

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Acuicultura**

**Crecimiento y composición bioquímica de *Scenedesmus
acuminatus* cultivada con distinto aporte químico de nitrógeno
e irradiancia**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Sandra Ivonne López Barrón

Ensenada, Baja California, México
2020

Tesis defendida por
Sandra Ivonne López Barrón

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Directora de tesis

Dra. Ceres Anabel Molina Cárdenas
Codirectora de tesis

Miembros del comité

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez

Dr. Rodrigo Méndez Alonzo



Dra. Fabiola Lafarga de la Cruz
Coordinador del Posgrado en Acuicultura

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Sandra Ivonne López Barrón © 2020

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Sandra Ivonne López Barrón** como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

Crecimiento y composición bioquímica de *Scenedesmus acuminatus* cultivada con distinto aporte químico de nitrógeno e irradiancia

Resumen aprobado por:

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra

Directora de tesis

Dra. Ceres Anabel Molina Cárdenas

Codirectora de tesis

La composición bioquímica de las microalgas se ve afectada por las condiciones de cultivo y las fases de crecimiento. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del aporte químico del nitrógeno y de la irradiancia respecto al crecimiento, la composición proximal, pigmentos, fotosíntesis y el perfil de ácidos grasos de *Scenedesmus acuminatus*. Se utilizaron dos aportes químicos de nitrógeno (nitratos y amonio) y tres irradiancias (50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). La tasa de crecimiento presentó diferencias significativas por efecto del aporte químico de nitrógeno y por el nivel de irradiancia utilizado, donde la mayor tasa de crecimiento se presentó en cultivos con amonio a 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La composición proximal exhibió diferencias significativas por efecto del aporte químico de nitrógeno y por la irradiancia, favoreciendo la producción de proteínas en cultivos con amonio a 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en fase estacionaria. La mayor producción de lípidos se presentó en cultivos con amonio a 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en fase exponencial, mientras que la mayor concentración de carbohidratos se obtuvo con amonio a 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en fase exponencial. El contenido de clorofila presentó diferencias por efecto del aporte de nitrógeno y la irradiancia, obteniendo los mayores valores de clorofila *a* en los cultivos a 50 y 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ suministrados con amonio en fase estacionaria. La tasa máxima de transporte de electrones (ETR_{max}) no mostró diferencias significativas durante las fases de crecimiento. Sin embargo, los valores mayores de ETR_{max} fueron para los cultivos con amonio como aporte de nitrógeno y con la mayor irradiancia (200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). *Scenedesmus acuminatus* mostró cambios en el contenido de ácidos grasos por efecto de la forma de nitrógeno y del nivel de irradiancia utilizado. La mayor producción de ácidos grasos poliinsaturados se obtuvo con aporte de amonio y con los tres niveles de irradiancia utilizados. En conclusión, el uso de amonio como forma química de nitrógeno en el medio de cultivo produce un incremento en la tasa de crecimiento, la síntesis de proteínas, el contenido de pigmentos, la eficiencia fotosintética y el contenido de ácidos grasos poliinsaturados en *Scenedesmus acuminatus*. La tasa de crecimiento, el contenido de proteínas y la eficiencia fotosintética aumentan con la menor irradiancia utilizada (50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) mientras que con el aporte de nitrato se promueve un incremento en el contenido de ácidos grasos saturados y monoinsaturados.

Palabras clave: Nitrógeno, irradiancia, crecimiento, composición proximal, ácidos grasos, *Scenedesmus acuminatus*.

Abstract of the thesis presented by **Sandra Ivonne López Barrón** as a partial requirement to obtain the Master in Science degree in Aquaculture.

Growth and biochemical composition of *Scenedesmus acuminatus* cultivated with different nitrogen source and irradiance

Abstract approved by:

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Directora de tesis

Dra. Ceres Anabel Molina Cárdenas
Codirectora de tesis

The biochemical composition of microalgae is affected by the culture conditions and the growth phases. The aim of this work was to evaluate the effect of nitrogen source and irradiance on growth, proximal composition, pigments, photosynthesis, and the fatty acid profile of *Scenedesmus acuminatus*. Two nitrogen sources (nitrates and ammonium) and three irradiances (50, 100, and 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) were used. The growth rate presented significant differences due to the effect of the chemical supply of nitrogen and the level of irradiance used, where the highest growth rate occurred in cultures with ammonium at 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The proximal composition exhibited significant differences due to the effect of nitrogen source and irradiance, favoring the production of proteins in cultures with ammonium at 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in the stationary phase. The highest lipid production occurred in cultures with ammonium at 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in the exponential phase, while the highest concentration of carbohydrates was obtained with ammonium at 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in the exponential phase. The chlorophyll content presented differences due to the effect of nitrogen source and irradiance, obtaining the highest values of chlorophyll *a* in the cultures at 50 and 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ supplied with ammonium in the stationary phase. The maximum electron transport rate (ETR_{max}) did not show significant differences during the growth phases. However, the highest ETR_{max} values were for cultures with ammonium as a nitrogen source and with the highest irradiance (200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). *Scenedesmus acuminatus* showed changes in the content of fatty acids due to the effect of the nitrogen source and the level of irradiance used. The highest production of polyunsaturated fatty acids was obtained with the ammonium and with the three levels of irradiance used. In conclusion, the use of ammonium as a nitrogen source in the culture medium produces an increase in the growth rate, protein synthesis, pigment content, photosynthetic efficiency, and the content of polyunsaturated fatty acids in *Scenedesmus acuminatus*. The effect of irradiance used in *Scenedesmus acuminatus* cultures, the growth rate, protein content, and photosynthetic efficiency increase with the lower irradiance used (50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), with the contribution of nitrate an increase in the content of saturated and monounsaturated fatty acids.

Keywords: Nitrogen, irradiance, growth, proximal composition, fatty acids, *Scenedesmus acuminatus*.

Dedicatoria

A mis padres Jorge y Cristina por su apoyo incondicional en cada sueño y meta planteada.

A mis hermanos Adán y Eduardo por su apoyo y cuidado a lo largo de mi vida.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE), por permitirme formar parte de sus estudiantes y hacer uso de sus instalaciones de primer nivel para realizar mi maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios y de esta tesis mediante la manutención obtenida a través de la beca para estudios de posgrado con número de becario 18214356.

Al apoyo económico para la realización de la sección experimental de la tesis y que fue obtenido por medio del FIDEICOMISO del CICESE cuenta 623801 y del proyecto con recursos fiscales cuenta interna del CICESE 623108.

A la Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra codirectora de tesis por recibirme como su estudiante, por su apoyo, dedicación, infinita paciencia y sus amplios conocimientos brindados durante este proceso de aprendizaje y crecimiento tanto académico como personal. Por su motivación y comprensión en los momentos difíciles durante mi transcurso en CICESE y por hacerme parte de un gran equipo de trabajo.

A la Dra. Ceres Anabel Molina Cárdenas codirectora de tesis, por los conocimientos brindados, el apoyo y la paciencia otorgada. Por su asesoría en el uso de equipos y técnicas de laboratorio, por su tiempo y consejos académicos.

A la Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez por su apoyo desde el inicio de la maestría, por sus acertadas observaciones y correcciones en el transcurso del proyecto de tesis. Por su apoyo durante mi proceso de ingreso a CICESE y su motivación a seguir haciendo ciencia después de concluir mi licenciatura.

Al Dr. Rodrigo Méndez Alonzo por sus correcciones y observaciones acertadas en el proyecto de tesis. Por los conocimientos brindados durante su clase y su motivación por seguir trabajando en ciencia que beneficie al medio ambiente.

A mis compañeras de laboratorio, Karolina Casian González y Génesis León Santos, por su apoyo durante mis pruebas de laboratorio, sus asesorías y los conocimientos compartidos.

A la M. en C. Fátima Y. Castro Ochoa por su asesoría y ayuda en el laboratorio, uso de equipo y desarrollo de técnicas de análisis bioquímicos. Por sus consejos y ayuda en el manejo de datos. A Fátima alias la bbcita, por ser la mejor roomie y la mejor amiga de Ensenada, por recibirme con los brazos abiertos desde

antes de mi llegada a Ensenada, por los buenos y bonitos recuerdos que formamos juntas y por el apoyo en los momentos difíciles. En mí siempre tendrás una amiga jaladora.

A Patricio González Galeana (el wero) por su apoyo incondicional desde antes de mi ingreso a CICESE, por sus asesorías en las materias difíciles, por los bonitos recuerdos que formamos juntos, por ver a Chummy bb conmigo cuando me sentía decaída. Por esas aventuras que pasamos durante nuestro tiempo juntos en Ensenada. Por ser mi entrenador y ayudarme a bajar de peso (el primer año) con sus rutinas cardiacas que hacían que me desmayara. Por motivarme y levantar siempre mis ánimos. Adonde quiera que vaya siempre tendrás a tu amiga la nortehña (fierro pariente).

A mi aquelarre María Alfaro Luna de Oyorzabal (enenese) y a Elsi Giovanna Oyorzabal Vázquez (elsinto, elsilantro, elsienpies), washa washa para ustedes!. Agradecida por tenerlas a lo largo de este último año de maestría, por su amistad sincera, sus consejos, las risas y el apoyo que me han brindado. Sin importar la distancia que nos separe, el lugar o la hora, ustedes siempre tendrán a una amiga al pie del cañón. Muchas aventuras juntas, y si hubiéramos sabido que ese día sería el último que podríamos estar juntas en la política, nos hubiéramos quedado hasta que cerraran.

A mis comadres Marylin Gil Martínez, Miriam Hueytletl-Pérez, Karolina Casián, por su apoyo incondicional en cada etapa de mi transcurso en CICESE, por su apoyo y las risas compartidas, por enseñarme lo rico que son los desayunos de Doña Karla y por brindarme una amistad incondicional llena de aprendizajes. Ya saben dónde encontrarme y que decir para que yo jale a todo. Me quedo con un bonito recuerdo de cada una de ustedes.

A Jeaneth Ramírez Esteban (la janny, la ghost rider) mi roomie, amiga y compañera de generación, muchas gracias por las mil y una aventuras, los buenos y malos momentos que pasamos juntas, por el crecimiento personal que representó una amistad como la tuya. Por seguir siempre el rollo cuando se trataba de salir a la playa o comer chatarra, y por permitirme formar parte de tu transcurso en Ensenada.

A mis compañeros de maestría: Enrique Atondo, Jazmín Gutiérrez, Itzel Pérez y Adriana Ramírez, por los buenos momentos compartidos, su apoyo cuando tenía la súper tiendita y sus asesorías en bioestadística y nutrición.

A Leonardo Daniel Mendoza por su apoyo durante mi estancia en CICESE, ser un buen compañero de GYM por invitarme a Santo Tomás, donde pude coincidir con grandes personas de CICESE y Ensenada.

A mis amigos de San Luis, Cinthia Duarte Vázquez, Vanessa Castro Pantoja, Cesar Morales Linares, Olivet Cruz Enciso y Edwin Reyes Gastelum, por su apoyo a distancia, sus buenos y acertados consejos, por escucharme y motivarme en mis momentos más difíciles. Por sus buenas vibras y por su amistad sincera. Por cada sonrisa que me sacaron y cada regañada recibida. Por todo, muchas gracias.

A todas y cada una de las personas que formaron parte de mi transcurso en CICESE y en Ensenada, llevaré un pedacito de ustedes a donde quiera que vaya, especialmente al Dr. Segovia y la Dra. Pilar mis maestros de vida, por mostrarme lo bello de la ciencia y lo mucho que tenemos por descubrir.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas.....	xi
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Fotosíntesis y Síntesis de carbohidratos, lípidos y proteínas.....	3
1.2 Usos de las microalgas en la acuicultura.....	4
1.3 Antecedentes.....	5
1.3.1 Nutrientes.....	6
1.3.2 Irradiancia.....	8
1.4 Justificación.....	10
1.5 Hipótesis.....	10
1.6 Objetivos.....	11
1.6.1 Objetivo general.....	11
1.6.2 Objetivos específicos.....	11
Capítulo 2. Materiales y métodos.....	12
2.1. Obtención de la cepa.....	12
2.2. Características del área de aislamiento de la cepa.....	12
2.3. Mantenimiento de la cepa.....	12
2.4. Efecto del aporte químico de nitrógeno y de la irradiancia.....	13
2.4.1. Diseño experimental.....	13
2.4.2. Crecimiento y tamaño de las células.....	13
2.4.3. Peso seco total, peso seco orgánico y cenizas.....	14
2.4.4. Composición proximal.....	15
2.4.4.1. Proteínas.....	15
2.4.4.2. Lípidos.....	16
2.4.4.3. Carbohidratos.....	16
2.5 Pigmentos.....	17

2.6 Fotosíntesis.....	17
2.7 Ácidos grasos.....	17
2.8 Análisis estadístico.....	18
Capítulo 3. Resultados.....	19
3.1. Curva de crecimiento preliminar.....	19
3.2 Efecto del aporte químico de nitrógeno y de la irradiancia.....	19
3.3 Peso seco total, peso orgánico y peso de cenizas.....	22
3.4 Composición proximal.....	25
3.5 Pigmentos.....	27
3.6 Fotosíntesis.....	29
3.7 Ácidos grasos.....	31
Capítulo 4. Discusión.....	34
4.1. Crecimiento.....	34
4.2 Peso seco total, peso orgánico y peso de cenizas.....	36
4.3 Composición proximal.....	37
4.4 Pigmentos.....	39
4.5 Fotosíntesis.....	41
4.6 Ácidos grasos.....	42
4.7 Recapitulación.....	45
Capítulo 5. Conclusiones.....	47
Recomendaciones.....	48
Literatura citada.....	49
Anexos.....	62

Lista de figuras

Figura	Página
1	19
2	20
3	21
4	22
5	24
6	26
7	28
8	30
9	31
10	62

Lista de tablas

Tabla	Página
1 Porcentaje del total de ácidos grasos identificados en cultivos de <i>Scenedesmus acuminatus</i> con dos aportes químicos de nitrógeno (NO_3 y NH_4) a tres irradiancias (50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Dónde: nd= no detectado. ΣSFA = sumatoria de ácidos grasos saturados. ΣMUFA =sumatoria de ácidos grasos monoinsaturados. ΣPUFA =sumatoria de ácidos grasos poliinsaturados.....	33
2 Resumen del análisis de covarianza (ANCOVA) de la densidad de células de cultivos de <i>Scenedesmus acuminatus</i> mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con diferente aporte químico de nitrógeno (nitrato y amonio). Donde se muestra el valor de F y P para el tiempo de cultivo (covariable), aporte químico de nitrógeno e irradiancia, con los niveles de interacción ($P < 0.05$).....	63
3 Resumen del análisis de varianza (ANOVA) de la tasa de crecimiento de cultivos de <i>Scenedesmus acuminatus</i> mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con diferente aporte químico de nitrógeno (nitrato y amonio). Donde se muestra el valor de F y P para el aporte químico de nitrógeno e irradiancia, con los niveles de interacción ($P < 0.05$).....	64
4 Resumen del análisis de varianza (ANOVA) del tiempo de generación de cultivos de <i>Scenedesmus acuminatus</i> mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con diferente aporte químico de nitrógeno (nitrato y amonio). Donde se muestra el valor de F y P para el aporte químico de nitrógeno e irradiancia, con los niveles de interacción ($P < 0.05$).....	65
5 Resumen del análisis de varianza (ANOVA) del largo de células en cultivos de <i>Scenedesmus acuminatus</i> mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con diferente aporte químico de nitrógeno (nitrato y amonio). Donde se muestra el valor de F y P para la fase de crecimiento, el aporte químico de nitrógeno e irradiancia, con los niveles de interacción ($P < 0.05$).....	66
6 Resumen del análisis de varianza (ANOVA) del ancho de células en cultivos de <i>Scenedesmus acuminatus</i> mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con diferente aporte químico de nitrógeno (nitrato y amonio). Donde se muestra el valor de F y P para la fase de crecimiento, el aporte químico de nitrógeno e irradiancia, con los niveles de interacción ($P < 0.05$).....	67
7 Resumen del análisis de varianza (ANOVA) del peso seco total en cultivos de <i>Scenedesmus acuminatus</i> mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con diferente aporte químico de nitrógeno (nitrato y amonio). Donde se muestra el valor de F y P para la fase de crecimiento, el aporte químico de nitrógeno e irradiancia, con los niveles de interacción ($P < 0.05$).....	68
8 Resumen del análisis de varianza (ANOVA) del peso orgánico en cultivos de <i>Scenedesmus acuminatus</i> mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con diferente aporte químico de nitrógeno (nitrato y amonio). Donde se muestra el valor de F y P para la fase de crecimiento, el aporte químico de nitrógeno e irradiancia, con los niveles de interacción ($P < 0.05$).....	69

9	Resumen del análisis de varianza (ANOVA) de cenizas en cultivos de <i>Scenedesmus acuminatus</i> mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con diferente aporte químico de nitrógeno (nitrato y amonio). Donde se muestra el valor de F y P para la fase de crecimiento, el aporte químico de nitrógeno e irradiancia, con los niveles de interacción ($P < 0.05$).....	70
10	Resumen del análisis de varianza (ANOVA) de proteínas en cultivos de <i>Scenedesmus acuminatus</i> mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con diferente aporte químico de nitrógeno (nitrato y amonio). Donde se muestra el valor de F y P para la fase de crecimiento, el aporte químico de nitrógeno e irradiancia, con los niveles de interacción ($P < 0.05$).....	71
11	Resumen del análisis de varianza (ANOVA) de lípidos en cultivos de <i>Scenedesmus acuminatus</i> mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con diferente aporte químico de nitrógeno (nitrato y amonio). Donde se muestra el valor de F y P para la fase de crecimiento, el aporte químico de nitrógeno e irradiancia, con los niveles de interacción ($P < 0.05$).....	72
12	Resumen del análisis de varianza (ANOVA) de carbohidratos en cultivos de <i>Scenedesmus acuminatus</i> mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con diferente aporte químico de nitrógeno (nitrato y amonio). Donde se muestra el valor de F y P para la fase de crecimiento, el aporte químico de nitrógeno e irradiancia, con los niveles de interacción ($P < 0.05$).....	73
13	Resumen del análisis de varianza (ANOVA) de clorofila a en cultivos de <i>Scenedesmus acuminatus</i> mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con diferente aporte químico de nitrógeno (nitrato y amonio). Donde se muestra el valor de F y P para la fase de crecimiento, el aporte químico de nitrógeno e irradiancia, con los niveles de interacción ($P < 0.05$).....	74
14	Resumen del análisis de varianza (ANOVA) de clorofila b en cultivos de <i>Scenedesmus acuminatus</i> mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con diferente aporte químico de nitrógeno (nitrato y amonio). Donde se muestra el valor de F y P para la fase de crecimiento, el aporte químico de nitrógeno e irradiancia, con los niveles de interacción ($P < 0.05$).....	75
15	Resumen del análisis de varianza (ANOVA) de clorofila c en cultivos de <i>Scenedesmus acuminatus</i> mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con diferente aporte químico de nitrógeno (nitrato y amonio). Donde se muestra el valor de F y P para la fase de crecimiento, el aporte químico de nitrógeno e irradiancia, con los niveles de interacción ($P < 0.05$).....	76
16	Resumen del análisis de varianza (ANOVA) de carotenos en cultivos de <i>Scenedesmus acuminatus</i> mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con diferente aporte químico de nitrógeno (nitrato y amonio). Donde se muestra el valor de F y P para la fase de crecimiento, el aporte químico de nitrógeno e irradiancia, con los niveles de interacción ($P < 0.05$).....	77
17	Resumen del análisis de varianza (ANOVA) de la eficiencia fotosintética (α) en cultivos de <i>Scenedesmus acuminatus</i> mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con diferente aporte químico de nitrógeno (nitrato y amonio).	

	Donde se muestra el valor de F y P para la fase de crecimiento, el aporte químico de nitrógeno e irradiancia, con los niveles de interacción ($P < 0.05$).....	78
18	Resumen del análisis de varianza (ANOVA) del índice de saturación (I_k) en cultivos de <i>Scenedesmus acuminatus</i> mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con diferente aporte químico de nitrógeno (nitrato y amonio). Donde se muestra el valor de F y P para la fase de crecimiento, el aporte químico de nitrógeno e irradiancia, con los niveles de interacción ($P < 0.05$).....	79
19	Resumen del análisis de varianza (ANOVA) de la eficiencia cuántica (F_v/F_m) en cultivos de <i>Scenedesmus acuminatus</i> mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con diferente aporte químico de nitrógeno (nitrato y amonio). Donde se muestra el valor de F y P para la fase de crecimiento, el aporte químico de nitrógeno e irradiancia, con los niveles de interacción ($P < 0.05$).....	80
20	Resumen del análisis de varianza (ANOVA) de la tasa máxima de transporte de electrones (ETR_{max}) en cultivos de <i>Scenedesmus acuminatus</i> mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con diferente aporte químico de nitrógeno (nitrato y amonio). Donde se muestra el valor de F y P para la fase de crecimiento, el aporte químico de nitrógeno e irradiancia, con los niveles de interacción ($P < 0.05$).....	81

Capítulo 1. Introducción

El incremento acelerado de la población y la poca disponibilidad de recursos ha traído consigo el difícil reto de satisfacer el suministro de alimentos de una manera sustentable. Se estima que para el año 2050, la población mundial sea de cerca de 9.7 billones de personas, lo cual implica un incremento hasta del 70% en la producción actual de alimentos (Hua *et al.*, 2019). La actividad agrícola y ganadera continúan siendo un aporte importante de alimentos, sin embargo, la acuicultura ha sido el sector productor de alimentos con el mayor crecimiento en los últimos 30 años, con tasas de crecimiento anuales del 10% en los años 90 y hasta 4.5% entre 2011 y 2018 (FAO, 2020).

Una de las principales metas de la acuicultura es proveer alimentos con alto valor nutritivo, para lo cual se requiere que los organismos de cultivo sean alimentados con dietas que incluyen a la harina y al aceite de pescado como sus ingredientes principales, los cuales se obtienen como subproducto del procesamiento de diversas especies de peces para consumo humano (Shepherd y Jackson, 2013). El uso de harina de pescado en las formulaciones trae consigo beneficios como una mejor eficiencia alimenticia, mayor crecimiento de los organismos, incrementa la palatabilidad de los alimentos y mejora la toma, digestión y absorción de los nutrientes, en tanto que el aceite de pescado es una excelente fuente de lípidos como triacilgliceroles y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), entre los que destacan el ácido araquidónico (ARA), el ácido eicosepentaenónico (EPA) y el ácido docosahexaenónico (DHA) (Hodar *et al.*, 2020). Sin embargo, la harina de pescado está considerada como la fuente de proteína más costosa en la elaboración de alimentos formulados (Bhosale *et al.*, 2010), debido a que con el aumento en la producción acuícola mundial se incrementa la demanda de harina y aceite de pescado y la disponibilidad de peces que son capturados y procesados para la elaboración de harinas y aceites no se ha incrementado en más de 20 años (Shepherd y Jackson, 2013). Estas situaciones, además de elevar el costo de estos ingredientes, contribuye a disminuir la sustentabilidad de la harina y del aceite de pescado destinados a la elaboración de piensos para la acuicultura (Hua *et al.*, 2019). Es así que dentro del sector acuícola también se presentan retos a resolver, tal es el caso de la formulación de alimentos que logren satisfacer los requerimientos de la especie a cultivar y disminuyan el alto costo de producción derivado de la compra de alimentos formulados, el cual puede ir desde el 30 al 60% del costo total de producción (Barreto-Pérez, 2018).

Durante los últimos años se ha buscado una solución para reducir los costos de los alimentos formulados y entre las estrategias que se han implementado se encuentra la sustitución parcial o total de la harina y aceite de pescado por otros ingredientes, tanto de origen animal como vegetal. Entre las opciones más utilizadas para sustituir a la harina de pescado se encuentran las harinas de subproductos de ave, de carne

y hueso, de sangre, harina de krill, de insectos, de gusanos de tierra, biomasa de artemia y harina de soya. Respecto a las alternativas para suplir al aceite de pescado se encuentran opciones de aceites vegetales de soya, linaza, girasol, coco y oliva, mientras que las grasas derivadas de fuentes animales como cebo de res o manteca de cerdo son menos utilizadas y han sido menos estudiadas en comparación con las fuentes vegetales (Hodar *et al.*, 2020).

