo una tabla comparativa con la cual se puede designar los posibles usos de las microalgas cultivadas (alimento animal, humano o biocombustibles) según sus propiedades  | Ohse et al.(2015)      |
| <i>N. oculata</i>   | Evaluar en diferentes métodos la concentración y  | La captación de microalga mediante centrifugación y floculación   | Borges et al.          |

|   |  |   |                        |
|---|--|---|------------------------|
|   | como la sal inorgánica afecta el contenido de lípidos y ácidos grasos de la biomasa de microalga marina <i>N. oculata</i>  | mediante NaOH y neutralizada con HCl presenta mayores concentraciones de ácidos grasos que usando solo NaOH   | (2016)                 |
| <i>H. pluvialis</i>   | Investigar la comercialización de la producción a gran escala de esta microalga para generar astaxantina natural   | La mayor producción de astaxantina natural se genera en sitios con alta radiación solar, altas temperaturas, su utilidad es para suplementos dietéticos y cosméticos.   | Panis y Rosales (2016) |
| <i>N. oleoabundans</i>  | Identificar los mecanismos que usa esta microalga verde bajo condiciones de salinidad y la influencia del nitrógeno.   | Entender estos procesos para incrementar la producción de lípidos. Desarrollo de producción a escala industrial para producción de TAG, biocombustibles y reducción de precios.   | Jaeger et al.(2018)    |
| <i>Scenedesmus</i> sp.  | Evaluar el efecto del sonido en diferentes frecuencias (1100 Hz, 2200 Hz y 3300 Hz) en el crecimiento, producción de biomasa y metabolitos de la cepa de microalga <i>Scenedesmus</i> sp.  | La frecuencia de 2200 Hz genera mayor concentración de biomasa seca. Optimizar la producción de microalgas mediante uso de sonido. El mayor valor de contenido de proteínas se obtuvo con la frecuencia de 2200 Hz, ya que alrededor del 38% (p/p) biomasa seca final de proteína | Amado y Higuera (2019) |
| <i>C. gracilis</i><br><i>T. maculata</i><br><i>Tisochrysis lutea</i><br><i>I. galbana</i> | Diseñar una alternativa adaptada al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM), que permita la intensificación a bajo costo en el cultivo de microalgas, produciendo mayores concentraciones y mejor calidad de microalgas en el espacio físico disponible. | Se logró obtener resultados favorables de la elaboración de un fotobiorreactor y un colector de bajo costo, mejorar la rentabilidad del cultivo de microalgas a gran escala   | Mora y Alberto (2019)  |

### 3. Justificación

El cultivo de microalgas presenta un desarrollo prometedor con diversos usos biotecnológicos, desde alimentos, cosméticos, pigmentos, suplementos, combustibles e incluso para el tratamiento de la calidad del agua. La obtención de recursos bioquímicos a partir de microalgas depende de la cepa, nutrientes suministrados y las condiciones del medio en el que se cultiva, de modo que una misma cepa puede presentar características muy diferentes con distintos tratamientos, esta información nos permite seleccionar factores específicos para mantener mayor control y precisión en la producción acuícola, disminuyendo costos innecesarios y haciendo más accesible e incluso comercial su uso. En este estudio se pretende mediante la modificación de las condiciones de cultivo conocer las respuestas fisiológicas de las microalgas *Scenedesmus obliquus* y *Phaeodactylum tricorutum* seleccionadas con inclinación a la generación de componentes útiles y de alto valor acuícola. Las microalgas mejoradas nutricionalmente se podrán ofrecer como alimento vivo promoviendo la mejora en la supervivencia, desarrollo y calidad de larvas en cultivo, originando en consecuencia una acuicultura más sustentable.

#### **4. Hipótesis**

Las microalgas seleccionadas *Scenedesmus obliquus* y *Phaeodactylum tricornutum* presentaran un perfil nutricional favorable para su empleo en actividades acuícolas, mediante el establecimiento de condiciones de estrés químico durante su cultivo, incrementando su valor nutricional debido a su cambio en la composición bioquímica.

## 5. Objetivos

### 5.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de las condiciones de cultivo y del estrés en las microalgas *Scenedesmus obliquus* y *Phaeodactylum tricornutum* seleccionadas para su mejoramiento en la composición bioquímica y aprovechamiento biotecnológico.

### 5.2 Objetivos específicos

1- Cultivar en condiciones controladas de laboratorio diferentes especies de microalgas marinas (*Dunaliella salina*, *D. tertiolecta*, *T. sueciaca* y *Phaeocactylum tricornutum*) y dulceacuícolas (*Clorella sorokiniana*, *Scenedesmus obliquus* y *P. tricornutum*), evaluando su densidad celular (biomasa) para su análisis bioquímico.

2- Seleccionar las cepas de microalgas con la mayor producción de biomasa (*S. obliquus* y *P. tricornutum*) y determinar su biomasa, composición bioquímica (proteínas, lípidos, carbohidratos y pigmentos) en diferentes fases de crecimiento.

3.- Evaluar la biomasa y composición bioquímica de las microalgas (*Scenedesmus obliquuos* y *Phaeodactylum tricornutum*) cultivadas en diferentes condiciones de estrés para inducir cambios en su perfil nutricional.

## 6. Materiales y métodos

### 6.1 Lugar donde se realizará el estudio

Este estudio se realizó dentro de las instalaciones del Instituto Tecnológico de Boca Del Río; Laboratorio de Alimento Vivo y en el Laboratorio de Investigación en Biotecnología Acuícola.

Figura 3. Fotografía primera entrada del ITBOCA



Instituto Tecnológico de Boca del Río (It Boca, 2023)

Figura 4 Imagen satelital del ITBOCA e instalaciones



Foto Satelital de INEGI (Google Earth, 2023)

## 6.2 Cultivo de microalgas en condiciones controladas.

### 6.2.1 Condiciones normales de cultivo para microalgas y posterior selección por su crecimiento y biomasa.

Se compararon 7 especies de microalgas: 4 marinas: *Tetraselmis suecica*, *Dunaliella salina*, *D. tertiolecta* y *Phaeodactylum tricornutum* y 3 dulceacuícolas: *Scenedesmus obliquus*, *P. tricornutum* y *Chlorella sorokiniana*, en 2 medios distintos de cultivo: Basal Bold y Guillard f/2 (Stein 1979; Andersen, 2005), bajo las mismas condiciones físico químicas a  $18 \pm 2$  °C, (FAO, 2006; Arredondo y Voltolina, 2007) iluminación continua a 2,000 Luxes (FAO, 1996), con aireación constante. Se realizaron conteos diarios con la cámara de Neubauer para establecer curvas de crecimiento, reconociendo las fase logarítmica y estacionaria, en base a su biomasa (cel/mL) correspondiente a cada fase de crecimiento, a partir de matraces de 1 litro con 2 réplicas y 2 repeticiones. Los cultivos se iniciaron a partir de una densidad de  $1 \times 10^6$  cel/mL. Una vez concluida esta parte, se seleccionaron las 2 especies de microalgas que presentaron un mejor rendimiento de biomasa en el medio guillard f/2.

Se utilizaron las microalgas *Scenedesmus obliquus* (CICESE SC01) y *Phaeodactylum tricornutum* 3 y 30 ups (CIBNOOR CIB 41) y agua dulce (CIBNOOR CIB 42) bajo condiciones de cultivo controladas en laboratorio (temperatura constante a  $20 \pm 2$  °C, aireación constante, iluminación de 2000 Luxes sin fotoperíodo), en medio Guillard f2 (Guillard and Ryther 1962, Guillard, 1975; Stein 1979; Andersen, 2005).

Se determinó para las dos especies de microalgas la biomasa (peso seco y densidad celular) por métodos de Arredondo y Voltolina (2007) y su composición bioquímica: pigmentos como clorofilas (Jeffrey y Humphey, 1975), carotenoides totales (Anderson et al., 2006) y fucoxantinas (Motten, 2004); carbohidratos totales por método ácido sulfúrico-uv (López-Legarda et al., 2017), proteínas (Bradford, 1976), lípidos totales (Bligh y Dyer, 1959) ) y porcentaje de inhibición antioxidante (Zahin M. et al., 2013). Los datos fueron evaluados mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía y pruebas post hoc de Tukey ( $P < 0.05$ ).

### 6.2.2 Recuento celular

La biomasa se cuantificó mediante conteo celular directo en cámara de Neubauer, se tomaron muestras de 1 ml con ayuda de una sonda para alimentación prematuro calibre 5 Fr marca Dip-Mac (modelo: DM-731) y se realizó el conteo celular por triplicado usando un microscopio óptico compuesto (Carl Zeiss) y una cámara de Neubauer (Labor Loptik) de acuerdo al protocolo de Arredondo y Voltolina (2007a) con modificaciones de Pérez-Legaspi et al. (2018); para reconocer las fases de crecimiento logarítmica y estacionaria, fue mediante la estimación de su tasa de crecimiento.

Para esto se utilizan principalmente los parámetros poblacionales definidos como velocidad específica de crecimiento, también conocida como tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y el tiempo de duplicación o de generación ( $t_g$ ).

La velocidad específica de crecimiento o tasa de crecimiento ( $\mu$ ) está definida por la siguiente ecuación:  $\mu = dx / dt \cdot 1/x$

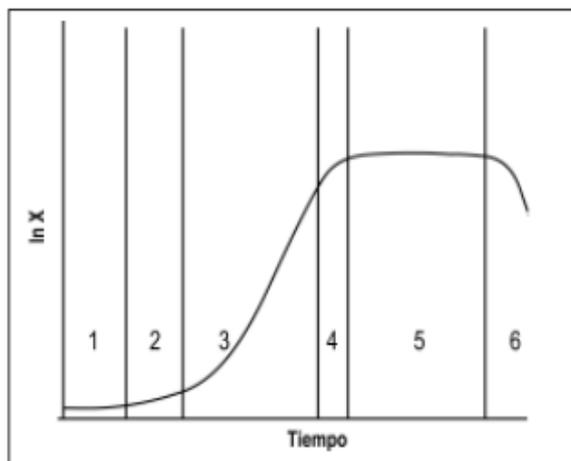
En donde:

$x$  = concentración de la biomasa (número de cél/mL)

$t$  = tiempo en días

En una curva de crecimiento se pueden reconocer las diferentes fases (Vonshak y Maske, 1982).

### Curva de crecimiento



1 fase lag, 2 fase de aceleramiento, 3 fase exponencial, 4 fase de desaceleración, 5 fase estacionaria y 6 fase de muerte. (Arredondo y Voltolina, 2007)

Figura 6. Diagrama representativo de la curva de crecimiento

### 6.2.3 Determinación de Peso seco

Determinación de peso seco (necesario como complemento para la determinación de lípidos). Se utilizó el método descrito en el protocolo propuesto por Arredondo y Voltolina (2007) con ligeras modificaciones por Guzman-Ferman (2013).

1.-Se inició colocando un tubo cónico de 2 ml eppendorf® (por triplicado) a 60°C en una estufa modelo arsa-INCUBADORA, por 24 h.

2.-Posteriormente, se retiró de la estufa, manteniéndolo 30 min en un desecador, permitiendo que se enfriara a temperatura ambiente, se coloca el tubo en una balanza analítica marca Denver Instrument® y se registró su peso, repitiendo este paso 2 veces.

3.-Se tomó una muestra de 500 ml (por duplicado) de medio de cultivo de cada especie de microalga, separando las muestras en alícuotas de 50 ml para

centrifugar (modelo H1650R) en tubos de ensayo cónicos de plástico a 3000 revoluciones por 10 min.

4.-Se retiro el sobrenadante (aproximadamente 40 ml), dejando 10 ml de sobrenadante con la pastilla de biomasa algal para después resuspenderla.

5.-Se coloco en el tubo (en peso constante), 1 ml de muestra concentrada por triplicado.

6.-Una vez seca la biomasa, se pesará el tubo y se registró su peso, mediante la siguiente fórmula:

$$PTBH-PTS=PBH$$

Dónde:

PTBH=Peso del tubo con muestra

PTS=Peso del tubo sin muestra

PBH=Peso de la biomasa húmeda

$$PTBH-PTS=PBH$$

7.-Se introdujo el tubo con la biomasa filtrada en la estufa a 60° C durante 24 h.

8.-Después se mantubo en el desecador por 30 min. Se peso el tubo y se registro el peso.

9.-Se introdujo el tubo a la estufa nuevamente por 2 h y se mantubo en el desecador por 30 min.

10.-Se repitio la operación 1 vez más hasta que alcanzo un peso constante y se registro el peso del tubo en base seca (PMBS).

11.-Por último, se determino el PBS con la siguiente fórmula:

$$PTBS-PTS=PBS$$

Dónde:

PTBS=Peso del tubo en base seca

PTS= Peso del tubo seco

PBS=Peso de la biomasa seca

### 6.3 Determinación de composición bioquímica

#### 6.3.1 Determinación de Proteínas

Para este método la curva de calibración se realizó con albúmina de huevo (Ovalbúmina) Golde Bell Como estándar (tabla 1), utilizando el reactivo de Bradford (Arredondo y Voltolita, 2007), como se señala en el Anexo1.

El procedimiento es el siguiente:

1-Se realizó una curva de calibración de albumina de huevo en NaOH 0.1N a partir de una solución madre de 200 mg/L con las siguientes concentraciones de referencia: 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 100 y 200 mg/L; obteniendo una  $R^2=0.9984$  (figura 26)

2-Apartir del concentrado líquido de microalga se tomaron 2 mL (por triplicado) en tubos de ensaye de cristal.

3.- Para cada replica agregué 5 mL de NaOH a 0.1 N para *P. tricornutum* y 5 mL a 1N para *S. obliquus*, posteriormente se realizó una incubación en baño María CIVEQ® durante 20 minutos a 100 °C.

4.- Después de la incubación se realizaron 2 ciclos de 5 minutos con agua fría en el sonicador BRANSON® 1800 para el rompimiento celular.

5.- Posteriormente, se centrifugó a 10,000 revoluciones a 10 °C por 10 minutos usando una centrifuga (H1650R), se tomó el sobrenadante recuperándolo para su análisis. En otro recipiente y se desecha la pastilla.

6- Se tomo 1 mL de muestra y 5 mL de reactivo de Bradford se espero 5 minutos y se leyo a  $\lambda = 595$  nm en espectrofotómetro de uv-vis (Thermo Scientific Genesys 10-S) (Bradford, 1976; Kruger, 2009; Guzman-Ferman, 2013).

### 6.3.2 Determinación de Carbohidratos por el Metodo ácido sulfúrico-UV

Se realizo una curva de calibración utilizando D-Glucosa anhidra como estándar para determinar la pendiente de carbohidratos (tabla 2 y figura 27).

- 1.- Se tomo diez o veinte mL de muestra de microalga.
- 2.- Se agrego 1 mL de  $H_2SO_4$  1.0 M, manteniéndose a temperatura ambiente.
- 3.- Posteriormente se realizo un ciclo de 5 minutos en el sonicador BRANSON 1800.
- 4.- Una vez sonicada la muestra se agregaron 4 ml de  $H_2SO_4$  1.0 M a cada tubo (En total se tendrán 5 mL de  $H_2SO_4$  1.0 M).
- 5.- Se colocaron los tubos en baño maría a  $100^\circ$  C durante 1 h. Se retiraron los tubos del baño y se dejaron reposar hasta que alcanzaran la temperatura ambiente.
- 6.- Se centrifugo a 4,000 rev por 15 min a  $10^\circ$  C.
- 7.- Se separo el extracto ácido con una micropipeta, cuidando de no resuspender las pastillas, midiendo el volumen total y pasándolo a un tubo de vidrio limpio
- 8.-Se leerán a  $\lambda = 315$  nm, en el espectrofotómetro de uv/vis (Thermo Scientific Genesys 10-S). Usando un blanco preparado del mismo modo, sustituyendo el extracto ácido de la muestra con 1 ml de  $H_2SO_4$  1 M.

Ecuación para la determinación de carbohidratos totales (%) propuesto por Dubois et al. (1956) adaptado Arredondo y Voltolina (2007) para microalgas y con ligeras modificaciones de Guzman Ferman (2013) y Lopez-Legarda et al. 2017):

$$\% \text{ Carbohidratos} = (m \cdot A_{315nm}) / V_m \cdot V_E / P_s \cdot 100$$

Dónde:

$P_s$ =Peso seco

$V_E$ =Volumen extracto ácido

$V_M$ =Volumen de muestra

m= Valor de la pendiente

$A_{315nm}$ = Absorbancia

(Dubois et al. 1956; Arredondo y Voltolina, 2007; Guzman-Ferman, 2013; López-Legarda et al., 2017)

### 6.3.3 Determinación de Lípidos

Extracción de lípidos a partir del método de cloroformo-metanol (1:2) adaptado para microalgas.

1.-Previo a este procedimiento se determino el peso seco y densidad de la muestra, la técnica empleo de 5-50 mg de alga por cada 3 mL de mezcla (cloroformo-metanol). En este caso se emplearon 6 mL de muestras concentrada por triplicado.

2.-Se hizo una mezcla de cloroformo /metanol (1:2 v/v).

3.-Se utilizo tubos de ensaye previamente llevados a peso constante (PMV) para el lípido resultante.

4.- La muestra se coloco en tubos de ensaye donde se llevaran a 3 ciclos de 15 minutos en el sonicador BRANSON 1800.

5.-El sobrenadante se incubo durante 24 horas en refrigeración constante posteriormente se aplicaron otros 3 ciclos de sonicación de 15 min.

6.-Finalmente se centrifugaron a 3000 rev/min por 20 minutos a 4 °C (centrifuga H1650R).

7.- El sobrenadante se coloco en un tubo de ensayo, la pastilla se lavo 2 veces con la mezcla de 1.5 ml de cloroformo metanol, se agregaron 2 ml de agua destilada.

8.- En el tubo de ensayo previamente pesado se agrego la fase superior (cloroformo lípido) y se realizo un segundo lavado con 3 ml de cloroformo metanol a la fase metanol agua, nuevamente se tomo la fase cloroformo lípido y se desecho la fase metanol agua, para unir finalmente ambas fases clorofórmicas.

$$\text{Lípidos (\%)} = 100 \cdot [(PTL - PTV) / P]$$

Dónde:

PTL= Peso del tubo de ensayo con lípido (mg)

PTV= Peso del tubo de ensayo vacío (mg)

P=Peso de la muestra (mg).

(Bligh y Dyer, 1959; Arredondo y Voltolina, 2007; Nuñez, 2008; Guzman-Ferman, 2013).

### **6.3.4 Método de sulfo-fosfovainillina para determinación de lípidos saturados e insaturados**

1.-Preparacion del reactivo (anexo 4)

2.- Se realiza una curva de calibración con aceite de oliva extra virgen en este caso se utilizó (Kirkland) (tabla 4 y figura 29)

3.-Se empleo entre el 1-5 % del extracto de lípidos totales usados para el método gravimétrico, por lo cual se resuspende la muestra en 5 mL de cloroformo y se tomo el volumen equivalente a la concentración o porcentaje, depositándolo en otro tubo de ensayo limpio.

4.-A este extracto se le adiciona 100  $\mu$ L de ácido sulfúrico concentrado y se incubo por 10 minutos (hasta evaporar cloroformo) posteriormente se metio cinco minutos en frío.

5.- Para la lectura se adiciono 2.4 mL del reactivo de sulfo-fosfovainillina (Anexos 4) y en frío 10 min para posterior lectura en espectrofotómetro (GENESYS TM 10S UV-Vis de Thermo Scientific™) a  $\lambda = 734$  nm.

(Bligh y Dyer, 1959; Park et al., 2016)

### **6.3.5 Determinación de ácidos grasos**

Se realizó la derivatización a los lípidos previamente obtenidos de las microalgas cosechadas y concentradas utilizando el protocolo estandarizado por Rosas (2017).

- 1.- Se resuspendió la muestra en 10 mL de cloroformo metanol. Posteriormente se agregó en un vaso de precipitado de 100 mL de cristal.
- 2.- Colocando el vaso sobre una parrilla con agitación baja, a 100 °C, se agregó 30 mL de metanol, 10 mL de agua destilada y 3 pastillas de Hidróxido de potasio.
- 3.- La agitación debe de ser tal que evite o disminuya el burbujeo o ebullición mientras se reduce el volumen a unos 20 mL de sustancia (de ser necesario disminuir o aumentar la temperatura de la parrilla).
- 4.- Se agregó 30 mL de ácido clorhídrico al 3 % en metanol, en esta ocasión se espera obtener cristalizada la muestra una vez que se evaporen los líquidos.
- 5.- Posterior a que se obtienen los cristales se retira el vaso de la parrilla para agregarle 20 mL de agua destilada, resuspendiendo el contenido para verterlo dentro del embudo de separación.
- 6.- En el embudo de separación se agregaron 10 mL de hexano por triplicado, agitando y liberando gases entre cada vertida de hexano.
- 7.- Se desechó la fase inferior (acuosa). La fase superior (orgánica) se introdujo en dos viales de diez mililitros.
- 8.- Finalmente se redujeron los volúmenes a 2 mL de los cuales se toma 1 mL y se agrega 1 mL de hexano grado HPLC en viales de 2 mL para las lecturas.
- 9.- Las lecturas se realizaron en un equipo de cromatografía de gases (PerkimElmer modelo Claurus 580), de manera manual inyectando 2 µL por muestra, para la curva estándar se empleó el estándar denominado FAME (Estér metílico de ácido Graso) Mix C4-C24 a una dilución de 10 mg/mL en cloruro de metileno.

### **6.3.6 Determinación de pigmentos, clorofilas, carotenoides totales y fucoxantinas**

La determinación de pigmentos, clorofilas, carotenoides totales y fucoxantinas se realizaron con los siguientes métodos: Jeffrey y Humphrey (1975), Anderson et al. (2006) y Motten (2004).

- 1.- Se tomaron 10 mL de muestra concentrada por triplicado.

2.- Se dividió la muestra en alícuotas de 1 ml en tubos eppendorf y se centrifugaron (doadlab modelo H1650R) a 3000 revoluciones por 10 minutos a 4°C.

3.-Se desecharon el sobrenadante con una micropipeta, con cuidado de no tocar la pastilla, se agregó 1 ml de acetona al 100 % a cada tubo resuspendiendo la pastilla en el vortex.

4.-Se transfirieron 5 ml del volumen suspendido (1 ml) a los tubos de ensayo limpios (por duplicado), cubriendo con papel aluminio para evitar la foto oxidación. Posteriormente, los tubos de ensayo con muestra, se sónico en baño de hielo por dos ciclos durante 5 min en el sonicador BRANSON 1510 y las muestras se dejaron reposar a 4 °C durante la noche (16h).

5.-Después de 16 h, se sónica 2 ciclos de 5 min nuevamente en las condiciones mencionadas anteriormente.

6.- Se vaciaron del tubo anterior 1 ml a cada tubo eppendorf y se centrifugaron a 3,000 revoluciones por 10 minutos a 4° C, recuperando el sobrenadante con pigmentos con una micropipeta (Science MED) y se colocaron en otro tubo limpio y protegido de la luz.

7.- Si la pastilla presenta pigmentación se agrega 0.5-1mL a cada réplica en conjunto con maceraciones repitiendo el punto 6 y finalmente uniendo el sobrenadante total de manera homogénea.

8.- Las muestras con pigmentos se colocaron en una celda de cuarzo y se leyeron en un espectrofotómetro de uv/vis marca Thermo scientific modelo Genesys 10 S, usando como blanco acetona al 100% a longitudes de onda de 630, 647 y 664 nm para clorofilas y 480 y 510 nm para carotenoides totales y fucoxantina 470, 630, 580y 664 nm.

Se utilizaron las siguientes ecuaciones para determinar clorofilas (Jeffrey y Humphrey, 1975), y carotenoides totales (Strickland y Parsons, 1972) y Fucoxantina (Motten, 2004):

**CLOROFILA a (mg/g alga):**

$$v \times [(11.85 \times A_{664}) - (1.54 \times A_{647}) - (0.08 \times A_{630})] / \text{g alga.}$$

**CLOROFILA b (mg/g alga):**

$v \times [(21.03 \times A_{647}) - (5.43 \times A_{664}) - (2.66 \times A_{630})] / \text{g alga.}$

**CLOROFILA c (mg/g alga):**

$v \times [(24.52 \times A_{630}) - (1.67 \times A_{664}) - (7.60 \times A_{647})] / \text{g alga.}$

**CAROTENOS (mg/g alga):**

$v \times [(7.60 \times A_{480}) - (1.49 \times A_{510})] / \text{g alga.}$

**FUCOXANTINA (mg/L):**

$(A_{470} - 1.239 \times (A_{630} + A_{580}) - 0.3A_{664}) - 0.0275A_{664} / 141$

**6.3.7 Capacidad de inhibición antioxidante por el metodo de Zahin et al., (2013)**

Previamente Se realizo la preparación del reactivo ABT'S (anexo 3) y una curva de calibración con ácido ascórbico (tabla 3 y figura 28).

- 1.-El ABT'S concentrado se diluye a manera de quedar una concentración que nos dé una lectura menor a  $\lambda = 0.700 \text{ nm}$ , utilizando alcohol a 96° como diluyente.
- 2.- Se empleo 1 mL de pigmento (la muestra extraída previamente en la técnica de determinación de pigmentos) con un mínimo de seis replicas, se agrego un mL de alcohol del 96° quedando 1:1 en relación acetona al 80% y alcohol.
- 3.-Previo a la lectura se emplearon 2.850 mL del diluido de ABT'S + 0.150mL del diluido (1:1) de la muestra de pigmentos (acetona+alcohol).
- 4.-Se incuban la muestra y el ABTS por diez minutos y se realiza la lectura en espectrofotómetro de rayos UV-vis a  $\lambda = 0.734 \text{ nm}$

**6.4 Análisis estadístico de resultados**

Analisis multivariado de una via (ANOVA) y pruebas de comparación múltiple "post hoc" de Tukey con un valor de  $p < 0.05$ . Se utilizo el paquete estadístico STATISTICA V.7.0 para windows.

