

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



**Maestría en Ciencias
en Acuicultura**

**Efecto de la irradiancia en la composición bioquímica de las
diatomeas *Amphora helenensis* y *Nitzschia thermalis* f. *curta***

Tesis

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

Presenta:

Brianda Andrade Moreno

Ensenada, Baja California, México
2021

Tesis presentada por
Brianda Andrade Moreno

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Directora 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

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Director de Estudios de Posgrado

Brianda Andrade Moreno © 2021

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

Resumen del avance de la tesis que presenta **Brianda Andrade Moreno** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

Efecto de la irradiancia en la composición bioquímica de las diatomeas *Amphora helenensis* y *Nitzschia thermalis* f. *curta*

Resumen aprobado por:

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Directora de tesis

En las microalgas, la alteración de factores ambientales como la irradiancia influye en el proceso de la fotosíntesis, modifica el crecimiento y metabolismo de las células y produce cambio en la composición bioquímica. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la irradiancia en el crecimiento y la composición bioquímica de las diatomeas *Nitzschia thermalis* f. *curta* y *Amphora helenensis*. Se realizaron cultivos monoespecíficos de cada especie de diatomea y se mantuvieron por triplicado con cinco niveles de irradiancia (50, 100, 150, 200 y 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Durante la fase exponencial y estacionaria, se evaluó el crecimiento, la composición bioquímica a través de métodos espectrofotométricos, la actividad fotosintética por fluorescencia de la clorofila y la composición de ácidos grasos por cromatografía de gases. En *N. thermalis* f. *curta* la tasa de crecimiento incrementó en los mayores valores de irradiancias y durante la fase exponencial aumentó el peso orgánico. Para *N. thermalis* f. *curta* la irradiancia de 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ produjo los mayores contenidos de proteínas en la fase estacionaria, mientras que los mayores contenidos de los carbohidratos y lípidos se presentaron durante la fase exponencial. El contenido de clorofila *a* y *c* de *N. thermalis* f. *curta* incrementaron en las bajas irradiancias en la fase estacionaria, mientras que el contenido de carotenos aumentó con las altas irradiancias en la fase estacionaria. Para *N. thermalis* f. *curta* los mayores valores de la eficiencia fotosintética (α) se encontraron en la irradiancia de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, para el índice de saturación lumínica (I_k) en 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y para la tasa máxima de transporte de electrones (ETR_{max}) en 200 y 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) para *N. thermalis* f. *curta* el ácido graso más abundante fue el ácido eicosapentaenoico (EPA) que incrementó su contenido en la fase estacionaria, sin embargo, no hubo diferencias por efecto de la irradiancia. Para *A. helenensis* los bajos valores de irradiancia incrementaron la densidad celular y la tasa de crecimiento, sin embargo, el peso seco orgánico no se modificó por efecto de la irradiancia, pero si se incrementó en la fase estacionaria. En *A. helenensis* en la fase estacionaria se incrementó el contenido de proteínas en irradiancias de 50 y 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mientras que el contenido de carbohidratos aumentó en la irradiancia de 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la fase exponencial y el contenido de lípidos se incrementó en la irradiancia de 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la fase exponencial. Para *A. helenensis* el contenido de clorofila *a* y de carotenos se incrementaron en las bajas irradiancias en la fase estacionaria. Para *A. helenensis* los valores mayores de α se presentaron en la fase exponencial en la irradiancia de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, para I_k de 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y para ETR_{max} de 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. El mayor contenido de PUFAs en *A. helenensis* se presentó con el EPA, que fue mayor en la fase exponencial y no se presentaron diferencias debido a la irradiancia. En conclusión, el crecimiento, la composición proximal, los pigmentos y los parámetros fotosintéticos de *Nitzschia thermalis* f. *curta* y *Amphora helenensis* se modifican por efecto de la irradiancia y por la fase de crecimiento, con una interacción entre ambos factores; mientras que los ácidos grasos poliinsaturados de mayor importancia en la nutrición acuícola se modifican principalmente debido a la fase de crecimiento.

Palabras clave: Diatomeas, ácidos grasos poliinsaturados, crecimiento, composición proximal, fotosíntesis, pigmentos.

Abstract of the thesis presented by **Brianda Andrade Moreno** as a partial requirement to obtain the Master in Science degree in Aquaculture.