Dentro de las opciones vegetales para la sustitución de la harina y el aceite de pescado que han sido recientemente estudiadas e implementadas se encuentra la inclusión de biomasa derivada del cultivo de diversas especies de microalgas, organismos que tienen la capacidad de transformar la energía luminosa en energía química y que constituyen la base de la cadena trófica. Se estima que existen de un millón a diez millones de especies de algas, siendo las microalgas las más abundantes y diversas en cuanto a formas, tamaño y estrategias de vida (Barsanti y Gualtieri, 2006). Estos organismos se clasifican en divisiones de acuerdo al tipo de pigmentos fotosintéticos, la naturaleza química de sus pigmentos, estructuras tilacoidales, composición y estructura de la pared celular, ciclo reproductivo, así como en el número, arreglo y ultraestructura de los flagelos. Según la clasificación taxonómica se distinguen once grupos mayores de microalgas: Cyanophyta, Prochlorophyta, Glaucophyta, Rhodophyta, Heterokontophyta, Haptophyta, Cryptophyta, Dinophyta, Euglenophyta, Chlorarachniophyta y Chlorophyta (Barsanti y Gualtieri, 2006), aunque autores como Morden y Sherwood (2002) mencionan que, además de éstos grupos, es posible que a lo largo de la historia evolutiva de las microalgas se hayan presentado eventos endosimbióticos que derivaron en varios linajes de dinoflagelados (Anexo 1).

Las microalgas presentan una amplia plasticidad ecológica, pueden encontrarse en ambientes marinos o dulceacuícolas, suelos y superficies húmedas, en ambientes extremos de frío y calor (Becker, 1994). Muchas de ellas pueden presentar un alto rango de tolerancia a pH, temperatura, turbidez, concentraciones de oxígeno (O₂) y dióxido de carbono (CO₂) (Barsanti y Gualtieri, 2006). Existen microalgas bentónicas, las cuales se pueden encontrar en áreas de baja profundidad o en los primeros centímetros de los sedimentos (Pinckney, 2018) y también las hay plantónicas, las cuales se encuentran a lo largo de la columna de agua (Gómez-Luna, 2007). Además, son responsables de los florecimientos algales los cuales, dependiendo de la especie, pueden producir toxinas que están asociadas a la mortandad de diversos organismos acuáticos. Aunado a esto, la alta densidad celular de microalgas que se presenta en los florecimientos algales puede disminuir la cantidad de oxígeno disuelto e impedir el paso de la luz solar a capas inferiores en la columna de agua, afectando a otros organismos fotosintéticos (Rodríguez-Hernández, 2018).

1.1 Fotosíntesis y síntesis de carbohidratos, lípidos y proteínas en microalgas

Al ser organismos fotoautótrofos, las microalgas son capaces de realizar el proceso de la fotosíntesis, mecanismo que involucra una serie de reacciones de óxido-reducción controladas por la energía lumínica cosechada por las moléculas de clorofila, donde el agua y el CO_2 son transformados en carbohidratos y oxígeno. Este proceso se lleva a cabo en dos fases, la primera se conoce como reacciones de luz, las cuales se llevan a cabo en las membranas fotosintéticas. En esta fase se llevan a cabo la absorción de la luz, la transferencia de excitones y la translocación de protones y electrones, con lo cual la energía lumínica es transformada a energía química y tiene como productos poder reductor en forma de NADPH_2 y moléculas energéticas de adenosin trifosfato (ATP). La segunda fase se conoce como reacciones oscuras y se lleva a cabo en el estroma. En esta fase, el NADPH_2 y el ATP son utilizados como sustrato para la reducción del CO_2 y la síntesis de carbohidratos (Masojídek *et al.*, 2013).

Los productos derivados del proceso fotosintético son empleados en diversas rutas metabólicas para la producción de lípidos, carbohidratos y proteínas. La biosíntesis de carbohidratos está estrechamente ligada al proceso fotosintético. En los cloroplastos, durante las reacciones del ciclo de Calvin (reacciones de oscuridad de la fotosíntesis), el CO_2 es utilizado para la carboxilación de la ribulosa 1,5-bifosfato en dos moléculas de 3 carbonos, conocidas como 3-fosfoglicerato, una de las cuales será la molécula base para la síntesis de carbohidratos. Los carbohidratos más comunes producidos en las microalgas son la glucosa, xilosa, manosa y ramnosa, mientras que los carbohidratos de reserva varían dependiendo de la especie, siendo el almidón el carbohidrato de reserva más importante en las algas verdes (Markou *et al.*, 2012).

La síntesis de lípidos, particularmente ácidos grasos, se lleva a cabo en el cloroplasto mediante una serie de siete reacciones que requieren del Acetil-CoA como molécula de inicio. El acetil-CoA es catalizado por la enzima acetil-Coa Carboxilasa (ACCase) formando Malonil-CoA. La segunda reacción tiene lugar cuando el Malonil-CoA por medio de la enzima Malonil-CoA: ACP transferasa es catalizado formando Malonil-ACP. La siguiente reacción está dada por una descarboxilación del Malonil-CoA y la condensación con Acetil-CoA. Durante la cuarta reacción ocurre una reducción del 3-Cetobutiril-ACP por la 3-cetoacil-ACP reductasa. La quinta reacción del ciclo se da mediante la deshidratación para la obtención de una insaturación en el carbono α por la enzima 3-hidroxiacil-ACP deshidrasa. Durante la siguiente reacción ocurre una reducción de la doble ligadura por la enoil-ACP reductasa. La última reacción del ciclo consiste en una elongación en donde las reacciones a partir de la etapa tres se repiten hasta la obtención de ácidos grasos saturados palmítico (C16) o esteárico (C18). Otros lípidos como los triacilgliceroles son sintetizados en plástidos localizados en el retículo endoplasmático (Fernández-Linares *et al.*, 2012; Castillo *et al.*, 2017).

Por su parte, la síntesis proteica se lleva a cabo en dos etapas, conocidas como transcripción y traducción. En la transcripción la información contenida en el ácido desoxirribonucleico (ADN) transcrita a ácido ribonucleico mensajero (ARNm), el cual contiene una secuencia complementaria de nucleótidos de una de las cadenas de ADN que sirvió como templete. En la etapa de traducción, el RNAm se une a unos organelos citoplasmáticos llamados ribosomas, los cuales son los sitios donde se lleva a cabo la síntesis de proteínas y donde se determina el orden de adición de los aminoácidos para la conformación de las proteínas (Lengyell y Söll, 1969).

1.2 Usos de las microalgas en la acuicultura

Las microalgas se han convertido en uno de los insumos más atractivos para los investigadores y productores tanto de la industria biotecnológica como acuícola, debido a que su cultivo es amigable con el medio ambiente, son materia prima de la cual es posible la obtención de compuestos con diversas actividad biológicas y su composición bioquímica contiene del 30 al 45% de proteínas, de 10 a 25% de carbohidratos, 10 a 20% de lípidos, con variaciones según la especie y el tipo de cultivo utilizado (Millamena y Golez, 2001; Li y Gatlin III, 2003; Cañavate, 2011; Barraza-Guardado *et al.*, 2019). Entre las especies más utilizadas en la industria acuícola debido a su importante aporte de proteínas con un perfil aminoacídico balanceado, carbohidratos, ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), vitaminas y factores promotores de crecimiento necesarios para la nutrición de los organismos en cultivo se encuentran *Nannochloropsis sp.*, *Pavlova sp.*, *Tetraselmis*, *Phaeodactylum*, *Skeletonema*, *Chaetoceros*, *Thalassiosira*, e *Isochrysis sp.* (Hemaiswarya *et al.*, 2011; Ortega-Salas y Reyes-Bustamante, 2012; Santos *et al.*, 2014; Daniel *et al.*, 2016). Según las necesidades del organismo a cultivar, pueden ser utilizadas las microalgas como único alimento para los organismos filtradores o durante las primeras etapas de vida de peces y crustáceos (Abalde, 1995; Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2006). Además, es posible realizar combinaciones de especies con la finalidad de mejorar el balance nutricional e incrementar el crecimiento de los organismos de cultivo (Hemaiswarya *et al.*, 2011).

La inclusión de biomasa de distintas especies de microalgas en proporciones desde el 10 hasta el 50% en las dietas formuladas para diversos organismos de cultivo ha sido probada con éxito, notando un desempeño comparable a las dietas control elaboradas con harina de pescado en su totalidad, indicando que la biomasa de microalgas es un excelente reemplazo parcial de la harina de pescado (Knutsen *et al.*, 2019). Por mencionar algunos de beneficios, se ha observado que al emplear biomasa de *Schizochytrium*

sp en la alimentación del salmón *Salmo salar* se obtiene una mejor calidad de filete y retención de ácidos grasos esenciales (Kousolaki *et al.*, 2016), mayor capacidad de absorción intestinal en *Sparus aurata* al incluir a *Scenedesmus almeriensis* en un 20% en la dieta (Vizcaíno *et al.*, 2014), así como un efecto inmunoestimulante y un mayor contenido de ácido araquidónico (ARA) en el filete de la tilapia *Oreochromis niloticus* al incluir un 25% de biomasa de *Scenedesmus almeriensis* en la dieta (García-Márquez *et al.*, 2020). Así mismo, la suplementación con 5% de *Schizochytrium* sp. y *Grammatophora* sp. promovió un crecimiento similar o mayor en postlarvas de camarón blanco *Litopenaeus vanammei* en comparación con la dieta control que contenía solo harina de pescado (Pacheco-Vega *et al.*, 2018).

Si bien el empleo de biomasa de microalgas tiene un gran potencial como sustituto de la harina y el aceite de pescado o como únicas fuentes de alimentación, es importante señalar que estos organismos son capaces de modificar su crecimiento composición bioquímica dependiendo de las condiciones de cultivo (Chia *et al.*, 2013). Es por ello que la selección de especies de microalgas capaces de satisfacer parcial o completamente los requerimientos nutricionales del cultivo acuícola estará en función no únicamente de la especie *per se*, sino también de las condiciones de cultivo a las que sea sometida.

1.3 Antecedentes

La irradiancia y la disponibilidad de nutrientes son dos de las variables medio ambientales de importancia fundamental para el fitoplancton, ya que estas variables están relacionadas con el proceso fotosíntesis y en la síntesis de los compuestos celulares (Dubinsky y Stambler, 2009).

En condiciones de cultivo controladas para diversas especies de microalgas, la manipulación de la magnitud de las variables ambientales como la disponibilidad de nutrientes y la cantidad de luz, han sido utilizadas para obtener biomasa microalgal para usos en la acuicultura, la biotecnología y la nutracéutica (Pal *et al.*, 2011; Gacheva y Gigova, 2014; Torres-Tiji *et al.*, 2020).

Se ha evaluado la composición de diversas especies de microalgas y se encontró que la producción de biomasa y la composición bioquímica se modifican según las características del grupo taxonómico de las distintas especies (Brown, 2002). En los cultivos de microalgas el mayor contenido de proteínas ocurre en general en la fase exponencial de crecimiento, debido a la mayor disponibilidad de luz y nutrientes;

mientras que el mayor contenido de carbohidratos y lípidos, ocurre durante la fase estacionaria del crecimiento por la limitación de luz y de nutrientes (Fernández-Reiriz *et al.*, 1989; Torres-Tiji *et al.*, 2020).

1.3.1 Nutrientes

Uno de los elementos clave en la producción de biomasa microalgal es la composición química del medio de cultivo. El nitrógeno es un elemento clave ya que es uno de los macro elementos que determinan la tasa de crecimiento, la composición proximal, el perfil de aminoácidos y de ácidos grasos (Torres-Tiji *et al.*, 2020).

Uno de los usos principales de la biomasa microalgal en la acuicultura es por el aporte de proteínas, en especial para las primeras etapas de vida de los organismos en cultivo (Brown, 2002). Las proteínas están constituidas por nitrógeno, el cual es esencial para la síntesis de ADN y ARN y es un elemento estructural de las células microalgales, por lo cual la cantidad y la forma química del nitrógeno en el medio de cultivo modifican la tasa de crecimiento y la composición bioquímica de las microalgas (López-Elías *et al.*, 2015). El medio de cultivo más ampliamente utilizado para la producción de microalgas es el descrito por Guillard y Ryther (1962). En éste medio de cultivo, el aporte químico de nitrógeno es provisto por nitrato de sodio. Se ha evaluado que las diversas especies de microalgas pueden utilizar distintas formas químicas de nitrógeno, la mayoría de las algas pueden utilizar, nitratos, nitritos, amonio y urea. La capacidad del uso de las distintas formas químicas de nitrógeno, depende de la concentración del nitrógeno en el medio y del tipo de enzimas disponibles en las células microalgales (Darley, 1987).

La clorofícea *Scenedesmus* sp. se describe que es una especie con alto potencial de uso en la industria de los alimentos balanceados para animales debido a su alto contenido de proteínas (25-35%), vitaminas y ácidos grasos poliinsaturados, además de contenidos de lisina en valores superiores a los indicados por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO por sus siglas en inglés). Por lo anterior, se investigó el uso de distintos medios de cultivo con los cuales obtener los valores mayores de contenido de proteínas en cultivos de *Scenedesmus* sp. El medio estándar 2 (KNO_3 : 1.00 g L^{-1} y NaHCO_3 : 5.44 g L^{-1}), presentó la mayor producción de biomasa (0.41 g L^{-1}), mientras que el medio Algal (NaNO_3 : 0.17 g L^{-1} y NaHCO_3 : 0.890 g L^{-1}) produjo el mayor contenido de proteínas (23.18%) (Quevedo *et al.*, 2008).

En cultivos de *Chlorella vulgaris* se evaluó el uso de dos medios mixotróficos con distintas concentraciones de nitrato de sodio, fosfato de potasio, acetato de sodio y carbonato de sodio (estos dos últimos como fuente de carbono). Las mayores producciones de biomasa (3.72 g L^{-1} para cultivos con acetato y 2.17 g L^{-1} para cultivo con carbonato) están directamente relacionadas con el uso nitrato de sodio (1.96 mM) y el fosfato de potasio (2.11 mM) en el medio de cultivo. Los máximos valores de proteínas fueron en los cultivos con acetato (60%) y carbonato (30%) (González-Delgado *et al.*, 2017).

En estudios previos con microalgas del grupo de las clorofíceas como *Desmodesmus communis* se ha evaluado que la limitación de nitrógeno en el medio de cultivo afecta la producción de lípidos y carbohidratos, además de reducir la tasa de crecimiento y el contenido proteico (Elías-Castelo, 2018).

En diversos estudios con *Scenedesmus* sp. se ha encontrado que la utilización de fertilizantes comerciales, entre ellos el uso amonio como aporte de nitrógeno en el medio de cultivo, incrementa la producción de proteínas y de la tasa de crecimiento. La búsqueda de fuentes alternas de nitrógeno para formular medios de cultivo para la acuicultura tiene especial interés, ya que las fuentes de amonio tienen un menor costo económico respecto al costo de los nitratos (Soares *et al.*, 2018).

Se logró el incremento de la producción de lípidos en *Scenedesmus obliquus* al utilizar un hidrolizado libre de lípidos (LFAH: 0, 5, 10 y 15%) y agua residual de glicerol (WG: 0, 5, 10 y 20 g L^{-1}), en donde las distintas concentraciones WG con 15% de LFAH dieron los mayores valores de producción de biomasa, mientras que el uso de WG al 20 g L^{-1} indujo a la sobreproducción de lípidos (Abomohra *et al.*, 2018).

La mayor producción de biomasa de *Scenedesmus obliquus* se obtuvo al realizar cultivos con aporte químico de urea y carbonato de amonio, sin embargo, se evaluó un efecto negativo en la formación de nanopartículas de plata (AgNPs), se considera que la presencia de enzimas (nitrato reductasa) como agente reductor tiene un papel importante en la síntesis extracelular de AgNPs (Darwesh *et al.*, 2019).

Al estudiar la relación del metabolismo del nitrógeno y la producción de lípidos en *Scenedesmus vacuolatus* se encontró que los valores mayores de la tasa de crecimiento, contenido de proteínas y carbohidratos se encuentran a una concentración de 10 mM de NaNO_3 , sin embargo, los valores mayores del contenido de lípidos se evaluaron en las menores concentraciones de nitrógeno en el medio de cultivo (2 mM de NaNO_3) (Gupta *et al.*, 2019).

En la clorofícea *Tetraselmis* sp. se estudió el efecto de la concentración de nitrógeno provista en el medio de cultivo (0N, 1N y 2N de NaNO_3) y se encontró que la mayor concentración de biomasa y lípidos se

obtuvieron en la concentración intermedia de nitrógeno, mientras que la mayor concentración de proteínas y carbohidratos se evaluaron con la mayor concentración de nitrógeno (Kumar *et al.*, 2020).

1.3.2 Irradiancia

La luz es un factor que controla la fotosíntesis en microalgas, las variaciones en la composición espectral, en la irradiancia y en las fluctuaciones temporales afectarán la producción de biomasa y la calidad de la biomasa producida en un cultivo (Dubinsky *et al.*, 1995). La luz tiene un efecto directo sobre el crecimiento de las microalgas en cultivo y puede producir alguna de las tres condiciones, limitación, saturación o inhibición. Dependiendo de la magnitud de la irradiancia y de las características del aparato fotosintético de las distintas especies de microalgas, se puede producir una limitación del crecimiento, o un daño al aparato fotosintético (Gatamaneni *et al.*, 2018). Para obtener una máxima producción de biomasa microalgal en condiciones de cultivo controladas con fines acuícolas o biotecnológicos, es necesario estudiar las condiciones adecuadas de irradiancia a las cuales se mantendrán los cultivos, ya que dependiendo de la magnitud de la irradiancia, se tendrá distinta producción de biomasa y composición bioquímica que repercutirá en el valor nutricional de los cultivos microalgales (Brown, 2002).

La clorofícea *Nannochloropsis* sp. se ha identificado como una buena alternativa para ser utilizada como alimento para organismos en cultivo. Para incrementar la producción de biomasa se evaluó el efecto de distintos niveles de irradiancia a 1500 lux ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 3000 lux ($60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y 4500 lux ($90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), los resultados mostraron que los mayores niveles de irradiancia incrementaron el crecimiento, el contenido de clorofila y carotenos (Fakhri *et al.*, 2017). En otro estudio realizado con *Nannochloropsis salina* mantenida en cultivos expuestos a distintos niveles de irradiancia (5, 25, 50, 100, 250 y 850 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), se evaluó que el crecimiento se aumentó hasta el nivel de irradiancia de 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y que el nivel de eficiencia de la utilización de la luz disminuyó a irradiancia mayor a 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Van Wageningen *et al.*, 2012).

El crecimiento de *Chamydomonas reinhardtii* incrementó cuando el nivel de la irradiancia aumentó de 60 a 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sin embargo, se encontró poco cambio en la magnitud del crecimiento por efecto del aumento del nivel de irradiancia en valores superiores a 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Kim *et al.*, 2006).

Se encontró que la diatomea *Cyclotella meneghiniana*, el efecto de la limitación de nitrógeno y de la irradiancia pueden cambiar las rutas metabólicas de síntesis bajo condiciones de estrés, generando un aumento en la producción de ciertos compuestos de reserva, como lípidos y carbohidratos, así como un decremento en la velocidad del crecimiento (Rosen y Lowe, 1984).

Una especie de *Scenedesmus obtusus* aislada de India fue caracterizada en cultivos mantenidos en estanques con distintos niveles de irradiancia, se encontró que los estanques con 3 cm de profundidad muestran altos niveles de producción de biomasa ($49.05 \text{ mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$) y los altos niveles de irradiancia ($1831 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) producen un decremento de los niveles de clorofila (Jethani *et al.*, 2019).

Al investigar el efecto del tipo de medio de cultivo (BBM: NaNO_3 a 25 g L^{-1} y Bristol: a 25 g L^{-1}) en el cultivo de *Scenedesmus obliquus* y *Selenastrum bibraianum* en distintas condiciones de cultivo, se encontró que el mayor crecimiento, contenido de lípidos y carbohidratos se obtuvo con el medio BBM con una irradiancia de $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Mientras que para *Selenastrum bibraianum* el mayor contenido de proteínas se obtuvo al mantener los cultivos al exterior con iluminación del sol (Khatoon *et al.*, 2019).

El efecto de la disponibilidad de la luz fue evaluado en cultivos de *Scenedesmus obliquus* en valores de irradiancia de 10 hasta $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y se encontró que al incrementar el nivel de la irradiancia en valores superiores a $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ no implicó un incremento en la tasa de crecimiento (Sforza *et al.*, 2014).

El efecto conjugado del nitrógeno y la irradiancia produce en *Scenedesmus* sp. acumulación de lípidos en valores de hasta el 41%, como resultado de un estrés por altos niveles de irradiancia ($400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y con limitación de nitrógeno en el medio (Liu *et al.*, 2012). Lo anterior difiere con lo evaluado por García-Cubero (2011) en *Scenedesmus vacuolatus*, quien reporta porcentajes de lípidos del 15.8%, posiblemente debido a la diferencia en la magnitud de la irradiancia utilizada ($135 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y a la distinta especie utilizada en los cultivos. Por anterior, la composición bioquímica de *Scenedesmus* spp. puede variar según la concentración de nitrógeno en el medio y la magnitud de la irradiancia en el cultivo.

Las investigaciones muestran un uso potencial del género *Scenedesmus* para la producción de compuestos bioquímicos de interés acuícola, como proteínas, lípidos y carbohidratos, por lo que el cultivo de *Scenedesmus acuminatus* bajo diferentes parámetros ambientales como luz y aporte de nitrógeno, contribuirán al acervo del conocimiento de este género. Además, el conocimiento generado acerca de esta especie ayudará a determinar su uso potencial en la industria acuícola como sustituto parcial o

complemento de piensos acuícolas dados los contenidos proteicos y lipídicos que esta especie pudiese alcanzar.

1.4 Justificación

El cultivo de microalgas para la acuicultura, la biotecnología y la farmacología se centra en el cultivo de no más de 20 especies. La amplia diversidad de ambientes en los que habitan las microalgas, incrementa la posibilidad de encontrar especies tolerantes a diversas condiciones de cultivo y que sean capaces de satisfacer los requerimientos nutricionales de los organismos en cultivo (Salomón-Pérez, 2015).

En el área de la acuicultura, uno de los principales problemas es obtener especies de microalgas con altas tasas de crecimiento, alta producción de biomasa y con una composición bioquímica capaz de satisfacer los requerimientos nutricionales de los organismos que las consuman (Abalde *et al.*, 1995).

Actualmente en México la mayoría de los estudios sobre microalgas se concentran principalmente en aspectos descriptivos como la abundancia y monitoreo (Jiménez-Valera, 2016). Sin embargo, la información respecto al aislamiento, caracterización del crecimiento, composición bioquímica y la respuesta fotosintética bajo diferentes variables es escasa (Guedes *et al.*, 2011). Tal es el caso de la clorofita aislada de Baja California, México, a saber, *Scenedesmus acuminatus*, de quien el efecto de la irradiancia y el aporte químico de nitrógeno respecto a su crecimiento, composición bioquímica, contenido de pigmentos, respuesta fotosintética y perfil de ácidos grasos no se conoce. Por tal motivo, se hace relevante la obtención de información sobre la respuesta a la irradiancia y al aporte químico de nitrógeno de esta especie de microalga, teniendo como referencia las investigaciones realizadas con este género donde se muestra un uso potencial en la industria acuícola y/o biotecnológica, además de incrementar al acervo del conocimiento biológico de las especies de la región de Baja California en México.

1.5 Hipótesis

El aporte químico de nitrógeno y la irradiancia son factores que afectan al crecimiento, composición y respuesta fotosintética de cultivos de microalgas, por lo que se espera que la forma reducida del nitrógeno (NH_4^+) y un estrés por alta irradiancia ($200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) aumenten la producción de biomasa, la

composición bioquímica, el contenido de pigmentos y la respuesta fotosintética de la microalga *Scenedesmus acuminatus*.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del aporte químico de nitrógeno, la irradiancia y edad del cultivo en el crecimiento, la composición proximal, el contenido de pigmentos, la respuesta fotosintética y el perfil de ácidos grasos de *Scenedesmus acuminatus*.

1.6.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar la tasa de crecimiento de *Scenedesmus acuminatus* cultivada con nitrato (NO_3^-) y amonio (NH_4^+) como aporte químico de nitrógeno con tres irradiancias (50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).
2. Evaluar la composición proximal de *Scenedesmus acuminatus* cultivada nitrato (NO_3^-) y amonio (NH_4^+) como aporte químico de nitrógeno con tres irradiancias (50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).
3. Caracterizar el contenido pigmentario de *Scenedesmus acuminatus* cultivada con nitrato (NO_3^-) y amonio (NH_4^+) como aporte químico de nitrógeno con tres irradiancias (50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).
4. Conocer la respuesta fotosintética de *Scenedesmus acuminatus* cultivada con nitrato (NO_3^-) y amonio (NH_4^+) como aporte químico de nitrógeno con tres irradiancias (50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).
5. Caracterizar el perfil de ácidos grasos de *Scenedesmus acuminatus* cultivada con nitrato (NO_3^-) y amonio (NH_4^+) como aporte químico de nitrógeno con tres irradiancias (50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Capítulo 2. Materiales y métodos

2.1 Obtención de la cepa

Para esta investigación se eligió una clorofícea *Scenedesmus acuminatus* que fue aislada por Fierro-Reséndiz (2006) a partir de muestras de agua de seis granjas de cultivo de camarón ubicadas en Mexicali, Baja California, México. La cepa de *Scenedesmus acuminatus* forma parte de la colección de microalgas del laboratorio de Biotecnología de Algas (BIOAL) del Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE).