## 6.5 Condiciones de cultivo estresantes

Para inducir cambios en la composición bioquímica en las microalgas, se realizó un modelo experimental para probar el efecto de la restricción de nutrientes (Nitrógeno y Fosforo) y/o intensidad lumínica de 14,000 luxes como factor de estrés en estas microalgas, como se muestra en la figura 5. Dicho estresor permitirá el mejor aprovechamiento de los nutrientes en el medio y una mayor eficiencia costo beneficio para la producción de microalgas. Posteriormente se realizaron los análisis bioquímicos correspondientes.

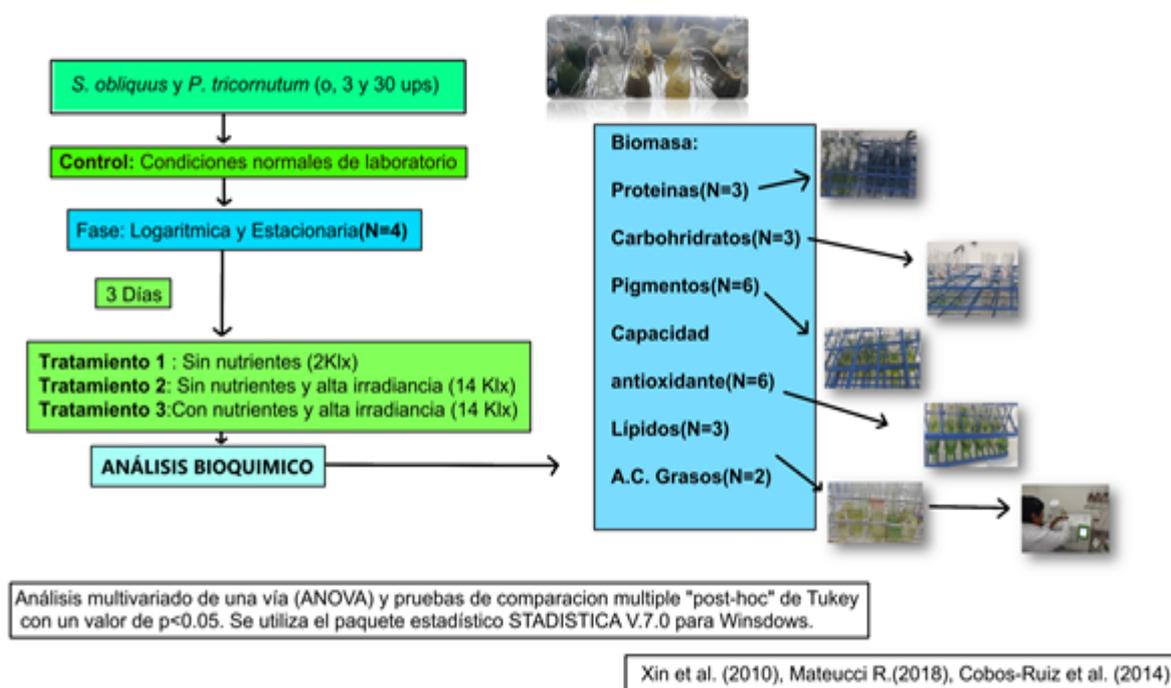


Figura 5. Modelo Experimental y análisis bioquímico.

## 6.6 Diseño Experimental

Para las condiciones control se empleó el medio Guillard f/2, 2 Klx, iluminación (24/0) y aireación continua a  $18 \pm 2$  °C de temperatura.

Las condiciones de estrés que se aplicaron en el estudio fueron:

- 1.- Tratamiento 1: Sin nutrientes

Se realizó un medio de cultivo normal Guillard f/2, se cosecho en la fase seleccionada de cultivo (Logarítmica o estacionaria) concentrando la biomasa en la centrifuga con tubos de 50 ml a 2000 revoluciones por 10 minutos, descartando el sobrenadante y utilizando agua destilada sin nutrientes se sustituye el medio en el matraz de 1000 ml resuspendiendo la microalga y exponiendo a las mismas condiciones previamente mencionadas (aireación constante, 2000 Luxes,  $18 \pm 2$  C°) y monitoreando el cultivo mediante conteo celular cada 24 horas hasta finalmente cosechar al tercer día para su posterior análisis concentrándola en 2 tubos.

## 2.-Tratamiento 2: Sin nutrientes y alta irradiancia.

Se toma la muestra en el día seleccionado acorde a la fase de crecimiento (Logarítmica o estacionaria), aplicando la restricción de nutrientes en lugar del medio de cultivo, para exponer durante 3-5 días a 14000 luxes; manteniendo los demás parámetros de manera similar (aireación constante,  $18 \pm 2$  C°), se realizó en fase logarítmica y estacionaria el conteo celular cada 24 horas hasta el día de la cosecha para determinar la cantidad de células por mililitro.

## 3.-Tratamiento 3: Alta irradiancia

A diferencia de las dos condiciones antes mencionadas en esta se tomó el cultivo de microalgas con el mismo sobrenadante (medio de cultivo Guillard) y se expuso en fase logarítmica y estacionaria a estrés lumínico 14 Klx durante 3 días monitoreando la cantidad de cel/ml, por conteo celular hasta el día de la cosecha y posteriormente se realizaron los ensayos bioquímicos correspondientes.

## 7. Resultados

Para el crecimiento celular se obtuvieron mejores resultados en el medio Guillard f/2 que el medio Basal Bold (figura 7- 14), en las graficas posteriores se señalo con un marcador de color rojo la fase logaritmica y un marcador de color negro la fase estacionaria seleccionada.

### 7.1 Curvas de crecimiento evaluadas para la selección de cepas y medio de cultivo

La mayor cantidad de cel/mL en *D. salina* (Figura 7) en fase log se obtuvo en el medio guillar seleccionandose el día 4 con 3.4 ( $10^6$ cel/ml) y en fase estacionaria el día 7 con 10.4 ( $10^6$ cel/ml).

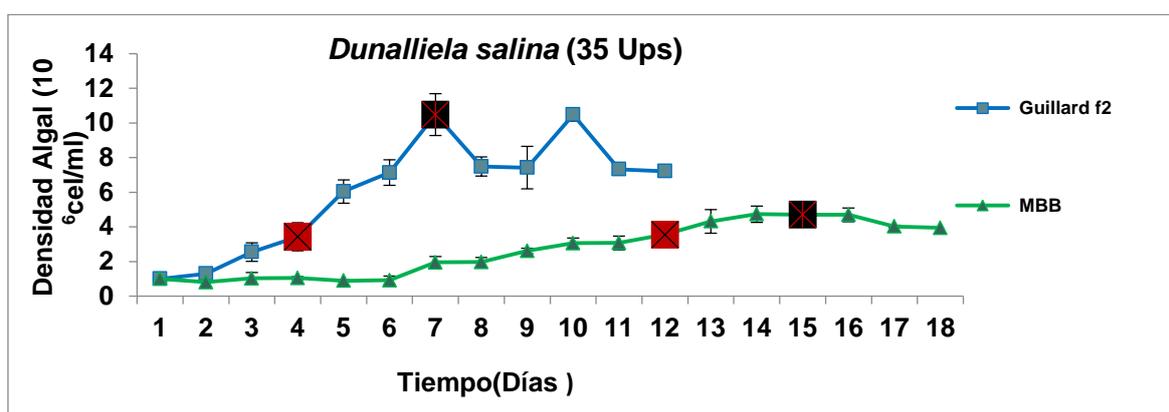


Figura 7. Curva de crecimiento entre medio Guillard f/2 y medio Basal Bold *D. salina*.

La mayor cantidad de cel/mL en *D. tertiolecta* (Figura 8) en fase log se obtuvo en el medio guillar seleccionándose el día 5 con 2.41 ( $10^6$ cel/ml) y en fase estacionaria con 4.95 ( $10^6$ cel/ml).

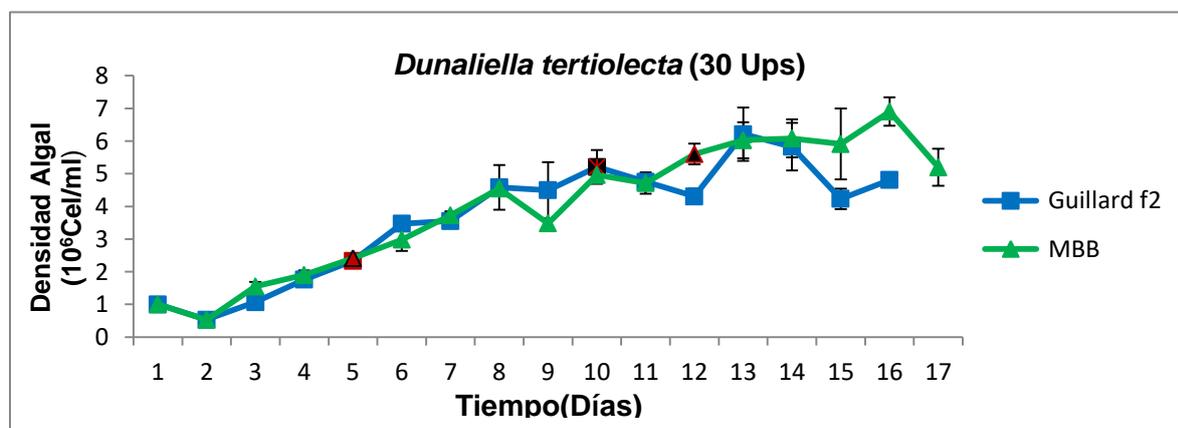


Figura 8. Curva de crecimiento entre medio Guillard f/2 y medio Basal Bold *D. tertiolecta*.

En *T. suecica* (Figura 9) la mayor cantidad de células se encontró en medio guillard f/2 y se seleccionó el día 10 para la fase logarítmica con  $3.39 \times 10^6$  cel/ml y para la fase estacionaria el día 13 con  $4.84 \times 10^6$  cel/ml.

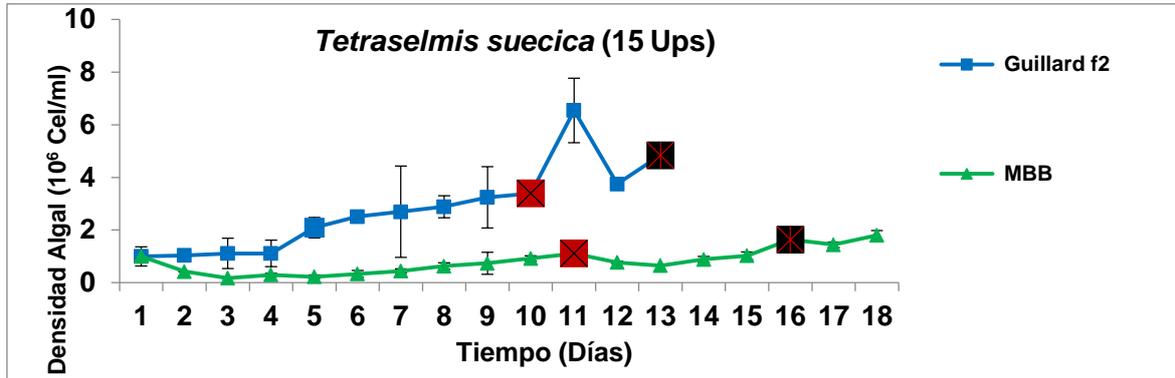


Figura 9. Curva de crecimiento entre medio Guillard f/2 y medio Basal Bold *Tetraselmis suecica*.

En *P. tricornutum* a 30 ups (Figura 10) se encontró un mejor crecimiento en medio guillard y se seleccionó el día 6 para la fase logarítmica con  $12.7 \times 10^6$  cel/ml y para la fase estacionaria el día 9 con  $17.23 \times 10^6$  cel/ml.

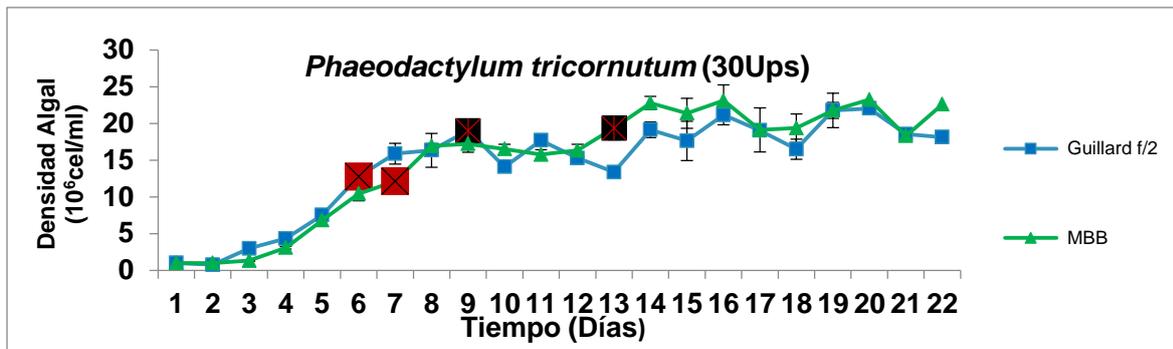


Figura 10. Curva de crecimiento entre medio Guillard f/2 y medio Basal Bold *P. tricornutum* 30 ups

Para *P. tricornutum* a 3 ups (Figura 11) se encontro mejor desarrollo en medio Guillard f/2 y se selecciono para la fase logarítmica el día 5 con 16.84 ( $10^6$ cel/ml) y para la fase estacionaria el día 9 con 25.49 ( $10^6$ cel/ml).

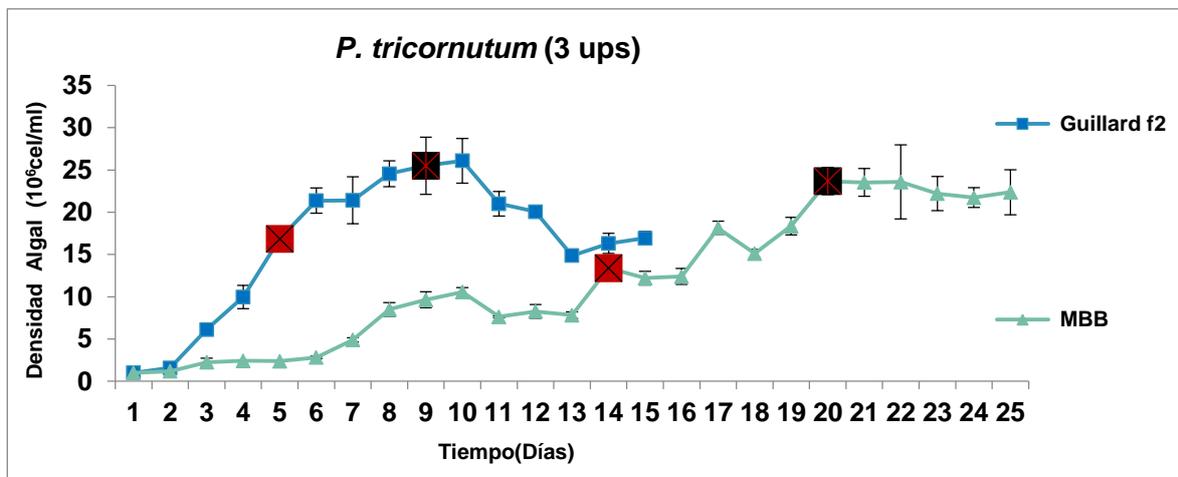


Figura 11. Curva de crecimiento entre medio Guillard f/2 y medio Basal old *P. tricornutum* 3 ups.

Para *P. tricornutum* a 0 ups (Figura 12) se encontro mejor desarrollo en medio Guillard f/2 y se selecciono para la fase logarítmica el día 9 con 12.49 ( $10^6$ cel/ml) y para la fase estacionaria el día 12 con 13.63 ( $10^6$ cel/ml).

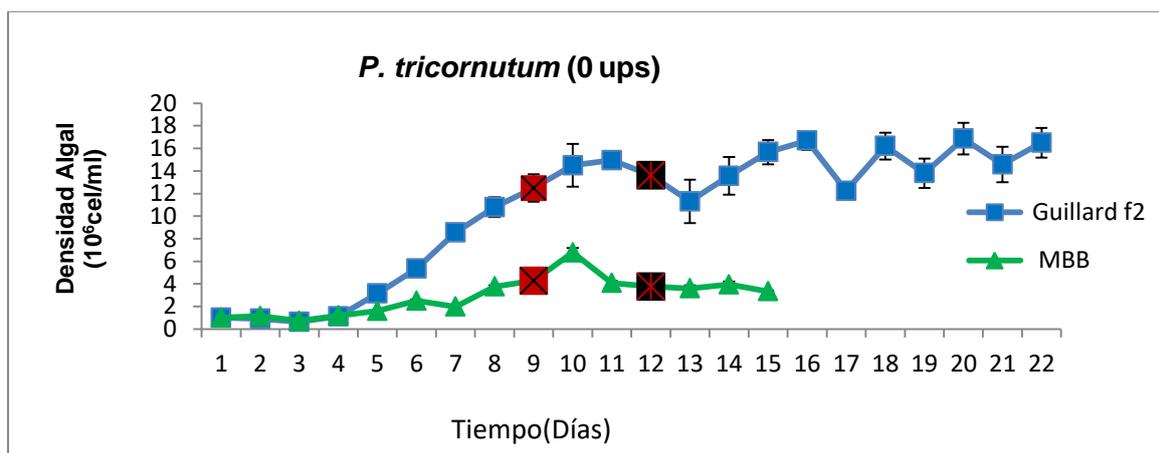


Figura 12. Curva de crecimiento entre medio Guillard f/2 y medio Basal Bold *P. tricornutum* 0 ups.

En el caso de *S. obliquus* (Figura 13) se encontro mejor desarrollo en el medio Guillard f/2 y se selecciono para la fase logarítmica el día 5 con 8.83 ( $10^6$ cel/ml) y para la fase estacionaria el día 10 con 17 ( $10^6$ cel/ml).

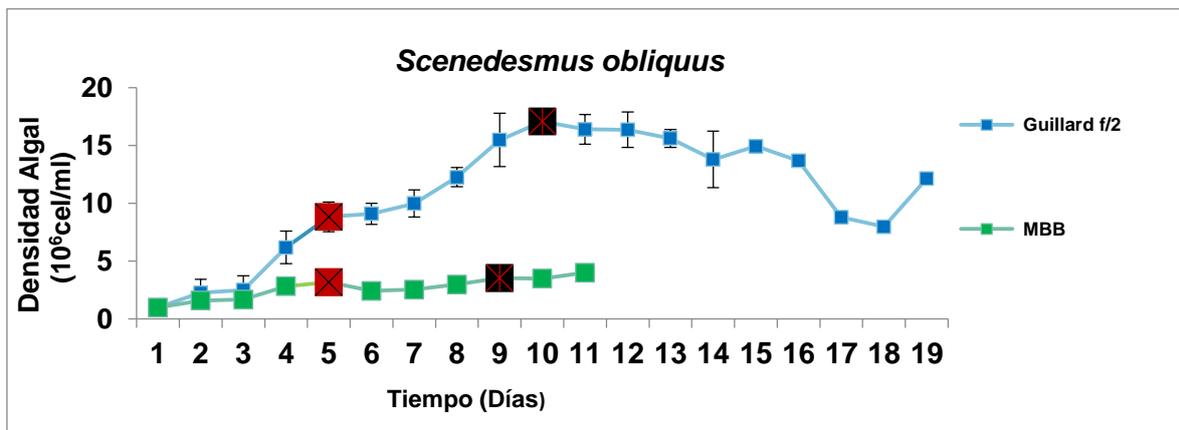


Figura 13. Curva de crecimiento entre medio Guillard f/2 y medio Basal Bold en *S. obliquus*.

Y finalmente en *C. sorokiniana* (Figura 14) se encontro mejor desarrollo en el medio Guillard f/2 y se selecciono para la fase logarítmica el día 6 con 3.2 ( $10^6$ cel/ml) y para la fase estacionaria el día 10 con 13.48 ( $10^6$ cel/ml).

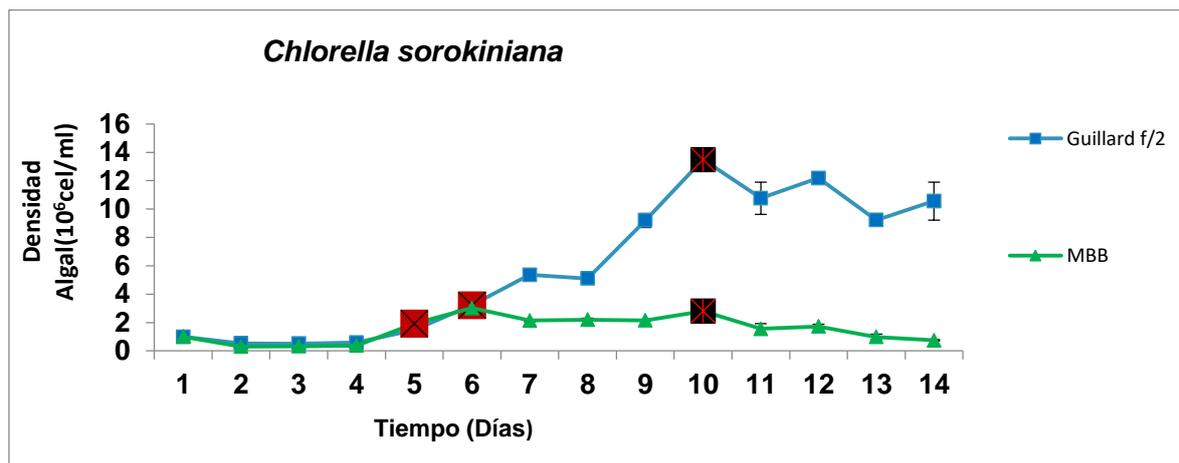


Figura 14. Curva de crecimiento entre medio Guillard f/2 y medio Basal Bold en *C. sorokiniana*.

## 7.2 *Scenedesmus obliquus*

Se selecciono *S. obliquus* por su rápido crecimiento, fácil manejo y propiedades nutricionales para la aplicación de los tratamientos (Figura 15), para el crecimiento celular se observaron los mejores resultados en el control para la fase Log con un máximo de 15.49 ( $10^6$ cel/ml) y en T1 en Est con 27.31 ( $10^6$ cel/ml).

### 7.2.1 Curva de crecimiento

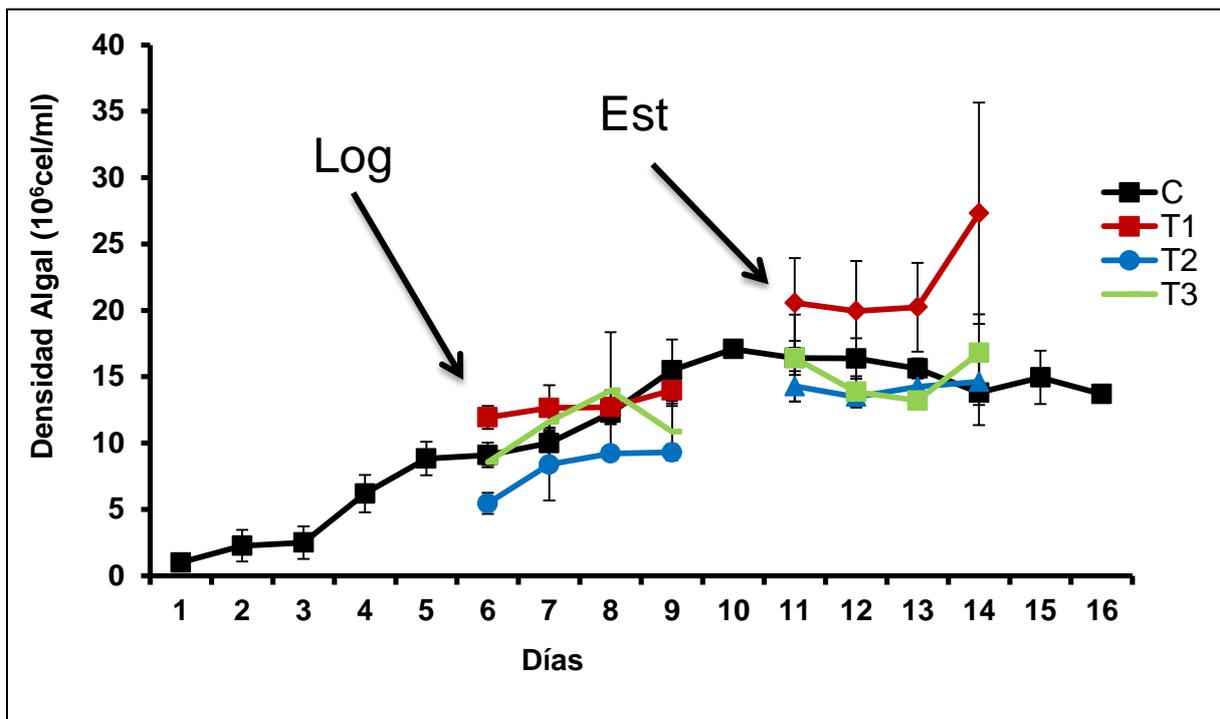


Figura 15. Curva de Crecimiento y aplicación de tratamientos en fase Log (Logarítmica) y Est (Estacionaria). Se empleó la biomasa del día 6 para realizar los tratamientos en la fase logarítmica y la biomasa del día 11 para los tratamientos de la fase estacionaria.

### 7.2.2 Peso Seco

El contenido más alto en fase log se obtuvo en T3 con 61.33 g/L y en fase estacionaria en el control con 94.5 g/L como se puede observar en la siguiente tabla (Tabla 6).