2.2. Características del área de aislamiento de la cepa

Durante el aislamiento de la cepa de microalga la temperatura del agua de las granjas de cultivo osciló entre 22 y 25 °C, mientras que el pH promedio del agua se encontró entre 8.2 y 9.3. El oxígeno disuelto varió entre 8.5 y 12.0 mg L⁻¹. La salinidad se encontró entre 1 a 2 ppm a excepción de la Granja Acuicultura Mosqueda en donde se registró un valor de salinidad promedio de 5.5 ppm (Fierro-Reséndiz, 2006). La zona de donde fue aislada la cepa de microalga se denomina la Cuenca baja del Río Colorado y se ha descrito que las aguas de esta zona tienen un alto contenido de sales en solución, debido al lavado de los suelos en el Valle Imperial (Giffard-Mena y Martínez, 2003).

2.3 Mantenimiento de la cepa

Se realizaron cultivos monoespecíficos, no axénicos de la cepa seleccionada, la cual fue mantenida de manera estática o sin recambio de medio (Stein, 1973), en matraces Erlenmeyer con medio "P" descrito por Guillard y Ryther (1962). Para la preparación del medio de cultivo se usó agua de uso doméstico y se esterilizó en una autoclave a 121 °C y 1.05 kg cm⁻¹ durante 20 min. Los cultivos se mantuvieron con iluminación continua suministrada por lámparas fluorescentes de luz blanca (General Electric F40D-EX) con una irradiancia de 50 μmol m⁻² s⁻¹ a una temperatura de 20 ± 1 °C y agitación manual diaria.

2.4 Efecto del aporte químico de nitrógeno y de la irradiancia

2.4.1 Diseño experimental

Para evaluar el efecto del aporte químico de nitrógeno y de la irradiancia en *Scenedesmus acuminatus* se mantuvieron cultivos estáticos o sin recambio de medio en matraces Erlenmeyer de 1000 ml con 950 ml de medio "f" (Guillard y Ryther, 1962). El nitrógeno del medio "f" fue provisto por nitrato de sodio (NO₃: nitrato) que fue utilizado como control experimental. El tratamiento experimental consistió en remplazar el nitrato de sodio por cloruro de amonio (NH₄: amonio). Para la sustitución del nitrógeno provisto por amonio, se tomó en consideración la relación atómica del ingrediente activo provisto por la fuente de nitrógeno en el medio (nitrato de sodio). El medio de cultivo se preparó con agua de uso doméstico y esterilizado como ya se indicó en la sección 2.3.

Las condiciones de cultivo fueron temperatura de 20 ± 1 °C, salinidad de 33 ± 1 ppm y agitación manual. El pH del medio fue medido cada día con un potenciómetro Ohaus modelo starter 3100. La iluminación de los cultivos fue provista por lámparas fluorescentes de las mismas características que las descritas en el inciso 2.3. Se mantuvieron tres niveles de irradiancia, 50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, los cuales se obtuvieron ajustando la distancia de los cultivos a la lámpara. La irradiancia se midió en el centro de la superficie del matraz Erlenmeyer con un radiómetro de sensor 4 π (Biospherical Instruments Inc.). Cada condición experimental (nutrientes y luz) fue mantenida por triplicado para los ensayos experimentales.

2.4.2 Crecimiento y tamaño de las células

De los cultivos mantenidos en las distintas condiciones experimentales, se tomó diariamente una alícuota para medir la densidad de células con un hematocitómetro (Hausser Scientific) de 0.1 mm de profundidad y un microscopio compuesto Olympus CX-31. La concentración celular se calculó de acuerdo a la fórmula descrita por Arredondo-Vega y Voltolina (2007):

$$C = N * 10^4 * dil$$

Dónde:

C= células mL⁻¹

N= promedio de células presentes en 1 mm² (0.1 µL)

dil= factor de dilución

Se agregó una gota de Lügol a cada muestra durante los días que duró el experimento para fijar las células y almacenar las muestras.

Con los datos de la densidad celular de cada muestra, se calculó la tasa de crecimiento y el tiempo de generación, con las fórmulas descritas por Fogg y Thake (1987):

$$\mu = \frac{\log_2(N_2) - \log_2(N_1)}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

$$Tg = \frac{1}{\mu} \quad (2)$$

Dónde:

μ: tasa de crecimiento específica

Log₂: logaritmo en base dos

N₂ y N₁: concentración de células en el tiempo 2 (t₂) y al tiempo 1 (t₁)

Tg: tiempo de generación

La medición del tamaño de las células se realizó en un microscopio compuesto Olympus CX31 adaptado con una cámara modelo Evolution MP Color, con objetivo de 40x aumentando el tamaño de la muestra 400 veces y se utilizó el software Imagine Pro Discovery versión 5.1.

2.4.3 Peso seco total, pero seco orgánico y peso de las cenizas

Las muestras se obtuvieron en la fase exponencial (día 2) y en la fase estacionaria (día 6 y 7) de los cultivos. El peso seco total, el peso seco orgánico y el contenido de cenizas de cada condición experimental, se

evaluó por medio del procedimiento descrito por Sorokin (1973). Se utilizaron filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/C) de 45 mm de diámetro y 1 μm de abertura del poro a los cuales se les realizó un lavado previo con agua destilada y se incineraron en una mufla Barnstead Thermolyn (1400) a 490 °C por 4 horas. Para obtener el peso seco, los filtros se pesaron en una balanza analítica Mettler Toledo modelo XS105.

Durante la fase exponencial y estacionaria del crecimiento y para cada condición experimental, se tomó una alícuota del cultivo que se pasó a través de los filtros previamente tratados. Para eliminar el efecto de las sales en las muestras, estas se enjuagaron con formiato de amonio al 3%. Los filtros con las células microalgales se colocaron en una estufa a 60 °C y a partir de las 24 horas se pesaron los filtros en una balanza analítica, hasta que su peso se mantuvo constante, para obtener el peso seco total. El peso de las cenizas se obtuvo incinerando los filtros en una mufla a 490 °C por 4 horas. El peso orgánico se calculó restando a los valores del peso seco total el valor del peso de las cenizas para cada caso.

2.4.4 Composición proximal

El análisis de la composición proximal se realizó en la fase exponencial y estacionaria del crecimiento de los cultivos de cada condición experimental. Para cada caso, las muestras se colectaron en filtros Whatman GF/C de 25 mm de diámetro y una apertura de poro 1 μm . Los filtros previamente se lavaron con agua destilada y se incineraron a 490 °C por 4 horas. Una vez realizada la colecta de muestras, éstas se almacenaron a -20 °C hasta su análisis. La cuantificación de proteínas, carbohidratos y lípidos, se realizó por métodos espectrofotométricos utilizando un HACH DR/6000 UV-VIS.

2.4.4.1 Proteínas

Para la cuantificación de proteínas, primero se realizó una curva estándar con concentraciones conocidas de albumina de bovino como proteína estándar (BSA, 98%). La extracción de las proteínas se realizó por el método de Lowry *et al.* (1951) modificado por Malara y Charra (1972). La extracción se realizó con NaOH 1N en baño María durante 60 min a 100 °C y se aplicó un baño con ultrasonido por 45 min. Las muestras se centrifugaron a 4000 rpm (Centrifuga 5810R, Eppendorf) por 15 minutos y a 4 °C. Se realizó una segunda extracción y el sobrenadante se unió con el obtenido en la primera extracción. Se verificó que el pH de las

extracciones se encontrara en valores de 12. Se agregó una solución de Folin y agua destilada (1:1), se agitaron las muestras y se dejaron reposar por 1.5 horas en obscuridad. Una vez transcurrido el tiempo de extracción, las muestras se leyeron a 750 nm en un espectrofotómetro HACH modelo DR/6000 UV-VIS.

2.4.4.2 Lípidos

Para la evaluación del contenido de lípidos, primero se realizó una curva de calibración con una solución de tripalmitina como estándar (Tripalmitina 98%). La extracción de lípidos se llevó a cabo de acuerdo a la metodología propuesta por Bligh y Dyer (1959) utilizando una mezcla de cloroformo:metanol (1:2). Las muestras se colocaron en un baño con ultrasonido por 45 minutos y posteriormente se centrifugaron a 4000 rpm por 15 minutos (Centrifuga 5810R, Eppendorf) y a 4 °C. El sobrenadante de la primera extracción se transfirió a un tubo de ensayo. Se procedió a una segunda extracción con el procedimiento antes descrito. Se juntó el sobrenadante de la primera y segunda extracción y se formó la bifase, se eliminó el sobrenadante y las muestras se mantuvieron en una estufa a 45 °C hasta evaporar los solventes. La cuantificación se realizó por el método descrito por Pande *et al.* (1963) agregando mezcla crómica y se colocaron las muestras en baño María (100 °C) por 15 minutos. Una vez que las muestras se encontraron a temperatura ambiente, se agregó agua destilada y se mezclaron con ayuda de un vórtex para después leer a 590 nm en un espectrofotómetro HACH modelo 6000.

2.4.4.3 Carbohidratos

Previo a la cuantificación de carbohidratos se realizó una curva de calibración con una solución de glucosa usada como estándar (Glucosa anhidra 98%). La extracción de carbohidratos se llevó a cabo con fenol según lo descrito por Whyte (1987). Para la cuantificación de carbohidratos se utilizó el método descrito por Dubois *et al.* (1956) con fenol al 5% y ácido sulfúrico concentrado. La lectura de las muestras se realizó a 485 nm en un espectrofotómetro HACH modelo 6000.

2.5. Pigmentos

Las muestras se colectaron en filtros (Whatman GF/C) de 25 mm de diámetro y abertura de poro de 1 μm . Para la extracción y cuantificación de pigmentos se utilizó la técnica descrita por Parsons *et al.* (1984). La extracción de los pigmentos se realizó con acetona al 90%. Las muestras se refrigeraron a 4 °C por 24 h y en oscuridad. La lectura de las muestras se realizó en un espectrofotómetro Hach modelo 6000 en las distintas longitudes de onda que indica el método.

2.6. Fotosíntesis

Para conocer la respuesta fotosintética a las condiciones de cultivo, se evaluó la absorbancia de las células de cada cultivo al medir el espectro de absorción *in vivo* en un intervalo de 350 a 750 nm con un espectrofotómetro Hach modelo 6000. Los valores de la absorbancia se usaron posteriormente en el cálculo de los parámetros fotosintéticos. Simultáneamente, se colectaron alícuotas de 15 mL⁻¹ de cultivo y se acondicionaron en oscuridad por 15 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron curvas rápidas de luz, durante la fase exponencial y estacionaria de los cultivos para cada condición experimental con ayuda de un fluorímetro de pulso de amplitud modulada (PAM) (Walz, Junior PAM) (Figueroa *et al.*, 1997; White *et al.*, 2011). Con los datos obtenidos de las curvas rápidas de luz y los cálculos de la absorbancia se realizaron los cálculos de los parámetros fotosintéticos transferencia máxima del transporte de electrones (ETR_{max}), eficiencia fotosintética (α), irradiancia de saturación lumínica o índice de saturación (E_k) y máxima producción fotoquímica del fotosistema II (F_v/F_m) o eficiencia cuántica máxima. El cálculo de los parámetros se realizó siguiendo el método de Eilers y Peeters (1988) a partir del uso del programa Solver (López-Figueroa, com. pers., 2018).

2.7 Ácidos grasos

Para medir el contenido de ácidos grasos, la biomasa proveniente de cada una de las condiciones experimentales, fue cosechada durante la fase estacionaria de los cultivos y se concentró por centrifugación a 4500 rpm por 15 minutos a 4 °C en una centrifuga marca Eppendorf modelo 5810R. Las muestras se congelaron a -20 °C hasta su liofilización en un equipo marca Labconco, modelo Freezone 2.5. Para la extracción de los lípidos totales se utilizaron de 30 a 50 mg de biomasa liofilizada y se siguió la

metodología descrita por Folch *et al.* (1957), al usar una mezcla de diclorometano-metanol en una relación 2:1. Una vez extraídos los lípidos, se realizó la saponificación con una solución metanólica de KOH 0.3 N al 90% en baño María a 60 °C por 30 min. Se agregó agua destilada, HCl 6N y hexano para extraer los lípidos saponificables y se reservaron para la metilación de ácidos grasos. Para realizar la metilación de ácidos grasos, se utilizó una solución de esterificación de Trifloruro de Boro (BF₃) al 14% de metanol y se calentaron las muestras a 60 °C por 15 minutos por medio de un baño María. Se agregó hexano y agua destilada para extraer los esteres de ácidos grasos para ser analizados en el cromatógrafo de gases (GC Agilent Technologies 7890A) de columna capilar (Agilent J&W, 123-3232 DB-FFAP) con detector de ionización de flama (250°C) e hidrógeno como gas de acarreo. Los ácidos grasos se identificaron mediante la comparación de sus tiempos de retención con la de un estándar comercial (37 componentes Supelco FAME Mix Sigma®).

2.8 Análisis estadístico

Para todos los análisis se probaron las hipótesis que fundamentan la estadística paramétrica de normalidad de los datos y la homogeneidad de varianzas (Zar, 2010). El cambio en la concentración de células con respecto al tiempo de cultivo (covariable), se evaluó por medio de un Análisis de Covarianza (ANCOVA). Se ajustaron los datos de la concentración de células a un modelo lineal, por medio de transformación a logaritmo natural y se comprobaron las hipótesis que fundamentan el ANCOVA.

Se utilizó un Análisis de Varianza (ANOVA) de tres vías con el fin de evaluar las interacciones entre las variables independientes e identificar las diferencias significativas, entre irradiancia, el tipo de aporte químico de nitrógeno y fase de crecimiento (exponencial y estacionaria), para cada una de las variables de respuesta (tamaño, peso seco total, peso seco orgánico y contenido de cenizas, proteínas, carbohidratos y lípidos, clorofila *a*, *b* y *c*, parámetros fotosintéticos). Para todas las pruebas estadísticas se fijó un nivel de confianza de 95% ($\alpha = 0.05$) y en el caso de encontrar diferencias significativas entre los tratamientos se utilizó una prueba *a posteriori* de Tukey. Los datos se analizaron con el programa Statistica® versión 10 (StatSoft, 2015).

Capítulo 3. Resultados

3.1. Curva de crecimiento preliminar

La curva de crecimiento de *Scenedesmus acuminatus* presentó una fase exponencial, del día 4 al día 15, en donde se observó el inicio de la fase estacionaria del cultivo (Figura 1). Los valores de pH del cultivo de *Scenedesmus acuminatus* oscilaron en valores entre 9 y 10, durante los días de cultivo.

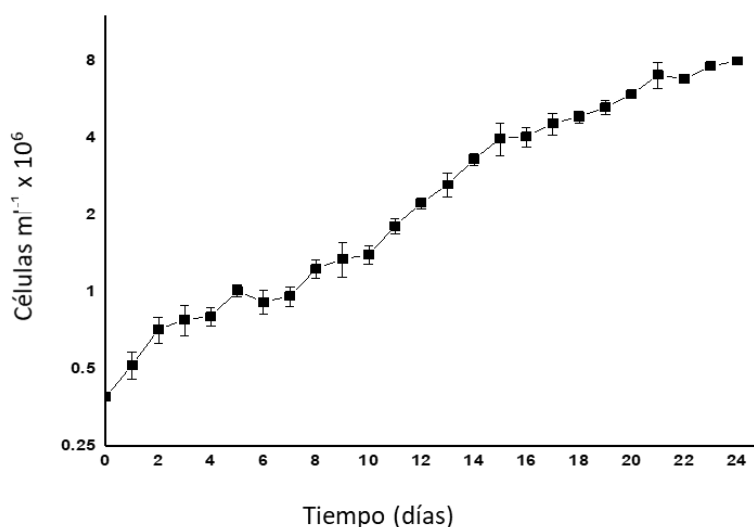


Figura 1. Valores promedio y desviación estándar de la densidad celular graficada en escala logarítmica (células mL⁻¹ x 10⁶) de *Scenedesmus acuminatus* cultivada en sistema por lotes a una irradiancia de 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en medio "f".

3.2 Efecto del aporte químico de nitrógeno y de la irradiancia

Las curvas de crecimiento obtenidas de cada condición experimental, muestran una fase exponencial a partir del día 2 hasta el día 4, donde inicia la fase estacionaria. No se encontraron diferencias significativas por efecto del aporte químico de nitrógeno ($P=0.744$). Sin embargo, se encontró que existe un efecto significativo del tiempo (covariable) ($P=0.001$) y de la irradiancia ($P=0.006$) respecto a la densidad de las células en los cultivos ($P=0.001$) (Figura 2, Anexo 2).

La tasa de crecimiento específica no presentó un efecto por el aporte químico de nitrógeno ($P=0.061$), pero si se observó un cambio significativo debido a la irradiancia ($P=0.009$) (Anexo 3). La menor tasa de crecimiento (0.331 ± 0.01 divisiones día⁻¹) se presentó en los cultivos con nitrato como aporte químico de

nitrógeno a $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La mayor tasa de crecimiento (0.479 ± 0.01 divisiones día^{-1}) se presentó en el tratamiento de amonio a $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 3). El tiempo de generación presentó diferencias significativas por efecto del aporte químico de nitrógeno ($P=0.041$) y por el efecto de la irradiancia ($P=0.005$) (Anexo 4). El mayor tiempo de generación (3.020 ± 0.12 días) se presentó en los cultivos con nitrato como aporte químico de nitrógeno a $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 3).

El largo de las células presentó diferencias significativas durante las fases de crecimiento de los cultivos ($P=0.001$). Los cultivos con nitrato como aporte químico de nitrógeno favorecieron al incremento del largo de las células en ambas fases de crecimiento ($P=0.014$), por efecto de la irradiancia no se encontraron diferencias significativas ($P=0.523$) (Figura 4, Anexo 5).

El ancho de las células presentó diferencias significativas durante las fases de crecimiento ($P=0.001$). El aporte de nitrógeno no afectó ($P=0.871$) el ancho de las células. Sin embargo, si fueron afectadas por efecto de la irradiancia ($P=0.004$) (Anexo 6). Los mayores valores del ancho de las células se presentaron durante la fase estacionaria a $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Durante la fase exponencial las células de los cultivos con 50 y $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en nitrato como aporte químico de nitrógeno, presentaron mayores valores del ancho de las células respecto a lo evaluado en los tratamientos con amonio. Sin embargo, durante la fase estacionaria en el tratamiento de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y con aporte químico de nitrato el ancho de las células fue mayor respecto a los valores obtenidos en los cultivos con amonio (Figura 4).

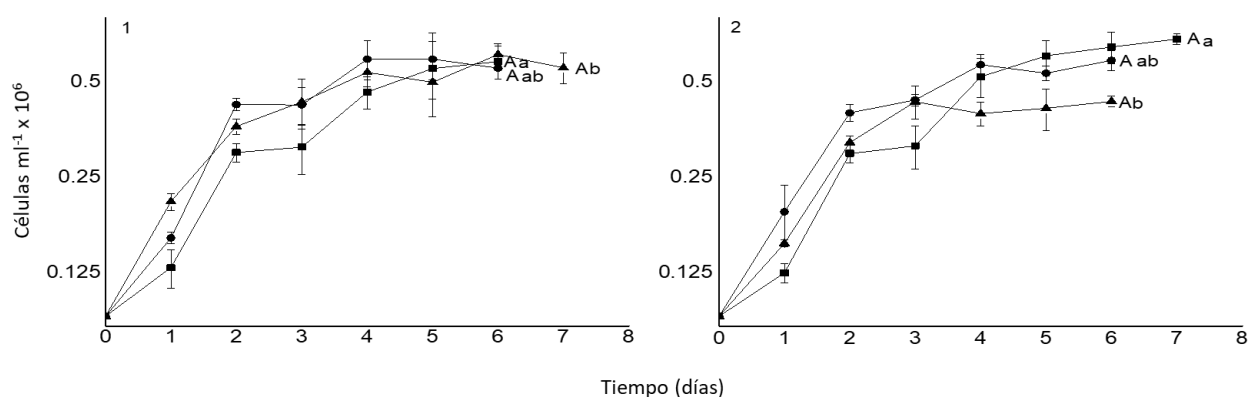


Figura 2. Valores promedio y desviación estándar de la densidad celular (células $\text{mL}^{-1} \times 10^6$) de cultivos de *Scenedesmus acuminatus* mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50 (■), 100 (●) y 200 (▲) $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con diferente aporte químico de nitrógeno (1: Nitrato y 2: Amonio) en el medio. Análisis de covarianza (ANCOVA) y prueba *a posteriori* de Tukey. Letras minúsculas indican diferencias significativas por efecto de la irradiancia ($a>b$). Letras mayúsculas indican diferencias significativas por efecto del aporte de nitrógeno ($A>B$).

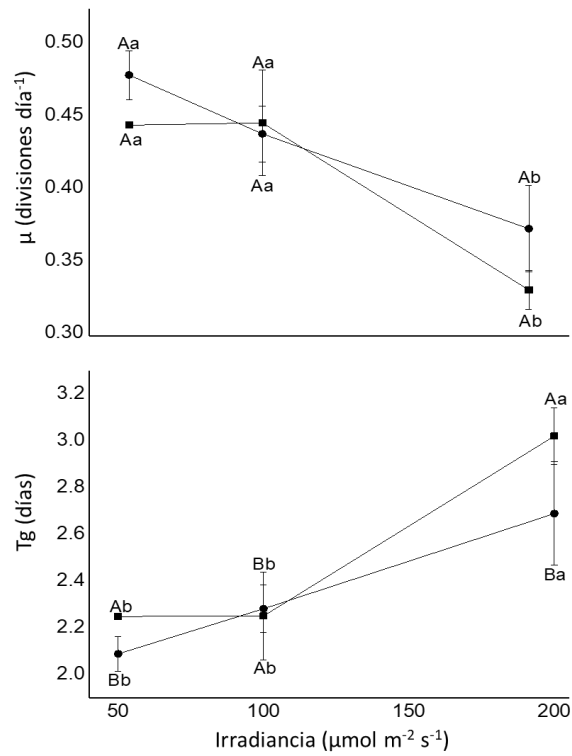


Figura 3. Valores promedio y desviación estándar de la tasa de crecimiento (μ) (divisiones d^{-1}) y tiempo de generación (T_g) de cultivos de *Scenedesmus acuminatus* mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con diferente aporte químico de nitrógeno (Nitrato: ■ y Amonio: ●). Análisis de varianza de dos vías y pruebas *a posteriori* de Tukey, $\alpha=0.05$. Letras minúsculas indican diferencias significativas por efecto de la irradiancia ($a>b$). Letras mayúsculas indican diferencias significativas por efecto del aporte de nitrógeno ($A>B$).

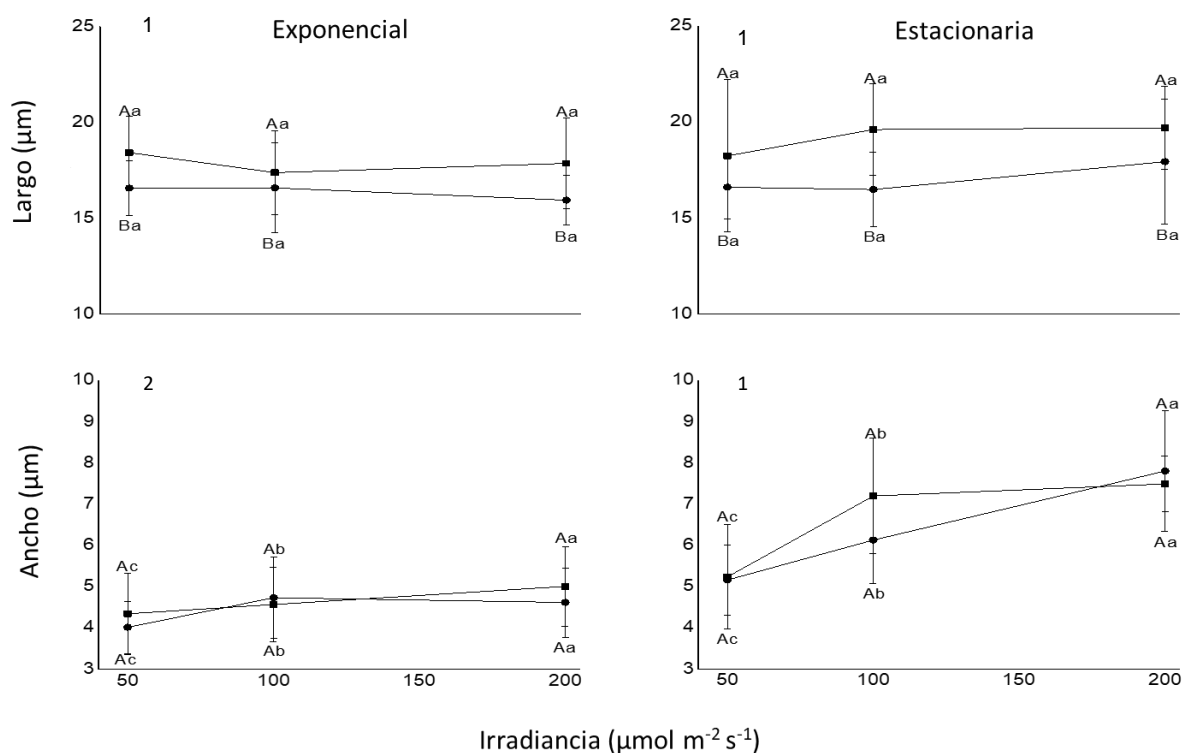


Figura 4. Valores promedio y desviación estándar del largo y ancho de las células (μm) de cultivos de *Scenedesmus acuminatus* mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con diferente aporte químico de nitrógeno (Nitrato: ■ y Amonio: ●). Análisis de varianza de tres vías y pruebas *a posteriori* de Tukey, $\alpha=0.05$. Valores con números indican diferencias significativas entre fases de crecimiento (1>2). Letras minúsculas indican diferencias significativas por efecto de la irradiancia ($a>b>c$). Letras mayúsculas indican diferencias significativas por efecto del aporte de nitrógeno ($A>B$).

3.3 Peso seco total, peso orgánico y peso de cenizas

El peso seco total presentó diferencias significativas durante las fases de crecimiento ($P=0.001$), por efecto del aporte químico del nitrógeno ($P<0.001$), por la irradiancia ($P<0.005$), además con interacción entre los factores ($P=0.003$) (Anexo 7). Los valores significativamente mayores de peso seco total se midieron en la fase de crecimiento estacionaria. El aporte químico de nitrato promovió valores significativamente mayores de peso seco en las dos fases de crecimiento. Las irradiancias de 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ promovieron significativamente mayores valores del peso seco total (Figura 5).

El peso orgánico mostró diferencias significativas durante las fases de crecimiento ($P=0.001$), con efecto del por aporte químico de nitrógeno ($P=0.001$) e irradiancia ($P=0.001$) y con interacción significativa entre los factores ($P=0.020$) (Anexo 8). Los mayores valores de peso orgánico se encontraron en la fase estacionaria del crecimiento. El aporte químico de nitrógeno favoreció mayores valores de peso seco

orgánico en los cultivos mantenidos con nitrato en ambas fases de crecimiento. Se encontró una relación directa entre la magnitud de la irradiancia y el peso seco orgánico solo durante la fase estacionaria (Figura 5).

Las cenizas mostraron diferencias significativas durante las fases de crecimiento ($P=0.001$), por efecto del aporte químico de nitrógeno ($P=0.001$), sin diferencia significativa por efecto de la irradiancia ($P=0.279$) y con interacción entre los factores ($P=0.037$) (Anexo 9). Los mayores valores de cenizas se encontraron durante la fase estacionaria de los cultivos. La mayor cantidad de cenizas se obtuvo de los cultivos con nitrato como aporte químico de nitrógeno, tanto en fase exponencial como fase estacionaria (Figura 6). Es posible que, debido a que los valores de probabilidad obtenidos al realizar los análisis estadísticos de ANOVA se encuentran próximos al nivel de significancia, las interacciones entre las variables no se aprecien de manera visual (Figura 5).

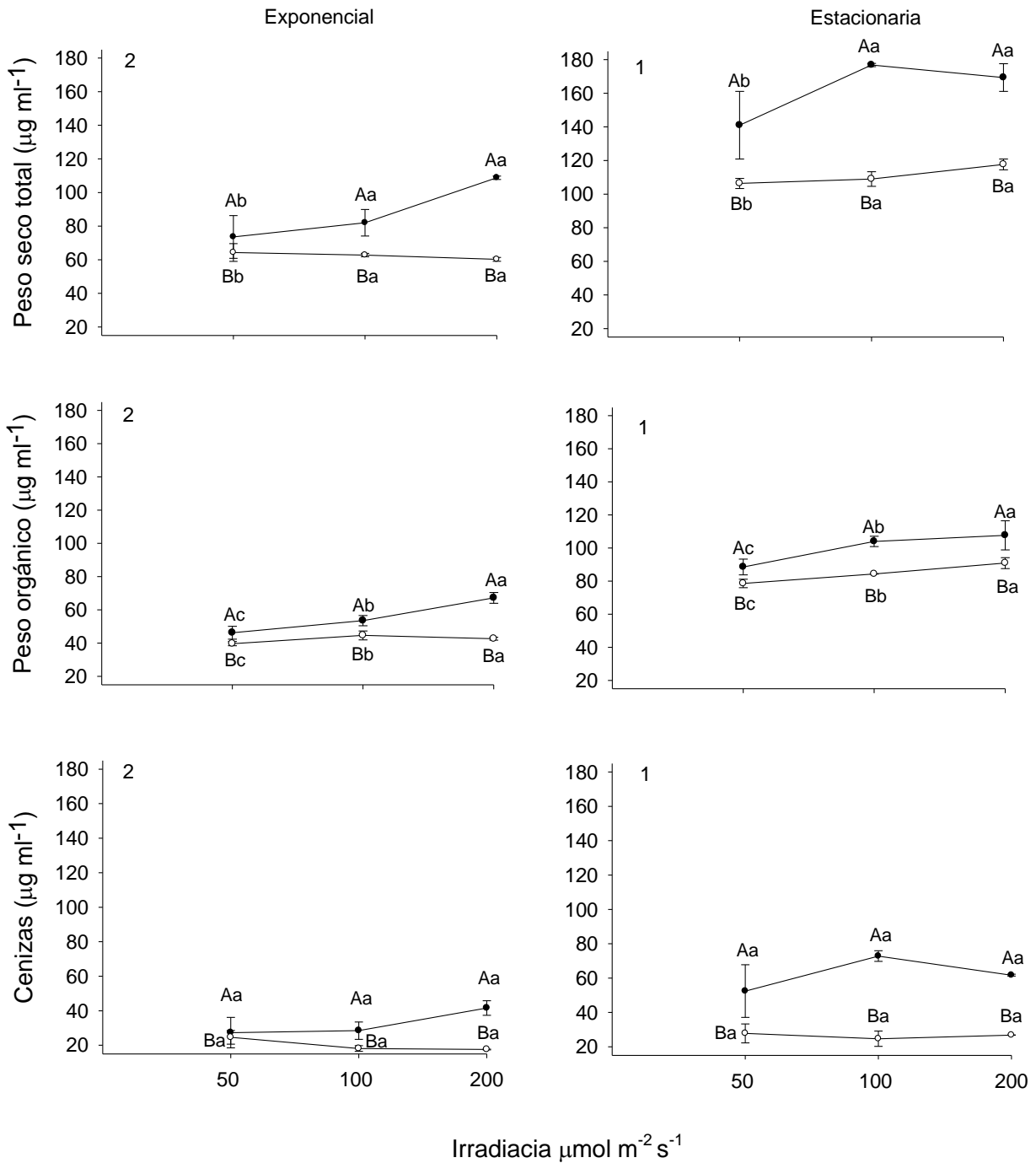


Figura 5. Valores promedio y desviación estándar del peso seco total, peso orgánico y peso de cenizas de cultivos de *Scenedesmus acuminatus* mantenidos en fase exponencial y estacionaria, con tres irradiancias (50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y dos aportes químicos de nitrógeno (NO_3^- : ● y NH_4^+ : ○). Análisis de varianza de tres vías y pruebas *a posteriori* de Tukey, $\alpha=0.05$. Valores con números indican diferencias significativas entre fases de crecimiento (1>2). Letras minúsculas indican diferencias significativas por efecto de la irradiancia (a>b>c). Letras mayúsculas indican diferencias significativas por efecto del aporte de nitrógeno (A>B).

3.4 Composición proximal

El porcentaje de proteínas presentó diferencias significativas durante las fases de crecimiento ($P=0.001$). Existió un efecto del aporte químico de nitrógeno ($P=0.001$), y por efecto de la irradiancia ($P=0.001$), con interacción entre los factores nitrógeno e irradiancia ($P=0.031$) (Anexo 10). El mayor contenido de proteínas se obtuvo durante la fase estacionaria, influenciado por el amonio como aporte químico de nitrógeno. La irradiancia de 50 y 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ promovió la producción del contenido proteico en ambas fases de crecimiento (Figura 6).

La producción de lípidos no mostró diferencias significativas durante las fases de crecimiento ($P=0.273$). Sin embargo, existió un efecto significativo debido al aporte químico de nitrógeno ($P=0.001$) y de la irradiancia ($P=0.002$). El contenido de lípidos presentó interacción ($P=0.029$) entre los factores aporte químico de nitrógeno e irradiancia (Anexo 11). El mayor contenido de lípidos se obtuvo durante la fase exponencial. El aporte químico de nitrógeno en forma de amonio favoreció la producción de lípidos en ambas fases de crecimiento. Durante la fase exponencial la irradiancia de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ favoreció la producción de lípidos, contrario a lo evaluado en la fase de crecimiento estacionaria, en donde la irradiancia de 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ favoreció la producción de lípidos, en medio con nitrato y amonio como aporte químico de nitrógeno (Figura 6).

El contenido de carbohidratos no presentó diferencias significativas durante las fases de crecimiento ($P=0.414$), sin efecto debido al aporte químico de nitrógeno ($P=0.365$). Sin embargo, existió un efecto significativo debido a la irradiancia ($P=0.001$), y con interacción entre los factores aporte de nitrógeno e irradiancia ($P=0.002$) (Anexo 12). El mayor contenido de carbohidratos se registró a 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con nitrato como aporte químico de nitrógeno en ambas fases de crecimiento. El amonio como aporte químico de nitrógeno favoreció la producción de carbohidratos en irradiancia de 50 y 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en ambas fases de crecimiento (Figura 6).

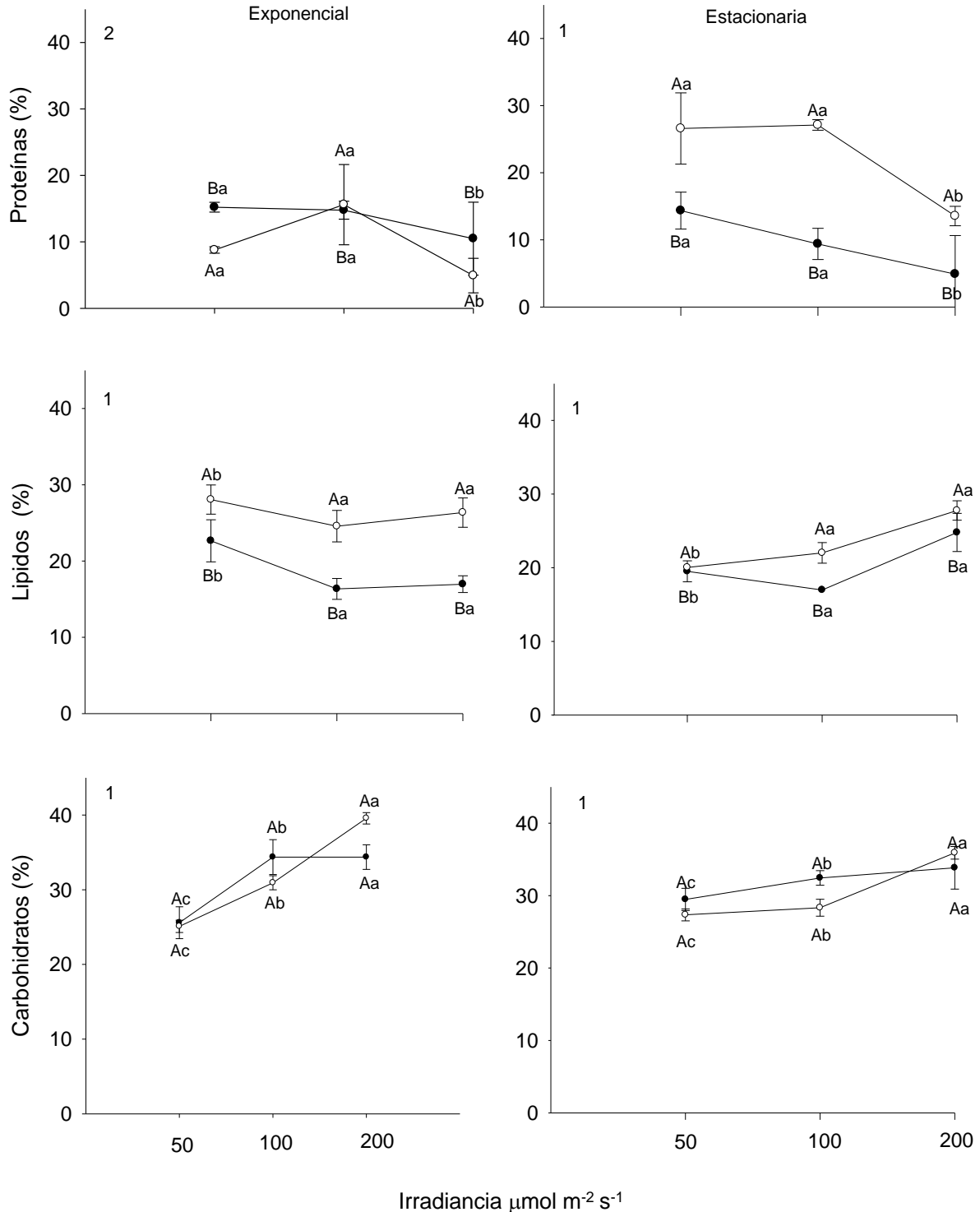


Figura 6. Contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos en (%) de cultivos de *Scenedesmus acuminatus* mantenidos en fase exponencial y estacionaria con tres irradiancias (50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en dos aportes de nitrógeno (Nitrato: ● y Amonio: ○). Análisis de varianza de tres vías y pruebas *a posteriori* de Tukey, $\alpha=0.05$. Valores con números indican diferencias significativas entre fases de crecimiento (1>2). Letras minúsculas indican diferencias significativas por efecto de la irradiancia (a>b>c). Letras mayúsculas indican diferencias significativas por efecto del aporte de nitrógeno (A>B).

3.5 Pigmentos

El contenido de clorofila *a* presentó diferencias significativas durante las fases de crecimiento ($P=0.001$). Sin embargo, no se encontró efecto del aporte químico de nitrógeno ($P=0.237$) o irradiancia ($P=0.050$). No obstante, se encontró una interacción entre los factores fase de crecimiento, aporte químico de nitrógeno e irradiancia ($P=0.001$) (Anexo 13). Los mayores contenidos de clorofila *a* se obtuvieron durante la fase estacionaria. El nitrato como aporte químico de nitrógeno, favoreció el contenido de clorofila *a* en irradiancia de 50 y 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante la fase estacionaria, mientras que el amonio presentó un mayor efecto en el contenido de clorofila *a* con irradiancia de 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 7).

La clorofila *b* presentó diferencias significativas durante las fases de crecimiento ($P<0.001$), por efecto del aporte químico de nitrógeno ($P<0.004$), sin embargo, no existió un efecto significativo por la irradiancia ($P=0.092$) y se presentó una interacción entre los factores fase de crecimiento, aporte químico de nitrógeno e irradiancia ($P=0.005$) (Anexo 14). Los mayores valores de clorofila *b* se obtuvieron durante la fase estacionaria. El amonio como aporte químico de nitrógeno favoreció la producción de clorofila *b* en fase estacionaria. Las irradiancias de 50 y 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ promovieron el contenido de clorofila *b* en ambas fases (Figura 7).

La clorofila *c* presentó diferencias significativas durante las fases de crecimiento ($P=0.047$). Se exhibió un efecto significativo por el aporte químico de nitrógeno ($P=0.001$), y de la irradiancia ($P=0.001$), con interacción significativa de los factores fase de crecimiento, aporte químico de nitrógeno e irradiancia ($P=0.033$) (Anexo 15). Los mayores valores de clorofila *c* se obtuvieron durante la fase estacionaria del crecimiento. Los cultivos con amonio como aporte químico de nitrógeno favorecieron la producción de clorofila *c* en ambas fases de crecimiento y para la irradiancia de 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en ambas fases (Figura 7).

El contenido de carotenos mostró diferencias significativas durante las fases de crecimiento ($P=0.001$). El aporte químico de nitrógeno no presentó un efecto significativo ($P=0.487$) en el contenido de carotenos. Sin embargo, existió un efecto por la irradiancia ($P=0.001$), con interacción entre los factores fase de crecimiento, aporte químico de nitrógeno e irradiancia ($P=0.003$) (Anexo 16). El mayor contenido de carotenos se obtuvo durante la fase estacionaria. Se evaluó que el aporte químico de nitrógeno como amonio y nitrato en los cultivos, presentó un efecto similar en la producción de carotenos para ambas fases de crecimiento. La irradiancia de 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante la fase exponencial favoreció la producción de carotenos en los cultivos con adición de amonio en el medio de cultivo (Figura 7).

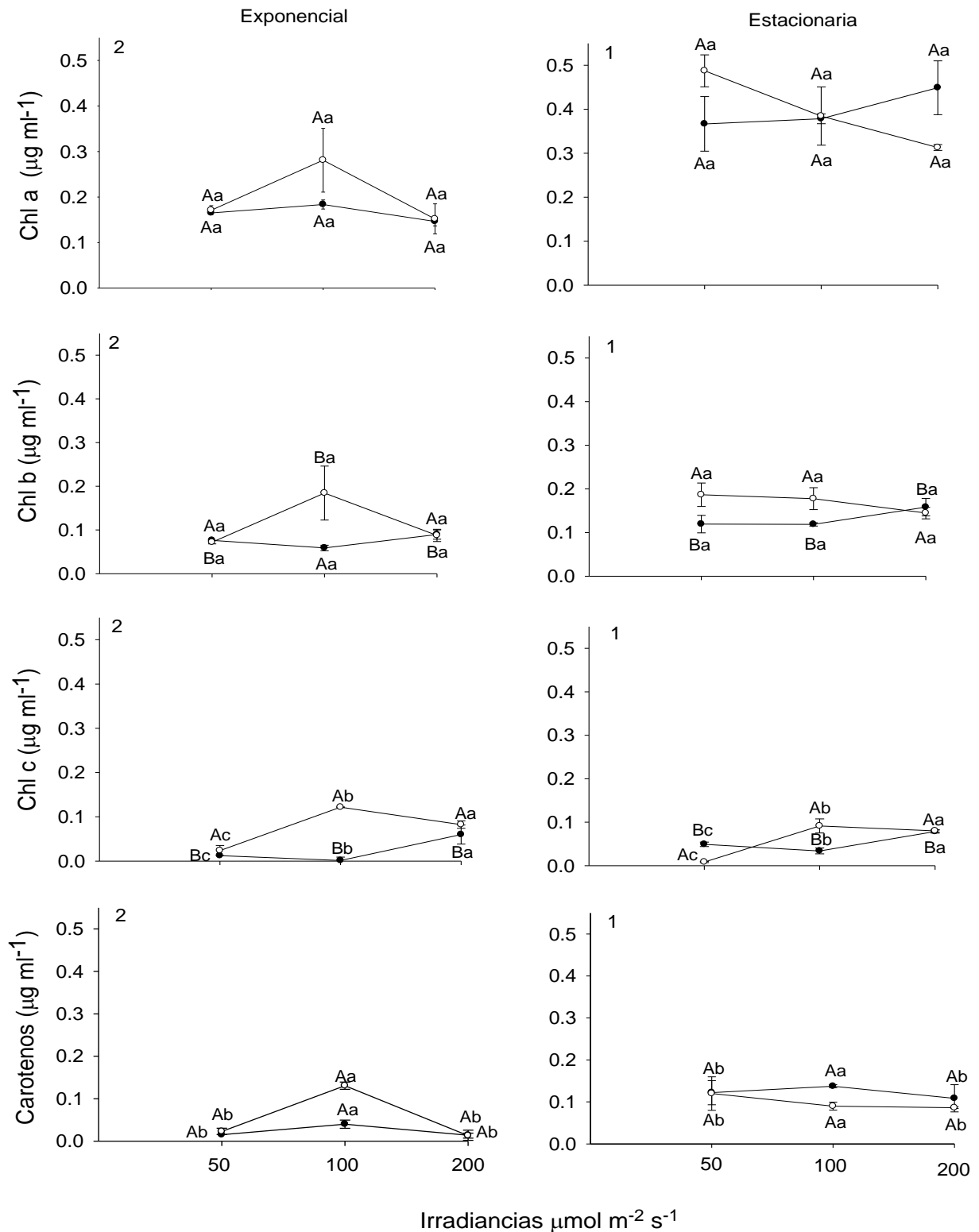


Figura 7. Valores promedio y desviación estándar del contenido de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila *c* y carotenos en cultivos de *Scenedesmus acuminatus* mantenidos en fase exponencial y estacionaria con tres irradiancias (50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en dos aportes de nitrógeno (Nitrato: ● y Amonio: ○). Análisis de varianza de tres vías y pruebas *a posteriori* de Tukey, $\alpha=0.05$. Valores con números indican diferencias significativas entre fases de crecimiento (1>2). Letras minúsculas indican diferencias significativas por efecto de la irradiancia (a>b>c). Letras mayúsculas indican diferencias significativas por efecto del aporte de nitrógeno (A>B).

3.6 Fotosíntesis

La eficiencia fotosintética (α) no presentó diferencias significativas durante las fases de crecimiento ($P=0.964$), sin embargo, existieron diferencias significativas por efecto del aporte químico de nitrógeno ($P=0.006$), por efecto de la irradiancia ($P=0.001$), con interacción significativa entre los factores ($P=0.004$) (Anexo 17). El mayor valor de la eficiencia fotosintética se registró durante la fase estacionaria a una irradiancia de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$. La eficiencia fotosintética presentó un incremento en los tratamientos suministrados con amonio como aporte químico de nitrógeno en irradiancia de 100 y $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ en ambas fases de crecimiento. El valor mayor de la eficiencia fotosintética se presentó en el tratamiento con nitrato a $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ (Figura 8).

El índice de saturación lumínica (I_k) no mostró diferencias significativas durante las fases de crecimiento ($P=0.796$), por efecto del aporte químico de nitrógeno existieron diferencias significativas ($P=0.011$), por efecto de la irradiancia existieron diferencias significativas ($P=0.006$) y sin interacción entre los factores ($P=0.449$) (Anexo 18). El índice de saturación lumínica obtuvo los mayores valores en los cultivos con amonio como aporte químico de nitrógeno durante la fase estacionaria, registrando el mayor con la irradiancia de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$. El índice de saturación lumínica presentó un ligero cambio en los cultivos durante la fase exponencial con los dos aportes de nitrógeno y los tres niveles de irradiancia utilizados. Sin embargo, durante la fase estacionaria de crecimiento se encontraron los menores valores para las tres irradiancias en los cultivos suministrados con nitrato como aporte químico de nitrógeno (Figura 8).

La eficiencia cuántica (F_v/F_m) presentó diferencias significativas durante las fases de crecimiento ($P=0.008$), no se encontraron diferencias significativas por efecto del aporte químico de nitrógeno ($P=0.156$), por efecto de la irradiancia no se encontraron diferencias significativas ($P=0.432$), sin interacción entre los factores ($P=0.973$) (Anexo 19). Los valores mayores de eficiencia cuántica se encontraron durante la fase estacionaria, en los cultivos con nitrato como aporte químico de nitrógeno en irradiancia de 100 y $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$. Se observó una tendencia a disminuir la magnitud de la eficiencia cuántica en los tratamientos con amonio como aporte químico de nitrógeno y conforme aumentó la irradiancia en ambas fases de crecimiento (Figura 8).

La tasa máxima de transporte de electrones (ETR_{max}) no mostró diferencias significativas durante las fases de crecimiento ($P=0.361$), por efecto del aporte químico de nitrógeno existieron diferencias significativas ($P=0.001$), así como por efecto de la irradiancia ($P=0.001$), con interacción significativa entre los factores

($P=0.019$) (Anexo 20). Los mayores valores de ETR_{max} se registraron en los cultivos con amonio como aporte químico de nitrógeno a $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en ambas fases de crecimiento (Figura 9).