Tabla 6. Contenido total de peso seco (g/L) en *S. obliquus* en dos fases de cultivo.

| <b>Peso seco</b>          | <b><i>S. obliquus</i></b> |             |
|---------------------------|---------------------------|-------------|
|                           | Log                       | Est         |
| Control                   | 34.9±10.83                | 94.5±14.4   |
| Tratamiento 1             | 37.22±0.83                | 55.44±1.41  |
| Tratamiento 2             | 38.11±15.27               | 75.05±6.69  |
| Tratamiento 3             | 61.33±1.69                | 86.05±0.53  |
| <b>Peso de una célula</b> | <b>ng/cel</b>             |             |
|                           | Log                       | Est         |
| Control                   | 36.56±27.58               | 34.53±45.3  |
| Tratamiento 1             | 26.63±7.12                | 20.29±1.69  |
| Tratamiento 2             | 40.96±252.67              | 51.33±38.43 |
| Tratamiento 3             | 56.50±7.95                | 51.22±1.84  |

### 7.2.3 Contenido de proteínas

El contenido más alto de proteínas (Figura 16) se encontró en la fase logarítmica en T1 con 14.86% con diferencias significativas con el T3.

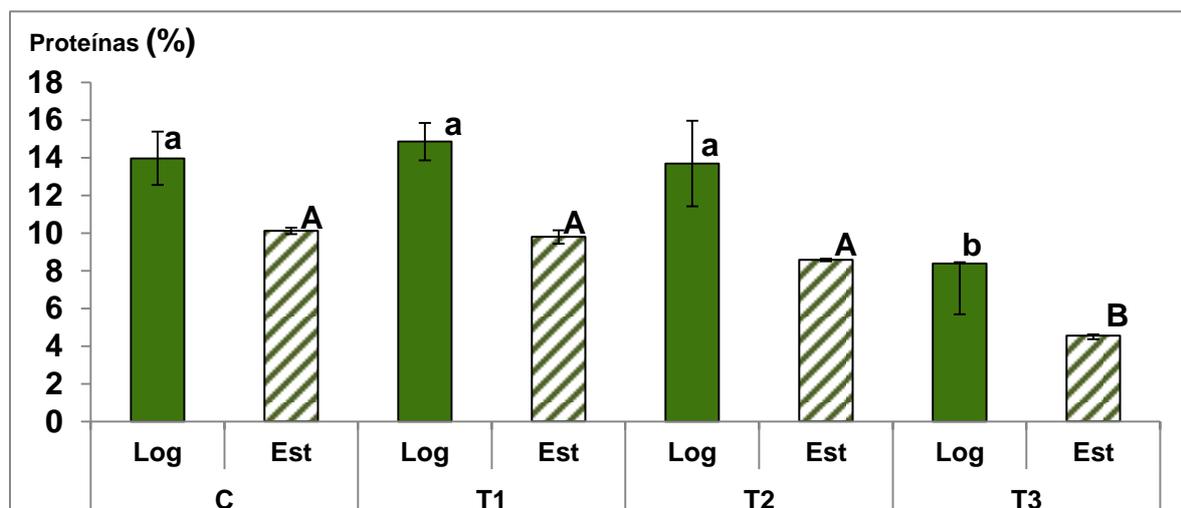


Figura 16. Contenido total de proteínas en *S. obliquus* en ambas fases de cultivo. C (Control), T1 (Sin nutrientes), T2 (Sin nutrientes + 14 Klx), T3 (14 Klx). Letras distintas indican diferencias significativa entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

### 7.2.4 Contenido de carbohidratos

El contenido más alto de carbohidratos (Figura 17) se encontró en la fase Est en el control con 23 % y diferencias significativas con los tratamiento.

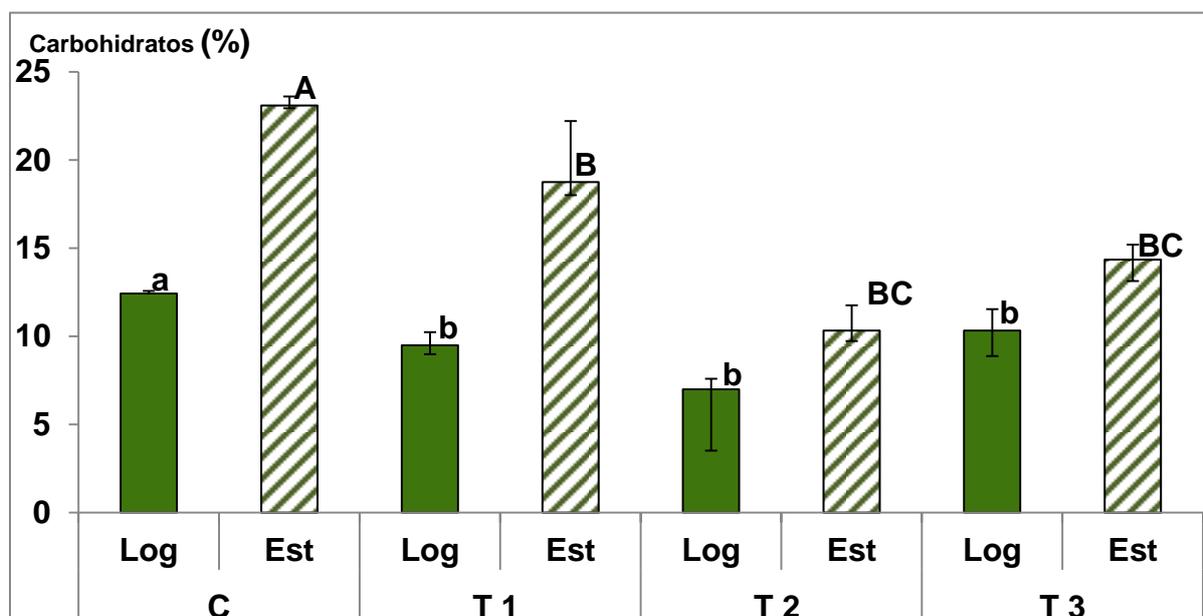


Figura 17. Contenido total de carbohidratos en *S. obliquus* en diferentes fases de cultivo. Letras distintas indican diferencias significativa entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

### 7.2.5 Contenido de lípidos totales

El contenido más alto de lípidos totales (Figura 18) se registro en la fase logarítmica en T1 con 59.77 % y diferencias significativas con el control.

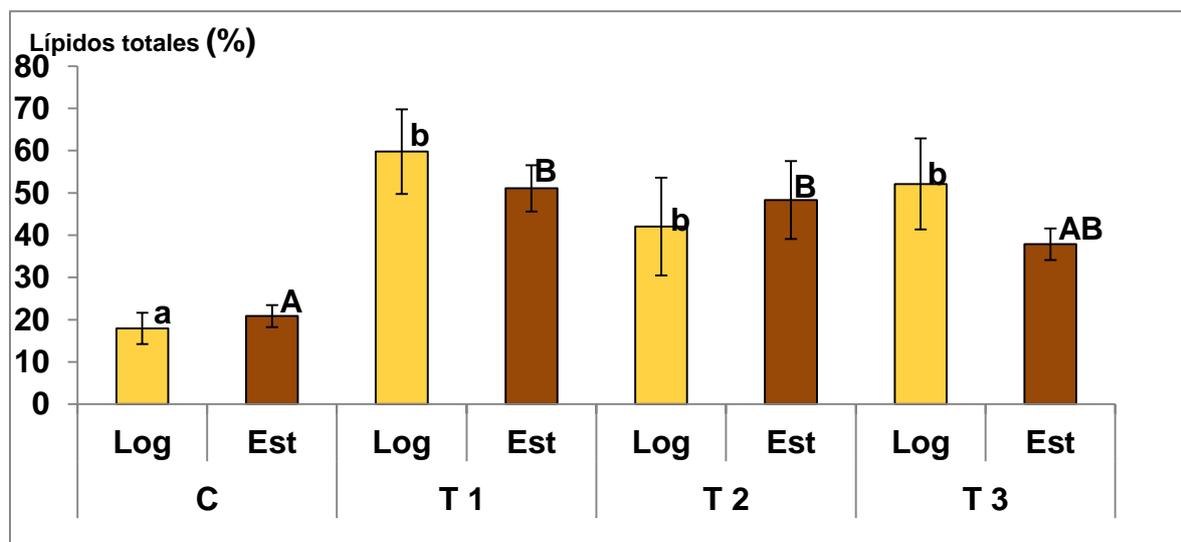


Figura 18. Lípidos totales en *S. obliquus* en condiciones normales y tres tratamientos encontrándose diferencias significativas en cada fase de cultivo. C (Control), T1 (Sin nutrientes), T2 (Sin nutrientes + 14 Klx), T3 (14 Klx). Letras distintas indican diferencias significativa entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

### 7.2.6 Contenido de lípidos Insaturados

El contenido más alto de lípidos insaturados (Figura 19) se registro en la fase Est en T2 con 80.7% y diferencias significativas con C y T3.

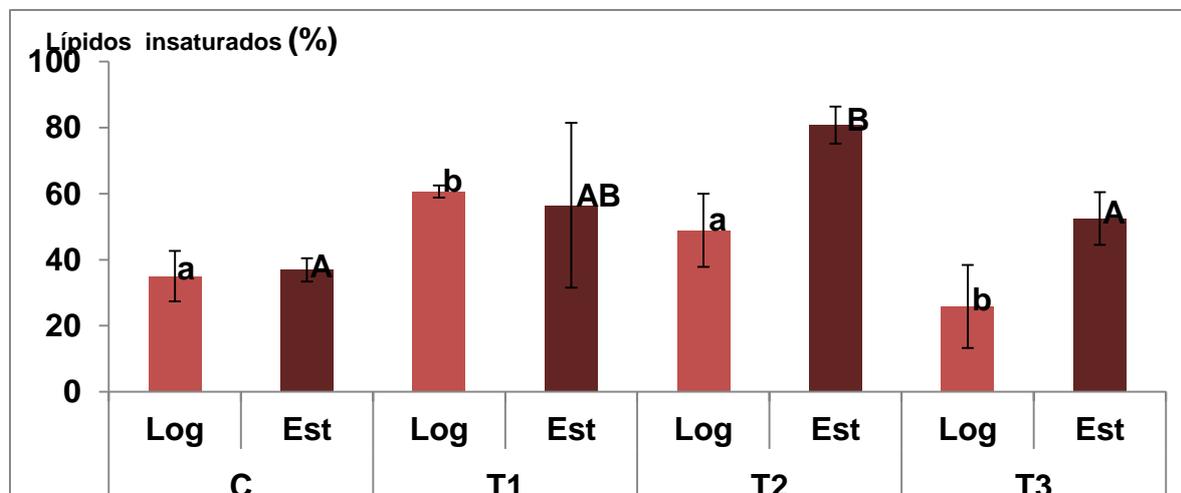


Figura 19. Contenido de lípidos insaturados por el método de sulfo-fosfovainillina en *S. obliquus* bajo en dos fases de cultivo. C (Control), T1 (Sin nutrientes), T2 (Sin nutrientes + 14 Klx), T3 (14 Klx). Letras distintas indican diferencias significativa entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

### 7.2.7 Contenido de ácidos grasos ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) en condiciones control. Replicas(N=3)

Se encontró una mayor concentración de ac. grasos en la fase Est de los cuales los más altos son el Butirico con 4845  $\mu\text{g}/\text{mg}$  y Erucico con 3870  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , como se puede apreciar en la siguiente tabla (Tabla 7).

Tabla 7. Contenido total de ácidos grasos en *S. obliquus* en dos fases de crecimiento.

| <b><i>S. Obliquus</i></b> |                       | <b>(<math>\mu\text{g}/\text{mg}</math>)</b> |                       |
|---------------------------|-----------------------|---|-----------------------|
| <b>Nombre comun</b>       | <b>Estructura</b>     | <b>Log</b>                                  | <b>Est</b>            |
| <b>Saturados (C)</b>      |                       |   |                       |
| Butirico                  | 4:0                   | 3012.831 $\pm$ 2638.22                      | 4845.11 $\pm$ 4233.43 |
| Caproico                  | 6:0                   | 0.0076 $\pm$ 0.0043                         | 1.763 $\pm$ 3.022     |
| Caprilico                 | 8:0                   | 0.044 $\pm$ 0                               |                       |
| Palmitico                 | <b>16:0</b>           | 1.064 $\pm$ 1.064                           | 0.0035 $\pm$ 0.0028   |
| Behenico                  | 22:0                  |   | 0.001 $\pm$ 0         |
| Lignocerico               | 24:0                  |   | 0.1154 $\pm$ 0        |
| Total                     |                       | 3013.946                                    | 4846.991              |
| <b>Monoinsaturados</b>    |                       |   |                       |
| Cis-10 pentadecanoico     | 15:1                  | 2.6 $\pm$ 0                                 | 215.05 $\pm$ 61.03    |
| Palmitoleico              | <b>16:1 n-7</b>       |   | 0.0035 $\pm$ 0.0029   |
| Elaidico                  | <b>18:1 n-9 trans</b> | 0.0023 $\pm$ 0                              |                       |
| Erucico                   | 22:1 n-9              | 101.5 $\pm$ 0                               | 3870 $\pm$ 2168       |
| Total                     |                       | 104.08                                      | 4085.02               |
| <b>Poliinsaturados</b>    |                       |   |                       |
| Docosadienoico            | 22:2                  | 0.04 $\pm$ 0                                |                       |
| <b>Omega 6</b>            |                       |   |                       |
| Linoléico                 | <b>18:2n-6</b>        | 0.227 $\pm$ 0                               |                       |
| Total                     |                       | 0.2633                                      |                       |

### 7.2.8 Contenido de pigmentos $\mu\text{g/mL}$

Los valores más altos (Figura 20) se encontraron en el control en la fase log principalmente la clorofila "a" con  $36.93 \mu\text{g/mL}$ .

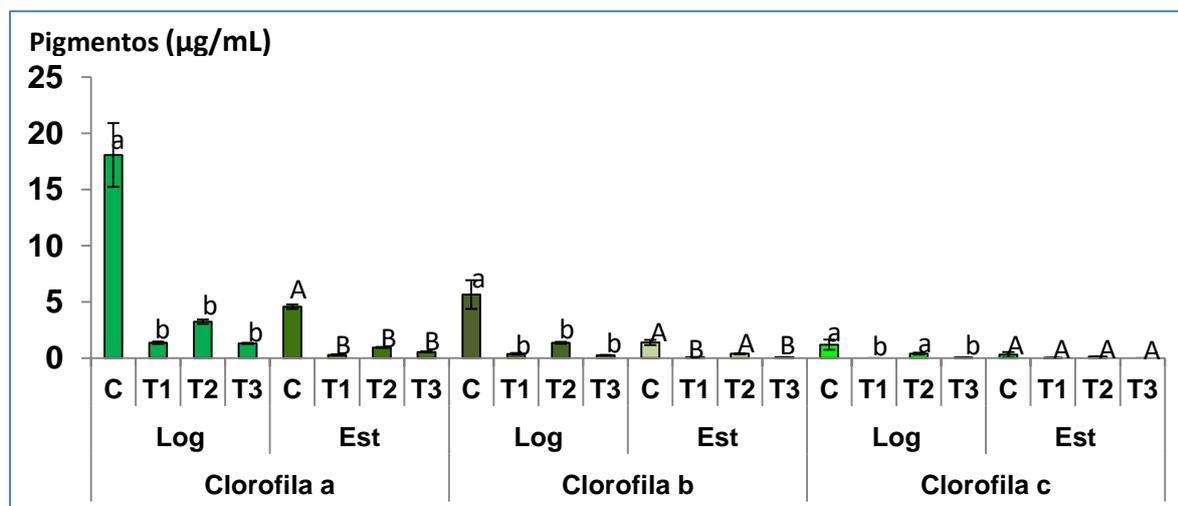


Figura 20. Clorofilas totales en *S. obliquus* en condiciones control y tratamientos en dos fases de cultivo con diferencias significativas. C (Control), T1 (Sin nutrientes), T2 (Sin nutrientes + 14 Klx), T3 (14 Klx). Letras distintas indican diferencias significativa entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

Para el contenido de carotenos y fucoxantina (Figura 21) los mejores resultados en la fase Log en el control con  $6.95 \mu\text{g/mL}$  en carotenos y  $8 \mu\text{g/mL}$  en fucoxantina.

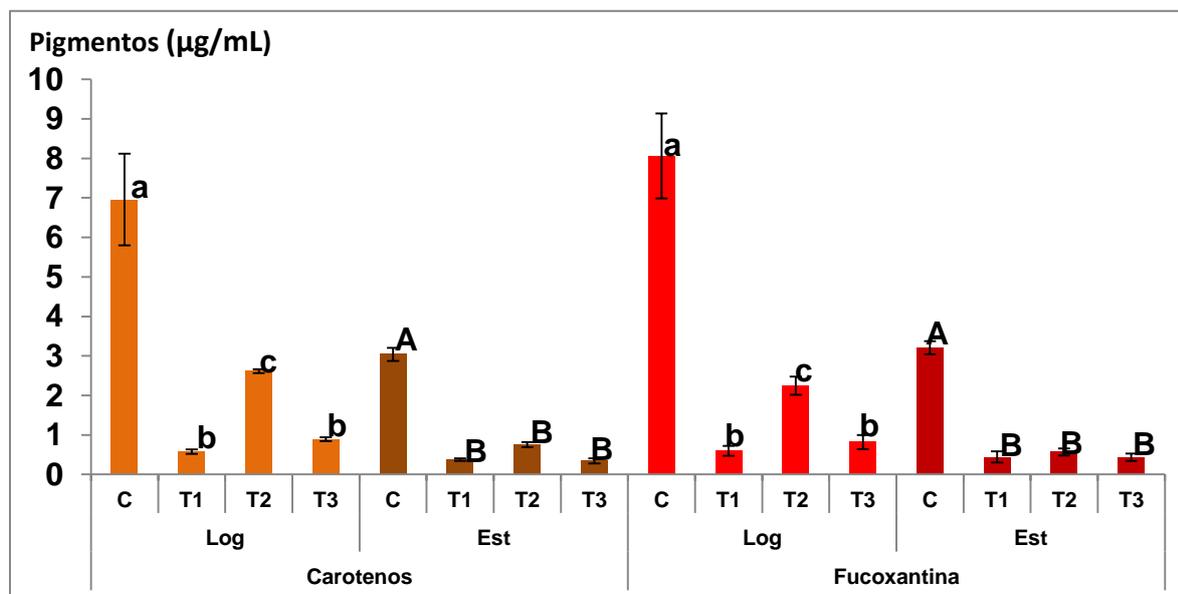


Figura 21. Carotenos y fucoxantinas totales de *S. obliquus* en dos fases de cultivo. C (Control), T1 (Sin nutrientes), T2 (Sin nutrientes + 14 Klx), T3 (14 Klx). Letras distintas indican diferencias significativa entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

### 7.2.9 Capacidad de Inhibición antioxidante

El contenido más alto de capacidad de inhibición antioxidante (Figura 22) se encuentra en la fase estacionaria en el control con 40% con diferencias significativas con T1.

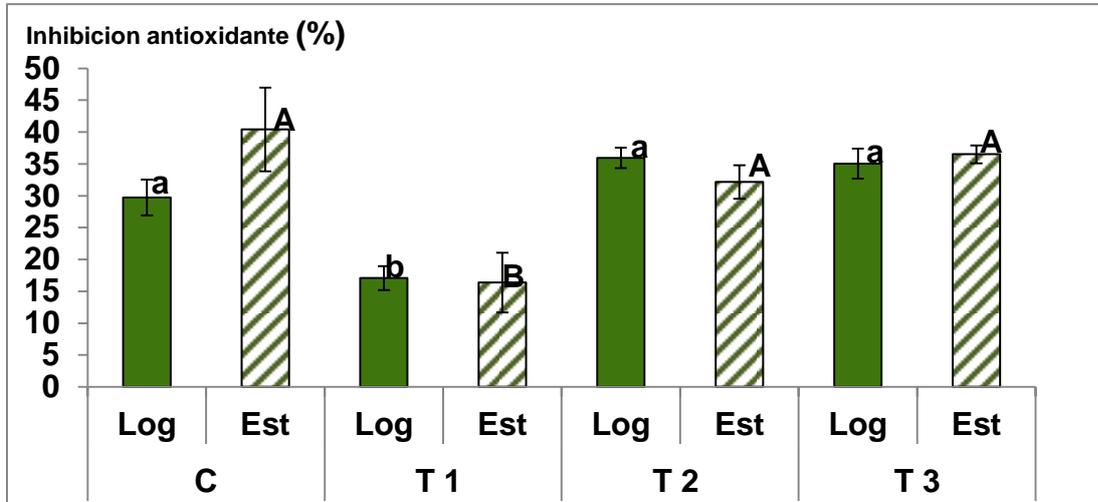


Figura 22. Capacidad total de inhibición antioxidante en *S. obliquus* en dos fases de cultivo. C (Control), T1 (Sin nutrientes), T2 (Sin nutrientes + 14 Klx), T3 (14 Klx). Letras distintas indican diferencias significativa entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

### 7.3 *Phaeodactylum tricornutum*

Esta es la segunda microalgas que se empleo para los análisis bromatológicos por sus cualidades y fácil manejo.

#### 7.3.1 Curvas de crecimiento

En el crecimiento celular *P. tricornutum* a 0 ups (Figura 23) se encontro los mejores resultados en el control tanto en la fase Log con 14.49 ( $10^6$ cel/ml) como en la fase Est con 15.66 ( $10^6$ cel/ml).

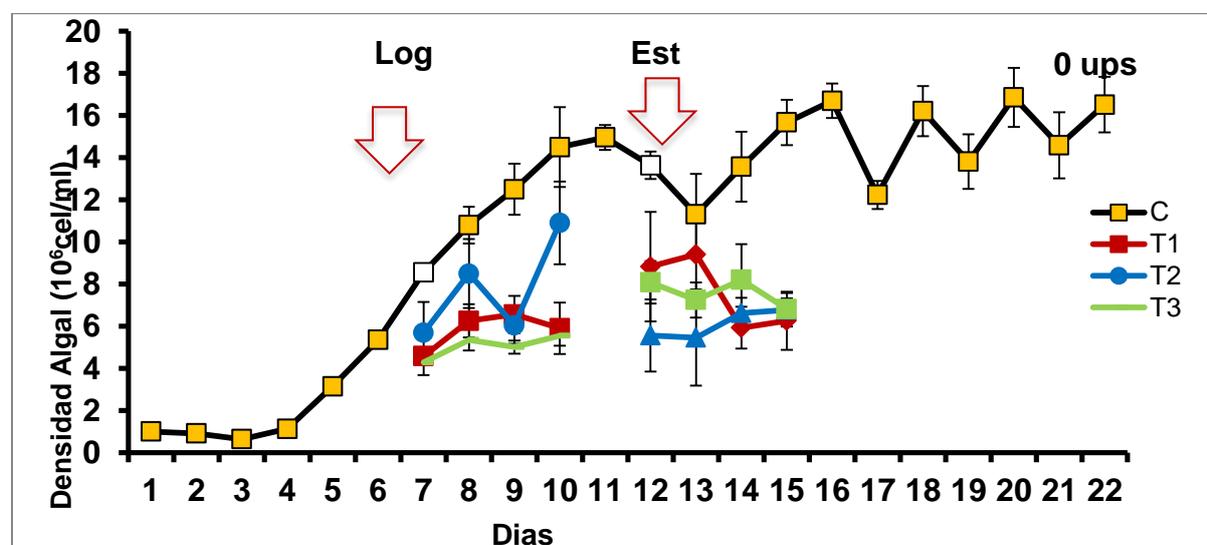


Figura 23. Curva de crecimiento *P. tricornutum* (0 ups) en condiciones control definiendo las fases de cultivo para la aplicación de tratamientos. Se empleo la biomasa del día 7 para aplicar los tratamientos en fase logarítmica y del día 12 para los de fase estacionaria.

En *P. tricornutum* a 3 ups (Figura 24) el valor más alto para la fase Log se encontro en el control con 26 ( $10^6$ cel/ml) y para la fase Est en T1 con 18.68 ( $10^6$ cel/ml).

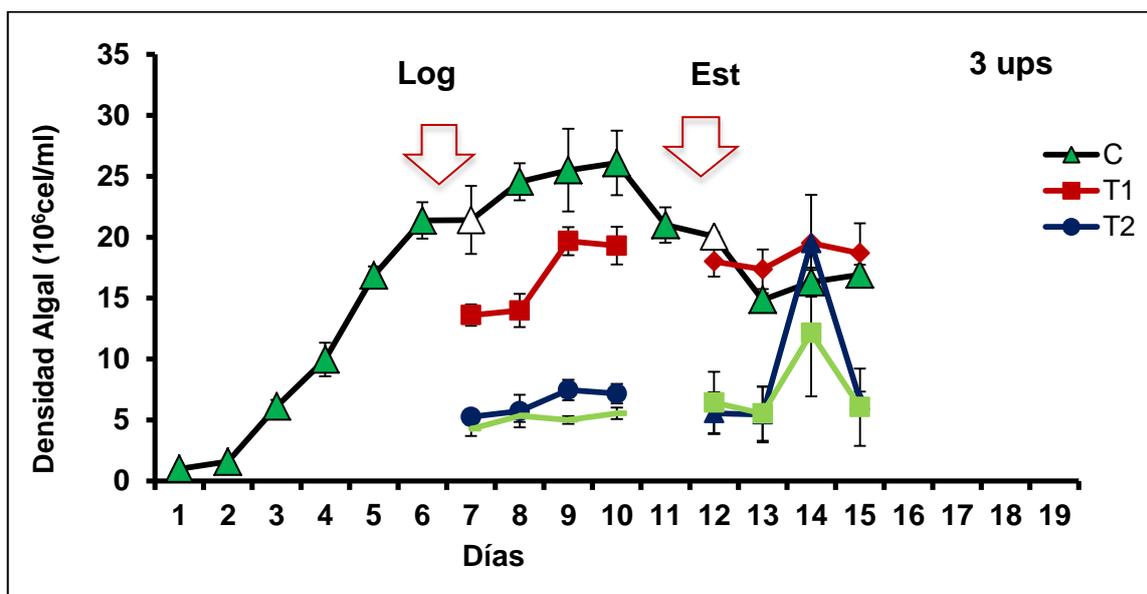


Figura 24. *P. tricornutum* (3 ups) en condiciones control definiendo las fases de cultivo para la aplicación de los tratamientos. Se empleó la biomasa del día 7 para la aplicación de los tratamientos en fase logarítmica y del día 10 para la fase estacionaria.