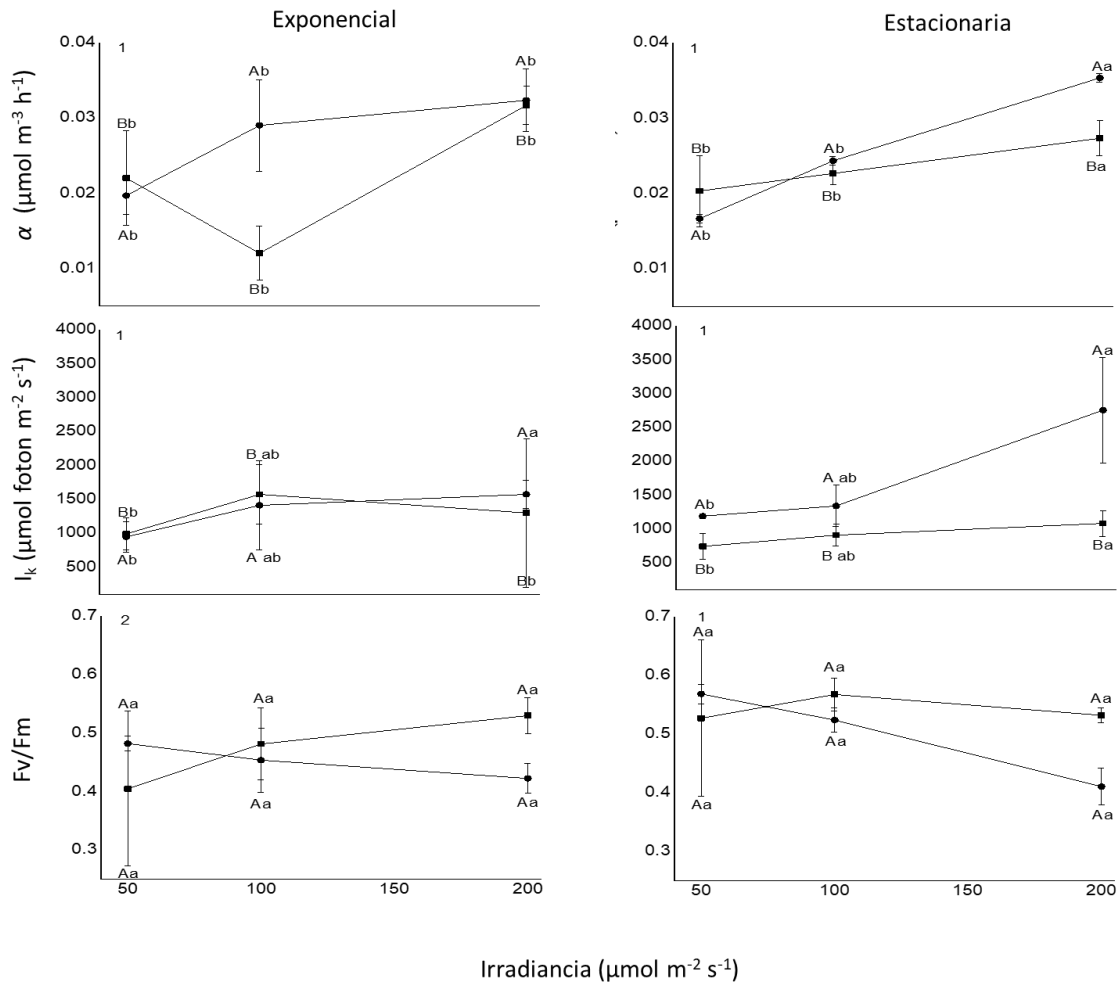


Figura 8. Parámetros fotosintéticos de la fase exponencial y estacionaria de cultivos de *Scenedesmus acuminatus* mantenidos con distinto aporte químico de nitrógeno (Nitrato: \blacksquare y Amonio: \bullet) a irradiancia (50, 100 y $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$). Eficiencia fotosintética (α : $\mu\text{mol m}^{-3} \text{h}^{-1}$); índice de saturación lumínica (I_k : $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y eficiencia cuántica (F_v/F_m). Análisis de varianza de tres vías y pruebas *a posteriori* de Tukey, $\alpha=0.05$. Valores con números indican diferencias significativas entre fases de crecimiento (1>2). Letras minúsculas indican diferencias significativas por efecto de la irradiancia (a>b>c). Letras mayúsculas indican diferencias significativas por efecto del aporte de nitrógeno (A>B).

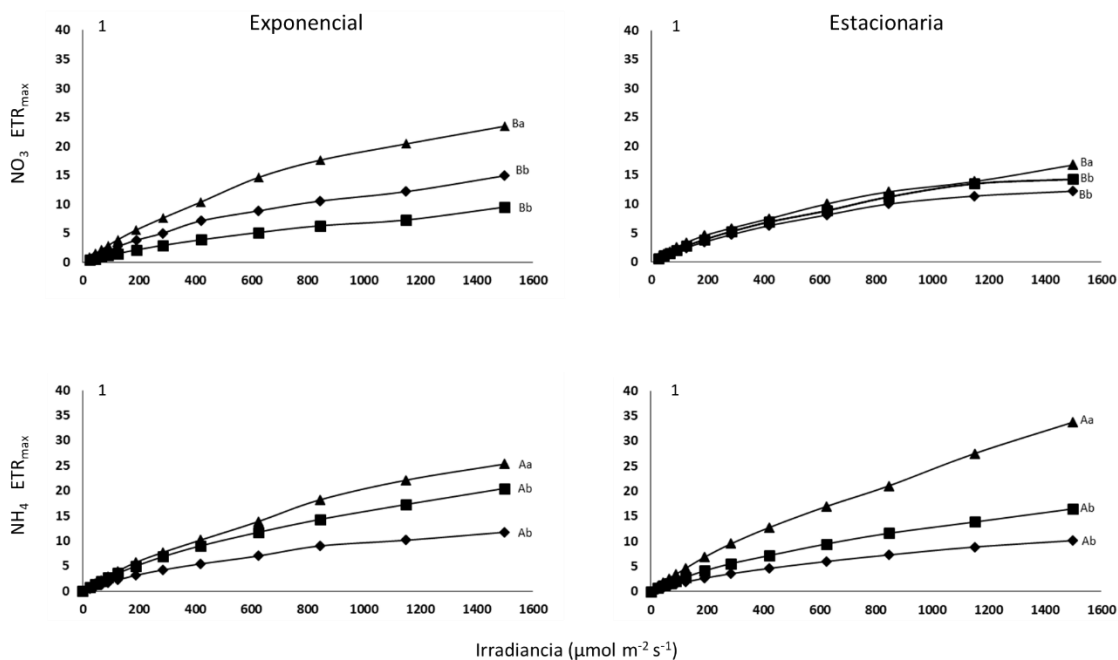


Figura 9. Curvas fotosintéticas medidas como tasa máxima de transporte de electrones (ETR_{max} : $\mu\text{mol electron m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de la fase exponencial y estacionaria de cultivos de *Scenedesmus acuminatus* mantenidos con dos aportes químicos de nitrógeno (NO_3 y NH_4) a irradiancias (50: ● 100: ○ y 200: ▼ $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$). Análisis de varianza de tres vías y pruebas *a posteriori* de Tukey, $\alpha=0.05$. Valores con números indican diferencias significativas entre fases de crecimiento (1>2). Letras minúsculas indican diferencias significativas por efecto de la irradiancia (a>b). Letras mayúsculas indican diferencias significativas por efecto del aporte de nitrógeno (A>B).

3.7 Ácidos grasos

La mayor concentración de ácidos grasos saturados (SFA) fue en el ácido graso C16:0 para todos los tratamientos. El tratamiento con nitrato como aporte químico de nitrógeno a $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ presentó el mayor contenido de C16:0 (34.67%). Se observó una ausencia en la mayoría de los ácidos grasos saturados con el tratamiento de nitrato a $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

En los tratamientos en donde se suministró amonio como aporte químico de nitrógeno, no se identificó el ácido graso C17:0, mientras que para los tratamientos con nitrato se identificó este ácido graso únicamente en irradiancia de 50 y $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

El grupo conformado por los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) presentó los mayores valores en el C18:1n9 para todos los tratamientos, el tratamiento con aporte químico de nitrato a $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fue el que presentó el mayor contenido (42.63%). Para el tratamiento con aporte químico de amonio se presentó el mayor porcentaje de C18:1n9 a $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (38.80%). Se observó la producción del ácido graso

C15:1 únicamente en los cultivos con la menor irradiancia ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para los dos tipos de aporte químico de nitrógeno.

El grupo de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) presentó las mayores concentraciones en el C18:3n3 siendo los cultivos suministrados con amonio a $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ los que presentaron el mayor porcentaje (23.68%). Los cultivos suministrados con nitrato presentaron los mayores porcentajes en los cultivos mantenidos a 100 (20.70%) y $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (19.30%). El ácido graso C18:2n6C presentó los mayores valores en los cultivos suministrados con amonio a irradiancias de 50 (9.93%) y 200 (10.27%) $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Para los cultivos suministrados con nitrato los mayores porcentajes se obtuvieron a 50 (8.96%) y 200 (7.20%) $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Tabla 1. Porcentaje del total de ácidos grasos identificados en cultivos de *Scenedesmus acuminatus* con dos aportes químicos de nitrógeno (NO_3 y NH_4) a tres irradiancias (50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Dónde: nd= no detectado. ΣSFA = sumatoria de ácidos grasos saturados. ΣMUFA =sumatoria de ácidos grasos monoinsaturados. ΣPUFA =sumatoria de ácidos grasos poliinsaturados.

Ácido graso	Tratamientos					
	Nitrato			Amonio		
	50	100	200	50	100	200
SFA						
C10: 0	4.68	2.20	0.90	3.82	1.22	3.34
C11: 0	1.10	0.70	nd	0.67	0.57	0.58
C13: 0	0.15	1.60	nd	2.69	1.46	2.14
C14: 0	0.40	0.30	nd	0.52	0.42	0.85
C15: 0	0.44	0.20	nd	0.45	nd	0.40
C16: 0	34.67	25.40	29.80	26.00	24.15	23.81
C17: 0	0.36	0.30	nd	nd	nd	nd
C18: 0	4.12	3.40	5.20	2.42	3.37	2.58
MUFA						
C15: 1	0.36	nd	nd	0.40	nd	nd
C16: 1	0.46	1.70	nd	3.89	1.84	3.99
C17: 1	0.32	2.40	2.80	3.01	1.67	3.36
C18: 1n9	42.63	34.00	34.80	23.18	38.80	25.00
C20: 1n9	nd	0.30	nd	nd	nd	nd
PUFA						
C18: 2n6C	8.96	6.40	7.20	9.93	6.63	10.27
C18: 2n6T	0.47	nd	nd	nd	nd	nd
C18: 3n6	0.42	0.40	nd	0.45	19.29	nd
C18: 3n3	0.47	20.70	19.30	22.53	0.58	23.68
ΣSFA	45.92	34.15	35.99	36.59	31.19	33.70
ΣMUFA	43.77	38.45	37.53	30.49	42.31	32.35
ΣPUFA	10.32	27.40	26.48	32.91	26.49	33.95

Capítulo 4. Discusión

4.1 Crecimiento

La densidad celular de los cultivos de *Scenedesmus acuminatus* mantenidos con los dos aportes químicos del nitrógeno (nitrato y amonio), muestran la preferencia de esta especie para crecer y reproducirse en medios de cultivo suministrados con amonio como aporte químico de nitrógeno. La densidad celular de *Scenedesmus acuminatus* no presentó diferencias significativas en la densidad de células por efecto del aporte químico de nitrógeno. Sin embargo, la densidad de células cambió con respecto al tiempo de cultivo. Este cambio en la densidad de células por la edad del cultivo es debido a que, durante la fase exponencial de crecimiento, las células dirigen los productos de la fotosíntesis a la producción de proteínas para continuar con su reproducción celular, mientras que durante la fase estacionaria, los productos de la fotosíntesis son destinados para la producción de compuestos de reserva de energía, como lípidos y carbohidratos. En diversas especies de microalgas se ha visto que en la fase estacionaria de crecimiento aumenta el tamaño de las células y se mantiene constante la densidad celular (Devi *et al.*, 2012; Breuer *et al.*, 2013; Romero-Romero, 2015). La densidad celular de *Scenedesmus acuminatus* mostró un cambio significativo por efecto de la irradiancia, donde los mayores valores de densidad de células ($0.68 \text{ células ml}^{-1} \times 10^6$) se presentaron en los cultivos mantenidos a $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, mientras que los menores valores ($0.43 \text{ células ml}^{-1} \times 10^6$) se obtuvieron con la mayor irradiancia utilizada ($200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) en cultivos con amonio como aporte químico de nitrógeno.

Los valores de las tasas de crecimiento obtenidas para los cultivos de *Scenedesmus acuminatus* suministrados con amonio evaluados en esta investigación son análogas a lo descrito por Adamsson (2000), quien observó mayores tasas de crecimiento durante los primeros días de cultivo de *Scenedesmus acuminatus* al suministrar urea en el medio de cultivo respecto a lo obtenido con nitrato como aporte químico de nitrógeno en el medio de cultivo.

La magnitud de la tasa de crecimiento de *Scenedesmus acuminatus* evaluada en esta investigación, muestra una relación inversa conforme se aumenta la irradiancia. Sin embargo, estos resultados difieren de lo obtenido con *Scenedesmus obtusus*, ya que mostró una tasa de crecimiento menor ($0.233 \text{ divisiones día}^{-1}$) a la mayor irradiancia utilizada en los cultivos ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (Chandra *et al.*, 2017). Estas diferencias en la respuesta en la tasa de crecimiento respecto al efecto de la irradiancia, pueden ser debidas a distintas adaptaciones del aparato fotosintético de las células del género de *Scenedesmus*. Se ha descrito que un aumento en la irradiancia produce un estrés en las células de las microalgas y puede

llegar a la saturación por luz o a la foto inhibición, dependiendo de la magnitud de la irradiancia y de la capacidad de adaptación del aparato fotosintético (Lin y Lin, 2011; Liu *et al.*, 2012).

En los ensayos con *Scenedesmus acuminatus* se encontró una relación inversa de los valores de la tasa de crecimiento respecto a la magnitud de la irradiancia y esto ocurrió con los dos aportes químicos de nitrógeno usados en los ensayos. Esta tendencia puede ser debida a una respuesta fisiológica adaptativa de la célula a los cambios en su entorno, favoreciendo el crecimiento en valores de baja irradiancia ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) con amonio como aporte de nitrógeno, así como ha sido descrito para otras especies del grupo de las clorofíceas (Lin y Lin, 2011; Liu *et al.*, 2012; Breuer *et al.*, 2013).

Syrett (1981) menciona que las células algales prefieren incorporar formas químicas de nitrógeno que representen un menor gasto de energía, como el amonio. Esto ocurre porque las células requieren incorporar el nitrógeno que ingresa en compuestos orgánicos como aminoácidos y proteínas. Para que el nitrato sea asimilado por la célula, requiere ser reducido a nitrito (NO_2^-) para después ser reducido por la enzima nitrito reductasa y convertirse en amonio, lo cual conlleva un mayor gasto energético.

Para que un factor se considere limitante en el crecimiento microalgal, debe de existir un desequilibrio metabólico que tiene como resultado un ajuste en el metabolismo y composición bioquímica de la célula, con el fin de volver a un estado de equilibrio (Torzillo y Vonshak, 2013). Teniendo en cuenta la reducción en la tasa de crecimiento conforme aumenta la irradiancia, es posible que se diera un cambio en las rutas metabólicas, asimilando de mejor manera el amonio como aporte químico de nitrógeno, fomentando una mayor producción de nuevas células, es decir, una mayor tasa de crecimiento. Lo anterior es probable que sea resultado de una mayor concentración de la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH), quien es la encargada de la incorporación del amonio en la célula y de quien se tiene evidencia que, bajo ciertas condiciones de estrés, puede aumentar su concentración (Boardman, 1977; Cullimore y Sims, 1981; Muñoz-Blanco y Cardenas, 1989).

En éste estudio se observaron cambios en el tamaño celular de *Scenedesmus acuminatus*, con diferencias en el largo de las células debido al aporte químico de nitrógeno, siendo mayor el tamaño celular en los cultivos con nitrato en ambas fases de crecimiento, mientras que el ancho de las células se vio afectado por la irradiancia y la fase de crecimiento, obteniendo un mayor tamaño celular en la fase de crecimiento estacionaria y con irradiancia de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. El cambio en el tamaño de las células ha sido descrito en otras investigaciones con *Scenedesmus acuminatus*, en donde una privación de nitrógeno promueve el aumento del largo de las células y se produce un incremento en sustancias de reserva y favorece la

formación de pequeños cúmulos de lípidos dentro de la célula por inanición de nitrógeno. Lo anterior produce disminución de la reproducción y en consecuencia, un aumento en el tamaño de las células (Zhan *et al.*, 2019). Se ha descrito que en células de *Scenedesmus obtusus* existe un aumento en el ancho de las células y en el contenido de lípidos cuando los cultivos han sido expuestos a altos valores de irradiancia ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Chandra *et al.*, 2017). Los resultados de esta investigación con *Scenedesmus acuminatus* indican que el ancho de las células se modificó por efecto de la irradiancia, presentando células más anchas en los cultivos expuestos a los mayores valores de irradiancia ($200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en fase estacionaria. Esto puede ser resultado de la respuesta de *Scenedesmus acuminatus* a un estrés producido por la irradiancia.

4.2 Peso seco total, peso orgánico y peso de cenizas

La cantidad de biomasa producida y evaluada como peso en *Scenedesmus acuminatus* mostró una mayor producción en los cultivos con nitrato como aporte químico de nitrógeno a $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Estos resultados difieren con lo reportado para *Scenedesmus obliquus*, donde se obtuvieron los mayores valores de peso seco (1.18 g l^{-1}) al mantener los cultivos con bajos niveles de irradiancia ($75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Mandal y Mallick, 2009).

Se encontró que *Scenedesmus obliquus* al ser mantenida en cultivos en gradiente de irradiancia (100 y $560 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), obtuvieron los mayores valores de peso orgánico con la mayor magnitud de la irradiancia utilizada (Senger y Fleischhacker, 1978). Estos resultados son similares a lo obtenido en esta investigación con *Scenedesmus obliquus* en donde los mayores valores de peso seco orgánico (79 a $110 \mu\text{g ml}^{-1}$) se tuvieron durante la fase estacionaria con los dos aportes de nitrógeno y con la mayor irradiancia utilizada ($200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). El cambio en el contenido de peso orgánico de *Scenedesmus acuminatus* puede ser explicado por la edad del cultivo, el aporte químico de nitrógeno y la irradiancia utilizada, principalmente (Darley, 1987; Arias-Peñaranda *et al.*, 2001; Pandey *et al.*, 2010).

Las células de *Scenedesmus acuminatus* presentaron los valores mayores de peso orgánico durante la fase estacionaria, lo que correspondió a los mayores tamaños de las células (largo y ancho) en esta fase de crecimiento. El aumento en el largo y ancho de las células de *Scenedesmus acuminatus* tiene relación directa con la magnitud de la irradiancia, ya que en altos valores de irradiancia ($200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) disminuyó la tasa de crecimiento y aumentó la producción de compuestos de reserva, lo cual dio como resultado un incremento en los valores de peso seco orgánico.

Los mayores valores en el tamaño celular de los cultivos de *Scenedesmus acuminatus* mantenidos con nitrato indican que, a pesar de encontrar mayor cantidad de biomasa expresada como peso seco orgánico en los cultivos con amonio, las células resultaron con menor tamaño respecto a las evaluadas en los cultivos con nitrato como aporte de nitrógeno. Se ha descrito que un mayor tamaño celular en las microalgas resulta en un incremento en el peso seco orgánico y que, en dependencia de la fase de crecimiento, puede haber acumulación de compuestos como proteínas, lípidos y/o carbohidratos (Darley, 1987; Pandey *et al.*, 2010).

El contenido de cenizas en esta investigación fue significativamente mayor durante la fase estacionaria de los cultivos para nitratos como aporte químico de nitrógeno. Este aumento en el contenido de cenizas se debe principalmente al aumento en la biomasa y a una posible acumulación de sales en la célula, ya que se ha reportado que las células tienden a acumular las sales del medio (Zhu y Lee, 1997) y esto aumentaría durante la fase estacionaria debido al mayor tiempo de exposición de la célula a las sales del medio.

4.3 Composición proximal

El contenido de proteínas de *Scenedesmus acuminatus* evaluado en esta investigación difiere con lo reportado por Renaud *et al.* (1991), quienes midieron porcentajes de proteína de 39% en *Isochrysis* sp. a $107 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y contenidos de proteína de 45.5% para *Nannochloropsis oculata* a irradiancias de $243 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En investigaciones con clorofitas como *Tetraselmis suecica* se indican valores de proteínas de 14% a $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante la fase estacionaria (Fernández-Reiriz *et al.*, 1989), lo que difiere con los resultados obtenidos para *Scenedesmus acuminatus* en esta investigación en el contenido de proteínas (17%) a $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante la fase estacionaria de crecimiento.

La mayor producción de proteínas durante la fase estacionaria en *Scenedesmus acuminatus* al utilizar amonio en el medio de cultivo, puede deberse a un cambio en el metabolismo celular, de manera que posiblemente existió un retraso en la producción de moléculas formadoras de proteínas. Este retraso en la producción de proteínas puede ser ocasionado por una retardada activación de los genes encargados de la asimilación del nitrógeno del medio, los cuales pueden ser activados o suprimidos por factores ambientales como pH, concentraciones de nitrógeno en el medio y estrés por irradiancia. La función de estos genes es inducir el transporte del nitrógeno al interior de la célula y por medio de enzimas como la glutamina sintetasa (GS) y la enzima glutamina oxoglutarato amino transferasa (GOGAT), se encargan de

la asimilación del nitrógeno para la formación de moléculas implicadas en la producción de proteínas. A este proceso de asimilación del nitrógeno se le conoce como el ciclo GS/GOGAT (Krauss y Thomas, 1954; Thomas y Krauss, 1955; Muñoz-Blanco y Cárdenas, 1989; Florencio, 1999; Fernández y Galván, 2007).

Los cultivos suministrados con amonio como aporte de nitrógeno durante la fase estacionaria presentaron posiblemente una mejor eficiencia en el ciclo GS/GOGAT, esta eficiencia puede ser debida al menor requerimiento energético que requiere la célula para convertir el amonio en aminoácidos, los cuales pasaran a formar parte de las proteínas formando así los componentes estructurales de la célula. A nivel metabólico, en otras clorofitas como *Chlamydomonas*, se ha reportado la activación de genes implicados en la asimilación del nitrógeno en forma de nitratos y amonio, siendo la asimilación del nitrato el proceso que requiere de más transportadores y enzimas para su asimilación (Syrett, 1981; Brown *et al.*, 1996; Fernández y Galván, 2007; Suárez *et al.*, 2013; Chiranjeevi y Mohan, 2016). Esta tendencia en el aumento de las proteínas durante la fase estacionaria de los cultivos se ha observado en cultivos de *Chaetoceros calcitrans* (Fernández-Reiriz *et al.*, 1989) y *Tetraselmis suecica*, *Aphanocapsa marina*, *Heterococcus* sp. y *Navicula* sp. (Jiménez-Valera y Sánchez-Saavedra, 2016).

La menor producción de proteínas en *Scenedesmus acuminatus* para el mayor valor de irradiancia ($200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) puede estar relacionada con el menor crecimiento evaluado en esta condición experimental, debido a que las células no pudieron realizar síntesis de nuevos componentes estructurales debido a una condición de estrés por la irradiancia. En otros estudios se ha descrito que, debido al efecto de altos niveles de irradiancia, el metabolismo de las células microalgales se desvía para producir componentes de reserva de energía (Harrison *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 1996; Yeesang y Cheirsilp, 2011; Chiranjeevi y Mohan 2016). Esta tendencia antes descrita corresponde a lo evaluado respecto a la composición proximal en *Scenedesmus acuminatus* en los cultivos suministrados con nitrato como aporte de nitrógeno.

Los resultados obtenidos en el contenido de lípidos con la mayor irradiancia ($200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) son similares a lo descrito por Wang *et al.* (2013) en *Scenedesmus dimorphus*, quienes describen un incremento en el contenido de lípidos (12 al 45%) conforme aumentó la irradiancia (50 a $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Esta mayor producción de lípidos en la mayor irradiancia es debida al estrés producido por el alto nivel de la irradiancia, a la síntesis de productos de reserva en las células y la disminución de la tasa de crecimiento. Sin embargo, en cultivos de *Scenedesmus obliquus* durante fase estacionaria se produjeron bajos valores de lípidos (12%) a irradiancias de $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Mandal y Mallick, 2009), esto posiblemente es debido a las características de esta especie para la síntesis de productos de reserva.

Los cambios en la concentración de lípidos y carbohidratos están asociados principalmente a un cambio en el metabolismo de la célula al medio en el que se encuentra. En otras investigaciones (Shifrin y Chisholm, 1981; Miller *et al.*, 2010; Us-Vázquez, 2011; Griffiths *et al.*, 2012; Chandra *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018), se ha descrito que *Scenedesmus acuminatus* tiene la capacidad de producir lípidos y carbohidratos como respuesta a una fotoaclimatación inducida por altas irradiancias, por lo que produce compuestos de reserva de energía. Lo anterior puede dar un indicio sobre la ruta metabólica que las células tomaron en respuesta a una elevada irradiancia ($200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), independientemente del aporte de nitrógeno utilizado.