En *P. tricornutum* a 30 ups (Figura 25) se encontro los valores más altos en T1 para la fase Log con 21.8 ( $10^6$ cel/ml) y en fase Est con 19.94 ( $10^6$ cel/ml).

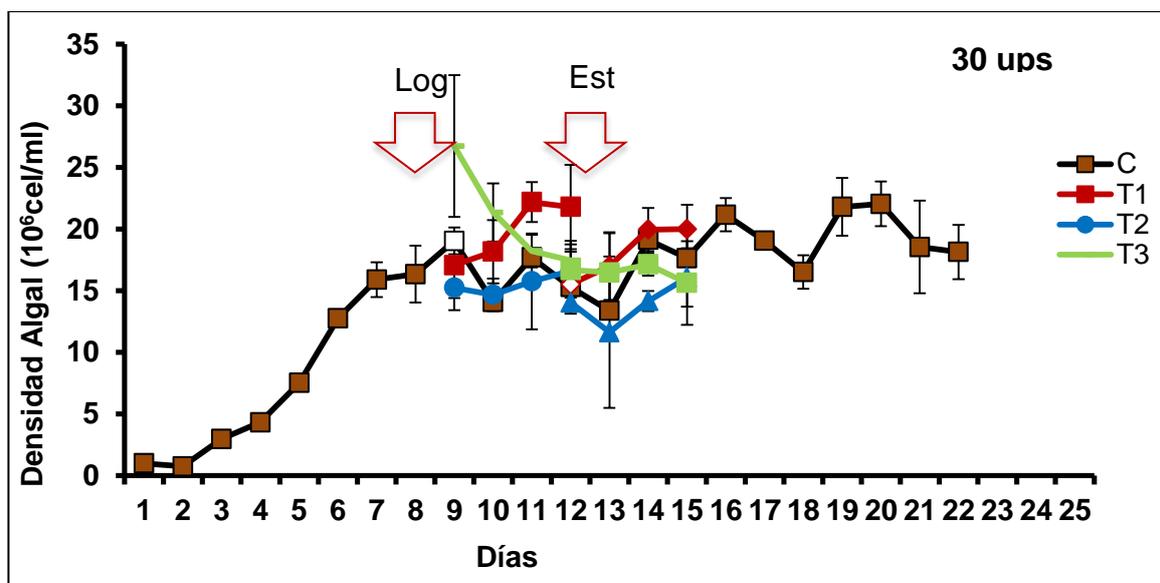


Figura 25. *P. tricornutum* (30 ups) Curva de crecimiento en condiciones control seleccionando las fases de cultivo donde se aplicaran los tratamientos. Se empleó la biomasa del día 9 para los tratamientos en la fase logarítmica y del día 12 para los de fase estacionaria.

### 7.3.2 Peso seco

Los valores más altos de peso seco se encontraron en *P. tricornutum* a 30 ups en fase Log con 376.16 g/L y en fase Est en T3 con 350.83 g/L, como se puede observar en la siguiente tabla (Tabla 8).

Tabla 8. Contenido total de peso seco en *P. tricornutum* a 0, 3 y 30 ups en dos fases de cultivo.

| Peso seco                   |      |             |              |
|-----------------------------|------|-------------|--------------|
| <i>P. tricornutum</i> 0 ups |      |             |              |
| Tipo                        | Fase | g/L         |              |
|                             |      | Log         | Est          |
| C                           |      | 49.45±11.99 | 59.8±16.43   |
| T1                          |      | 19.55±9.36  | 26.05±4.66   |
| T2                          |      | 30.94±5.03  | 38.27±16.65  |
| T3                          |      | 21.38±2.33  | 35.94±1.64   |
| Peso de una célula 0 ups    |      |             |              |
| Tipo                        | Fase | ng/cel      |              |
|                             |      | Log         | Est          |
| Control                     |      | 34.16±73.14 | 32.18±46.34  |
| T1                          |      | 33.15±76.62 | 41.67±33.81  |
| T2                          |      | 28.38±25.65 | 56.54±208.76 |
| T3                          |      | 38.56±49.37 | 52.78±32.58  |
| Peso seco                   |      |             |              |
| <i>P. tricornutum</i> 3 ups |      |             |              |
| Tipo                        | Fase | g/L         |              |
|                             |      | Log         | Est          |
| C                           |      | 72.4±8.70   | 118.44±7.60  |
| T1                          |      | 76.55±1.78  | 81.33±7.80   |
| T2                          |      | 60.66±4.19  | 69.88±6      |
| T3                          |      | 39±1.52     | 45.38±3.56   |
| Peso de una célula 3 ups    |      |             |              |
| Tipo                        | Fase | ng/cel      |              |
|                             |      | Log         | Est          |
| C                           |      | 52.93±69.03 | 45.46±26.61  |
| T1                          |      | 39.66±11.51 | 43.52±31.88  |
| T2                          |      | 84.65±53.22 | 105.51±83.27 |
| T3                          |      | 55.19±9.3   | 74.98±11.22  |

|                       |      |               |
|-----------------------|------|---------------|
| Peso seco             |      |               |
| <i>P. tricornutum</i> |      | 30 ups        |
| Tipo                  | Fase | g/L           |
|                       | Log  | Est           |
| C                     |      | 29.1±7.54     |
| T1                    |      | 376.16±47.2   |
| T2                    |      | 315.61±32.74  |
| T3                    |      | 365.16±2.72   |
|                       |      | 65.2±2.89     |
|                       |      | 301.5±11.02   |
|                       |      | 345.38±14.48  |
|                       |      | 350.83±7.52   |
| Peso de una célula    |      |               |
| 30 ups                |      |               |
| Tipo                  | Fase | ng/cel        |
|                       | Log  | Est           |
| C                     |      | 16.78± 17.43  |
| T1                    |      | 172.52±138.05 |
| T2                    |      | 190.12±150.94 |
| T3                    |      | 209.05±17.27  |
|                       |      | 29.38±0.904   |
|                       |      | 150.78±55.34  |
|                       |      | 21.48±61.14   |
|                       |      | 224.48±22.22  |

### 7.3.3 Contenido de proteínas (%)

El valor más alto de proteínas (Figura 26) se encontró en el control a 0 ups con 21.5 % y diferencias significativas con los tratamientos.

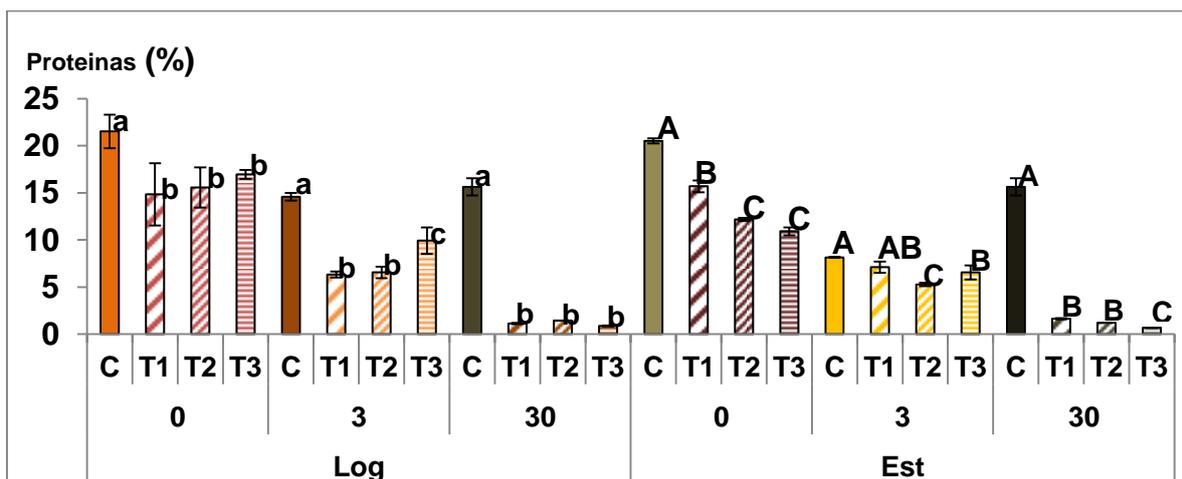


Figura 26. Contenido de proteínas totales en *P. tricornutum* (0, 3 y 30 ups) en dos fases de cultivo. C (Control), T1 (Sin nutrientes), T2 (Sin nutrientes + 14 Klx), T3 (14 Klx). Letras distintas indican diferencias significativa entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

### 7.3.4 Contenido de carbohidratos (%)

El valor más alto de carbohidratos (Figura 27) se encontró a 30 ups en fase log en T2 con 23.82% y diferencias significativas con T1 y T3.

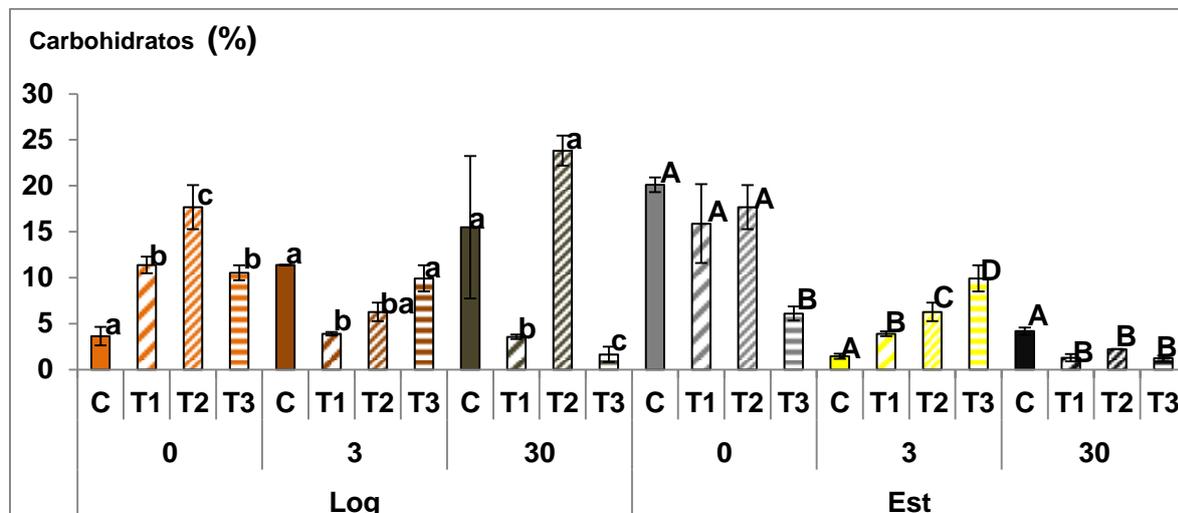


Figura 27. Carbohidratos totales en *P. tricornutum* (0, 3 y 30 ups) en dos fases de cultivo. C (Control), T1 (Sin nutrientes), T2 (Sin nutrientes + 14 Klx), T3 (14 Klx). Letras distintas indican diferencias significativa entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

### 7.3.5 Contenido de lípidos totales (%)

El contenido más alto de lípidos totales (Figura 28) se encontró en fase Est a 0 ups en T1 con 51.36% y diferencias significativas con el control.

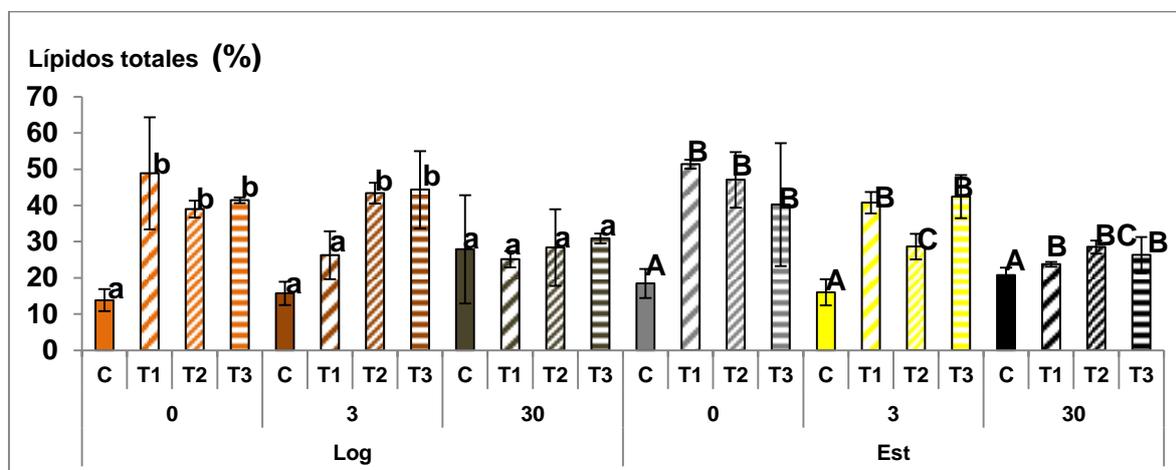


Figura 28. Lípidos totales en *P. tricornutum* (0, 3 y 30 ups) en diferentes fases de cultivo. C (Control), T1 (Sin nutrientes), T2 (Sin nutrientes + 14 Klx), T3 (14 Klx). Letras distintas indican diferencias significativa entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

### 7.3.6 Contenido de lípidos Insaturados

El contenido más alto de lípidos insaturados (Figura 29) se encontró en fase Log a 0 ups en T1 con 81% y diferencias significativas con los tratamientos y el control.

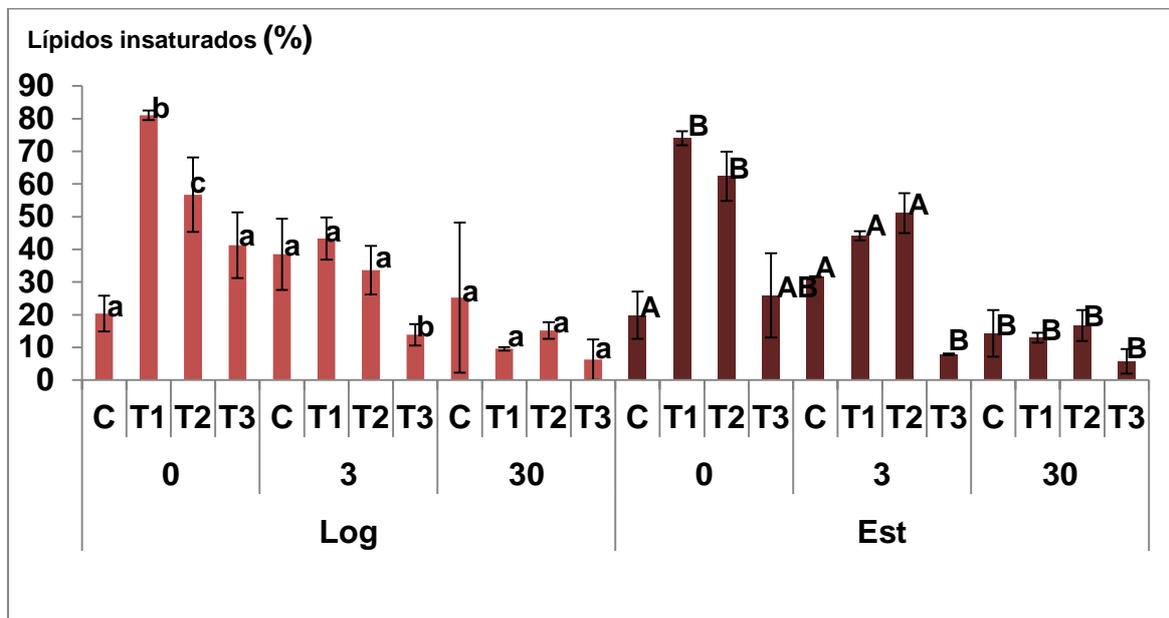


Figura 29. Determinación de lípidos insaturados por el método de sulfofosfovainillina en *P. tricornutum* (0, 3 y 30 ups) en dos fases de cultivo. C (Control), T1 (Sin nutrientes), T2 (Sin nutrientes + 14 Klx), T3 (14 Klx). Letras distintas indican diferencias significativa entre tratamientos (p < 0.05).

### 7.3.7 Contenido de ácidos grasos

Se encontro más ac. grasos en 0 ups en fase Log con 17 y en cantidad a 3 ups en fase Est hasta 10, 647 µg/mg seguido por el acido Butirico hasta 10, 635.55 µg/mg3 ups en fase Log como se observa en la siguiente tabla (Tabla 9).

Tabla 9. Contenido de cada ácido graso encontrado en muestras de lípidos totales de *P. tricornutum* a 0, 3 y 30 ups en fase logarítmica y estacionaria de condiciones control.

| <i>P. tricornutum</i> |            | 0 (ups)        |                 | 3 (ups)           |               | 30 (ups)     |                |
|-----------------------|------------|----------------|-----------------|-------------------|---------------|--------------|----------------|
| Ac. Grasos (µg/mg)    | Estructura | Log            | Est             | Log               | Est           | Log          | Est            |
| <b>Saturados C</b>    |            |                |                 |                   |               |              |                |
| Butirico              | 04:00      | 2974.65±4205.7 | 1085.45±1428.27 | 10635.55±1340.658 | 852.41±1086.7 | 4128.6 ±5839 | 4186.53±5909.1 |
| Caproico              | 06:00      |                |                 | 0.03±0.005        | 0.0077±0.0033 | 0.0245±0     | 0.0292±0.04    |
| Caprilico             | 08:00      | 0.00024±0      |                 |                   |               |              | 0.0103±0       |
| Tridecanoico          | 13:00      |                |                 |                   |               | 0.000864±0   |                |
| Miristico             | 14:00      | 4.1 E-06±0     | 1861.6±2632.44  |                   |               |              | 34.88±505      |
| Pentádecanoico        | 15:00      | 0.00084±0      |                 |                   |               |              | 34.88±505      |
| Palmitico             | 16:00      | 0.000235±0     | 0.3144±0        |                   |               |              | 0.0004±0.1     |
| Heptadecanoico        | 17:00      | 4867.21±0      | 8619.44±0       |                   | 10647.2±0     | 0.078±0      |                |
| Esteárico             | 18:00      |                |                 |                   |               |              | 0.0135±0       |
| Heneicosanoico        | 21:00      |                |                 |                   |               |              | 98.61±0        |
| Tricosanoico          | 23:00      | 0.05±0         |                 | 0.061±0           |               |              |                |
| Lignocérico           | 24:0       | 4900±0         | 0.17±0          |                   |               |              |                |
| Total                 |            | 12742          | 11567           | 10636             | 11499.6       | 4128.7       | 4434.6         |
| <b>Monosaturados</b>  |            |                |                 |                   |               |              |                |
| Miristoleico          | 14:01      |                | 1862±2632       |                   | 0.0007±0      | 35.85±0      | 0.00457±0.001  |

|                        |                          |              |          |           |            |              |                |
|------------------------|--------------------------|--------------|----------|-----------|------------|--------------|----------------|
| Cis-10 pentadecanoico  | 15:01                    | 4.96±5.54    | 1.2±0    | 2.8±0     | 8.73±3.53  | 175.525±0    | 0.7335±1.03    |
| cis- 10 heptadecanoico | 17:01                    | 71.31±100.8  | 2.23±0   | 12.52±1.6 | 5164±6935  | 171.815±0    | 2741.4±3846.7  |
| <b>Omega 9</b>         |                          |              |          |           |            |              |                |
| Oleico                 | 18:1 n-9                 |              |          |           |            |              | 1382.31±0      |
| Erúcico                | 22:1 n-9                 | 0.04±0       |          |           |            |              |                |
| <b>Omega 7</b>         |                          |              |          |           |            |              |                |
| Palmitoleico           | 16:1 n-7                 | 0.38±0       | 0.71±0   | 0.96±0    | 1.252±1.53 | 517.0±727.34 | 30.93±36.72    |
| Linoleadico            | 18:02                    | 0.00027±0    |          |           |            |              |                |
| Total                  |                          |              | 77       | 1866.4    | 16.27      | 5174.25      | 900.24 4155.37 |
| <b>Poliinsaturados</b> |                          |              |          |           |            |              |                |
| <b>Omega 6</b>         |                          |              |          |           |            |              |                |
| cis-11, 14 eico        | 20:02                    | 6.08±0       |          |           |            |              |                |
| Gama linolenico        | 18:3 n-6                 | 0.0006±0     |          |           |            |              |                |
| cis-8, 11, 14          | 20:3 n-6                 | 5.0515E-05±0 |          |           |            |              |                |
| metil cis-5, 8         | 20:4 n-6                 | 0.000235±0   | 3723±0   |           |            |              |                |
| Total                  |                          | 0.0009       | 3723     |           |            |              |                |
| <b>Omega 3</b>         |                          |              |          |           |            |              |                |
| cis-4,7,10,13,         | 22:6n3                   |              | 0.0101±0 |           |            | 3.83±0       | 0.21±0         |
| Total                  |                          | 0.00088      | 3723.01  |           |            | 3.83         | 0.21           |
| <b>Trans</b>           |                          |              |          |           |            |              |                |
| Linolelaidico          | trans,trans-18:2,n-6,n-9 |              |          |           |            | 1±0          | 0.01±0         |
| Total                  |                          |              |          |           |            | 1            | 0.01           |

### 7.3.8 Pigmentos totales (µg/mL)

#### Clorofila a

Se encontró una mayor concentración de clorofila “a” (Figura 30) en fase Log a 3 ups en el control con 4 µg/mg con diferencias significativas con los tratamientos.

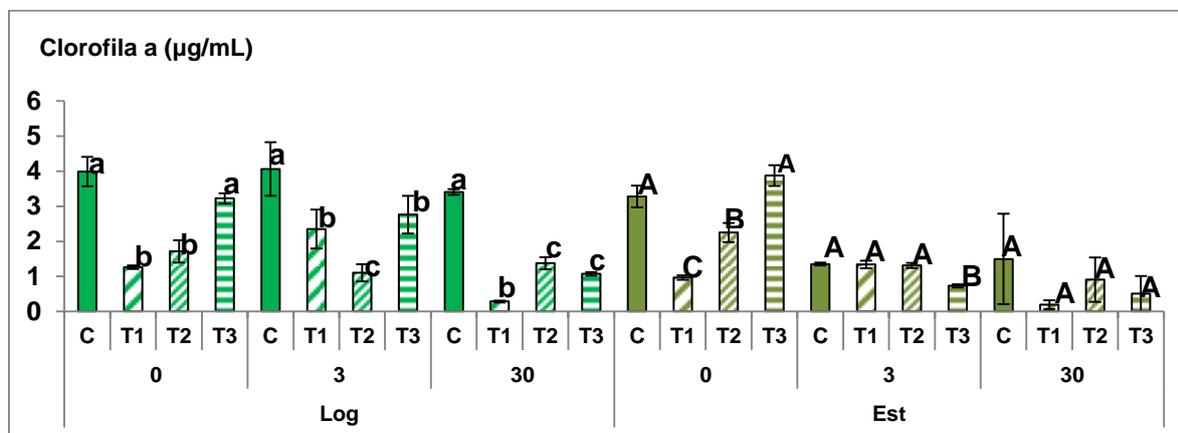


Figura 30. Clorofila “a” en *P. tricornutum* (0, 3 y 30 ups) en dos fases de cultivo. C (Control), T1 (Sin nutrientes), T2 (Sin nutrientes + 14 Klx), T3 (14 Klx). Letras distintas indican diferencias significativa entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

#### Clorofila b

El contenido más alto de clorofila “b” (Figura 31) se encontro en fase Est a 0 ups en T2 con 2.25 µg/mg y diferencias significativas con C y T1 y T3.

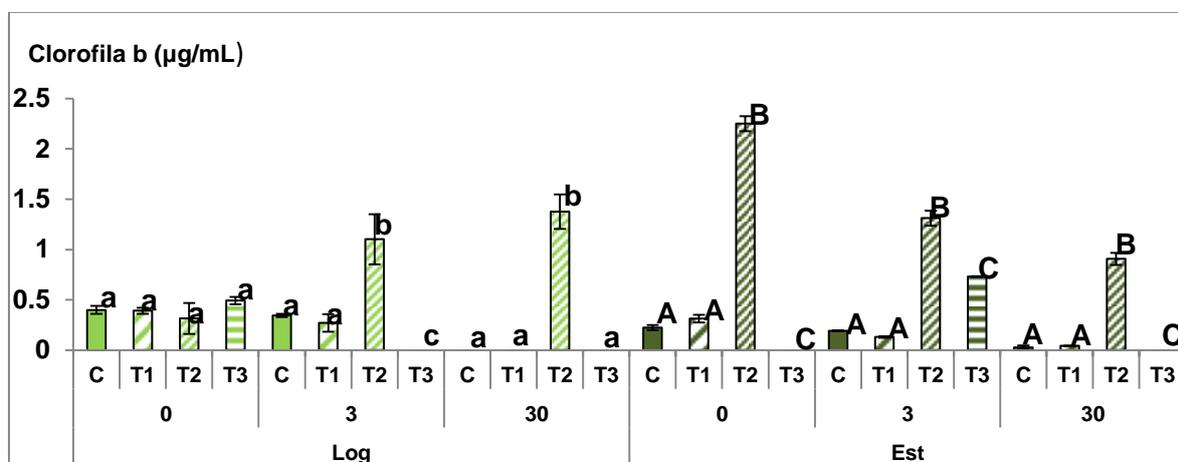


Figura 31. Contenido total de clorofila “b” en *P. tricornutum* (0, 3 y 30 ups) en dos fases de cultivo. C (Control), T1 (Sin nutrientes), T2 (Sin nutrientes + 14 Klx), T3 (14 Klx). Letras distintas indican diferencias significativa entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

### Clorofila c

El mayor contenido de clorofila “c” (Figura 32) se encontro en la fase Log en el control a 0 ups con 0.83 µg/mg con diferencias significativas con T1 y T2.

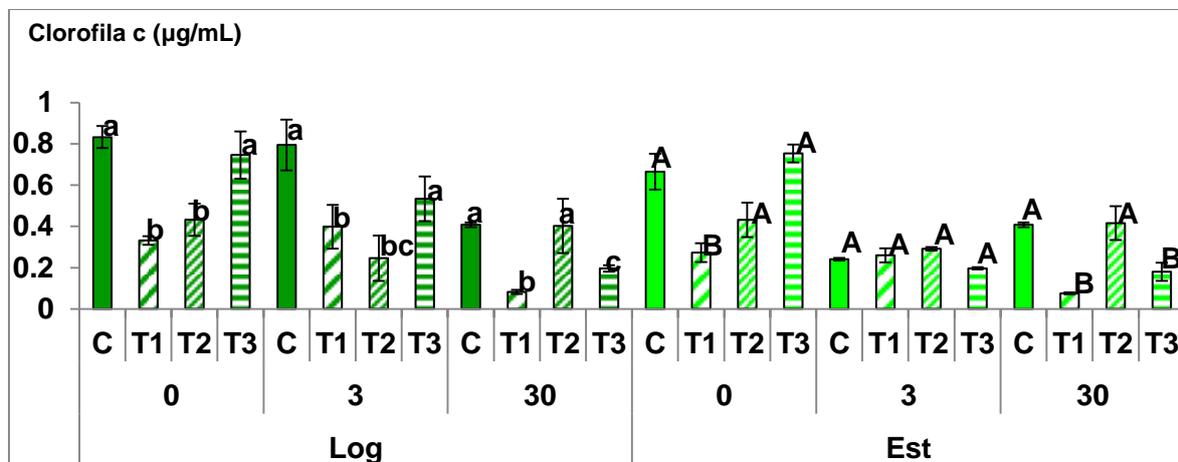


Figura 32. Contenido total de clorofila “c” en *P. tricornutum* (0, 3 y 30 ups) en dos fases de cultivo. C (Control), T1 (Sin nutrientes), T2 (Sin nutrientes + 14 Klx), T3 (14 Klx). Letras distintas indican diferencias significativa entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

### Carotenos

El contenido más alto de carotenos (Figura 33) se encontro en el control a 0 ups con 3.81 µg/mg y diferencias significativas con T1 y T2.

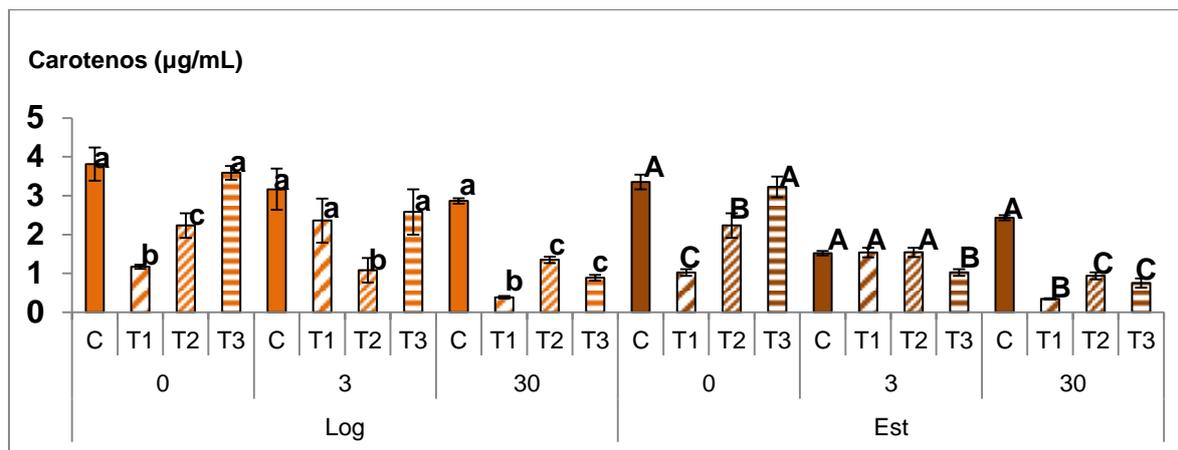


Figura 33. Contenido de carotenos totales en *P. tricornutum* (0, 3 y 30 ups) en dos fases de cultivo. C (Control), T1 (Sin nutrientes), T2 (Sin nutrientes + 14 Klx), T3 (14 Klx). Letras distintas indican diferencias significativa entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

## Fucoxantinas

El contenido más alto de fucoxantina (Figura 34) se encontro en fase Log en el control a 0 ups con 3.68 µg/mL y diferencias significativas con T1 y T2.

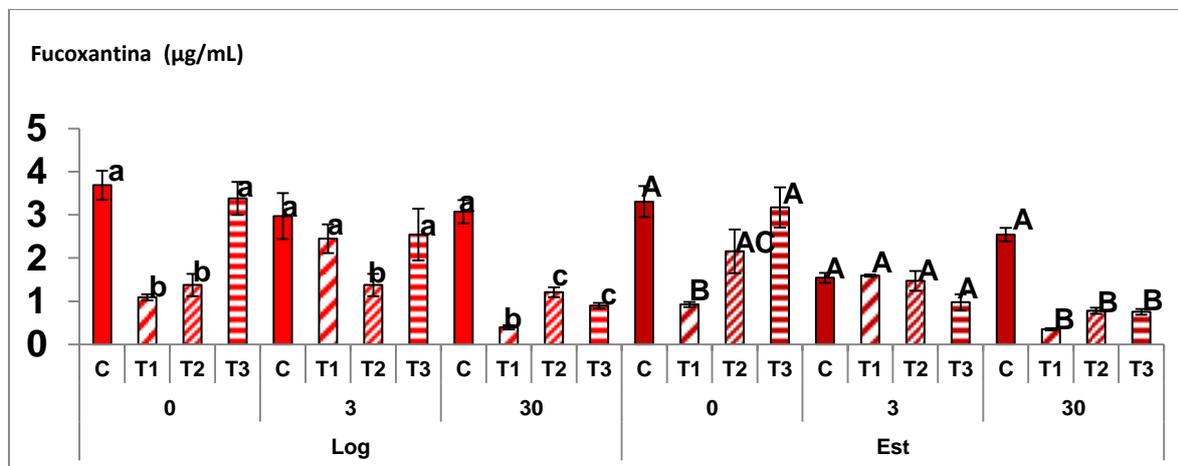


Figura 34. Contenido total de fucoxantina en *P. tricornutum* (0, 3 y 30 ups) en dos fases de cultivo. C (Control), T1 (Sin nutrientes), T2 (Sin nutrientes + 14 Klx), T3 (14 Klx). Letras distintas indican diferencias significativa entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

## 7.3.9 Contenido de capacidad de inhibición antioxidante (%)

El contenido más alto se encontro en fase Log a 30 ups (Figura 35) en T3 con 82.5 % y diferencias significativas con C, T1 y T2.

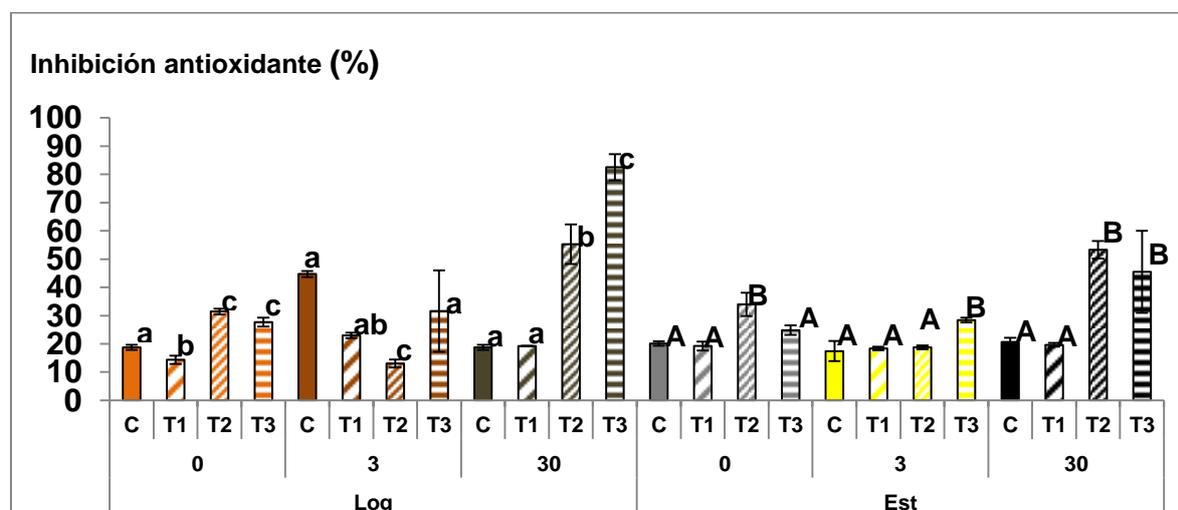


Figura 35. Capacidad de inhibición antioxidante en *P. tricornutum* (0, 3 y 30 ups) en distintas fases de cultivo. C (Control), T1 (Sin nutrientes), T2 (Sin nutrientes + 14 Klx), T3 (14 Klx). Letras distintas indican diferencias significativa entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

## 9. Discusión

El crecimiento de las especies que se cultivaron a pesar de iniciar con la misma cantidad de inóculo ( $1 \times 10^6$  cél/mL), presentaron desarrollos dispares pero con similitudes en el Medio Basald Bold en las microalgas de agua salada con un rango de 1.6-23( $1 \times 10^6$  cél/mL) y en microalgas de agua dulce 2.8-3.7 ( $1 \times 10^6$  cél/mL) entanto a bajos rendimientos en comparación con el medio Guillard f/2 donde en agua salada 4.9-25.4 ( $1 \times 10^6$  cél/mL) mientras que en agua dulce 13.4-17( $1 \times 10^6$  cél/mL), Prieto et al, (2005) comparo el rendimiento de tres especies de diatomeas en medio de cultivo CONWAY y Guillard f/2 encontrando más adecuado el Guillard f/2, Panta et al. (2016) probó el crecimiento de 2 especies de microalgas comparando 2 fertilizantes (Stimufol y Complefol) con el medio Guillard f/2 siendo nuevamente el Guillard f/2 en donde se encontró mejor rendimiento esto se atribuye a la cantidad de N presente en el medio con relación con los otros nutrientes, González et al.,(1999) probaron el crecimiento de tres especies de microalgas (*Chaetoceros* sp, *C. gracilis* e *Isochrysis aff. Galbana* variedad italiana) y 4 medios de cultivo (Algal, f/2, Fertilizante Agrícola (F.A.) y Walne), obtuvieron mejores resultados de manera general con el fertilizante agrícola, la cinética de crecimiento microalgal depende de la composición del medio, por otro lado el desarrollo de cada especie se presenta de manera diferente, Méndez et al. (2020) comparó el rendimiento de 3 microalgas (*C. vulgaris*, *N. oculata* y *Tetraselmis striata*) en medio Guillard f/2, *C. vulgaris* presentó los mejores resultados pese a contar con las mismas condiciones de cultivo.

### *S. obliquus*

En este estudio se encontró mejor producción de la biomasa usando el medio Guillard f/2 en comparación con el medio Basald Bold donde presentaba menor densidad celular y una fase estacionaria muy próxima con respecto a la fase logarítmica. La cantidad de N y P definen el desarrollo del cultivo y la cantidad de lípidos, pese a que son factores que influyen en el crecimiento y composición bioquímica. Mercado (2016) no encontró diferencias significativas entre la biomasa final y el contenido de lípidos de los tres medios que probó (Guillard, BG-11 y Bayfolan) siendo el Bayfolan el que presentó los mejores resultados. Por otra parte,

la composición espectral de la luz modifica las rutas metabólicas en *S. obliquus*, causando importantes cambios en la tasa de crecimiento, composición bioquímica, síntesis de pigmentos y en la tasa fotosintética (Fernández, 2013), en este estudio se ocupó para los cultivos luz cálida a 2 Klx y para dos de los tratamientos (T2 y T3) 14 Klx, registrando que la luz es un prerrequisito para inducir la autotrofia en cultivos de microalgas, se ha visto que una intensidad lumínica alta induce la síntesis de lípidos, y en algunos casos incrementando la cantidad de ARA, EPA y DHA, la alta intensidad lumínica puede aumentar la cantidad de carotenoides, las condiciones lumínicas óptimas dependen de la taxonomía de la especie cultivada (Maltsev et al., 2021), exponiendo la microalga a estos espectros lumínicos obtuvimos un cambio en la composición de ácidos grasos y pigmentos.

Para el crecimiento y mantenimiento del cultivo se utilizó una aireación constante utilizando bombas de acuario y aire proveniente del ambiente, una fuente constante de CO<sub>2</sub> maximiza la producción de biomasa en *S. obliquus*, generando proporcionalmente mayor cantidad de proteínas, lípidos y carbohidratos que tratamientos con poco CO<sub>2</sub> (Castañeda, 2020). Por lo tanto, la biomasa se incrementó en una fase de cultivo con los medios antes mencionados y posteriormente se expuso a una condición desfavorable en base a que hay un mayor crecimiento de las microalgas con una fuente de nitrógeno pero se demostró que una limitación de los niveles de N generó mayor biomasa y cantidad de lípidos en relación con cultivos donde se mantenían altos los niveles de N (Cobos, 2016), el emplear distintas estrategias nutritivas dando al cultivo las condiciones ideales para su crecimiento y optimizar con restricción de nutrientes cambiando la composición bioquímica de microalgas es una manera para aumentar la sustentabilidad de los cultivos (Markou et al., 2014; Pérez-Rojas, 2016; Jiménez y Catillo, 2021; Nadal, 2021; Zapata et al., 2022).

Los valores de proteínas obtenidos varían de 4.5-14.88 % mientras que en la literatura se tienen registros de 19-24 a un 50-56 % (Arredondo y Voltolina, 2007; Fernandez, 2013; Rendón et al., 2015; Das y Varanasi, 2019; Jimenes y Castillo, 2019) aunque no se especifican los medios de cultivo empleados o la fase del crecimiento del cultivo. Con usos posteriores a su producción y extracción, para la proteína se ha visto que utilizando el solvente adecuado es posible la extracción de

proteínas en *S. obliquus* con fines en la industria alimentaria, al igual, a la biomasa des-proteinizada, se le pueden extraer los lípidos y ácidos grasos (Torres, 2020), otra de las aplicaciones que presenta *Scenedesmus sp.*, puede ser empleada para la elaboración de bio-estimulantes proteicos, debido a su estabilidad ante cambios de pH se puede incorporar como emulsificante en dietas (Perote, 2021). Los resultados más altos de proteínas del estudio se encontraron en la fase log en todos los casos, la disposición de los nutrientes y la influencia del entorno modificaron la composición bioquímica de las proteínas con una disminución en los tratamientos en fase estacionaria.

Los valores de carbohidratos se encuentran en 6.9-23%, mientras que se tienen registros de 10-16% (Arredondo y Voltolina 2007), 10-17 % (Das y Varanasi, 2019; Jimenes y Escobedo, 2019) y 30% (Fernandez, 2013). Los valores más altos se encontraron en la fase estacionaria, coincidiendo con los resultados obtenidos, estos carbohidratos pueden presentar posibles aplicaciones para la producción de biocombustibles como el bio-etanol (Jimenes y Castillo, 2021).

En tanto a lípidos totales, los valores obtenidos fueron de 17.9-59.77 % mientras que se tienen registros de 9-12 (Fernández, 2013) y 12-14% (Das y Varanasi, 2019; Jimenes y Castillo, 2021), los lípidos producidos mediante las microalgas entran en la categoría de biocombustibles de tercera generación, las microalgas tiene la capacidad de producir de 4 a 5 veces más, que las plantas con una mayor concentración de ácidos grasos (Jiménez y Catillo, 2021). Los cultivos se mantuvieron monoalgales axénicos tanto en el cultivo como en los tratamientos, Lucero (2018) encontró que las condiciones de estrés aumentan la producción de lípidos, la presencia de bacterias puede ser benéfica en la producción de lípidos en microalga y con el control de la relación N/P es posible aumentar la concentración de lípidos en *Scenedesmus sp.* (Xin et al., 2010).

Se ha demostrado que, la restricción de nutrientes principalmente N y P son limitantes del crecimiento de la microalga, e influyen directamente sobre la composición bioquímica, son después de la fuente de carbono, los nutrientes de mayor importancia en el cultivo (Mateucci, 2018; Orantes, 2022), los efectos registrados en los tratamientos en tanto al aumento de lípidos con respecto al

control fue influido por la reducción de nutrientes y el suministro continuo de CO<sub>2</sub> mediante la aireación.

Los valores de lípidos insaturados a partir de los resultados obtenidos de lípidos totales constituyen un 25-80 % presentando diferencias significativas entre tratamientos, en los modelos de producción de biodiesel a partir de *S. obliquus* se ha encontrado hasta el 22 % de lípidos en relación con la biomasa total, si se varía la proporción de N y P en el cultivo, se puede aumentar de 40-60% (Yaakob *et al.*, 2021).

El contenido de ácidos grasos presenta 11 ácidos grasos en fase log, con más PUFA y 10 ácidos grasos en fase est con más MUFA, y distinta composición de ácidos grasos saturados (AGS), dependiendo las condiciones de cultivo, una misma especie puede presentar composiciones muy diferentes en tanto a los ácidos grasos, debido a adaptaciones fenotípicas, mucho más que genotípicas (Hernandez *et al.*, 2019), los cambios en la composición y cantidad de ácidos grasos está directamente relacionado con factores físicos y químicos presentes en el medio.

Los valores correspondientes a pigmentos: en clorofila "a" de 0.3-18 µg/mL, clorofila "b" 0.08-5.6 µg/mL, clorofila "c" 0.1-1.19 µg/mL, carotenos 0.34-6.95 µg/mL y fucoxantina 0.43-8 µg/mL, con diferencias significativas entre tratamientos y control, en todos los casos, los valores más altos se encontraron en el control en fase log, la luz continua es favorable para aumentar la cantidad de carotenos (luteína), se recomienda utilizar un medio favorable para el crecimiento y posteriormente aplicar el estrés o condición que favorezca el aumento del pigmento (Martínez, 2017), bajo condiciones óptimas en conjunto con luminosidad e influencia de nitratos y acetato de sodio *S. obliquus* es capaz de generar mayor cantidad de carotenoides, proteínas y fenoles totales (Zapata *et al.*, 2020). La reducción de los pigmentos acorde a los resultados se presentó en los tratamientos, por lo mencionado anteriormente la restricción de nutrientes y la exposición a alta irradiancia no propicia un aumento en los pigmentos al contrario decrecen.

Los valores de capacidad de inhibición antioxidante obtenidos van de 16-40%, *S. obliquus* bajo condiciones de estrés genera carotenos, principalmente luteína con función de protección contra la foto-oxidación, lo que genera un color amarillento al

cultivo (Vera y Martínez, 2021), en este estudio el estrés resultó contraproducente para la obtención de pigmentos, posiblemente por el tiempo de exposición tan prolongado o la severa restricción nutritiva.

### *P. tricornutum*

Se utilizó el medio Guillard f/2 por presentar mejores resultados de crecimiento que el medio Basal Bold causado por relaciones entre la cantidad de N con respecto a P y el flujo de CO<sub>2</sub> suministrado (Xin et al., 2010; Barajas et al., 2012), los cultivos se mantuvieron con aireación constante incluso durante los tratamientos, existe una influencia entre el tipo de movimiento, el flujo de aire y la frecuencia con la que circula el medio de cultivo con respecto al crecimiento del mismo, un exceso de agitación mecánica puede dañar la célula, la carencia de movimiento genera sedimentación y zonas oscuras en el cultivo (Brindley et al., 2004), se ha encontrado una alta tolerancia a condiciones ambientales adversas, incluyendo tratamientos con alto CO<sub>2</sub> (1500 ppm) y metales pesados como el Cadmio a concentraciones de 0.4- 1.2 mg/L, con lo que se demuestra que *P. tricornutum* tiene una alta tolerancia al estrés oxidativo (Fang et al., 2019), se mantuvo una temperatura constante de 18 ± 2 °C, el factor temperatura como condición de estrés influye directamente en el crecimiento y la composición bioquímica de *P. tricornutum* con cambios en los pigmentos y ácidos grasos (Feijóo et al., 2017), también los fosfatos son una fuente indispensable para el crecimiento del cultivo, al igual, limitar la cantidad de Fe, genera cambios en tres genes de esta microalga (Jiashun et al., 2022). En relación con el crecimiento de los cultivos, *P. tricornutum* presentó mejores resultados en medio guillard f/2 por tener los requerimientos necesarios en la cantidad apropiada para el desarrollo de estas microalgas en conjunto con las demás condiciones de cultivo.

Se obtuvieron valores de proteínas de 0.7-21.5 %, en todos los casos; el control a 0 ups presentó los resultados más altos, en comparación a otros estudios realizados con resultados de 33 % (Arredondo y Voltolina, 2007), 36.67 % (Felix, 2015) y 58.9 % (Liza, 2015).

Los valores de carbohidratos obtenidos van de 1.23-15.56%, estando en el rango de otros estudios realizados por Arredondo y Voltolina (2007) y Felix (2015), que

reportan hasta un 46.78%. Existe una influencia epigenética en el comportamiento de los genes de *P. tricornutum*, acorde al tratamiento o estrés efectuado será la expresión o ruta metabólica que efectuó esta microalga a manera de respuesta, estos mecanismos no se repiten de la misma manera con otras especies de diatomeas o incluso en mutantes de esta especie (Ait-Mohamed et al., 2020). Los resultados nos muestran cantidades diferentes acorde a la salinidad y tras la influencia de los tratamientos todavía más diferentes, con lo que la capacidad para adaptarse y en contraste los cambios que presenta metabólicamente permiten alterar su composición bioquímica y obtener distintas cantidades de carbohidratos.

En lípidos totales se encontraron valores de 13-51 %, en el tratamiento 1 a 0 ups se encontraron los valores más altos, que los señalados por otros autores que registran valores de 3.62 % (Liza, 2015), 17.5 % (Arredondo y Voltolina, 2007) y 1.07% (Felix, 2015), como anteriormente se mencionó una misma especie puede presentar diferente composición bioquímica, *P. tricornutum* puede presentar un 18 -57 % de lípidos, Ohse et al. (2015) obtuvieron un 18% con 46.8% de ácidos grasos de los cuales 18.3% corresponde a PUFAs siendo el ácido palmítico con 26.96 % el que se encontró en mayor cantidad mientras que en este caso obtuvimos menos del 1 % en tres tratamientos y en los demás no estaba presente.

A partir de los lípidos totales, se determinó el total de lípidos insaturados obteniéndose de un 5-81 %, donde las muestras a 0 ups presentan los valores más altos, en *P. tricornutum* se ha encontrado respuestas fisiológicas diferentes entre fases de cultivo (Log-Est), al igual la influencia de un estrés como con el fenantreno en conjunto con micro-plásticos, inducen la acumulación de una mayor cantidad de lípidos como una reacción energética de almacenamiento, y a su vez, inhiben el crecimiento del cultivo (Yahong et al., 2019), en otro estudio obtuvieron 39.50 – 51.78% PUFAS y 22.81-30.72% de EPA, de modo que existe una correlación entre las condiciones de cultivo y condiciones de estrés que se empleen (Qiao et al., 2015)

En condiciones control, se encontró una mayor proporción de ácidos grasos en la fase estacionaria principalmente ácidos saturados y monosaturados, se identificaron en fase log a 0 ups 17 ácidos grasos, a 3 ups 6 ácidos grasos y a 30 ups 10 ácidos grasos, mientras en fase est a 0 ups 11 ácidos grasos, a 3 ups 7 ácidos grasos y

finalmente a 30 ups 11 ácidos grasos, la fuente de nitrógeno influye en la cantidad de ácidos grasos a bajas concentraciones de N, aumentando los PUFAS y EPA en conjunto con tratamientos con luz, lo que coincide con una fase estacionaria del cultivo (Liang et al., 2006), se encontró una mayor producción de ácidos grasos de tipo MUFAS Y PUFAS bajo un fotoperiodo de 24:0 luz oscuridad, aunque un tratamiento más óptimo sería utilizando un fotoperíodo 12:12 (L:O), además de un aumento en el tamaño de las membranas de los tilacoides (Lim y Zaleha, 2013), en este estudio se utilizó un fotoperiodo 24:0 (L:O) lo que es una iluminación continua durante el cultivo, a 2 Klx y en los tratamientos a 14 Klx, los ácidos grasos se ven afectados por las condiciones de cultivo, la concentración de N y la exposición a RUV (Radiación UV) pueden ser factores que optimicen el valor nutricional con un posible uso en la maricultura (Liang et al., 2006). El uso de sustancias como la fluoxetina induce estrés oxidativo en *P. tricornutum* lo que aumenta el  $\beta$ -caroteno, las enzimas antioxidantes e induce la aparición de LC-PUFAs aunque incrementa la peroxidación lipídica (Feijóo et al., 2020), otra manera de aumentar el contenido de lípidos es mediante modificaciones genéticas en *P. tricornutum*, cuyos ácidos grasos tienden a triacilgliceroles (TAG), pero esto a su vez reduce la producción de proteínas y carbohidratos (Xiang et al., 2020), el valor nutricional de los ácidos grasos se ve comprometido pese a que *P. tricornutum* presenta grandes cantidades de EPA, por lo cual es ampliamente usada en la acuicultura como alimento en los organismos en cultivo (Jimenez y Catillo, 2021).