4.4 Pigmentos

Los máximos picos de absorción in vivo para los cultivos de *Scenedesmus acuminatus* se observaron en las regiones azul y rojo del espectro de luz visible, en longitudes de onda próximas a los 430 y 663 nm en todos los tratamientos. Se ha descrito que la clorofila *a* tiene valores máximos de absorción a los 438 y 675, mientras que la clorofila *b* presenta máximos de absorción a los 470 y 652 nm (Bidigare *et al.*, 1989), por lo que es probable que estos dos pigmentos sean los responsables de los máximos de absorción espectral para la especie aquí estudiada. El contenido de pigmentos de *Scenedesmus acuminatus* en esta investigación se modificó por efecto de la fase de crecimiento, el tipo de aporte de nitrógeno y el nivel de la irradiancia utilizada. La clorofila *a* presentó los mayores valores durante la fase estacionaria. Esta respuesta es debida a que, durante la fase estacionaria, hay una mayor densidad de células y éstas causan un efecto pantalla o de auto sombreado y se produce una disminución de la cantidad de luz disponible para las células. Por lo anterior, las células requieren incrementar la síntesis de clorofila para aumentar la captación de la luz. Esta adaptación en la síntesis de clorofila *a* respecto a la fase de crecimiento y la densidad de células, ha sido previamente descrita para diversos grupos de microalgas por otros autores (Dubinsky y Stambler, 2009).

El aumento significativo en el contenido de la clorofila *a* en los cultivos suministrados con amonio como aporte de nitrógeno puede ser debido a la mayor asimilación del nitrógeno del medio. Esto concuerda con lo evaluado para *Scenedesmus acuminatus* respecto a la mayor producción de proteínas en los cultivos suministrados con amonio como aporte de nitrógeno en la fase estacionaria, ya que la molécula de clorofila contiene proteínas que forman parte de su estructura en los complejos de captación de luz (William y Laurens, 2010).

Para los cultivos suministrados con nitrato, la mayor producción de clorofila *a* se presentó en los cultivos a $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Sin embargo, en éstos se encontró el menor porcentaje de proteínas, posiblemente el nitrato en *Scenedesmus acuminatus* fomentó el aumento en el tamaño de las unidades cosechadoras de luz y no requirió la síntesis de clorofila *a*. Esta tendencia, previamente descrita para *Scenedesmus acuminatus*, ha sido mencionada por otros autores para otras especies de microalgas en donde se modifica el tamaño de las unidades antena, el tamaño de las células y se produce un incremento en el peso orgánico de las células (Chávez-Medrano, 2008; González-Moreno *et al.*, 2008).

Los resultados obtenidos acerca del contenido de pigmentos para *Scenedesmus acuminatus* en cultivos suministrados con nitrato como aporte de nitrógeno y durante la fase estacionaria, son similares a lo reportado en *Chlorella* sp. y *Monoraphidium* sp. en donde se mantuvieron los cultivos a diferentes irradiancias ($40, 80$ y $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por dos días y después $40, 200$ y $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), observando un decremento en el contenido de la clorofila *a* bajas irradiancias ($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (He *et al.*, 2015). Las células de microalgas en fase exponencial de crecimiento y con bajos niveles de irradiancia, no requieren alta concentración de clorofila *a*, ya que la densidad de células en la fase exponencial es baja y no se produce auto sombreado de las células (Dubinsky y Stambler, 2009).

En cuanto al efecto combinado de la irradiancia y el aporte de nitrógeno respecto a la producción de clorofila *b* en los cultivos de *Scenedesmus acuminatus*, se observó una mayor concentración en los cultivos suministrados con nitrato como aporte de nitrógeno a bajos niveles de irradiancias, mientras que este mismo efecto combinado produjo en los cultivos suministrados con nitrato, una mayor producción de clorofila *b* bajo la mayor irradiancia ($200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). La clorofila *b*, funciona como antena receptora de la energía de los fotones que luego transfiere a la clorofila *a* (Dubinsky y Stambler, 2009).

En los cultivos de *Scenedesmus acuminatus* se encontró que en la clorofila *c* hubo un efecto combinado del aporte químico de nitrógeno y de la irradiancia y que favoreció la producción de clorofila *c* con los tres niveles de irradiancia utilizados en los cultivos suministrados con nitrato como aporte de nitrógeno. Sin embargo, el contenido de clorofila *c* en los cultivos con amonio permaneció similar en la fase exponencial. La clorofila *c*, es un pigmento accesorio que capta energía y la transfiere a la clorofila *a* para la activación de los centros de reacción (Dubinsky y Stambler, 2009). En este trabajo realizado con *Scenedesmus acuminatus*, la síntesis de clorofila *c* parece estar modulada por la fase de crecimiento de las células, en donde es sintetizada para favorecer la captación de luz y transmitirla a la clorofila *a* para la activación de los centros de reacción.

En esta investigación se observó en los cultivos de *Scenedesmus acuminatus* que el nitrato a 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ favorece la producción de carotenoides en los cultivos suministrados con amonio. El aumento en el contenido de carotenoides puede ser explicado como una forma de fotoprotección que utiliza la microalga para maximizar la actividad celular como la fotosíntesis y el mantenimiento de las funciones básicas de las células (Figueroa *et al.*, 1997; Guerrero *et al.*, 1999; Miranda de la Maza, 2019).

4.5 Fotosíntesis

En los ensayos realizados con *Scenedesmus acuminatus* se observó una correspondencia entre los valores de la eficiencia fotosintética (α) con respecto a los valores mayores de irradiancia (200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Posiblemente esto se debe a una respuesta de esta especie de microalga ante el estrés ocasionado por la irradiancia. Se ha descrito que Intensidades de luz elevadas, temperaturas altas o bajo contenido de nutrientes en el medio de cultivo, suelen ser factores inhibitorios para la tasa fotosintética (Darley *et al.*, 1987; South y Whittick, 2009).

En este estudio se observó un aumento en el índice de saturación lumínica (I_k) durante la fase estacionaria de crecimiento y con aporte químico de amonio a 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, dónde se obtuvieron valores de I_k de 1500 a 3500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, lo que puede ser interpretado como una respuesta altamente adaptativa de esta especie a los altos valores de la irradiancia utilizada. Estos valores de I_k difieren con lo reportado en *Scenedesmus obliquus*, donde se presentaron valores de I_k de 7696 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, estas diferencias pueden ser debidas al distinto tipo de medio de cultivo utilizado (TAP), el nivel de irradiancia (100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), que se utilizó como factor estresante a la temperatura (20, 25 y 30°C) y el aporte de carbono (ácido acético y sacarosa) (Márquez-Reyes, 2016). Diversos autores recomiendan usar un índice de saturación lumínica en clorofitas en valores de 211 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para evitar un estrés celular (Richardson *et al.*, 1983).

El estrés producido por efecto de la irradiancia en los cultivos de *Scenedesmus acuminatus* puede observarse también en la eficiencia cuántica (F_v/F_m), en donde los cultivos se mantuvieron en un rango de valores de 0.250 a 0.525 durante la fase exponencial y en valores de 0.390 a 0.690 en la fase estacionaria del crecimiento, como respuesta a un estrés por la menor irradiancia utilizada (50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Los valores antes mencionados son inferiores a los valores asociados a células no estresadas que se sitúan en un intervalo de valores de entre 0.650 a 0.850 (Maxwell y Johnson, 2000; Parkhill *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2017). Los cultivos de *Scenedesmus acuminatus* en fase exponencial presentan menores valores de

Fv/Fm, esto puede ser debido a que las células se encontraban en un proceso de adaptación al medio de cultivo y a los niveles de irradiancia utilizados en los ensayos. Los resultados evaluados para *Scenedesmus acuminatus* en ésta investigación son similares a los descritos para células de la clorofita *Nannochloris maculata*, quienes mostraron valores de eficiencia cuántica de 0.1 a 0.3 al ser para expuestas a radiación solar (Figueroa *et al.*, 1997).

La eficiencia cuántica guarda una estrecha relación con la producción de compuestos como la clorofila, ya que es un indicador del funcionamiento del fotosistema II. Al encontrarse en valores de 0.4 a 0.5 es posible que el fotosistema II presente algún daño debido a factores ambientales (Tan *et al.*, 2016), lo que causa una reducción en la captación de luz por medio de los complejos de clorofila. En los cultivos de *Scenedesmus acuminatus* se encontraron valores bajos para el contenido de clorofila *a* en los cultivos suministrados con amonio y mantenidos a $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mismos que también presentaron los menores valores de Fv/Fm durante fase estacionaria.

La tasa de transporte de electrones (ETR_{max}) puede proporcionar información del estado fisiológico del aparato fotosintético, por lo que niveles bajos de ETR_{max} pueden indicar que las células de las microalgas se encuentran bajo niveles estresantes y que pueden limitar la tasa de fotosintética (Masojídek *et al.*, 2001; Zermeño-González *et al.*, 2015). Se ha descrito para diversas especies de microalgas una reducción en la eficiencia fotosintética conforme aumenta el nivel de la irradiancia y un posible daño en el PSII (Werner *et al.*, 2001; He *et al.*, 2015). Los resultados de ETR_{max} obtenidos en este estudio con *Scenedesmus acuminatus* son menores a los reportados por Wu *et al.* (2008) quienes obtuvieron valores de ETR_{max} de 38 a $40 \mu\text{mol electrón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para cultivos de *Scenedesmus quadricauda* sometidos a oscuridad. Estas diferencias en los valores de ETR_{max} obtenidos *Scenedesmus acuminatus* respecto a lo evaluado por los autores antes mencionados, pueden indicar una distinta capacidad del aparato fotosintético entre especies, aun a pesar del mismo género taxonómico y por las distintas condiciones de cultivo utilizadas.

4.6 Ácidos grasos

Diversos organismos marinos no tienen la capacidad de sintetizar ácidos grasos poliinsaturados en la cantidad suficiente para satisfacer sus necesidades fisiológicas, por lo que tienen que ser adquiridos por medio de la dieta (Thompson *et al.*, 1993). Los perfiles de los ácidos grasos de *Scenedesmus acuminatus* bajo las condiciones experimentales de esta investigación mostraron porcentajes de ácidos grasos

saturados (SFA) del 31 al 45%, ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) del 30 al 43% y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) del 10 al 33%.

Los porcentajes de los ácidos grasos C16:0 y C18:0 obtenidos en esta investigación difieren con lo reportado por da Silva *et al.* (2009) para *Scenedesmus obliquus*, donde se obtuvieron menores porcentajes de C16:0 (21%) y de C18:0 (0.4%) y mayores porcentajes en C16:1 (6%) respecto a lo encontrado en este estudio. Asimismo, los autores determinaron la presencia de los ácidos grasos C16:2, C16:3, C16:4, y C18:4, los cuales no fueron identificados en esta investigación.

Investigaciones realizadas con cultivos de *Chlorella* cepa MFD-1 y *Nannochloropsis* cepa MFD-2 muestran menores porcentajes de ácidos grasos monoinsaturados a los obtenidos en este trabajo, como el C18:1n9, en donde se determinó un 3.70% para *Chlorella* y el cuál no logro determinarse en los cultivos con *Nannochloropsis*. Para los ácidos grasos poliinsaturados, como el C18:3n3, en este trabajo se encontraron porcentajes similares a los descritos para *Chlorella* (21.60%), mientras que para *Nannochloropsis* se encontraron porcentajes de 1.35%, valores menores a los encontrados en esta investigación. Sin embargo, los porcentajes de ácidos grasos saturados son similares a los obtenidos en esta investigación, reportando en *Chlorella* porcentajes menores al 1% para el C14:0 y para el C16:0 porcentajes de 23.25% para *Chlorella* y 26.70% para *Nannochloropsis* (James *et al.*, 1989).

Las variaciones en el contenido de ácidos grasos para *Scenedesmus acuminatus* encontrada en esta investigación respecto a lo descrito por James *et al.* (1989) pueden ser atribuidas a la especie utilizada, a las diferentes temperaturas a las que se realizaron los experimentos (15 a 35°C) y a las distintas irradiancias en las que se mantuvieron los cultivos (140 y 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en las investigaciones anteriores, ya que se ha observado que las variaciones en estos factores modifican el contenido de ácidos grasos (Breuer *et al.*, 2013).

El proceso de fotosíntesis se encuentra estrechamente ligado al contenido de ácidos grasos presentes en *Scenedesmus acuminatus*. Al existir un mayor contenido de clorofilas captadoras de luz como lo observado en esta investigación, el proceso que lleva a la formación de ácidos grasos puede verse favorecido en menores irradiancias (50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A mayores irradiancias (200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), las células pueden estar sometidas a condiciones estresantes, lo cual derivaría en posibles daños en el fotosistema II. De acuerdo a lo descrito por González *et al.* (2019) conforme hay un incremento en la irradiancia, el contenido de ácidos grasos saturados y monoinsaturados disminuye, lo cual incrementa la proporción de ácidos grasos

poliinsaturados, respuesta que permite a las células incrementar la fluidez de membranas y la captación de luz en las células fitoplanctónicas en condiciones de elevada irradiancia (He *et al.*, 2015).

En un estudio realizado por Darki *et al.* (2017) con *Scenedesmus obliquus* se encontraron mayores valores de C16:0, C16:1, C18:2n6c, C18:3n6 y C18:3n3 respecto a los valores obtenidos con *Scenedesmus acuminatus* en esta investigación. Estas diferencias en el contenido de ácidos grasos entre ambas especies de microalgas pueden ser debido al tipo de especie utilizada (Custódio *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2018), método de extracción de los ácidos grasos (Wiltshire *et al.*, 2000) y a diferencias en las condiciones de cultivo como luz, el tiempo de cultivo y temperatura. Otros factores como el pH (Breuer *et al.*, 2013), salinidad (Salama *et al.*, 2013) y CO₂ (Tang *et al.*, 2011) también pueden modificar el contenido de ácidos grasos y, cuando en el medio de cultivo existe un ambiente desfavorable por el contenido de nutrientes o un estrés por la irradiancia, las células tienen la capacidad de cambiar las rutas metabólicas para la síntesis de compuestos primarios como proteínas, lípidos o carbohidratos (Liu *et al.*, 2012).

En esta investigación se observaron cambios principalmente en la síntesis de lípidos neutros como el C16:0, con porcentajes del 23.81 al 34.67% y donde la mayor producción se obtuvo en los cultivos a 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para cada aporte de nitrógeno. Además, se observó una relación directa entre el ácido graso C16:0 y el contenido de C18:1n9, donde los cultivos con mayores porcentajes de C16:0 presentaron de igual forma los mayores contenidos de C18:1n9. Esto se puede atribuir al proceso de desaturación y elongación que sufre el ácido palmítico (C16:0) para formar ácidos grasos de cadena larga como el C18:1n9 (Boyer, 2000; Nelson y Cox, 2005). La producción de ácidos grasos como el C16:0 y el C18:1n9 son los principales productos utilizados para el almacenamiento de energía en la célula (Thompson *et al.*, 1990; Breuer *et al.*, 2013; Leal-Medina *et al.*, 2017), estrategia que las células de *Scenedesmus acuminatus* pudieron emplear al encontrarse en la fase de crecimiento estacionaria.

La mayor producción de C16:0 a la menor y mayor irradiancia utilizada (50 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) fue consistente con distintas especies de *Scenedesmus* como *Scenedesmus bijugatus* (Arumugam *et al.*, 2013), *Scenedesmus* sp. (Samkhaniani *et al.*, 2017) o en otras clorofitas como *Neochloris oleoabundans* (Li *et al.*, 2008).

En investigaciones con *Scenedesmus rubescens* se observó un mayor porcentaje de ácidos grasos saturados (64%) en medios con urea como aporte químico de nitrógeno, en comparación con medio suministrado con nitrato (62%) (Lin y Lin, 2011). Este cambio puede deberse a una mayor asimilación del nitrógeno en el medio.

El perfil de ácidos grasos de *Scenedesmus acuminatus* en esta investigación muestra a los ácidos grasos saturados y monoinsaturados como los principales grupos de ácidos grasos que componen a *Scenedesmus acuminatus*, con porcentajes totales de SFA del 31 al 45% y de MUFA del 30 al 43%. Estudios en otras especies de clorofitas como *Parietochloris incisa* indican un incremento en los ácidos grasos totales conforme aumenta la irradiancia, obteniendo un contenido de ácidos grasos del 16% al 34% del peso seco total al ser cultivadas en irradiancias de 35 a 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente. Esta tendencia difiere con la observada en esta investigación, donde los mayores valores del total de ácidos grasos se presentaron de forma general en los tratamientos con las menores irradiancias (50 y 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Solovchenko *et al.*, 2008).

Los cultivos suministrados con nitrato como aporte químico de nitrógeno muestran un decremento en el contenido total de ácidos grasos saturados y monoinsaturados conforme aumenta la irradiancia, mientras que el grupo de los poliinsaturados presentó un mayor contenido (27%) a 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Para los cultivos suministrados con amonio como aporte de nitrógeno se observaron mayores porcentajes de ácidos grasos saturados a 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. El grupo de los monoinsaturados presentaron un mayor contenido (42%) a 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Mientras que el grupo de los poliinsaturados presentó mayores porcentajes a 50 (32%) y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (33%). El aumento en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados a baja irradiancia puede deberse a una correcta captación de energía por parte del fotosistema II, del cual por medio del proceso de fotosíntesis surgirán los productos necesarios para la formación de ácidos grasos, mientras que para los cultivos a alta irradiancia el aumento en el contenido de ácidos grasos puede deberse a una forma de fotoprotección de la célula para evitar un daño en el fotosistema II.

4.7 Recapitulación

Esta investigación con *Scenedesmus acuminatus* muestra que el efecto conjugado de la irradiancia y el aporte de nitrógeno puede promover la producción de ácidos grasos de grupos específicos, como los SFA, en especial el ácido graso C16:0 y los MUFA como el C18:1n9. Respecto al grupo de los PUFA's, el C18:3n3 presentó los mayores contenidos. Este ácido graso es utilizado en la dieta de salmónidos para satisfacer los requerimientos del organismo de ácidos grasos como C16:0 y C18:0, además de ser el ácido graso precursor para la síntesis del ácido graso C22:6n3 (DHA), uno de los más importantes en la nutrición de especies marinas en etapas larvales y postlarvales de organismos en cultivo (Kanzawa, 2000; Bell *et al.*, 2001).

Además de promover la producción de ciertos ácidos grasos, el efecto del aporte de nitrógeno/irradiancia puede llegar a favorecer la desaturación de ácidos grasos como el C16:0 para la formación de ácidos grasos mono y poliinsaturados, tales como el C20:1n9 a $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y el C18:2n6t a $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ los cuales se identificaron únicamente en los cultivos suministrados con nitrato como aporte químico de nitrógeno. Esta respuesta puede estar relacionada con una mayor actividad de las elongasas y las desaturasas las cuales son las responsables de la síntesis de los ácidos grasos C18:2n6T y el C20:1n9 a partir del C16:0 (Solovchenko *et al.*, 2008; Mühlroth *et al.*, 2013).

Al modificar factores como el aporte de nitrógeno y la irradiancia se producen cambios en el contenido de ácidos grasos de *Scenedesmus acuminatus*, es por ello que los parámetros de cultivo dependerán del fin que se le quiere dar a la biomasa producida ya sea para la nutrición acuícola de especies larvales o como sustituto parcial en harinas de pescado, la cual por el contenido de ácidos grasos presentes en la biomasa algal, facilita la absorción de nutrientes solubles en grasa a los organismos acuícolas (Lee *et al.*, 2003).

Teniendo en cuenta los factores irradiancia y aporte químico de nitrógeno, *Scenedesmus acuminatus* se presenta como una especie con potencial uso en la industria acuícola, además de que puede producir un alto contenido de ácidos grasos saturados (34-45%), ácidos grasos monoinsaturados (38-43%) y ácidos grasos poliinsaturados (10-27%) empleando nitrato como aporte químico de nitrógeno y bajas irradiancias (50 y $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) minimizando los requerimientos de energía eléctrica para los cultivos.

Capítulo 5. Conclusiones

- El tipo de aporte químico de nitrógeno, la irradiancia y la edad del cultivo modifican el crecimiento y la composición proximal de *Scenedesmus acuminatus*.
- El uso de amonio como forma química de nitrógeno en el medio produce un incremento en la tasa de crecimiento de *Scenedesmus acuminatus*.
- Los cultivos de *Scenedesmus acuminatus* con nitrato y amonio como aporte químico de nitrógeno presentan inhibición de la fotosíntesis a $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, reduciendo la tasa de crecimiento de los cultivos.
- La producción de biomasa evaluada como peso seco orgánico en *Scenedesmus acuminatus* fue mayor cuando se suministró nitrato como aporte químico de nitrógeno en el medio.
- Existe una relación directa entre el incremento del peso seco orgánico y los niveles de irradiancia en *Scenedesmus acuminatus*.
- El uso de amonio en el medio de cultivo y nivel de irradiancia de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ favorecen la producción de proteínas en *Scenedesmus acuminatus*.
- El uso de amonio como aporte de nitrógeno en el medio de cultivo induce la producción de lípidos en *Scenedesmus acuminatus*.
- Durante la fase exponencial de crecimiento y con baja nivel de irradiancia ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) se incrementó la producción de lípidos en *Scenedesmus acuminatus*, mientras que durante la fase estacionaria se incrementó el contenido de lípidos con altos niveles de irradiancia ($200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).
- El contenido de carbohidratos en *Scenedesmus acuminatus* aumentó en altos niveles de irradiancia ($200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).
- El contenido de clorofila *a* en *Scenedesmus acuminatus* se ve modificado por efecto del tiempo de cultivo favoreciendo su acumulación durante la fase estacionaria de crecimiento.
- La respuesta fotosintética de *Scenedesmus acuminatus* se modificó por el tipo de aporte químico de nitrógeno y por los niveles de irradiancia. Los valores mayores de tasa máxima de transporte de electrones (ETRmax) corresponden a los obtenidos en cultivos con amonio como aporte de nitrógeno y con la mayor irradiancia ($200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).
- El uso de amonio como medio de cultivo para *Scenedesmus acuminatus* favorece la producción de ácidos grasos saturados (SFA) y ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) con los tres niveles de irradiancia utilizados en los ensayos ($50, 100$ y $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Capítulo 6. Recomendaciones

- Evaluar el perfil de aminoácidos de *Scenedesmus acuminatus* al ser mantenido en cultivo bajo las tres irradiancias y los dos aportes químicos de nitrógeno utilizados en esta investigación.
- Sustituir el aporte químico de nitrato en el medio de cultivo por aportes de nitrógeno orgánicos o bien por fertilizantes y evaluar la composición química de *Scenedesmus acuminatus*.
- Utilizar mayores gradientes de irradiancia como factor estresante para inducir una posible acumulación de ácidos grasos poliinsaturados en *Scenedesmus acuminatus*.
- Realizar bioensayos en organismos acuícolas al utilizar la biomasa de *Scenedesmus acuminatus* como sustituto parcial en piensos acuícolas.

Literatura citada

- Abalde, J. 1995. *Microalgas: Cultivo y Aplicaciones*. Universidad de Coruña. Edición 1ra. España. 210 pp.
- Abomohra, A. E. F., Eladel, H., El-Esawi, M., Wang, S., Wang, Q., He, Z., Y. Feng., H. Shang, Hanelt, D. 2018. Effect of lipid-free microalgal biomass and waste glycerol on growth and lipid production of *Scenedesmus obliquus*: Innovative waste recycling for extraordinary lipid production. *Bioresource Technology*, 249, 992-999.
- Adamsson, M. 2000. Potential use of human urine by greenhouse culturing of microalgae (*Scenedesmus acuminatus*), zooplankton (*Daphnia magna*) and tomatoes (*Lycopersicon*). *Ecological Engineering*, 16(2), 243-254.
- Arias Peñaranda, M. T., Cañizares Villanueva, R. O., Martínez Roldán, A. D. J. 2013. Producción de biodiesel a partir de microalgas: parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. *Acta Biológica Colombiana* 18 (1), 43-68 1900-1649 0120-548X.
- Arredondo-Vega, B.O., Voltolina, D., 2007. Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. *Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal*, 1, 17-25.
- Arumugam, M., Agarwal, A., Arya, M. C., Ahmed, Z. 2013. Influence of nitrogen sources on biomass productivity of microalgae *Scenedesmus bijugatus*. *Bioresource Technology*, 131, 246-249.
- Barraza-Guardado, R. H., Pérez-Villalba, A. M., González-Félix, M. L., Ortega-Urbina, J. A. T., Muñoz-Hernández, R., Zúñiga-Panduro, M., Perez-Velazquez, M. 2019. Uso de microalgas como constituyentes parciales del alimento balanceado para engorda de tilapia (*Oreochromis niloticus*)/The use of microalgae as partial constituents of growout feeds for tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Biocetnia*, 22(1), 135-141.
- Barreto-Pérez, R. 2018. Evaluación de microalgas para su uso en la elaboración de piensos para acuicultura. Tesis de Maestría en Biotecnología Industrial y Agroalimentaria. Universidad de Almería. España 33 pp.
- Barsanti, L., Gualtieri, P. 2006. *Algae: anatomy, biochemistry and biotechnology*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 145-204 pp.
- Becker, E. W. 1994. *Microalgae: Biotechnology and microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge. 63-171 pp.
- Bell, J. G., McEvoy, J., Tocher, D. R., McGhee, F., Campbell, P. J., Sargent, J. R. 2001. Replacement of fish oil with rapeseed oil in diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipid compositions and hepatocyte fatty acid metabolism. *The Journal of Nutrition*, 131(5), 1535-1543.
- Bhosale, S. V., Bhilave, M. P., Nadaf, S. B. 2010. Formulation of fish feed using ingredients from plant sources. *Research Journal of Agricultural Sciences*, 1(3), 284-287.