Del contenido de pigmentos se obtuvieron: clorofila "a" 0.1-4 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), clorofila "b" 0-2.25 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), clorofila "c" 0.075-0.83 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), carotenos 0.34-3.8 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y fucoxantina 0.35-3.67( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) La fucoxantina es uno de los pigmentos principales que genera *P. tricornutum* ante condiciones de estrés, existe una tendencia al aumento de pigmentos secundarios carotenoides como foto-protectores de las clorofilas (Kuczynska et al., 2020), se esperaba obtener mayor cantidad de pigmentos secundarios a través de los tratamientos, dado a que Sadoud (2020) encontró que existe una relación entre el contenido de nitrógeno y la alta irradiancia para la producción de pigmentos secundarios (astaxantina), como fuente de  $\text{CO}_2$  se utilizó principalmente la aireación constante, Orosa et al.(2001) encontró que el empleo de acetato de sodio puede elevar la producción de pigmentos secundarios

significativamente, en conjunto con un estrés salino (en microalgas de agua dulce), y disminuye el contenido de nitrógeno, pero inhibe el crecimiento de las células.

Para la capacidad de inhibición antioxidante se encontraron valores de 13-82 %, en donde los tratamientos presentan diferencias significativas con respecto al control, mediante condiciones de estrés en *P. tricornutum* se genera un aumento en la producción de metabolitos secundarios, los cuales se pueden emplear como antioxidantes, anti-inflamatorios, antibióticos o incluso anti-cancerígenos (Riccio y Lauritano, 2022), con esto una condición inhóspita puede ser favorable para el aumento de la capacidad antioxidante de *P. tricornutum*.

Con lo anteriormente mencionado, es alentador encontrar variables que se pueden controlar, como en el caso de este estudio: la selección de fases de cultivo, salinidad, restricción de nutrientes e intensidad lumínica para obtener como respuesta variaciones con incrementos y diferencias significativas en lípidos totales, el potencial antioxidante y no menos importante la composición, distribución de ácidos grasos y pigmentos, esto promueve la sustentabilidad para el cultivo a escala de laboratorio con perspectivas a escala industrial por un lado producir la mayor cantidad posible de microalga y consecuentemente aplicar un tratamiento que nos disminuya tiempo de cultivo y favorezca la cantidad y calidad nutricional de nuestro cultivo.

## 10. Conclusiones

La fase logarítmica de *S. obliquus* es conveniente para obtener mayor cantidad de pigmentos y proteínas, mientras que la fase estacionaria presenta mayor cantidad de carbohidratos, lípidos y capacidad antioxidante. Los nutrientes presentes en la fase Log son mayores en el medio antes de la depleción súbita de los nutrientes en los tratamientos, y que comience la inducción para acumular lípidos, para sobrevivir ante el medio hostil. En *S. obliquus* los tratamientos (T1, T2 Y T3), nos permiten obtener una mayor cantidad de lípidos totales los cuales pueden presentar aplicaciones para la acuicultura, nutraceuticas o biorrefinerias. Por su parte *P. tricornutum* dependiendo de la fase, la salinidad y el tratamiento T2 a 30 ups puede generar más carbohidratos que tienen aplicación nutricional o generar etanol como fuente de combustibles renovables, también puede presentar más antioxidantes en T3 a 30 ups con aplicación a la nutraceutica o lípidos en los 3 tratamientos con perfiles de ácidos grasos útiles en acuicultura, nutrición o generar biodiesel.

*P. tricornutum* es de mejor calidad nutricional en medios a 0 y 30 ups de salinidad, en fase logarítmica para la obtención de biomoléculas de alto valor como son las proteínas, pigmentos y lípidos, se encontró hasta cinco veces más lípidos totales en *P. tricornutum*, tras efectuar los tratamientos con respecto al control. El aumento de lípidos es generado por la disminución súbita de N con relación al CO<sub>2</sub> disponible en el medio, a su vez se ve un aumento en la capacidad de inhibición antioxidante.

Los cambios metabólicos presentes en las células fueron controlados apartir de factores físicos y nutricionales, con lo cual se cumple el objetivo de este estudio al generar un cambio en la composición bioquímica de ambas microalgas para su posible aplicación en acuicultura, nutraceutica o biorrefinerias.

## 11. Literatura citada

- Abalde, J., Cid, A., Fidalgo, J., Torres, E., y Herrero, C. (1995). Microalgas: Cultivos y Aplicaciones. Universidad De Coruña: Universidade Da Coruña. Servicios de Publicaciones. 11-15.  
[https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/25013/Abalde\\_Julio\\_1995\\_Microalgas\\_cultivo\\_aplicaciones.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/25013/Abalde_Julio_1995_Microalgas_cultivo_aplicaciones.pdf?sequence=2&isAllowed=y)
- Acién-Fernandez F. G., Fernandez-Sevilla J. M. y Molina E. (2018). Contribucion De Las Microalgas Al Desarrollo De La Bioeconomía. Universidad de Almería. Mediterráneo Económico. 31. 309-332.
- Adams C., Godfrey V., Wahlen B., Seefeldt L. y Bugbee B. (2013). Understanding precision nitrogen stress to optimize the growth and lipid content tradeoff in oleaginous green microalgae. *Bioresource Technology*, 131, 188-194.
- Ait-Mohamed O., Novák-Vanclova A. M. G., Joli N., Liang Y., Zhao X., Genovesio A., Tirichine L., Bowler C. y Dorrell R. G. (2020). PhaeoNet: A Holistic RNAseq-Based Portrait of Transcriptional Coordination in the Model Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Frontiers in Plant Science*. (11)1-17 Science.doi: 10.3389/fpls.2020.590949
- Ak B., Isik O., Uslu L. y Azgm C. (2015) The effect of stress due to nitrogen limitation on lipid content of *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin) Cultured Outdoor in Photobioreactor. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 15. 647-652. 10.4194/1303-2712-15\_3\_09
- Amado Pachon, C., y Higuera Martinez, K. (2019). Efecto de la frecuencia de sonido sobre la producción de biomasa en la microalga *Scenedesmus* sp. Bogotá, Colombia: Universidad De Bogota Jorge Tadeo Lozano. Colombia. Grupo De Investigación en Ingeniería De Procesos Y Sistemas Programas Ingeniería Química, Alimentos Y Ambiental. Facultad Ciencias Naturales e Ingeniería. Bogotá D. C.

<https://expeditiorepositorio.utadeo.edu.co/bitstream/handle/20.500.12010/7782/Trabajo%20de%20grado.pdf?sequence=5&isAllowed=y>

An M., Gao L., Zhao W., Chen W., Li M. (2020). Effects of nitrogen forms and supply mode on lipid production of microalga *Scenedesmus obliquus*. *energies*.MDPI.(13) 1-13. Doi:10.3390/en13030697

Andersen, R. A. (2005) *Algal Culturing Techniques*. Phycological Society of America Recipes for Freshwater and Seawater Media.Ed. Burlington, MA. 429-538. file:///C:/Users/pc/Downloads/AlgalCulturingTechniques1.pdf

Anderson, M., Van Nieuwnburgh, L., y P. Snoejis (2003). Pigment transfer from phytoplankton to zooplankton with emphasis on astaxanthin production in the Baltic Sea food web. *Marine Ecology Progress Series*, 4. 254: 213-224.

Anderson M., Schubert H. y M. Pendersén (2006). Different patterns of carotenoid composition and photosynthesis acclimation in two tropical red algae. *Marine Biology*. 149: 635-665.

Anzures M., Gaytán M. y Cuna E. (2021). Algas extremófilas: estrategias de supervivencia y uso potencial. *BioTecnología*, Año 2021, Vol. 25 No.2 pag. 9-20

Aragão, C.; Conceição, L.E.; Dinis, M.T. y Fyhn, H.-J. (2004). Amino acid pools of rotifers and *Artemia* under different conditions: nutritional implications for fish larvae. *Aquaculture*, 234, 429-445. file:///C:/Users/pc/Desktop/10.1016@j.aquaculture.2004.01.025.pdf

Ardila-Álvarez, A. M., López-Matos, Y., Vásquez-Cáceres, M. E., González-Delgado, A. D y Barajas-Solano, A. F. (2017). Obtención de lípidos y carbohidratos a partir de microalgas mediante el diseño de medios de cultivo selectivos. *Tecnología y Ciencias. Medellín, Colombia*. 20(38).85-96. <https://www.redalyc.org/pdf/3442/344249897007.pdf>

Arredondo, B. O. y D. Voltolina. 2007a. Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. Capítulo 2. En: Arredondo, B.O. y D Voltolina (eds.). Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal, centro de investigaciones biológicas del noroeste, S.C La Paz, B.C. Sur. México.17-25

Arredondo, B.O. y D. Voltolina 2007b. Determinación de peso seco y contenido orgánico e inorgánico. Capítulo 3. En: Arredondo, B.O. y D Voltolina (eds.). Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal Centro de investigaciones biológicas del noroeste, S.C La Paz, B.C. Sur. México. 27-30,

Arredondo, B.O y D. Voltolina. 2007c. Determinación de proteínas por métodos espectrofotométricos. Capítulo 4. En: Arredondo, B.O. y D Voltolina (eds.). Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C La Paz, B.C. Sur. México. 31-39.

Arredondo, B.O. y D. Voltolina. 2007d. Determinación de carbohidratos por métodos espectrofotométricos. Capítulo 5. En: Arredondo, B.O. y Voltolina (eds.). Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal centro de investigaciones biológicas del noroeste, S.C La Paz, B.C. Sur. México. 41-45.

Arredondo, B.O. y D. Voltolina. 2007e Determinación de pigmentos por espectrofotometría. Capítulo 7. En: Arredondo, B.O. y D Voltolina (eds.). Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal. centro de investigaciones biológicas del noroeste, S.C La Paz, B.C. Sur. México. (59-67).

Arredondo Vega, B. O. y Voltolina D. (2007). Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal. CiB Centro de Investigaciones

Astocondor, M. M., Mayta Huatuco, E., Montoya Terreros H., Tarazona Delgado R. (2017). Crecimiento poblacional y productividad de la microalga nativa *Chlorella peruviana* bajo diferentes salinidades. Revista. Investigaciones Veterinarias del Perú, 28(4), 976-986. <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v28n4/a23v28n4.pdf>

Bajguz, A.; Godlewska-Zylkiewicz, B. Protective role of 20-hidroxyecdsonone against lead stress in *Chlorella vulgaris* cultures, *Phytochemistry*, 2004, 65, 711-720.

Barajas S. A. F., Godoy R. C. A., Monroy D. J. D., Barajas F. C. y Kafarov V. (2012). Mejoramiento del secuestro de CO<sub>2</sub> por *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 en fotobiorreactores a escala laboratorio. Revista ION. Bucaramanga (Colombia). 25(2). 39-47.

Bligh, E. G., y Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology* 37(8), 911-917.

Boonyaratpalin, M., Thongrod, S., Supamattaya, K., Britton, G., y L.E. Schliapalius (2001). Effects of  $\beta$ - carotene source, *Dunaliella salina*, and astaxanthin on pigmentation, growth, survival and health of *Penaeus monodon*, *Aquaculture Research*. 32. (1), 182-190.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein.-dye binding. *Reproduction Research Laboratories, Department of Biochemistry, University of Georgia, Athens.* 72, 248-254. [http://hoffman.cm.utexas.edu/courses/bradford\\_assay.pdf](http://hoffman.cm.utexas.edu/courses/bradford_assay.pdf), <http://winklerltda.cl/quimicav2/wp-content/uploads/2017/04/kit-proteinas-bradfor.pdf>

- Boraso, A. L., Perales, S., Pérez, L., y Zalazar, H. (2003). Algas marinas de la Patagonia. Fundacion De Historia Natural. Universidad Maimónides .1-64. <https://www.fundacionazara.org.ar/img/libros/algas-marinas-de-la-patagonia.pdf>
- Borges, L., Caldas, S., Montes D´Oca, M., y Abreu, P. (2016). Effect of harvesting process on the lipid yield and fatty acid profile of the marine microalga *Nannochloropsis oculata*. *Aquaculture Reports*, 164-168. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352513416301193>
- Boonyaratpalin, M., Thongrod, S., Supamattaya, K., Britton, G., y Schlipalius, L. (2001). Effects of  $\beta$ -carotene source, *Dunaliella salina*, and astaxanthin on pigmentation, growth, survival and health of *Penaeus monodon*. *Aquaculture Research*, 32(1). 182-190. [https://www.researchgate.net/publication/227537192\\_Effects\\_of\\_b-carotene\\_source\\_Dunaliella\\_salina\\_and\\_astaxanthin\\_on\\_pigmentation\\_growth\\_survival\\_and\\_health\\_of\\_Penaeus\\_monodon](https://www.researchgate.net/publication/227537192_Effects_of_b-carotene_source_Dunaliella_salina_and_astaxanthin_on_pigmentation_growth_survival_and_health_of_Penaeus_monodon)
- Brindley-Alías C., López-García M., Acien-Fernández F. G., Fernández-Sevilla J. M., García-Sánchez J. L., y Molina-Grima E. (2004). Influence of power supply in the feasibility of *Phaeodactylum tricornutum* cultures. Department of Chemical Engineerinf, University of Almería.2004. 1-11. [10.1002@bit.20179.pdf](https://doi.org/10.1002/bit.20179)
- Butler T., Kapoore R. V. y Vaidyanathan S. (2020). *Phaeodactylum tricornutum*: A Diatom Cell Factory. *Trends in Biotechnology*. 38 (6). pp. 606-622. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.12.023>
- Camacho Kurmen, J., González, G., y Klotz, B. (2013). Producción de Astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo diferentes condiciones de estrés. *NOVA - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 93-104. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1794-24702013000100009](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702013000100009)

- Castillo, O. S. (2017). Producción de biodiésel a partir de microalgas: avances y perspectivas biotecnológicas. *Scielo Mexico*, vol.27(3) .337-352. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0188-88972017000300337](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-88972017000300337)
- Castro Barrera, T., Lara Andrade, R., Castro Mejía, G., Castro Mejía, J., y Malpica Sánchez, A. (2003). Alimento Vivo en la Acuicultura. México: Departamento El Hombre y su Ambiente. División de CBS. UAM Unidad Xochimilco.27-33. <http://www2.izt.uam.mx/newpage/contactos/anterior/n48ne/acuicultura.pdf>
- Castañeda-Hernández L.(2020). Influencia de la concentración de dióxido de carbono en el crecimiento y composición de la biomasa de *Botryococcus braunii* y *Scenedesmus sp.* Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras. Pag 1-34
- Cerón García, M. C. (2013). Producción de microalgas con aplicaciones nutricionales para humanos y animales. Universidad de Almería, Cuadernos de Estudios Agroalimentarios. 87-105. <https://docplayer.es/4681469-Resumen-produccion-de-microalgas-con-aplicaciones-nutricionales-para-humanos-y-animales-summary-maria-del-carmen-eron-garcia-universidad-de-almeria.html>
- Choix Ley F. J. (2014). Evaluación de la acumulación de carbohidratos en la microalga *Chorella spp.* Asociada con la bacteria *Azospirillum brasilense*. Centro de investigaciones Biológicas del Noroeste. S. C. 1-121.
- Civera-Cerecedo, R., Alvarez-González, C. A. y Montoya-Lopez, F.J. (2004). Nutrición y alimentación de larvas de peces marinos. Avances en Nutrición VII. Memorias del VLL Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Hermosillo Sonora. 1-87. [https://www.uanl.mx/utilerias/nutricion\\_acuicola/VII/archivos/3RobertoCivera.pdf](https://www.uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/VII/archivos/3RobertoCivera.pdf)

- Cruz C. I. (2019). Evaluación de microalgas endémicas para el cultivo y enriquecimiento de presas vivas y su aplicación en la primera alimentación de *Seriola rivoliana*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. 1-84. <http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/2960>
- Cobos Ruiz M., Paredes Rodríguez J.D., Castro Gómez J.C. (2016). Inducción de la producción de lípidos totales en microalgas sometidas a estrés nutritivo. Acta biológica Colombiana.; 21(1):17-26. Doi: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v21n1.47439>
- Coman F. F. y Connolly R. M. (2003). Zooplankton and epibenthic fauna in shrimp ponds: factors influencing assemblage dynamics. Cleveland Austria: CSIRO Division of Marine Research, Blackwell Publishing Ltd, 359-371. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2109.2003.00898.x>
- Conceicao D., Garcia L. R., Bianchini D. R., Cella H., Barbosa C. A., Montes D. M. G., Petersen R., Passos M. F., Coelho V. J. V., Glli-Teresawa L. V. y Kava V. (2020). The effect of light intensity on the production and accumulation of pigments and fatty acids in *Phaeodactylum tricornutum*. Journal of Applied Phycology. Springer Nature. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-02001-6>.
- Cordero Esquivel, B. y Voltolina D. (1997). Viability of mass algal cultures preserved by freezing and freeze-drying. Aquacultural Engineering. 16: 205-211 p. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144860997000010>
- Cuéllar-Lugo M. B., Asiain-Hoyos A., Juaréz-Sánchez J. P., Reta-Mendiola J. L. (2018). Evolución normativa e institucional de la acuicultura en México. AS y D. 15: 541-546.
- Das, D., y Varanasi, J. (2019). Fundamentals of Biofuel Production Processes. Taylor & Francis Group, CRC Press. 1-241.

- David-Ruales C. A., Manchado-Frascalossi D., Vásquez-Torres W. (2018). Desarrollo temprano en larvas de peces, clave para el inicio e la alimentación exigena. Revista Lasallista de Investigación. 15(1).180-194. <http://repository.lasallista.edu.co:8080/ojs/index.php/rldi/article/view/1747/210210239>
- Del Ángel, J., Carreón, L. y M.O. Arjona. (2007). Extracción y cuantificación de lípidos. Capítulo 6. En: Arredondo, B.O y D. Voltolina (Eds). Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, B.C. Sur. México. pp. 47-57.
- Dell'Aquila, G., y Maier, U. G. (2020). Specific acclimations to phosphorus limitations in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. Biological Chemistry. 401(12):1495-1501.
- Ding W., Ye Y., Yu L., Liu M. y Liu J. (2023). Physiochemical and molecular responses of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* to illumination transitions. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts. 1-22. <https://doi.org/10.1186/s13068-023-02352-w>
- Doan Y., y Obbard J. (2010). Enhanced lipid production in *Nannochloropsis* sp. using fluorescence-activated cell sorting. ResearchGate Global Change Biology BIOENERGY, 264-270. <file:///C:/Users/pc/Downloads/EnhancedlipidproductioninNannochloropsis1.pdf>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. y F. Smith. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28 (3): 350-356. <http://pubs.acs.org>

- El-Chaghaby G., Rashad S., Abdel –Kader S. F., Rawash E. A., Moneem M. A. (2019). An assessment of phytochemical components, proximate composition and antioxidant properties of *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* algae extracts. Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries. Zoology Department, Faculty of Science, Ain Shams University, Cairo, Egypt. 23(4): 521- 526. [www.ejabf.journals.ekb.eg](http://www.ejabf.journals.ekb.eg)
- Fallas, J. (2010). XLStatistics, Análisis Estadístico con Excel. UNA, Universidad Nacional Costa Rica. 1-163. <https://ucipfg.com/Repositorio/MGAP/MGAP-05/BLOQUE-ACADEMICO/Unidad-3/03.pdf>
- Falkowski, P. G. (2002) El bosque invisible de los océanos. Investigación y ciencia .Scrib.22-29. <https://es.scribd.com/document/494908468/El-Bosque-invisible-de-los-oceanos-2>
- Fang D., Xiaoshan Z., Wei Q., Pu W., Jiangxin W. (2019). Combined effects of CO<sub>2</sub>-driven ocean acidification and Cd stress in the marine environment: Enhanced tolerance of *Phaeodactylum tricornutum* to Cd exposure. Marine Pollution Bulletin. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110594>
- FAO, Torrentera, L. B., y J., A. T. (1989). II. Cultivo de microalgas. Obtenido de Fao.org: <https://www.fao.org/3/ab473s/ab473s02.htm> accessed 8 11 2021.
- FAO, Lavens,P. y Sorgeloos, P. (1996). Manual on the production and use of live food for aquaculture. Laboratory of Aquaculture and Artemia Reference Center, University of Ghent. FAO Fisheries Technical 361. 1-305. [file:///C:/Users/pc/Downloads/Manual%20of%20the%20production%20an%20use%20of%20live%20food%20for%20aquaculture%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/pc/Downloads/Manual%20of%20the%20production%20an%20use%20of%20live%20food%20for%20aquaculture%20(1).pdf)
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2003). Fisheries Management. 2: the ecosystem approach to fisheries. FAO Technical Guidelines for Responsible Fisheries 4(2), 112 p.

- FAO. (2016). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. 1-226. ISBN 978-92-5-309185-0.
- FAO. (2018). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. <https://www.fao.org/3/I9540ES/i9540es.pdf>
- Feijão E., Gameiro C., Franzitta M., Duarte B., Cacador I., Cabrita M. T., Matos A. R. (2017). Heat wave impacts on the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*: Searching for photochemical and fatty acid biomarkers of thermal stress. *Ecological Indicators*. (2017). 1-12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.07.058>
- Feijao E., Cruz R. C., Duarte I. A., Matos A. R., Cabrita M. T., Novais S. C., Lemos M. F. L., Caçador I., Marques J. C., Reis-Santos P., Fonseca V. F. y Duarte B. (2020). Fluoxetine Arrests growth of the model diatom *Phaeodactylum tricornutum* by increasing oxidative stress and altering energetic and lipid metabolism. *Frontiers in Microbiology*. 11:1803. doi: 10.3389/fmicb.2020.01803
- Félix Medina J. V. (2015). Empleo de la biomasa residual de la microalga, *Phaeodactylum tricornutum* en la formulación de una bebida funcional. Universidad Autónoma de Sinaloa. 1-171.
- Fernández R. A. (2013). Efecto de la composición espectral de la luz en el crecimiento y en la composición proximal de *Scenedesmus obliquus*. Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Marinas. Ensenada, Baja California 2013, pag 1-48.
- Fernández, J. S. (2014). Microalgas - definición y características. Obtenido de Universidad de Almería. Ingeniería de Procesos aplicada a la Biotecnología

de Microalgas. <https://w3.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/tema-1---generalidades/1-1-microalgas.html>

Fimbres Olivarría, D., Mercado Castillo, L., Murguía López, Á., y López Elías, J. (2010). Crecimiento y biomasa de *Dunaliella* sp. cultivada en medios limitantes en nitrógeno. *BIOTecnia*, 12(3). 58-66. <https://biotecnia.unison.mx/index.php/biotecnia/article/view/104/97>

Forjan, E., Garbay, I., Casal, C., y C. Vílchez. (2007). Enhancement of carotenoid production in *Nannochloropsis* by phosphate and sulphur limitation. En: A. Méndez. Vilas (Ed.). *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. 356-364.

García Cañedo, J. C. (2017). Escalamiento de un cultivo por lote alimentado de la microalga *Scenedesmus incrassatulus* para la producción de luteína. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. <https://repositorio.cinvestav.mx/bitstream/handle/cinvestav/1348/SSIT0014610.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

García-Galano, T. (2000) Nutrición de larvas de camarón. Centro DE Investigaciones Marinas, Universidad de la Habana Avances en Nutrición Acuícola IV. La Paz, B.C.S. México. 42-52. [https://www.uanl.mx/utilerias/nutricion\\_acuicola/IV/archivos/4tsai.pdf](https://www.uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/IV/archivos/4tsai.pdf)

García Gómez, V. (2019). Desarrollo y caracterización de helados salados con microalgas. Universitat Politecnica de Valencia. Valencia .1-42. <https://m.riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/119795/Garc%C3%ADa%20-%20Desarrollo%20y%20caracterizaci%C3%B3n%20de%20helados%20salados%20con%20microalgas.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

García Ortega A. (2000) Valor nutricional de los quistes de *Artemia* y su uso como fuente de proteína en dietas artificiales para larvas de peces. Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición

Acuícola. Mérida Yucatán. 287-299.  
[https://www.uanl.mx/utilerias/nutricion\\_acuicola/V/archivos/agarcia.pdf](https://www.uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/V/archivos/agarcia.pdf)

García Sánchez, J., Molina Grima, E., García Camacho, F., Sánchez Pérez, J., y Giménez Giménez, A. (1993). Cuantificación de ácidos grasos a partir de biomasa microalgal. *Grasas y Aceites*, 348-353.  
<https://core.ac.uk/download/pdf/268177792.pdf>

Gatenby, C., M. Orcutt, D., A. Kreeger, D., C. Parker, B., A. Jones, V., y J. Neves, R. (2003). Biochemical composition of three algal species proposed as food for captive freshwater mussels. *Journal of Applied Phycology*. 15.1-12.  
[https://www.mussellab.fishwild.vt.edu/mussel/PDFfiles/Bicochemical\\_composition.pdf](https://www.mussellab.fishwild.vt.edu/mussel/PDFfiles/Bicochemical_composition.pdf)

German-Báez L.J., Valdez-Flores M.A., Félix-Medina J.V., Norzagaray-Valenzuela C.D., Santos –Ballardo D. U., Reyes-Moreno C., Shelton L. M. y Valdez- Ortiz A. (2017) Chemical composition and physicochemical properties of *Phaeodactylum tricornutum* microalgal residual biomass. *Food Science and Technology International*. 0(0) 1-9. 10.1177/1082013217717611

Gómez Luna, L. M. (1997). Cultivo y aplicaciones de las microalgas *Dunaliella salina* y *Chlorella vulgaris* en Cuba. *Universidade da Coruña. A Coruña*. 20-26.  
<https://core.ac.uk/download/pdf/61897834.pdf>

Gómez Luna, L. M. (2007). Microalgas: Aspectos Ecológicos y Biotecnológicos. *Revista Cubana de Química, Santiago de Cuba*. 19(2), 3-20.  
<https://www.redalyc.org/pdf/4435/443543707001.pdf>

Gómez A. L., López J. A., Rodríguez A., Fortiz J., Martínez L. R., Apolinar A. y Enríquez L. F. (2016). Producción de compuestos fenólicos por cuatro especies de microalgas marinas sometidas a diferentes condiciones de iluminación. *Latin American Journal of Aquatic Research*. 44(1). 137- 143.  
Doi: 10.3856/vol44-issuel-fulltext-14.