- Bidigare, R. R., Morrow, J. H., Kiefer, D. A. 1989. Derivative analysis of spectral absorption by photosynthetic pigments in the western Sargasso Sea. *Journal of Marine Research*, 47(2), 323-341.
- Bligh, E.G., W.J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Journal Biochemistry Physiology*, 37, 911-917.
- Boardman, N. T. 1977. Comparative photosynthesis of sun and shade plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 28(1), 355-377.
- Boyer, R. 2000. Metabolismo de ácidos grasos y lípidos. En: Boyer, R. (Ed.), *Conceptos de Bioquímica*. Thomson, México. 560-585 pp.
- Breuer, G., Lamers, P. P., Martens, D. E., Draaisma, R. B., Wijffels, R. H. 2013. Effect of light intensity, pH, and temperature on triacylglycerol (TAG) accumulation induced by nitrogen starvation in *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, 143, 1-9.
- Brown, M. R., Dunstan, G. A., Norwood, S. J., Miller, K. A. 1996. Effects of harvest stage and light on the biochemical composition of the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Journal of Phycology*, 32(1), 64-73.
- Brown, M. R. 2002. Nutritional value and use of microalgae in aquaculture. En: Cruz-Suárez, E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M. (Eds.). *Avances en nutrición acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, 3-6 de septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.
- Cañavate, J. 2011. Funciones microalgas en acuicultura. En; Centro Tecnólogo México del Mar. *Las algas como recurso. Valorización. Aplicaciones industriales y tendencias*. Centro Tecnológico del Mar. Recuperado de: 193-203 pp. <https://www.researchgate.net/publication/235960627>
- Castillo, O. S., Torres-Badajoz, S. G., Núñez-Colín, C. A., Peña-Caballero, V., Herrera-Méndez, C. H., Rodríguez-Núñez, J. R. 2017. Producción de biodiésel a partir de microalgas: avances y perspectivas biotecnológicas. *Hidrobiológica*, 27(3), 337-352.
- Chandra, T. S., Aditi, S., Kumar, M. M., Mukherji, S., Modak, J., Chauhan, V. S., Mudliar, S. N. 2017. Growth and biochemical characteristics of an indigenous freshwater microalga, *Scenedesmus obtusus*, cultivated in an airlift photobioreactor: effect of reactor hydrodynamics, light intensity, and photoperiod. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40(7), 1057-1068.
- Chávez-Medrano, C. 2008. Efecto de distintas variables ambientales en la fisiología y composición bioquímica de *Navicula incerta*. Tesis de Maestría en Ciencias. Posgrado de Acuicultura. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. México. 129 pp.
- Chia, M. A., Lombardi, A. T., Melao, M. D. G. G. 2013. Growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* in different growth media. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 85(4), 1427-1438.
- Chiranjeevi, P., Mohan, S. V. 2016. Critical parametric influence on microalgae cultivation towards maximizing biomass growth with simultaneous lipid productivity. *Renewable Energy*, 98, 64-71.

- Cullimore, J. V., Sims, A. P. 1981. Glutamine synthetase of *Chlamydomonas*: its role in the control of nitrate assimilation. *Planta*, 153(1), 18-24.
- Custódio, L., Soares, F., Pereira, H., Barreira, L., Vizetto-Duarte, C., Rodrigues, M. J., Varela, J. 2014. Fatty acid composition and biological activities of *Isochrysis galbana* T-ISO, *Tetraselmis* sp. and *Scenedesmus* sp.: possible application in the pharmaceutical and functional food industries. *Journal of Applied Phycology*, 26(1), 151-161.
- da Silva, T. L., Reis, A., Medeiros, R., Oliveira, A. C., Gouveia, L. 2009. Oil production towards biofuel from autotrophic microalgae semicontinuous cultivations motorized by flow cytometry. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 159(2), 568-578.
- Daniel, N., Sivaramakrishnan, T., Saravanan, K., Shalini, B., Arunjyoti, B., Sankar, R., Dann Roy, S. 2016. A review on microalgae as potential fish feed ingredient. *Journal of Andaman Science Association*, 1, 140-144.
- Darki, B. Z., Seyfabadi, J., Fayazi, S. 2017. Effect of nutrients on total lipid content and fatty acids profile of *Scenedesmus obliquus*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 60: e17160304
- Darley, W. 1987. *Biología de las algas: enfoque fisiológico*. (1st ed.). Limusa. México. 65-66 pp.
- Darley, W. M., Guzmán-Ortiz, M. 1987. Fitoplancton: factores ambientales que influyen en el crecimiento. En: Noriega (Ed.). *Biología de las algas enfoque fisiológico*. Limusa. México. 37-52 pp.
- Darwesh, O. M., Matter, I. A., Eida, M. F., Moawad, H., Oh, Y. K. 2019. Influence of nitrogen source and growth phase on extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using cultural filtrates of *Scenedesmus obliquus*. *Applied Sciences*, 9(7), 1465.
- Devi, M. P., Subhash, G. V., Mohan, S. V. 2012. Heterotrophic cultivation of mixed microalgae for lipid accumulation and wastewater treatment during sequential growth and starvation phases: effect of nutrient supplementation. *Renewable Energy*, 43, 276-283.
- Dubinsky, Z., Matsukawa, R., Karube, I. 1995. Photobiological aspects of algal mass culture. *Journal of Marine Biotechnology*, 2, 61-65.
- Dubinsky, Z., Stambler, N. 2009. Photoacclimation processes in phytoplankton: mechanisms, consequences, and applications. *Aquatic Microbial Ecology*, 56(2-3), 163-176.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350- 356.
- Eilers, P. H. C., Peeters, J. C. H. 1988. A model for the relationship between light intensity and the rate of photosynthesis in phytoplankton. *Ecological Modelling*, 42(3-4), 199-215. doi:10.1016/0304-3800(88)90057-9

- Elías-Castelo, J. 2018. Efecto del consumo de nitrógeno de la microalga *Desmodesmus communis* sobre la composición bioquímica, productividad de la biomasa, comunidad bacteriana y longitud de los telómeros. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Baja California. 99 pp.
- Fakhri, M., Arifin, N. B., Hariati, A. M., Yuniarti, A. 2017. Growth, biomass, and chlorophyll-a and carotenoid content of *Nannochloropsis* sp. strain BJ17 under different light intensities *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 16(1), 15-21.
- FAO. 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020 -Sustainability in action. Rome. 224 pp
<https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- Fernández, E., Galvan, A. 2007. Inorganic nitrogen assimilation in *Chlamydomonas*. *Journal of Experimental Botany*, 58(9), 2279-2287.
- Fernández-Linares, L. C., Montiel-Montoya, J., Millán-Oropeza, A., Badillo-Corona, J. A. 2012. Producción de biocombustibles a partir de microalgas. *Ra Ximhai*, 8(3), 101-115.
- Fernández-Reiriz, M. J., Perez-Camacho, A., Ferreiro, M. J., Blanco, J., Planas, M., Campos, M. J., Labarta, U. 1989. Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture*, 83(1-2), 17-37.
- Fierro-Reséndiz, S. 2006. Informe de actividades, agosto de 2005 a enero de 2006. Proyecto SEP-CONACyT. Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Laboratorio de Microalgas. Ensenada, Baja California, México. 31 pp.
- Figuroa, F. L., Mercado, J., Jiménez, C., Salles, S., Aguilera, J., Sánchez-Saavedra, M. P., Lubián, L. 1997. Relationship between bio-optical characteristics and photoinhibition of phytoplankton. *Aquatic Botany*, 59(3-4), 237-251.
- Florencio, F. 1999. Biología molecular de La asimilación de amonio en cianobacterias. *Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis*, (147), 147-67.
- Fogg, G.E., Thake, B.J. 1987. *Algal cultures and phytoplankton ecology*. University of Wisconsin Press, Londres. 269 pp.
- Folch, J., Lees, M., Stanley, G. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.
- Gacheva, G., Gigova, L. 2014. Biological activity of microalgae can be enhanced by manipulating the cultivation temperature and irradiance. *Open Life Sciences*, 9(12), 1168-1181.
- García-Cubero, R. 2011. Producción de biomasa de microalgas rica en carbohidratos acoplada a la eliminación fotosintética de CO₂. Tesis de Doctorado en Biología. Universidad de Sevilla. España. 197 pp. Recuperado de: [http://digital.csic.es/bitstream/10261/101928/1/Tesis doctoral RGC.pdf](http://digital.csic.es/bitstream/10261/101928/1/Tesis%20doctoral%20RGC.pdf)

- García-Márquez, J., Rico, R. M., Sánchez-Saavedra, M. D. P., Gómez-Pinchetti, J. L., Ación, F. G., Figueroa, F. L., Alarcón, F. J., Moriñigo, M. A., Abdala-Díaz, R. T. 2020. A short pulse of dietary algae boosts immune response and modulates fatty acid composition in juvenile *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Research*, 00:1–13. DOI: 10.1111/are.14781
- Gatamaneni, B. L., Orsat, V., Lefsrud, M. 2018. Factors affecting growth of various microalgal species. *Environmental Engineering Science*, 35(10), 1037-1048.
- Giffard-Mena, I., Martínez, L. 2003. Desarrollo del cultivo de camarón “tierra adentro” en el Valle de Mexicali, Baja California, México. *Panorama Acuicola*, 8,14-16.
- Gómez-Luna, L. M. 2007. Microalgas: Aspectos ecológicos y biotecnológicos. *Revista Cubana de Química*, 19(2), 3-20.
- González, F., Sáez, K., Vega, M. E., Bizama, B., Becerra, J., Lépez, I., Hernández, V. y Silva, M. 2019. Effect of nitrate and irradiance on fatty acid production in microalgae cultivated for feeding larvae and broodstock conditioning in batch culture. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 54(1), 91-106.
- González-Delgado, A., Barajas-Solano, A., Ardila-Álvarez, A. 2017. Producción de biomasa y proteínas de *Chlorella vulgaris* Beyerinck (Chlorellales: Chlorellaceae) a través del diseño de medios de cultivo selectivos. *Corporación Colombiana de Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 18 (3), 451-461.
- González-Moreno, S., Perales-Vela, H. V., Salcedo-Álvarez, M. O. 2008. La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(4), 119-129.
- Griffiths, M. J., van Hille, R. P., Harrison, S. T. 2012. Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. *Journal of Applied Phycology*, 24(5), 989-1001.
- Guedes, A., Amaro H.M., Malcata, F.X. 2011. Microalgae as sources of high added-value Compounds-A Brief Review of recent work. *Biotechnology Progress*, 27 (3), 597-61.
- Guerrero, M. G., Rodríguez, H., Vargas, M., García-González, M., Campo, J. A. D., Moreno, J., Rivas, J. 1999. Las microalgas como productoras de pigmentos con interés comercial. *Biotecnología y Aplicaciones de Microorganismos Pigmentados. Simposio Científico en Biología Celular y Molecular. La Coruña. 48, 215-232. Recuperado de: <https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/10773/CC%2048%20art%2011.pdf>*
- Guillard, R.R.L., J.H. Ryther. 1962. Studies on marine planktonic diatoms I. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology*, 8(2), 229-239.
- Gupta, N., Khare, P., Singh, D. P. 2019. Nitrogen-dependent metabolic regulation of lipid production in microalga *Scenedesmus vacuolatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 174, 706-713.

- Harrison, P. J., Thompson, P. A., Calderwood, G. S. 1990. Effects of nutrient and light limitation on the biochemical composition of phytoplankton. *Journal of Applied Phycology*, 2(1), 45-56.
- He, Q., Yang, H., Wu, L., Hu, C. 2015. Effect of light intensity on physiological changes, carbon allocation and neutral lipid accumulation in oleaginous microalgae. *Bioresource Technology*, 191, 219-228.
- Hemaiswarya, S., Raja, R., Kumar, R. R., Ganesan, V., Anbazhagan, C. 2011. Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(8), 1737-1746.
- Hodar, A. R., Vasava, R. J., Mahavadiya, D. R., Joshi, N. H. 2020. Fish meal and fish oil replacement for aqua feed formulation by using alternative sources: a review. *Journal of Experimental Zoology, India*, 23(1), 13-21.
- Hua, K., Cobcroft, J. M., Cole, A., Condon, K., Jerry, D. R., Mangott, A., Praeger, C., Vucko, M. J., Zeng, C., Zenger, K., Strugnell, J. M. 2019. The future of aquatic protein: implications for protein sources in aquaculture diets. *One Earth*, 1(3), 316-329.
- James, C. M., Al-Hinty, S., Salman, A. E. 1989. Growth and ω 3 fatty acid and amino acid composition of microalgae under different temperature regimes. *Aquaculture*, 77(4), 337-351.
- Jethani, H., Patel, P., Mudliar, S. N., Sarada, R., Chauhan, V. S. 2019. Growth and biochemical response of an indigenous oleaginous microalga *Scenedesmus obtusus* cultivated in outdoor open ponds. *Indian Journal of Experimental Biology*, 57, 40-49.
- Jiménez-Valera, S. 2016. Aislamiento y caracterización bioquímica de microalgas de Baja California como alternativas para la producción de lípidos. Tesis de Doctor en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. México. 191 pp.
- Kanzawa A. 2000. Nutrición de larvas de peces. En: Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C.J., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, L.E. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Noviembre 15-18, 1998. La Paz, Baja California Sur, México. 53-64 pp.
- Khatoon, H., Rahman, N. A., Suleiman, S. S., Banerjee, S., Abol-Munafi, A. B. 2019. Growth and proximate composition of *Scenedesmus obliquus* and *Selenastrum bibrainum* cultured in different media and condition. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 89(1), 251-257.
- Kim, J. P., Kang, C. D., Park, T. H., Kim, M. S., Sim, S. J. 2006. Enhanced hydrogen production by controlling light intensity in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* culture. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(11), 1585-1590.
- Knutsen, H. R., Ottesen, O. H., Palihawadana, A. M., Sandaa, W., Sørensen, M., Hagen, Ø. 2019. Muscle growth and changes in chemical composition of spotted wolffish juveniles (*Anarhichas minor*) fed diets with and without microalgae (*Scenedesmus obliquus*). *Aquaculture Reports*, 13, 100175.

- Kousoulaki, K., Mørkøre, T., Nengas, I., Berge, R. K., Sweetman, J. 2016. Microalgae and organic minerals enhance lipid retention efficiency and fillet quality in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 451, 47-57.
- Krauss, R. W., Thomas, W. H. 1954. The growth and inorganic nutrition of *Scenedesmus obliquus* in mass culture. *Plant Physiology*, 29(3), 205.
- Kumar, S. D., Sojin, K., Santhanam, P., Dhanalakshmi, B., Latha, S., Kim, M. K. 2020. Reciprocal response of nitrogen for enhancing growth and proximate compositions of marine microalga *Tetraselmis* sp. under low saline conditions. *Indian Journal of Geo Marine Science* 49, 326-332.
- Leal-Medina, G. I., Abril-Bonett, J. E., Martínez-Gélvez, S. J., Muñoz-Peñaloza, Y. A., Peñaranda-Lizarazo, E. M., Urbina-Suárez, N. A. 2017. Producción de ácidos grasos poliinsaturados a partir de biomasa microalgal en un cultivo heterotrófico. *Revista Ion*, 30(1), 91-103.
- Lee, S. M., Lee, J. H., Kim, K. D. 2003. Effect of dietary essential fatty acids on growth, body composition and blood chemistry of juvenile starry flounder (*Platichthys stellatus*). *Aquaculture*, 225(1-4), 269-281.
- Lengyel, P., Söll, D. 1969. Mechanism of protein biosynthesis. *Bacteriological Reviews*, 33(2), 264.
- Li, P., Gatlin III, D. M. 2003. Evaluation of brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a feed supplement for hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*). *Aquaculture*, 219(1-4), 681-692.
- Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., Lan, C. Q. 2008. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(4), 629-636.
- Lin, Q., Lin, J. 2011. Effects of nitrogen source and concentration on biomass and oil production of a *Scenedesmus rubescens* like microalga. *Bioresource Technology*, 102(2), 1615-1621.
- Liu, J., Yuan, C., Hu, G., Li, F. 2012. Effects of light intensity on the growth and lipid accumulation of microalga *Scenedesmus* sp. 11-1 under nitrogen limitation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(8), 2127-2137.
- López-Elías, J. A., González-Vega, R., Márquez-Ríos, E., Torres-Arreola, W. 2015. Efecto de la concentración y fuentes de nitrógeno en la producción de proteínas de cultivos masivos de la microalga *Chaetoceros muelleri*. *Phyton*, 84(2), 331-337.
- Lowry, O., Rosebrought, N., Farr, A., Randall, R. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biology Chemistry*, (193), 265-275.
- Malara, G., Charra, R. 1972. Dosificaciones de proteínas particulares según el método de Lowry. Universidad de París. Sation Zoologique. Villefrenche-Sur-Mer. Notes de Travail, (6) 11 pp.

- Mandal, S., Mallick, N. 2009. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(2), 281-291.
- Markou, G., Angelidaki, I., Georgakakis, D. 2012. Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(3), 631-645.
- Márquez-Reyes, L. A. 2016. Efecto de las condiciones ambientales y la adición de consumidores de oxígeno sobre el crecimiento y la producción de hidrógeno en cultivos de clorofíceas. Tesis de Doctorado en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 131 pp.
- Masojídek, J., Grobbelaar, J. U., Pechar, L., Koblížek, M. 2001. Photosystem II electron transport rates and oxygen production in natural water blooms of freshwater cyanobacteria during a diel cycle. *Journal of Plankton Research*, 23(1), 57-66.
- Masojídek, J., Koblížek, M., Torzillo, G. 2013. Photosynthesis in microalgae. En: Richmond, A y Hu, Q. *Handbook of microalgal culture: Applied Phycology and Biotechnology*. Segunda Ed. John Wiley & Sons. Australia.
- Maxwell, K., Johnson, G. 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51, 659-668.
- Millamena, O. M., Golez, N. V. 2001. Evaluation of processed meat soluble as replacement for fish meal in diet for juvenile grouper *Epinephelus coioides* (Hamilton). *Aquaculture Research*, 32, 281-287.
- Miller, R., Wu, G., Deshpande, R. R., Vieler, A., Gärtner, K., Li, X., Bullard, B. 2010. Changes in transcript abundance in *Chlamydomonas reinhardtii* following nitrogen deprivation predict diversion of metabolism. *Plant Physiology*, 154(4), 1737-1752.
- Miranda de la Maza, M. 2019. Respuesta en el crecimiento y la producción pigmentaria a cambios en las condiciones de luz y temperatura en cultivos de microalgas. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad del País Vasco. Chile. 4-7 pp.
- Morden, C. W., Sherwood, A. R. 2002. Continued evolutionary surprises among dinoflagellates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(18), 11558-11560.
- Mühlroth A, K Li, G Røkke, P Winge, Y Olsen, MF Hohmann-Marriott, O Vadstein, AM Bones. 2013. Pathways of lipid metabolism in marine algae, co-expression network, bottlenecks and candidate genes for enhanced production of EPA and DHA in species of Chromista. *Marine Drugs*, 11(11), 4662-4697.
- Muñoz-Blanco, J., Cardenas, J. 1989. Changes in glutamate dehydrogenase activity of *Chlamydomonas reinhardtii* under different trophic and stress conditions. *Plant, Cell and Environment*, 12(2), 173-182.

- Nelson, D., Cox, M. 2005. Catabolismo de los ácidos grasos. En: Nelson, D., Cox, M. Lehninger Principios de bioquímica. Edición 4ta. OMEGA. 631-656 pp.
- Ortega-Salas, A. A., Reyes-Bustamante, H. 2012. Cultivo de las microalgas dulceacuícolas *Kirchneriella obesa*, *Scenedesmus quadricauda* y *Chlorococcum infusorium* empleando tres medios de cultivo. Avances en Investigación Agropecuaria, 16(2), 35-44.
- Pacheco-Vega, J. M., Gamboa-Delgado, J., Alvarado-Ibarra, A. G., Nieto-López, M. G., Tapia-Salazar, M., Cruz-Suárez, L. E. 2018. Nutritional contribution of fish meal and microalgal biomass produced from two endemic microalgae to the growth of shrimp *Penaeus vannamei*. Latin American Journal of Aquatic Research, 46(1), 53-62.
- Pal, R., A. Gupta, A. Tripathi. 2011. Impact of environmental factors on the biomass production of *Spirulina* in different conditions. Vegetos, 24 (2), 142-148.
- Pande, S.V., R.K. Parvin., T. A. Venkitasubramanian. 1963. Microdetermination of lipids and serum total fatty acids. Analytical Biochemistry, (6), 415-423.
- Pandey, J. P., Pathak, N., Tiwari, A. 2010. Standardization of pH and light intensity for the biomass production of *Spirulina platensis*. Journal of. Algal Biomass Utilization, 1(2), 93-102.
- Parkhill, J. P., Maillet, G., Cullen, J. J. 2001. Fluorescence-based maximal quantum yield for PSII as a diagnostic of nutrient stress. Journal of Phycology, 37(4), 517-529.
- Parsons, T.R., Y. Maita, C.M. Lalli. 1984. A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis. Pergamon Press, Oxford. 173 pp.
- Pinckney, J. L. 2018. A mini-review of the contribution of benthic microalgae to the ecology of the continental shelf in the South Atlantic Bight. Estuaries and Coasts, 41(7), 2070-2078.
- Quevedo, C. O., Morales V, S. P., Acosta, A. C. 2008. *Scenedesmus* sp. growth in different culture mediums for microalgal protein production. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica, 15, 25-31. Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v15n1/v15n1a04.pdf>
- Renaud, S. M., Parry, D. L., Thinh, L. V., Kuo, C., Padovan, A., Sammy, N. 1991. Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis* sp. and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture. Journal of Applied Phycology, 3(1), 43-53.
- Richardson, K., Beardall, J., Raven, J. A. 1983. Adaptation of unicellular algae to irradiance: an analysis of strategies. New Phytologist, 93(2), 157-191.
- Rodríguez, I. P. D., Ruíz, L. C. M., Agudelo, G. A. P., Melgarejo, L. M. 2017. Medición de la fluorescencia de la clorofila a en algas encapsuladas en alginato de calcio. Acta Biológica Colombiana, 22(2), 199-208.

- Rodríguez-Hernández, A. 2018. Patrones espacio-temporales de clorofila-a de imágenes satelitales durante un florecimiento algal nocivo de *Gymnodinium catenatum* en el norte del Golfo de California en enero de 2015. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. México. 54 pp.
- Romero-Romero, C. 2015. Efecto de la absorción y de la composición espectral de la luz sobre el crecimiento y la composición proximal de *Amphora* sp. y su influencia en la preservación en frío y en la criopreservación. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 141 pp.
- Rosen, B. H., Lowe, R. L. 1984. Respuestas fisiológicas y ultraestructurales de *Cyclotella meneghiniana* (Bacillariophyta) a la intensidad de la luz y la limitación de nutrientes. *Journal of Phycology*, 20(2), 173-183.
- Salama, E. S., Kim, H. C., Abou-Shanab, R. A., Ji, M. K., Oh, Y. K., Kim, S. H., Jeon, B. H. 2013. Biomass, lipid content, and fatty acid composition of freshwater *Chlamydomonas mexicana* and *Scenedesmus obliquus* grown under salt stress. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(6), 827-833.
- Salomón-Pérez, D. M. 2015. Metodología de alto rendimiento para evaluar contenido de lípidos y producción de biomasa en microalgas. Universidad San Francisco de Quito Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales. Recuperado de: <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/5644/1/122855.pdf>
- Samkhanian, F., Najafpour, G. D., Ardestani, F. 2017. Evaluation of effective nutritional parameters for *Scenedesmus* sp. microalgae culturing in a photobioreactor for biodiesel production. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 14(5), 1037-1046.
- Sánchez-Saavedra, M.P., Voltolina, D. 2006. The growth rate, biomass production and composition of *Chaetoceros* sp. grow with different light sources. *Aquacultural Engineering*, 35(2), 161-165.
- Santos, A., González-Arechavala, Y., Martín-Sastre, C. 2014. Uso y aplicaciones potenciales de las microalgas. *Anales De Mecánica Y Electricidad*, (1), 20-28. Recuperado de: <https://www.iit.comillas.edu/docs/IIT-14-027A.pdf>
- Senger, H., Fleischhacker, P. H. 1978. Adaptation of the photosynthetic apparatus of *Scenedesmus obliquus* to strong and weak light conditions: I. Differences in pigments, photosynthetic capacity, quantum yield and dark reactions. *Physiologia Plantarum*, 43(1), 35-42.
- Sforza, E., Urbani, S., Bertuccio, A. 2015. Evaluation of maintenance energy requirements in the cultivation of *Scenedesmus obliquus*: effect of light intensity and regime. *Journal of Applied Phycology*, 27(4), 1453-1462.
- Shepherd, C. J., Jackson, A. J. 2013. Global fishmeal and fish-oil supply: inputs, outputs and markets. *Journal of Fish Biology*, 83(4), 1046-1066.
- Shifrin N.S, Chisholm S.W. 1981. Phytoplankton lipids: interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles. *Journal of Phycology*, 17, 374-384.