- González B., Buitrago E. y Frontado K. (1999). Evaluación de medios nutritivos para el crecimiento de tres microalgas marinas de uso común en acuicultura. *Fundación La Salle de Ciencias Naturales*. 151, 75-84.
- Guedes, A.C., Amaro, H.M y F. X. Malcata (2011), Microalgae as sources of carotenoids. *Marine Drugs*. 9:625-644.
- Guerrero M. G., Rodríguez H., Vargas M. A., García-González M., Campo J. A., Moreno J. y Rivas J. (1999). Las microalgas como productoras de pigmentos con interes comercial. *Biotecnología y Aplicaciones de Microorganismos Pigmentos*. 215- 232.
- Guerin, M., Huntley, M.E. y M. Olaizola (2003). *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnol*; 21:210-6.
- Guzman-Ferman, B. M. (2013) Características bromatológicas de las microalgas marinas *Dunaliella salina*, *Nannochloropsis oculata* e *Isochrysis* sp. y su efecto en el rotífero *Brachionus ibericus*. Tesis de licenciatura, Instituto Tecnológico De Boca Del Río Veracruz, México.
- He L., Han X. y Yu Z. (2014). A rare *Phaeodactylum tricornutum* cruciform morphotype: culture conditions, transformation and unique fatty acid characteristics. *Plos ONE* 9(4)1-8. doi:10.1371/journal.pone.0093922
- Han, P., Lu, Q., Fan, L. y Zhou W. (2019). A review on the use of microalgae for sustainable aquaculture. *Applied Sciences*, MDPI.1-20. [www.mdpi.com/journal/applsci](http://www.mdpi.com/journal/applsci)
- Hegewald E. H. (1997). Taxonomy and Phylogeny of *Scenedesmus*. *Algae (The Korean Journal of Phycology)*. 12(4): 235-246

- Hemaiswarya, S., Raja, R., Ravi Kumar, R., Ganesan, V., y C. Anbazhagan. (2011). Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 27: 1737-1746.
- Hernández Acevedo H., L. Flores Ramos, A. Ruiz Soto. (2019). Ácidos grasos en cepas de microalgas del banco de germoplasma de organismos acuáticos del Instituto del Mar del Perú (IMARPE). *Revista Peruana de Biología* 26(3): 369 - 378. Doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v26i3.XXXX>
- Hernandez-Perez, A.y Labbe, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista Biología Marina y Oceanografía*. 49 (2) ,157-173. <https://www.scielo.cl/pdf/revbiolmar/v49n2/art01.pdf>
- Hlaing S. A. A., Bilal S. M. y Kumar A. A. (2020). Enhanced yield *Scenedesmus obliquus* biomacromolecules through medium optimization and development of microalgae based functional chocolate. *Journal of Food Science and Technology*. 57(3): 1090- 1099. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-019-04144-3>
- Hong-Yu, R., Bing-Feng, L., Chao, M., Lei, Z., y Nan-Qi, R. (2013). A new lipid-rich microalga *Scenedesmus* sp. strain R-16 isolated using Nile red staining: effects of carbon and nitrogen sources and initial pH on the biomass and lipid production. *Biotechnology for Biofuels*, 1-10. <https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1754-6834-6-143.pdf>
- Huanacuni P. J. I. y Espinoza R. L. A. (2018). Producción de alimento vivo para la investigación en acuicultura de peces marinos en la UNJBG, TACNA. *Ciencia y Desarrollo*. 17,22(1) 82-86. <https://doi.org/10.33326/26176033.2018.22.749>
- Humphrey, G. F. (1979). Photosynthetic characteristics of algae grown under constant illumination and light-dark regimes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 40(1), 63-70.

- Imamoglu, E., Conk Dalay, M., y Vardar Sukan, F. (2009). Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *New Biotechnology*, 26(3-4) 199-204. <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1871678409012102?token=EE7367D5686948D6D56437C0A411C7E97794F275667B92F7CC308BC1DAEDCBF9949C9572697854F14261FD0BBD2A809F&originRegion=us-east-1&originCreation=20211115020658>
- Iñarra, B., Bald, C., San Martín, D., Orive, M., Cebrián, M. y Zufía, J. (2018). Guía para la valorización de subproductos de la acuicultura. AZTI, Derio, España. 44., [https://www.azti.es/wpcontent/uploads/2018/12/AZTI\\_guia\\_VALACUI101218online.pdf](https://www.azti.es/wpcontent/uploads/2018/12/AZTI_guia_VALACUI101218online.pdf)
- Jaeger, L., M. Carreres, B., Springer, J., J. Schaap, P., Eggink, G., P. Martins Dos Santos, V., Martens, D. (2018). *Neochloris oleoabundans* is worth its salt: Transcriptomic analysis under salt and nitrogen stress. *PLOS ONE RESEARCH ARTICLE*, 1-21. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29652884/>
- Jeffrey, S.W. y G.F. Humphrey. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochimie and Physiology Pflanze* 167:191-194.
- Jian, L., Daling, Z., Jianfeng, N., Songdong, S., y Guangce, W. (2011). An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology Advances*, 569-574. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0734975011000401>
- Jiashun L., Kaidian Z., Xin L., Ling L. y Senjie L. (2022). Phytate as a phosphorus nutrient with impacts on iron stress-related gene expression for phytoplankton: insights from the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 88(2)1-15. <https://journals.asm.org/journal/aem>

- Jiménez-Escobedo M. y Castillo-Calderón A. (2021). Biomasa microalgal con alto potencial para la producción de biocombustibles. *Scientia Agropecuaria*. 12(2), 265-282. <https://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.030>
- Kaixian Q., Borowitzka M. A. (1992). Light and nitrogen deficiency effects on the growth and composition of *Phaeodactylum tricornutum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 38. 93-103.
- Kim J., Lee J., Voo A. Y. H., Tan Y. X., Mok W. K., Li A. Z y Chen W. N. (2023) Okara waste as a substrate for the microalgae *Phaeodactylum tricornutum* enhances the production of algal biomass, fucoxanthin , and polyunsaturated fatty acids. *fermentation*. 9,31:1-15. <https://doi.org/10.3390/10.3390/fermentation9010031>
- Kim S.M., Jun Y., Kwon O., Cha K.H., Um B., Chung D. y C. Pan. (2012). A potential commercial source of fucoxanthin extracted from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Applied Biochemistry Biotechnology*. 166: 1843-1855.
- Kolkovski S., Koven W., Tandler A. (1997). The mode of *Artemia* in enhancing utilization of microdiet by gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. *Aquaculture* 193-205. <file:///C:/Users/pc/Desktop/kolkovski1997.pdf>
- Kruger, N.J. (2002). The Bradford method for protein quantification. En: Walker J. M., (Ed.). *The protein protocols* Humana Press Inc.: 15-21
- Kruger, N. J. (2009). The Bradford Method For Protein Quantitation. *Thre Protein Protocols Handbook, Third Edition*. Springer Science .17-24. [https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-59745-198-7\\_4](https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-59745-198-7_4)
- Kuczynska, P., Jemiola-Rzeminska, M., Nowicka, B., Jakubowska, A., Strzalka, W., Burda, K., y Strzalka, K. (2020). The xanthophyll cycle in diatom

*Phaeodactylum tricornutum* in response to light stress. Plant physiology and biochemistry, 152, 125-137.

Lee, R.E. (2008). Phycology. Cambridge University Press. Fourth edition. Colorado State, E.U.A. pp. 561

Lee A., Shin H., Park J., Koo S., Kim S.M y S. Yang. (2021). Fucoxanthin from microalgae *Phaeodactylum tricornutum* inhibits pro-inflammatory cytokines by regulating both NF-kB and NLRP3 inflammasome activation. Scientific Reports 11:543.

Lemus, N., Urbano, T., Arredondo Vega, B., Guevara, M., Vázquez, A., Carreón Palau, L., y Vallejo, N. (2006). Crecimiento y perfil bioquímico de *Chaetoceros muelleri* cultivada en sistemas discontinuos y semicontinuos. Ciencias Marinas, 32(3) .597-603. <https://www.redalyc.org/pdf/480/48032311.pdf>

Lewin, J. C. (1958). The taxonomic position of *Phaeodactylum tricornutum*. The Journal of General Microbiology. 18, 427-432.

Liang Y., Beardall J., Heraud P. (2006). Effects of nitrogen source and UV radiation on the growth chlorophyll fluorescence and fatty acid composition of *Phaeodactylum tricornutum* and *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae). Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 82 (2006) 161-172. [www.Elsevier.com/locate/jphotobiol](http://www.Elsevier.com/locate/jphotobiol)

Lim, K., y Zaleha, K. (2013). Effect of photoperiod on the cellular fatty acid composition of three tropical microalgae. Malaysian Applied Biology, 41-49. <file:///C:/Users/pc/Downloads/ChinandZaleha2013.pdf>

Liza S. R. C. R. (2015) Efecto de dietas con tres microalgas bentónicas en el crecimiento y supervivencia post larval del *Loxechinus albus* erizo verde. Universidad Nacional de Moquegua. Perú.1-80.

- Londoño-Lopera J. M. (2021). Efecto de fertilizantes comerciales sobre la producción de biomasa de *Scenedesmus obliquus* ATCC 11457 a escala piloto. Departamento de Biología, EAFIT.1-21
- López-Elías J. A., Fimbres-Olivarria, Medina-Juárez, Miranda-Baeza A., Martínez-órdova L. R., Molina-Quijada DMA. (2013). Producción de biomasa y carotenoides de *Dunaliella tertiolecta* en medios limitados en nitrógeno. Revista Internacional de Botanica Experimental. Centro de Estudios Superiores del Estado de Sonora. 23-30. <http://www.scielo.org.ar/pdf/phyton/v82n1/v82n1a04.pdf>
- López-Legarda X., Taramuel-Gallardo A., Arboleda-Echavarría C., Segura-Sánchez F., Restrepo-Betancur L. (2017). Comparación de métodos que utilizan ácido sulfúrico para la determinación de azúcares totales. Revista Cubana de Química. (29)180-198.<http://ojs.uo.edu.cu/index.php/cq>
- López Rosales, A. (2017). Potencial de microalgas aisladas de la costa de Yucatán para la producción de biodiesel. Mérida, Yucatán: Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Posgrado en Ciencias en Energía Renovable. . [https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1003/424/1/PCER\\_M\\_Tesis\\_2017\\_L%C3%B3pez\\_Alan.pdf](https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1003/424/1/PCER_M_Tesis_2017_L%C3%B3pez_Alan.pdf)
- Lucero-Rouzaud E. A. (2018). Variación del contenido de lípidos en microalgas con potencial biotecnológico sometidas a diferentes condiciones de estrés. Universida Autónoma de Baja California Sur. La Paz. 1-102. <http://rep.uabcs.mx:80/handle/23080/361>
- Luna-Figueroa J. (2007). Incorporación de larvas de mosquito *Culex stigmatosoma* (Diptera:Culicidae) en la dieta del pez cebra *Brachidanio rerio* (Pisces:Cyprinidae) y su efecto en la reproducción. Laboratorio de Acuicultura, Departamento de Hidrobiología, Centro de Investigaciones

Biológicas, UAEMor, México.11 (1),49-59.  
<http://ww.ucol.mx/revaia/pdf/2007/enero/5.pdf>

Luna-Figueroa J. (2009). Nematodo de vida libre *Panagrellus redividus* (Goodey , 1945): Una alternativa para la alimentación inicial de larvas de peces y crustáceos. Investigación y Ciencia. Aguascalientes México 17(45). 4-11.  
<https://www.redalyc.org/pdf/674/67412188002.pdf>

Luna-Figueroa, J., Vargas, Z. T. y Figueroa,T. J. (2010). Alimento vivo como alternativa en la dieta de larvas y juveniles de *Pterophyllum scalare* (Lichtenstein, 1823). Avances en investigación Agropecuaria, 14 (3),63-72.  
<https://www.redalyc.org/pdf/837/83715746005.pdf>

Luna-Figueroa J., Arce Uribe E. (2017). Un menú diverso y nutritivo en la dieta de peces: "Live Feed". Agroproductividad: Vol. 10, (9) 112-116. <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/985/843>

Gatenby, C., M. Orcutt, D., A. Kreeger, D., C. Parker, B., A. Jones, V., y J. Neves, R. (2003). Biochemical composition of three algal species proposed as food for captive freshwater mussels. Journal of Applied Phycology, 1-12.  
[https://www.mussellab.fishwild.vt.edu/mussel/PDFfiles/Bicochemical\\_composition.pdf](https://www.mussellab.fishwild.vt.edu/mussel/PDFfiles/Bicochemical_composition.pdf)

Maltsev Y., Maltseva K., Kulikovskiy M., Maltseva S. (2021). Influence of light conditions on microalgae growth and content of lipids, carotenoids, and fatty acid composition. Biology 2021, 10, 1060. <https://doi.org/10.3390/biology10101060>

Manrique Ruiz I. G. y Corzo Piñeros R. J., (2019). Evaluacion de carotenoides y lipidos en la microalga *Scenedesmus dimorphus* a escala laboratorio bajo condiciones de fotobiorreactor. Fundacion Universidad de America Facultad de Ingenieria Bogota. 1-164.  
<https://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/7392/1/6141292-2019-1-IQ.pdf> Access:24/11/21

Markou G., Vandamme D., Muylaert K.(2014) Microalgal and cyanobacterial cultivation: the supply of nutrients. *Water Research*, 65, 186-202.

Martínez Cordoba L. R., Quadros W., Molina Poveda C., Villarreal Cavazos D., Montoya N., Nolasco Soria H., Vega F. Casillas Hernández R., Carrillo O., García Galano T., Fraga I., Lechuga Devéze C. H., Magallón Barajas F. J. y Villarreal Colmenares H. (2008). Estrategias de Alimentación en la etapa de engorda del camarón. *CYTED Ciencia y tecnología para el desarrollo*, La Paz B.C.S, México. 1-130.  
<https://www.cibnor.gob.mx/images/stories/biohelis/pdfs/Estrategias-de-alimentacion-en-la-etapa-de-engorda-del-camaron.pdf>

Martínez Córdova L. R., Martínez Porchas M., López Elías J. A., Campaña Torres A., Miranda Baeza A., Ballester E., Porchas Cornejo M. A. (2010). Alimento natural en acuicultura: una revisión actualizada. *Avances en Nutrición Acuícola X- Memorias del X Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*, 8-10 de noviembre, San Nicolas Garza. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, 668-699.  
[https://www.uanl.mx/utillerias/nutricion\\_acuicola/X/archivos/26-LuisMartinez.pdf](https://www.uanl.mx/utillerias/nutricion_acuicola/X/archivos/26-LuisMartinez.pdf)

Martínez Jiménez, A. (2012). Caracterización fisiológica y genómica de *Neochloris oleoabundans* bajo condiciones foto y heterotróficas que favorecen el crecimiento celular y la acumulación de lípidos. Instituto de Biotecnología, UNAM, Colecciones Universitarias Digitales y cosechado de Portal de Datos Abiertos UNAM, Colecciones Universitarias <http://datosabiertos.unam.mx/DGAPA:PAPIIT:IT200312> Access 24/11/21

Martínez-García J. (2017). Estudio de la influencia de distintas condiciones de cultivo en la producción de luteína en microalgas. Universidad de Coruña. Coruña. España. (2017). 1-44.

[https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/18610/MartinezGarcia\\_Jessica\\_TFM\\_2017](https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/18610/MartinezGarcia_Jessica_TFM_2017)

Mayer C., Come M., Ulmann L., Chini Z. G., Faraloni C., Nazih H., Ouguerram K., Chénais B. y Mimouni V. (2019). Preventive effects of the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*, used as food supplement, on risk factors associated with metabolic síndrome in wistar rats. *Nutrients*. 11, 1069:1-19. Doi: 10.3390/nu11051069

Medina-Reyna, C., y Cordero-Esquivel, B. (1998). Crecimiento y composición bioquímica de la diatomea *Chaetoceros muelleri* Lemmerman, mantenida en cultivo estático con un medio comercial. *Ciencia y Mar*, 2(6). 19-25. <https://docplayer.es/21406587-Crecimiento-y-composicion-bioquímica-de-la-diatomea-Chaetoceros-muelleri-lemmerman-mantenida-en-cultivo-estatico-con-un-medio-comercial.html>

Méndez A. S., Alvarez Y., Sosa L. E. y Vizxarra Y. G. (2020). Concentración celular y biomasa seca en tres especies de microalgas marinas: *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata* y *Tetraselmis striata*. *Journal of High Andean Research*. 22(2): 155-160. <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Mercado-Tupiño E. (2016). Cultivo de la microalga *Scenedesmus obliquus* var. *Dimorphus* (TURPIN) para la obtención de biomasa y lípidos. Universidad Ricardo Palma. Lima. Perú. 1-137.

Mimouni, V., Ulmann, L., Pasquet, V., Mathieu, M., Picot, L., Bougaran, G., Cadoret J.P., Morant-Manceau, A., Schoefs B. (2012). ResearchGates, Bentham Science Publishers. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 1-18. <file:///C:/Users/pc/Downloads/2012CurrPharmBiotechnol.pdf>

Mora, A., Ramos, K., Sánchez, A. y Camacho, R. (2015). Efecto de la salinidad y la luminosidad sobre el tamaño de *Neochloris cohaerens* library (RcmdrMisc). Amazonaws.com. <https://rstudio-pubs->

static.s3.amazonaws.com/124294\_6656ce7bb32d4393a082feb91e0ae5d0.html

Mora Pinargote, J. A. (2019). Alternativa para la intensificación a bajo costo en el cultivo de microalgas. Guayaquil Ecuador: Escuela Superior Politécnica Litoral.1-61.

<http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/123456789/48136/D-76680.pdf?sequence=-1&isAllowed=y>

Motten A.F. (2004). Diversity of photosynthetic pigments. 159-177. In: Tested studies for laboratory teaching, 25 (M.A. O'Donell, Ed.) Proceeding of the 25<sup>th</sup> Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE).16. 81-98.

Msangi, S., Kobayashi, M., Batka, M., Vannuccini, S., Dey, M. M., y Anderson, J. L. (2013). Fish to 2030: prospects for fisheries and aquaculture. World Bank Report, (83177-GLB), 102 p. <https://openknowledge.worldbank.org/bitstream/handle/10986/17579/831770WP0P11260ES003000Fish0to02030.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Muller-Feuga, A. (2000). The role of microalgae in aquaculture: situation and trends .Journal of Applied Phycology.12: 527-534.

Muñoz-Gutiérrez, M. E. (2006). Alimento vivo para peces. Revista de la Facultad de Ciencias Básicas. 2(1) 43-63. <https://es.slideshare.net/Ed8109/alimentos-vivos>

Nadal Moscoso N. A. (2021). Reutilización de biomasa microalgal *Tetradismus obliquus*, obtenida durante la operación de un sistema de recirculación acuícola, para la producción de ácidos grasos insaturados empleados en la fabricación de resinas epoxicas.Universidad del Bío-Bío. Sistema de Bibliotecas Chile. 1-58.

- Neofotis, P., Huang, A., Sury, K., Chang, W., Joseph, F., Gabr, A., Twary, S., Qiu, W., Holguin, O., Polle, J.E.W. (2016) Characterization and classification of highly productive microalgae strains discovered for biofuel and bioproduct generation. *Algal Research*, 15, pp. 164-178. doi: [10.1016/j.algal.2016.01.007](https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.01.007)
- Neumann U., Derwenskus F., Flister V.F., Schmid-Staiger U., Hirth T. y S. C. Bischoff. (2019). Fucoxanthin a carotenoid derived from *Phaeodactylum tricornutum* exert antiproliferative and antioxidant activities in vitro. *Antioxidants*. 8(6):1-11.
- Nuñez, C. E. (2008). Extracciones con equipo Soxhlet.1-5. <http://cenunez.com.ar/archivos/39-ExtraccinconequipoSoxhlet.pdf>
- OESA - Fundación Biodiversidad. (2018). Caracterización de la cría en cautividad y repoblación de especies de interés a través de la acuicultura. Fundación Biodiversidad, Madrid, España. 60 páginas [https://observatorio-acuicultura.es/sites/default/files/images/adjuntos/libros/caracterizacion\\_cria\\_cautividad\\_repoblacion\\_especies\\_interes\\_14052018.pdf](https://observatorio-acuicultura.es/sites/default/files/images/adjuntos/libros/caracterizacion_cria_cautividad_repoblacion_especies_interes_14052018.pdf)
- Ohse, S., Bianchini Derner, R., Ávila Ozório, R., Gordo Corrêa, R., Badiale Furlong, E., y Roberto Cunha, P. (2015). Lipid content and fatty acid profiles in ten species of microalgae. *IDESIA (Chile)*, 33(1), 93-101. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/idesia/v33n1/art10.pdf>
- Olmedo, V. (2019). Carbohidratos y proteínas en microalgas: potenciales alimentos funcionales. *Brazilian Journal of Food Technology* (22) 1-12.
- Orantes Calleja P. D. (2022). Optimización del cultivo de microalgas en agua residual sintética para la producción de biodiesel. Universidad de ciencias y artes de Chiapas. 1-87.

- Orosa, M., Torres E ., Fidalgo, P. y J. Abalde. (2000). Production and analysis of secondary carotenoids in green algae, *Journal of Applied Phycology*. 12: 553-556.
- Orosa, M., Valero, JF., Herrero, C.H. y J. Abalde (2001). Comparison of the accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* and other green microalgae under N-starvation and high light conditions, *Biotechnology Letters*. 23: 1079-1085.
- Pal, D., Khozin-Goldberg., I., Cohen, Z., y Boussiba, S. (2011). Effect of light salinity and nitrogen on availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. *Applied Microbiology Biotechnology Springer -Verlag*, 1429-1441.  
file:///C:/Users/pc/Downloads/2011TheeffectoflightsalinityandnitrogenavailabilityonlipidproductionbyNannochloropsissp.pdf
- Panta V. R. P., Macay G. A. G., Moncayo Z. E. M. y Vélez C. J. C. (2016). Crecimiento de las microalgas *Chaetoceros gracilis* e *Isochrysis galbana* con fertilizantes agrícolas, en laboratorio, *Revista La Técnica. Pesca*. 44-55.
- Panis G. y Rosales C. J. (2016). Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: A microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line. *Algal Research* 18. 175-190. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2016.06.007>
- Patil V., Kallqvist C., Olsen E., Vogt G. y Gislerod H.R. (2007). Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Aquaculture International*, 1-9.  
file:///C:/Users/pc/Downloads/Fatty\_acid\_composition\_of\_12\_microalgae\_for\_possib.pdf
- Park J., Jeong H., Yoon E. y Moon S. (2016). Easy and rapid quantification of lipid contents of marine dinoflagellates using the sulpho-phospho-vainillin method. *Algae*. 31(4) 391-91. <https://doi.org/10.4490/algae.2016.31.12.7>

Peña, S., UTEX. (2021). Algal Culture Media. Obtenido de UTEX culture collection of Algae at The University of Texas at Austin <https://utex.org/pages/algal-culture-media>.acceded 10 11 21

Peñaranda Arias, M. T., Roldan Martínez, A. J. y Cañizares Villanueva, R. O. (2013) Producción de *Biodiesel a partir de Microalgas*: Parámetros de cultivo que afectan la producción de Lípidos. Acta Biológica Colombiana, Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, Colombia. 18(1), 43-68. <https://www.redalyc.org/pdf/3190/319028010004.pdf>

Pérez-Legaspi, I. A., Guzmán-Fermán, B. M., Moha-León, J. D., Ortega-Clemente, L. A. y Valadez-Rocha, V. (2018). Effects of the biochemical composition of three microalgae on the life history of the rotifer *Brachionus plicatilis* (Alvarado strain): an assessment. *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology* (.54), 1-8 . <https://doi.org/10.1051/limn/2018011>

Pérez-Legaspi, I.A., Valadez-Rocha, V., Ortega –Clemente, L.A y M.I. Jiménez-García. (2019). Microalgae pigment induction and transfer in aquaculture, *Reviews in Aquaculture*, 12, 3, 1323-1343.

Pérez-Rojas C. A., (2016). Producción de lípidos, ácidos grasos y pigmentos en *Triceratium dictyosum* Sims y Ross (1990) (Bacillariophyta: Coscinodiscophyceae) bajo condiciones de estrés por déficit de nitrógeno, déficit de silicio y distintas irradiancias. Maestría en Ciencias. Centros de Investigación Biológicas del Noroeste. La Paz. 1-99.

Perote-Acln L., Serrat M. y Jorba M. (2021) Desarrollo de aminoácidos libres para formular bioestimulantes proteicos a partir de la microalga *Scenedesmus sp.* Facultad de Ciencias y Tecnología LEiTAT managing technologies. 1-52. <http://hdl.handle.net/10854/6940>

Pirastru L., Darwish M., Chu F. L., Perreault F., Sirois L., Sleno, L. y R. Popovic (2012). Carotenoid production and change of photosynthetic functions in *Scenedesmus* sp. Exposed to nitrogen limitation and acetate treatment. *Journal of Applied Phycology*, 24: 117-124.

Platas R. D. E. y Vilaboa A. J. (2014) "La acuicultura mexicana : potencialidad retos y áreas de oportunidad." *Revista Mexicana De Agronegocios*, vol. 35, no. 8, pp. 1065-1071. Redalyc, <https://www.redalyc.org/pdf/141/14131676015.pdf>. Accessed 15 10 2021.

Plasencia Álvarez, J. (2012) Cultivo de microalgas (*Chlorella sorokiniana*) con iluminación mediante LEDs (Light Emitting Diodes). Universidad Politécnica de Madrid. Madrid. 1-104. [https://oa.upm.es/22523/1/TFC\\_Juan\\_Plasencia.pdf](https://oa.upm.es/22523/1/TFC_Juan_Plasencia.pdf)

Prieto M, J, Mogollon M. J. Castro A. L. y Sierra L. A. (2005). Efecto del medio y condiciones de cultivo en la productividad de tres diatomeas marinas con potencial acuícola. *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Córdoba*. 10(1), 544-554.

Prieto M., Castaño F., Sierra J., Logato P., Botero J. (2006). Alimento vivo en la larvicultura de peces marinos: Copépodos y mesocosmos. *Revista MVZ Córdoba*. Montería Colombia. 11(1), 30-36. <https://www.redalyc.org/pdf/693/69309904.pdf>

Priyadarshani, I., Sahu, D. y B. Rath. (2011). Microalgal bioremediation: Current practices and perspectives. *Journal Biochemistry Technology*. 3(3): 299-304.

Puello-Cruz A. C., González-Rodríguez B. y García-Ortega A.(2011) Compilación sobre el uso y producción de copépodos como alimento vivo para larvicultura marina en Ciad-Mazatlán. *Avances en Acuicultura y manejo ambiental*. 123-135.

- Qiao H., Cong. C., Sun C., Li B., Wang J. y L. Zhang. (2015). Effect of culture conditions on growth, fatty acid composition and DHA/EPA ratio of *Phaeodactylum tricornutum*. *Aquaculture* 452, 311-317. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.011>
- Quevedo O. C., Morales V. S P. y Acosta C. A. (2008). Crecimiento de *Scenedesmus* sp. En diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalgal. *VITAE. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*.15 (1)25-31.ISSN 0121-4004.
- Rendón Castrillón, L. J., Ramírez Carmona, M. E. y Vélez Salazar, Y. H. (2013). *Microalgas para la Industria alimenticia*. Editorial Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia.1-72 .  
file:///C:/Users/pc/Downloads/microalgas%20version%20web%20(4).pdf
- Riccio G. y Lauritano C. (2022). Nutrient starvation exposure induced the down-regulation of stress responsive genes and selected bioactive metabolic pathways in *Phaeodactylum tricornutum*. *Stresses* 2022, 2, 308–321. <https://doi.org/10.3390/stresses203002>
- Rivera C. M. y Botero M. (2009). Alimento vivo enriquecido con ácidos grasos para el desarrollo larvario de peces. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* Medellín, Colombia. 22(4), 607-618. <https://www.redalyc.org/pdf/2950/295023527004.pdf>
- Rosas-Reyna R. (2017). Obtención de biodiesel por método enzimático a partir de lípidos de biomasa microalgal. Instituto TecNM. Tecnológico de Boca Del Rio.1-53.
- Sadoud M. (2020) Propriétés biologiques de l'astaxanthine produite par *Haematococcus pluvialis* sous conditions de stress. Université abdelhamid ibn badis mostaganem. Faculte de Sciences de la nature et de la vie

Departament de Biologie. 1-144. <http://e-biblio.univ-mosta.dz/bitstream/handle/123456789/15479/Th%C3%A8se%20Sadoud%20meryem.pdf?sequence=1>

Salazar-Pérez, L. E. (2012) .Evaluacion de métodos de extracción de aceite de microalgas para la produccion de biodiesel. Repositorio Institucional PIRHUA.Facultad de Ingeniería.Área Departamental de Ingeniería Industrial y de Sistemas. 1-145. [https://pirhua.udep.edu.pe/bitstream/handle/11042/1490/ING\\_508.pdf](https://pirhua.udep.edu.pe/bitstream/handle/11042/1490/ING_508.pdf)

Sang M. K., Yu-Jim J., Oh. Nam K., Kwang H. C., Byung-Hun U., Donghwa C. y Cheol-Ho P. (2011). A potencial comercial source of fucoxanthin extracted from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. Applied Biotechnology. 166:1843-1855. Doi : 10.1007/s12010-012-9602-2

Stack J., Le G. A. V., Tobin P. R., Guihéneuf F., Stengel D. B. y FitzGerald R. J. (2018). Protein extraction and bioactive hydrolysate generation from two microalgae, *Porphyridium purpureum* and *Phaeodactylum tricornutum*. Journal of Food Bioactives. International Society for Nutraceuticals and Functional Foods.1: 153-165. Doi: 10.31665/JFB. 2018.1134.

Saoudi-Helis, L., Dubacq, J.-P., Marty, Y., Samain, J.-F., y Gudin, C. (1994). Influence of growth rate on pigment and lipid composition of the microalga *Isochrysis aff. galbana* clone T.iso. Journal of Applied Phycology, 315-322. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02181945>

Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural. (09 Abril 2019). “GOBIERNO DE MÉXICO: Acuicultura, producción y conservación de organismos acuáticos.” GOBIERNO DE MEXICO, Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/acuicultura-produccion-y-conservacion-de-organismos-acuaticos>. Accessed 15 10 2021.

Sen-Roy, S., y Pal, R. (2014). Microalgae in Aquaculture: A review with special references to nutritional value and fish dietetics. Research Gate, 1-9. [https://www.researchgate.net/publication/263150670\\_Microalgae\\_in\\_Aquacult](https://www.researchgate.net/publication/263150670_Microalgae_in_Aquacult)

ure\_A\_Review\_with\_Special\_References\_to\_Nutritional\_Value\_and\_Fish\_Dietetics

Severes A., Hegde S., D'Souza L. y Hegde. (2017). Use of light emitting diodes (LEDs) for enhanced lipid production in micro-algae based biofuels. *Journal of Photochemistry y Photobiology, B: Biology*.1-15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.04.023>

Sheath, R.G. y J. D. Wehr (2003). Introduction to freshwater algae. In: *Freshwater Algae of North America Ecology and Classification*. Academic Press. Elsevier Science. San Diego, Cal. E.U.A. pp. 935.

Soeder., J. C.(1976). The technical production of microalgae and its prospects for marine aquaculture. (P. Press, Ed.) *Harvesting Polluted Eater*. Devik, 1-1. [https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/25013/Abalde\\_Julio\\_1995\\_Microalgas\\_cultivo\\_aplicaciones.pdf](https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/25013/Abalde_Julio_1995_Microalgas_cultivo_aplicaciones.pdf). Accessed 01 11 2021.

Soto-León, S., Zazueta-Patrón, I., Piña-Valdez, P., Nieves-Soto, M., Reyes-Moreno, C., y Contreras-Andrade, I. (2014). Extracción de lípidos de *Tetraselmis suecica*: Proceso Asistido Por Ultrasonido Y Solventes. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 13(3) 723-737. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmiq/v13n3/v13n3a7.pdf>

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. e Isambert, A. (2005). Commercial applications of microalgae. *Journal Of Biosciencie and Bioengineering. The Society for Biotechnology*. 101(2),87-96. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16569602/>

Starr y Zeikus (1993). MES Volvox Medium. Provasoli-Guillard, NCMA, National Center for Marine Algae and Microbiota, Culturing Diversity. Bigelow Laboratory For Ocean Sciences. 1-2. <https://ncma.bigelow.org/PDF%20Files/NCMA-algal-medium-Volvox.pdf>

- Stein, J. (1979). Handbook of Phycological Methods, Culture Methods and Growth Measurement Cambridge at the University Press pp. 448.
- Strickland, J.D. y T.R. Parsons. (1972). Spectrophotometric determination of chlorophylls and total carotenoids. A practical handbook of seawaters analysis. Pigments analysis. Fish Resource Building Canada Bulletin. Canada 167:185-199.
- Trivedi J, Atray N. y Agrawal D. (2020). Evaluating cell disruption strategies for aqueous lipid extraction from oleaginous *Scenedesmus obliquus* at high solid loadings. European Journal of Lipid Science and Technology. 1-6. Doi: 10.1002/ejit.201900328.
- Torrentera-Blanco L. y Tacon A. (1989). La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura una diagnosis. Brasil. Prohct Reports, 12:90.
- Torres-Da-Silva M. E. (2020) Caracterización nutricional y toxicidad de la Microalga *Scenedesmus obliquus* y propiedades técnico-funcionales de sus proteínas. Tesis de Doctorado Universidad Federal de Viçosa-Minas Gerais. 1-129.
- Torres-Valencia G. A., Imués-Figueroa M. A., Sanguino-Ortiz W. R. y Chapman F. A. (2017). Aislamiento de una cepa de rotífero de agua dulce con potencial como alimento vivo en acuicultura. Revista Investigación Pecuaria (REVIP) 5(1): 25-32. <http://dx.doi.org/10.22267/revip.1851.3>
- Us-Vázquez R. A. (2011). Efecto de la limitación de Nitrógeno y Fósforo en la producción de Nitrógeno y Fósforo en la producción de lípidos en cultivos de las microalgas verdes *Scenedesmus obliquus* y *Scenedesmus* sp. Maestría en Ciencias en energía renovable. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Yucatán, Mexico. 1-105.

UTEX (2021, 30 de noviembre). Algae Culture Media. Universidad de Austin Texas.  
<https://utex.org/collections/algae-culture-media>.

Vásquez-Suárez, A., Guevara, M., Salazar, G., Arredondo-Vega, B., Cipriani, R., y Lemus, N. (2007). Crecimiento y composición bioquímica de cuatro cepas de *Dunaliella* para ser utilizadas en acuicultura. Boletín Del Centro de Investigaciones Biológicas, 42(2).181-194.  
<https://produccioncientificaluz.org/index.php/boletin/article/view/71/71>

Velasco, L. A., Barros-Gómez J., Ospina-Salazar, G. H. y Trujillo C. A. (2009). La intensidad luminica, temperatura y salinidad sobre el crecimiento de la microalga *Isochrysis galbana*(T-ISO). Revista del Instituto de Investigaciones Tropicales, Universidad del Magdalena, Laboratorio de Moluscos y Microalgas Santa Marta D.T.C.H. Colombia. 93-99

Vera-López P. y Marínez J. A. (2021). Pigmentos en microalgas: funciones, aplicaciones y técnicas de sobreproducción. BioTecnología, Año 2021, Vol. 25 No.5. pag 35-51.

Viso, A.-C., y Marty, J.C. (1993). Fatty acids from marine microalgae. Phytochemistry. 34(6).1521-1533.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031942200908392>

Volkman, J., Jeffrey, S., Nichols, P., Rogers, G., y Garland, C. (1989). Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 128(3).219-240.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0022098189900294>

Xiang W., Si-Fen Li., Rou-You Li., Wei-Dong Y., Jie-Sheng L., Carol-Sze K. L., Srinivasan B. y Hong-Ye L.(2020). TAG pathway engineering via GPAT2 concurrently potentiates abiotic stress tolerance and oleaginity

in *Phaeodactylum tricornutum*. *Biotechnology for Biofuels*. 1-14.  
<https://doi.org/10.1186/s13068-020-01799-5>

Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., y Ying-xue, S. (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*, 101, (14)54945500.<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852410002877>

Yaakob, M.A.; Mohamed, R.M.S.R.; Al-Gheethi, A.; Aswathnarayana G. R y R.R. Ambati. (2021). Influence of nitrogen and phosphorus on microalgal growth, biomass, lipid, and fatty acid production: An overview. *Cells* 10, 393.

Yahong G., Wei M., Jiji L., Wei L., Pengzhi Q., Yingying Y., Baoying G., Jianshe Z., Chengkai Q.(2019). Effects of microplastics on growth, phenanthrene stress, and lipid accumulation in a diatom, *Phaeodactylum tricornutum*. *Environmental Pollution*. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113628>

Yang Y. H., Du L., Hosokawa M., Miyashita K., Kokubun Y., Arai H. y Taroda H. (2017). Fatty acid and lipid class composition of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Oleo Science*. Faculty of Fisheries Sciences. Japan. ISSN 1347-3352. 363-368 Doi: 10.5650/jos.ess16205

Ynga-Huamán, G. A. (2011). Cultivo masivo de microalgas en biorreactores verticales. Universidad Nacional de San Agustín, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Escuela Profesional y Académica de Biología. Arequipa-Perú.  
<https://repositorio.imarpe.gob.pe/bitstream/20.500.12958/2110/1/Ynga%20Huam%C3%A1n%20G..pdf>

Yongmanitchai W. y Ward O. P. (1991). Growth of and Omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornutum* under different culture conditions. Applied and Environmental Microbiology. American Society for Microbiology. 57(2):419-425

Zahin, M. Aqil F., Husain F.M. y I. Ahhmad. (2013). Antioxidant capacity and antimutagenic potential of *Murraya Koenigii*. Biomed Research International. 1-10 ID 263509. <https://doi.org/10.1155/2013/263509>

Zapata L. M., Jiménez-Veuthey M., Vezzosi-Zoto G. F., Sacks N. A., Flores A. y Zampedri P., Zampedri C. (2020). Optimización de condiciones de cultivo de *Scenedesmus obliquus* para maximizar la producción de componentes bioactivos de interés industrial. Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal. 11(1) 15-33. <https://www.researchgate.net/publication/343430820>

Zapata L. M., Jiménez-Veuthey M., Flores A. B., Sack N. A., Vezzosi-Zoto G. F. (2022). Desarrollo de un medio de cultivo para potenciar la producción de componentes bioactivos en la microalga autóctona *Scenedesmus obliquus*. Ciencia, Docencia y Tecnología. Suplemento CD y T .(2022) 12 (13) 279-292. <https://pcient.uner.edu.ar/index.php/Scdyt/article/view/1350>

## 12. Anexo

### Anexo (1)

Método para preparar reactivo de Bradford (Guzman, 2013)

1.-Se disolvió 25 mg de azul brillante de Comassie G-250 en 12.5 ml de etanol al 95°.

La solución resultante se mezcló con 25 ml de ácido fosfórico al 85 % y se aforó a 250 ml de agua destilada.

La solución se filtró en un filtro whatman No. 1 y se transfirió a un frasco ámbar manteniendo en refrigeración.

Tabla Anexo 1. Curva de calibración para la determinación de proteínas

| Utilizando Albumina de huevo a distintas concentraciones como estándar |              |                                 |                             |
|--|--------------|---------------------------------|-----------------------------|
| Solución madre 200mg/L   |              | se realizó la medición a 595 nm |                             |
| Concentraciones (mg/L)   | Lectura (nm) | µL Albumina                     | µL Hidroxido de Sodio 0.1 N |
| 10   | 0.064        | 50                              | 950                         |
| 15   | 0.144        | 75                              | 925                         |
| 20   | 0.15         | 100                             | 900                         |
| 30   | 0.226        | 150                             | 850                         |
| 40   | 0.283        | 200                             | 800                         |
| 50   | 0.316        | 250                             | 750                         |
| 60   | 0.366        | 300                             | 700                         |
| 100  | 0.605        | 500                             | 500                         |
| 200  | 1.097        | 1000                            | 0                           |

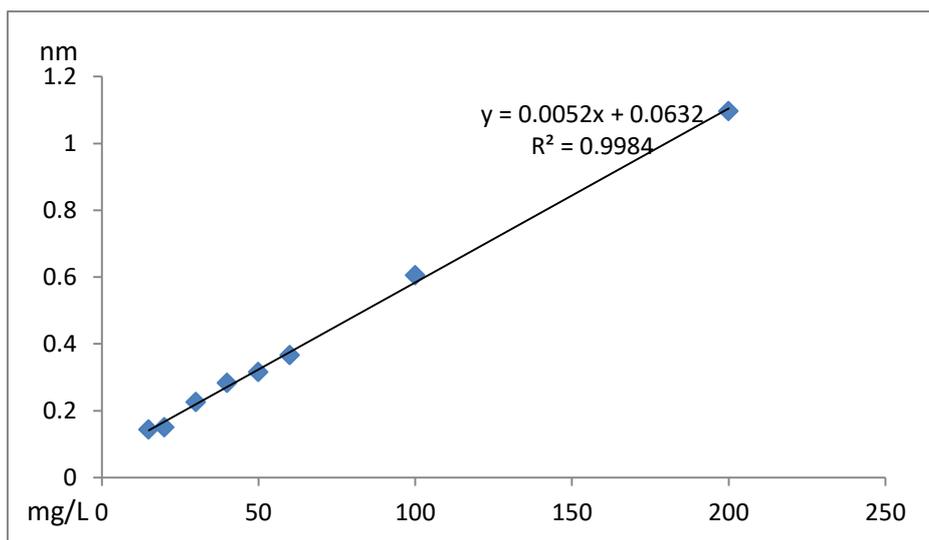


Figura 36. Curva de calibración proteínas

Anexo (2)

Tabla Anexo 2. Curva de calibración de carbohidratos con glucosa anhidra

| curva de calibración de carbohidratos con glucosa anhidra |                   |                             |                   |
|---|-------------------|-----------------------------|-------------------|
| (Sol. Madre 100mg/L)                                      | Lecturas a 315 nm |                             |                   |
| concentración(mg/L)                                       | Absorbancia       | μL sol. madre de glucosa a. | μL agua destilada |
| 75  | 0.827             | 750                         | 250               |
| 50  | 0.606             | 500                         | 500               |
| 30  | 0.538             | 300                         | 700               |
| 15  | 0.465             | 150                         | 850               |
| 10  | 0.395             | 100                         | 900               |

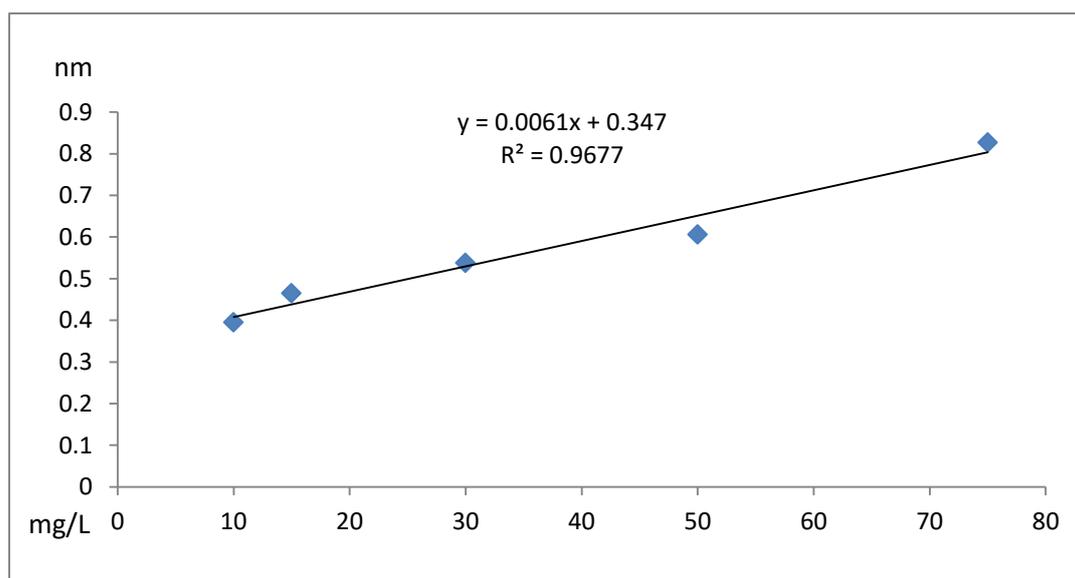


Figura 37. Curva de calibración carbohidratos

### Anexo (3)

Método para preparar reactivo ABT'S (Zahin et al., 2013)

2.-Para la formación del radical ABTS se mezclaron 12.5 mL de persulfato de potasio ( $K_2S_2O_8$ ) 2.45 mM (0.0662 g/100 mL de agua) con 25 mL de ABTS 7 mM (0.3602 g/100 mL de agua).

La mezcla mantiene a temperatura ambiente y en oscuridad durante 12-16 h.

Tabla Anexo 3. Curva de calibración determinación de Inhibición antioxidante con ABT'S

| Curva de Calibración Abts (Ac. Ascórbico) |                    |              |
|---|--------------------|--------------|
|   | Lecturas 734nm     |              |
| Concentracion(mg/L)                       | Absorbancia(734nm) | % Inhibición |
| 3.125                                     | 0.573              | 21.9346049   |
| 12.5                                      | 0.496              | 32.4250681   |
| 25  | 0.4                | 45.5040872   |
| 100                                       | 0.012              | 98.3651226   |

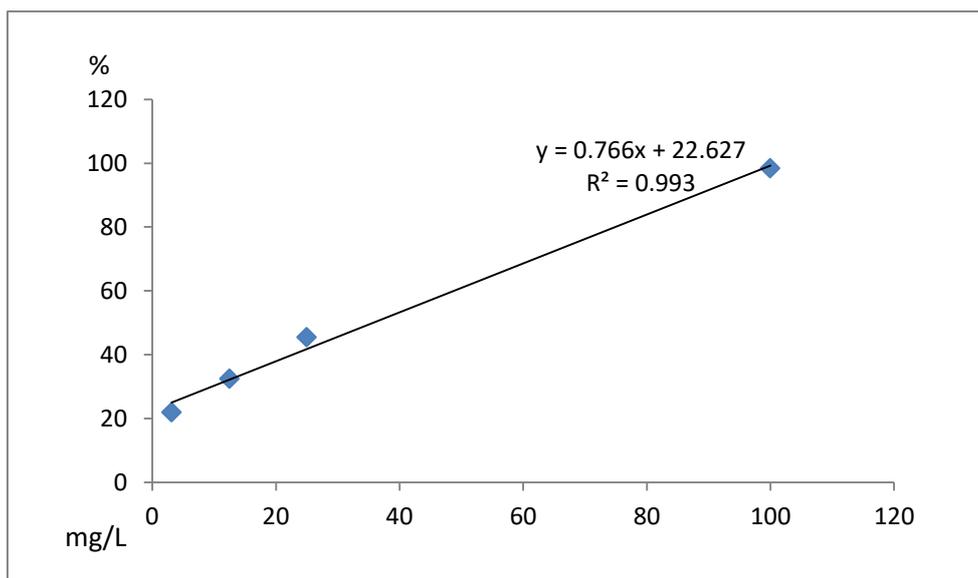


Figura. 38 Curva de calibración Inhib Antioxidante

#### Anexo (4)

Método para preparar reactivo Sulfo-fosfovainillina (Park et al., 2016)

En un matraz de 150 mL., forrado de papel aluminio se agregan 120 mL. Ac. Fosfórico, 30 mL agua destilada.

Finalmente se agregan 0.181 mg del reactivo de Vainillina.

Tabla Anexo 4. Curva de calibración para determinación de lípidos por sulfo-fosfovainillina

| Curva de calibración de Lípidos Totales mediante el método de Sulfo-fosfovainillina |                           |                        |
|---|---------------------------|------------------------|
| Utilizando Aceite de Oliva Extra Virgen/Cloroformo                                  |                           | (50mg/50mL)=<br>1mg mL |
| Concentración   | Diluciones en microlitros | Valores de Lectura     |
| Mg  | µL                        | Nm                     |
| 0.04  | 40                        | 0.124                  |
| 0.08  | 80                        | 0.129                  |

|      |      |       |
|------|------|-------|
| 0.1  | 100  | 0.134 |
| 0.15 | 150  | 0.207 |
| 0.5  | 500  | 0.407 |
| 1    | 1000 | 0.683 |

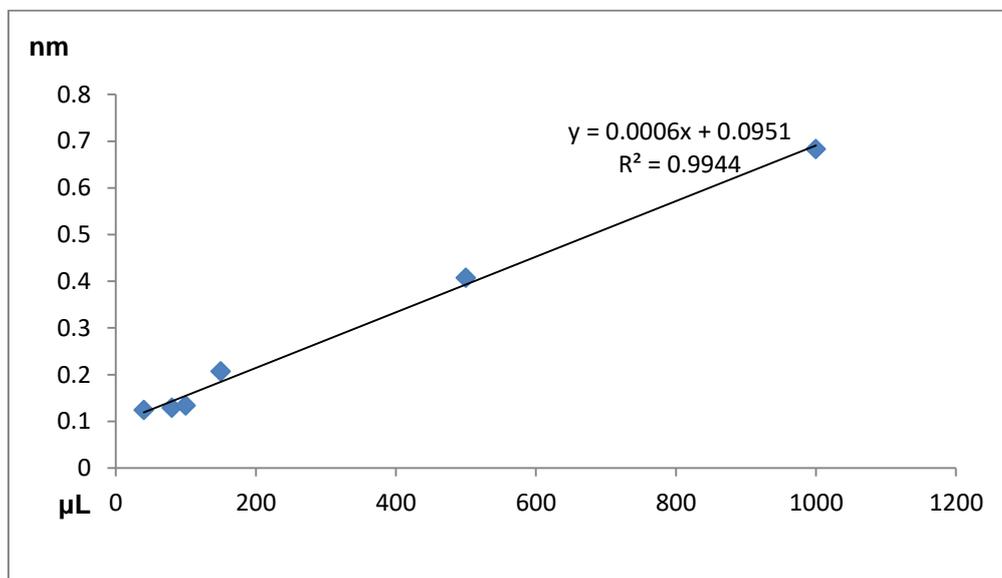


Figura 39. Curva de calibración para lípidos totales