- Soares, J., Loterio, R. K., Rosa, R. M., Santos, M. O., Nascimento, A. G., Santos, N. T., Martins, M. A. 2018. *Scenedesmus* sp. cultivation using commercial-grade ammonium sources. *Annals of Microbiology*, 68(1), 35-45.
- Solovchenko, A. E., Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Cohen, Z., Merzlyak, M. N. 2008. Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*. *Journal of Applied Phycology*, 20(3), 245-251.
- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. En: J. Stein (Ed.) *Handbook of Phycological Methods. Culture methods and growth measurements*. University Press, Cambridge. 321-344 pp.
- South, G. R., Whittick, A. 2009. Physiology and biochemistry. En: Seymour H. Hutner. (Ed.) *An introduction to phycology*. John Wiley & Sons. 163-170 pp.
- Statsoft, 2015. StatSoft Announces Version 10 of Statistica (World wide web log), Stat soft, Tulsa. Recuperado el 01/08/19 de <http://www.statsoft.com/textbook/stathome.html>.
- Stein, J. 1973. *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge University Press, London. 448 pp.
- Suárez, A., Guevara, M., González, M., Cortez, R., Arredondo-Vega, B. 2013. Crecimiento y composición bioquímica de *Thalassiosira pseudonana* (Thalassiosirales: Thalassiosiraceae) bajo cultivo semi-continuo en diferentes medios y niveles de irradiancias. *Revista de Biología Tropical*, 61(3), 1003-1013.
- Syrett, P. J. 1981. Nitrogen metabolism of microalgae. En: Watson, J. *Canadian bulletin of fisheries and aquatic sciences. Physiological Bases of Phytoplankton Ecology*. Trevor Platt. Ottawa. 182-210 pp.
- Tan, K. W. M., Lin, H., Shen, H., Lee, Y. K. 2016. Nitrogen-induced metabolic changes and molecular determinants of carbon allocation in *Dunaliella tertiolecta*. *Scientific Reports*, 6, 37235.
- Tang, D., Han, W., Li, P., Miao, X., Zhong, J. 2011. CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. *Bioresource Technology*, 102(3), 3071-3076.
- Thomas, W. H., Krauss, R. W. 1955. Nitrogen metabolism in *Scenedesmus* as affected by environmental changes. *Plant Physiology*, 30(2), 113.
- Thompson, P. A., Guo, M., Harrison, P. J. 1993. The influence of irradiance on the biochemical composition of three phytoplankton species and their nutritional value for larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Marine Biology*, 117(2), 259-268.
- Thompson, P. A., Harrison, P. J., Whyte, J. N. 1990. Influence of irradiance on the fatty acid composition of phytoplankton 1. *Journal of Phycology*, 26(2), 278-288.

- Torres-Tiji, Y., Fields, F. J., Mayfield, S. P. 2020. Microalgae as a future food source. *Biotechnology Advances*, 41, 107536.
- Torzillo, G., Vonshak, A. 2013. Environmental stress physiology with reference to mass cultures. En: Richmond, A. y Hu, Q. (eds). *Handbook of microalgal culture*. 90-113 pp.
- Us-Vázquez, R. 2011. Efecto de la limitación de nitrógeno y fósforo en la producción de lípidos en cultivos de las microalgas verdes de *Scenedesmus obliquus* y *Scenedesmus* sp. Tesis de Maestro en Ciencias. Centro de Investigación Científica de Yucatán. 68-71 pp.
- Van Wageningen, J., Miller, T. W., Hobbs, S., Hook, P., Crowe, B., Huesemann, M. 2012. Effects of light and temperature on fatty acid production in *Nannochloropsis salina*. *Energies*, 5(3), 731-740.
- Vizcaíno, A.J., Lòpez, G., Sáez, M.I., Jiménez, J.A., Barros, A., Hidalgo, L., Camacho-Rodríguez, J., Martínez, T.F., Cerón-García, M.C., Alarcón, F.J., 2014. Effects of microalga *Scenedesmus almeriensis* as fishmeal alternative in diets for gilthead sea bream, *Sparus aurata*, juveniles. *Aquaculture* 431, 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.010>.
- Wang, L., Li, Y., Sommerfeld, M., Hu, Q. 2013. A flexible culture process for production of the green microalga *Scenedesmus dimorphus* rich in protein, carbohydrate or lipid. *Bioresource Technology*, 129, 289-295.
- Werner, C., Ryel, R. J., Correia, O., Beyschlag, W. 2001. Effects of photoinhibition on whole-plant carbon gain assessed with a photosynthesis model. *Plant, Cell and Environment*, 24, 27:40.
- White S, Anandraj A, Bux F (2011) PAM fluorometry as a tool to assess microalgal nutrient stress and monitor cellular neutral lipids. *Bioresource Technology*, 102, 1675-1682.
- Whyte, J.N.C. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture*, (60), 231-241.
- Williams, P. J. L. B., Laurens, L. M. 2010. Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. *Energy & Environmental Science*, 3(5), 554-590.
- Wiltshire, K. H., Boersma, M., Möller, A., Buhtz, H. 2000. Extraction of pigments and fatty acids from the green alga *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae). *Aquatic Ecology*, 34(2), 119-126.
- Wu, Z., Song, L., Li, R. 2008. Different tolerances and responses to low temperature and darkness between water bloom forming cyanobacterium *Microcystis* and a green alga *Scenedesmus*. *Hydrobiologia*, 596(1), 47-55.
- Yeesang, C., Cheirsilp, B. 2011. Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand. *Bioresource Technology*, 102(3), 3034-3040.
- Zar, J. H. 2010. *Biostatistical analysis*. Pearson Prentice-Hall. Upper Saddle River, New Jersey. USA.

- Zermeño-González, A., Cárdenas-Palomo, J. O., Ramírez-Rodríguez, H., Benavides-Mendoza, A., Cadena-Zapata, M., Campos-Magaña, S. G. 2015. Fertilización biológica del cultivo de maíz. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(SPE12), 2399-2408.
- Zhang, Y., Wu, H., Sun, M., Peng, Q., Li, A. 2018. Photosynthetic physiological performance and proteomic profiling of the oleaginous algae *Scenedesmus acuminatus* reveal the mechanism of lipid accumulation under low and high nitrogen supplies. *Photosynthesis Research*, 138(1), 73-102.
- Zhang, Y., Wu, H., Yuan, C., Li, T., Li, A. 2019. Growth, biochemical composition, and photosynthetic performance of *Scenedesmus acuminatus* during nitrogen starvation and resupply. *Journal of Applied Phycology*, 31(5), 2797-2809.
- Zhu, C. J., Lee, Y. K. 1997. Determination of biomass dry weight of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 9(2), 189-194.
- Zhu, C. J., Lee, Y. K. Chao. T. M. 1997. Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1. *Journal of Applied Phycology*, 9, 451-457.

Anexo 1

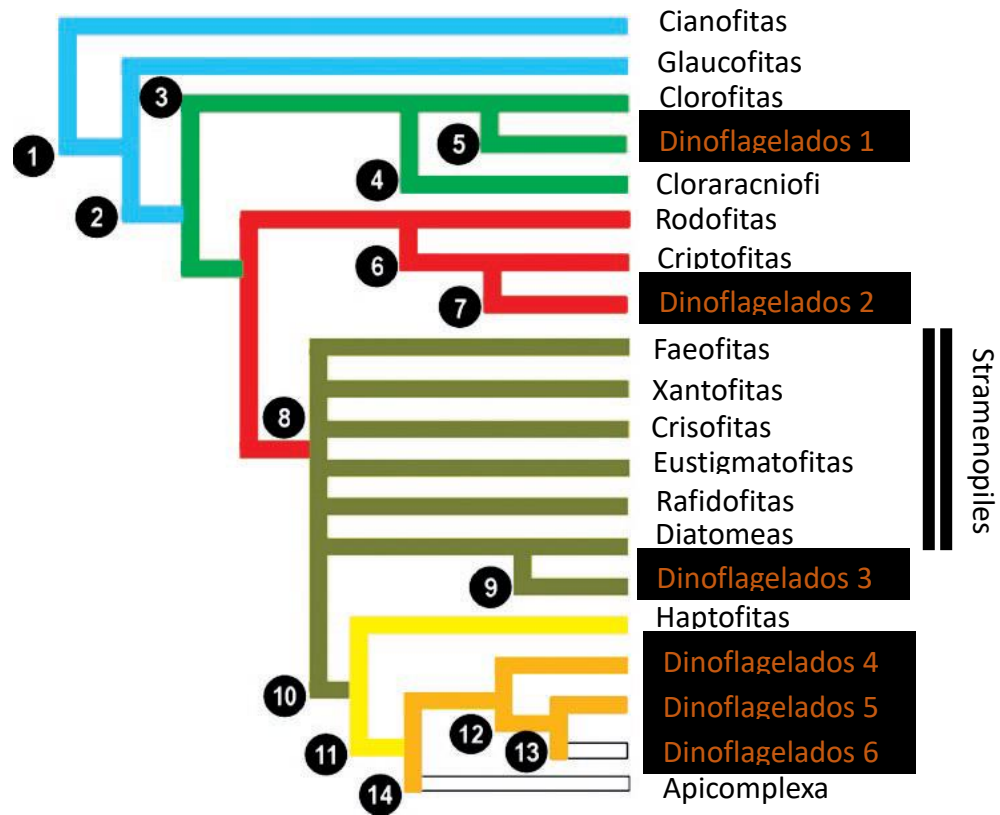


Figura 10. Relaciones evolutivas hipotéticas entre grupos de microalgas y derivaciones de varios linajes de dinoflagelados basados en posibles eventos de endosimbiosis de plástidos (Modificado de Morden y Sherwood, 2002).

Anexo 2

Efecto del aporte químico de nitrógeno y de la irradiancia

Tabla 2. Resumen del análisis de covarianza (ANCOVA) de la densidad de células de cultivos de *Scenedesmus acuminatus* mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con diferente aporte químico de nitrógeno (nitrato y amonio). Donde se muestra el valor de F y P para el tiempo de cultivo (covariable), aporte químico de nitrógeno e irradiancia, con los niveles de interacción ($P < 0.05$).

	F	P
Covariable	592.30	0.0001
Irradiancia	13.66	0.0006
Nitrógeno	0.11	0.7448
Irradiancia*Nitrógeno	1.00	0.3702

Anexo 3

Efecto del aporte químico de nitrógeno y de la irradiancia... continuación

Tabla 3. Resumen del análisis de varianza (ANOVA) de la tasa de crecimiento de cultivos de *Scenedesmus acuminatus* mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con diferente aporte químico de nitrógeno (nitrato y amonio). Donde se muestra el valor de F y P para el aporte químico de nitrógeno e irradiancia, con los niveles de interacción ($P < 0.05$).

	F	P
Nitrógeno	4.23	0.0619
Irradiancia	35.73	0.0009
Nitrógeno*Irradiancia	1.89	0.1930

Anexo 4

Efecto del aporte químico de nitrógeno y de la irradiancia... continuación

Tabla 4. Resumen del análisis de varianza (ANOVA) del tiempo de generación de cultivos de *Scenedesmus acuminatus* mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con diferente aporte químico de nitrógeno (nitrato y amonio). Donde se muestra el valor de F y P para el aporte químico de nitrógeno e irradiancia, con los niveles de interacción ($P < 0.05$).

	F	P
Nitrógeno	5.21	0.0413
Irradiancia	39.46	0.0005
Nitrógeno*Irradiancia	2.37	0.1348

Anexo 5

Efecto del aporte químico de nitrógeno y de la irradiancia... continuación

Tabla 5. Resumen del análisis de varianza (ANOVA) del largo de células en cultivos de *Scenedesmus acuminatus* mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con diferente aporte químico de nitrógeno (nitrato y amonio). Donde se muestra el valor de F y P para la fase de crecimiento, el aporte químico de nitrógeno e irradiancia, con los niveles de interacción ($P < 0.05$).

	F	P
Fase	13.76	0.0010
Nitrógeno	6.89	0.0147
Irradiancia	0.66	0.5239
Fase*Nitrógeno	0.93	0.3428
Fase*Irradiancia	0.37	0.6894
Nitrógeno*Irradiancia	0.16	0.8487
Fase*Nitrógeno*Irradiancia	0.21	0.8047

Anexo 6

Efecto del aporte químico de nitrógeno y de la irradiancia... continuación

Tabla 6. Resumen del análisis de varianza (ANOVA) del ancho de células en cultivos de *Scenedesmus acuminatus* mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con diferente aporte químico de nitrógeno (nitrato y amonio). Donde se muestra el valor de F y P para la fase de crecimiento, el aporte químico de nitrógeno e irradiancia, con los niveles de interacción ($P < 0.05$).

	F	P
Fase	138.95	0.0001
Nitrógeno	0.02	0.8712
Irradiancia	21.94	0.0004
Fase*Nitrógeno	1.64	0.2124
Fase*Irradiancia	11.64	0.0002
Nitrógeno*Irradiancia	4.95	0.0157
Fase*Nitrógeno*Irradiancia	0.38	0.6853

Anexo 7

Peso seco total

Tabla 7. Resumen del análisis de varianza (ANOVA) del peso seco total en cultivos de *Scenedesmus acuminatus* mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con diferente aporte químico de nitrógeno (nitrato y amonio). Donde se muestra el valor de F y P para la fase de crecimiento, el aporte químico de nitrógeno e irradiancia, con los niveles de interacción ($P < 0.05$).

	F	P
Fase	532.47	0.0001
Nitrógeno	209.55	0.0001
Irradiancia	15.13	0.0005
Fase*Nitrógeno	23.31	0.0006
Fase*Irradiancia	3.13	0.0617
Nitrógeno*Irradiancia	10.19	0.0006
Fase*Nitrógeno*Irradiancia	6.08	0.0072

Anexo 8

Peso orgánico

Tabla 8. Resumen del análisis de varianza (ANOVA) del peso orgánico en cultivos de *Scenedesmus acuminatus* mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con diferente aporte químico de nitrógeno (nitrato y amonio). Donde se muestra el valor de F y P para la fase de crecimiento, el aporte químico de nitrógeno e irradiancia, con los niveles de interacción ($P < 0.05$).

	F	P
Fase	1182.27	0.0001
Nitrógeno	130.62	0.0001
Irradiancia	40.87	0.0001
Fase*Nitrógeno	0.73	0.3997
Fase*Irradiancia	1.20	0.3172
Nitrógeno*Irradiancia	8.08	0.0020
Fase*Nitrógeno*Irradiancia	4.59	0.0205

Anexo 9

Peso de cenizas

Tabla 9. Resumen del análisis de varianza (ANOVA) de cenizas en cultivos de *Scenedesmus acuminatus* mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con diferente aporte químico de nitrógeno (nitrato y amonio). Donde se muestra el valor de F y P para la fase de crecimiento, el aporte químico de nitrógeno e irradiancia, con los niveles de interacción ($P < 0.05$).

	F	P
Fase	81.14	0.0001
Nitrógeno	144.33	0.0001
Irradiancia	1.34	0.2790
Fase*Nitrógeno	34.35	0.0005
Fase*Irradiancia	3.37	0.0512
Nitrógeno*Irradiancia	6.73	0.0047
Fase*Nitrógeno*Irradiancia	3.78	0.0372

Anexo 10

Composición proximal

Tabla 10. Resumen del análisis de varianza (ANOVA) de proteínas en cultivos de *Scenedesmus acuminatus* mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con diferente aporte químico de nitrógeno (nitrato y amonio). Donde se muestra el valor de F y P para la fase de crecimiento, el aporte químico de nitrógeno e irradiancia, con los niveles de interacción ($P < 0.05$).

	F	P
Fase	13.38	0.0012
Nitrógeno	14.79	0.0001
Irradiancia	20.19	0.0007
Fase*Nitrógeno	48.49	0.0001
Fase*Irradiancia	3.14	0.0614
Nitrógeno*Irradiancia	4.01	0.0314
Fase*Nitrógeno*Irradiancia	0.29	0.7475

Anexo 11

Composición proximal... continuación

Tabla 11. Resumen del análisis de varianza (ANOVA) de lípidos en cultivos de *Scenedesmus acuminatus* mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con diferente aporte químico de nitrógeno (nitrato y amonio). Donde se muestra el valor de F y P para la fase de crecimiento, el aporte químico de nitrógeno e irradiancia, con los niveles de interacción ($P < 0.05$).

	F	P
Fase	1.25	0.2732
Nitrógeno	85.11	0.0001
Irradiancia	16.80	0.0002
Fase*Nitrógeno	17.96	0.0002
Fase*Irradiancia	26.81	0.0001
Nitrógeno*Irradiancia	4.10	0.0292
Fase*Nitrógeno*Irradiancia	0.65	0.5270

Anexo 12

Composición proximal... continuación

Tabla 12. Resumen del análisis de varianza (ANOVA) de carbohidratos en cultivos de *Scenedesmus acuminatus* mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con diferente aporte químico de nitrógeno (nitrato y amonio). Donde se muestra el valor de F y P para la fase de crecimiento, el aporte químico de nitrógeno e irradiancia, con los niveles de interacción ($P < 0.05$).

	F	P
Fase	0.69	0.4145
Nitrógeno	0.85	0.3658
Irradiancia	99.44	0.0001
Fase*Nitrógeno	3.00	0.0960
Fase*Irradiancia	11.22	0.0003
Nitrógeno*Irradiancia	17.31	0.0002
Fase*Nitrógeno*Irradiancia	0.46	0.6351

Anexo 13

Pigmentos

Tabla 13. Resumen del análisis de varianza (ANOVA) de clorofila *a* en cultivos de *Scenedesmus acuminatus* mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con diferente aporte químico de nitrógeno (nitrato y amonio). Donde se muestra el valor de F y P para la fase de crecimiento, el aporte químico de nitrógeno e irradiancia, con los niveles de interacción ($P < 0.05$).

	F	P
Fase	241.77	0.0001
Nitrógeno	1.47	0.2371
Irradiancia	3.40	0.0507
Fase*Nitrógeno	2.04	0.1657
Fase*Irradiancia	5.80	0.0087
Nitrógeno*Irradiancia	8.94	0.0012
Fase*Nitrógeno*Irradiancia	8.16	0.0019

Anexo 14

Pigmentos... continuación

Tabla 14. Resumen del análisis de varianza (ANOVA) de clorofila *b* en cultivos de *Scenedesmus acuminatus* mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con diferente aporte químico de nitrógeno (nitrato y amonio). Donde se muestra el valor de *F* y *P* para la fase de crecimiento, el aporte químico de nitrógeno e irradiancia, con los niveles de interacción ($P < 0.05$).

	F	P
Fase	51.99	0.0001
Nitrógeno	24.74	0.0004
Irradiancia	2.63	0.0920
Fase*Nitrógeno	0.02	0.8794
Fase*Irradiancia	3.95	0.0327
Nitrógeno*Irradiancia	13.97	0.0009
Fase*Nitrógeno*Irradiancia	6.65	0.0050

Anexo 15

Pigmentos... continuación

Tabla 15. Resumen del análisis de varianza (ANOVA) de clorofila *c* en cultivos de *Scenedesmus acuminatus* mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con diferente aporte químico de nitrógeno (nitrato y amonio). Donde se muestra el valor de *F* y *P* para la fase de crecimiento, el aporte químico de nitrógeno e irradiancia, con los niveles de interacción ($P < 0.05$).

	F	P
Fase	4.35	0.0477
Nitrógeno	82.29	0.0001
Irradiancia	96.49	0.0001
Fase*Nitrógeno	51.16	0.0001
Fase*Irradiancia	0.80	0.4599
Nitrógeno*Irradiancia	96.17	0.0001
Fase*Nitrógeno*Irradiancia	3.91	0.0337

Anexo 16

Pigmentos... continuación

Tabla 16. Resumen del análisis de varianza (ANOVA) de carotenos en cultivos de *Scenedesmus acuminatus* mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con diferente aporte químico de nitrógeno (nitrato y amonio). Donde se muestra el valor de F y P para la fase de crecimiento, el aporte químico de nitrógeno e irradiancia, con los niveles de interacción ($P < 0.05$).

	F	P
Fase	138.18	0.0001
Nitrógeno	0.49	0.4876
Irradiancia	18.25	0.0001
Fase*Nitrógeno	21.70	0.0009
Fase*Irradiancia	13.28	0.0001
Nitrógeno*Irradiancia	2.52	0.1008
Fase*Nitrógeno*Irradiancia	11.36	0.0003

Anexo 17

Fotosíntesis

Tabla 17. Resumen del análisis de varianza (ANOVA) de la eficiencia fotosintética (α) en cultivos de *Scenedesmus acuminatus* mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con diferente aporte químico de nitrógeno (nitrato y amonio). Donde se muestra el valor de F y P para la fase de crecimiento, el aporte químico de nitrógeno e irradiancia, con los niveles de interacción ($P < 0.05$).

	F	P
Fase	0.02	0.9648
Nitrógeno	8.90	0.0064
Irradiancia	35.22	0.0001
Fase*Nitrógeno	1.90	0.1800
Fase*Irradiancia	1.33	0.2819
Nitrógeno*Irradiancia	7.14	0.0036
Fase*Nitrógeno*Irradiancia	6.70	0.0048

Anexo 18

Fotosíntesis... continuación

Tabla 18. Resumen del análisis de varianza (ANOVA) del índice de saturación (I_k) en cultivos de *Scenedesmus acuminatus* mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con diferente aporte químico de nitrógeno (nitrato y amonio). Donde se muestra el valor de F y P para la fase de crecimiento, el aporte químico de nitrógeno e irradiancia, con los niveles de interacción ($P < 0.05$).

	F	P
Fase	0.06	0.7964
Nitrógeno	7.50	0.0114
Irradiancia	6.18	0.0068
Fase*Nitrógeno	6.12	0.0208
Fase*Irradiancia	2.11	0.1422
Nitrógeno*Irradiancia	2.62	0.0929
Fase*Nitrógeno*Irradiancia	0.82	0.4494

Anexo 19

Fotosíntesis... continuación

Tabla 19. Resumen del análisis de varianza (ANOVA) de la eficiencia cuántica (Fv/Fm) en cultivos de *Scenedesmus acuminatus* mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con diferente aporte químico de nitrógeno (nitrato y amonio). Donde se muestra el valor de F y P para la fase de crecimiento, el aporte químico de nitrógeno e irradiancia, con los niveles de interacción ($P < 0.05$).

	F	P
Fase	8.11	0.0088
Nitrógeno	2.14	0.1563
Irradiancia	0.86	0.4325
Fase*Nitrógeno	0.27	0.6038
Fase*Irradiancia	2.49	0.1032
Nitrógeno*Irradiancia	5.82	0.0086
Fase*Nitrógeno*Irradiancia	0.02	0.9739

Anexo 20

Fotosíntesis... continuación

Tabla 20. Resumen del análisis de varianza (ANOVA) de la tasa máxima de transporte de electrones (ETR_{max}) en cultivos de *Scenedesmus acuminatus* mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con diferente aporte químico de nitrógeno (nitrato y amonio). Donde se muestra el valor de F y P para la fase de crecimiento, el aporte químico de nitrógeno e irradiancia, con los niveles de interacción ($P < 0.05$).

	F	P
Fase	0.86	0.3619
Nitrógeno	17.66	0.0001
Irradiancia	22.61	0.0001
Fase*Nitrógeno	4.52	0.0437
Fase*Irradiancia	2.39	0.1126
Nitrógeno*Irradiancia	6.15	0.0069
Fase*Nitrógeno*Irradiancia	4.63	0.0198