Effect of irradiance on the biochemical composition of diatoms *Amphora helenensis* and *Nitzschia thermalis f. curta*

Abstract approved by:

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra

Thesis director

In microalgae, the alteration of environmental factors such as irradiance influences the photosynthesis process, modify the growth and metabolism of cells and changes the biochemical composition. this research had the objective of evaluating the effect of irradiance on the growth and biochemical composition of the diatoms *Nitzschia thermalis f. curta* and *Amphora helenensis*. Monospecific cultures of each diatom species were maintained in triplicate within five irradiance levels (50, 100, 150, 200, and 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). During the exponential and stationary growth phase, the biochemical composition was evaluated through spectrophotometric methods, photosynthetic activity by fluorescence of chlorophyll, and fatty acid composition by gas chromatography. In *N. thermalis f. curta*, the higher irradiances levels increased the growth rate and, in the exponential phase, the organic weight increase. For *N. thermalis f. curta* the irradiance of 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ produced the highest protein contents in the stationary growth phase, while carbohydrates and lipids contents were higher at the exponential growth phase. The chlorophyll a and c contents of *N. thermalis f. curta* increased in the low irradiances in the stationary growth phase, while the carotene content increased with the high irradiances in the stationary growth phase. For *N. thermalis f. curta* the highest photosynthetic efficiency (α) values were in the in 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, for light saturation index (I_k) in 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, and for maximum electron transport rate (ETRmax) in 200 and 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. In polyunsaturated fatty acids (PUFAs) for *N. thermalis f. curta* the most abundant fatty acid was eicosapentaenoic acid (EPA), which increased its content in the stationary growth phase; however, no differences were obtained due to the effect of irradiance. For *A. helenensis*, the low irradiance values increased the cell density and the growth rate; however, the organic dry weight did not change due to the irradiance level used, but it did increase in the stationary growth phase. In *A. helenensis*, at the stationary growth phase produced an increase in proteins content at 50 and 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; while carbohydrates content increased at 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at exponential growth phase, and the lipids content increased at irradiance levels of 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in the exponential growth phase. For *A. helenensis*, the content of chlorophyll a and carotenes increased at low irradiances in the stationary growth phase. For *A. helenensis* the highest values of α were obtained in the exponential growth phase at 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, for I_k at 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, and ETRmax were in 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The highest PUFAs content in *A. helenensis* was presented in the EPA, which was higher in the exponential phase, and without differences due to the irradiance level. In conclusion, the growth, proximal composition, pigments, and photosynthetic parameters of *Nitzschia thermalis f. curta* and *Amphora helenensis* are modified by the effect of irradiance level and by the growth phase, with an interaction between both factors; the most important polyunsaturated fatty acids in aquaculture nutrition are modified mainly due to the growth phase.

Keywords: Diatoms, polyunsaturated fatty acids, growth, proximal composition, photosynthesis, pigments.

A mi familia, con mucho amor

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 con la matrícula 19214456.

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 el folio 27371.

Al apoyo económico para la adquisición de materiales y reactivos para la realización de esta tesis, por medio de obtenidos a partir de las cuentas de los proyectos con recursos fiscales 623108 y 623115.

A la Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra por aceptarme como estudiante y hacerme parte de su equipo de trabajo, por el apoyo y conocimientos brindados en cada etapa del posgrado, por alentarme en los momentos difíciles y creer en mí.

A la Dra. Carmen Paniagua Chávez por ser una gran profesora y por aceptar ser parte de mi comité de tesis. Por sus observaciones y correcciones tan acertadas en clase y en la tesis y sus consejos para mejorar este trabajo de investigación.

Al Dr. Rodrigo Méndez Alonzo por ser un excelente profesor y ser parte del sínodo de esta tesis. Por sus siempre acertadas observaciones y sus consejos, por sus ideas para mejorar el diseño experimental y las presentaciones y por todos los conocimientos brindados en clase y en el trabajo de investigación.

A la M. en C. Fátima Y. Castro Ochoa por apoyarme en todo momento en el laboratorio, por enseñarme todo lo relacionado al uso de equipos y técnicas. Por asesorarme en el análisis de datos y en la utilización de los softwares requeridos. Por ser tan servicial y paciente, por los consejos brindados y por todos los gratos momentos compartidos en las largas jornadas de trabajo. Sin tu ayuda el proceso hubiera sido mucho más complicado, por eso, mil gracias.

A la Dra. Ceres Anabel Molina Cárdenas por el apoyo brindado en mi estancia en el laboratorio. Por ser tan amable y siempre estar dispuesta a ayudarme. Por su apoyo en la utilización de softwares y en el análisis de datos y por ayudarme a tomar las fotografías para la tesis.

Al Dr. David Siqueiros Beltrones del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR) por su ayuda en la identificación de las especies de las microalgas utilizadas para esta investigación.

A mis compañeros de laboratorio Juan Carlos Ayala y Eugenio García por su ayuda en los experimentos. Al Dr. Armando Mendoza por compartirme literatura útil para este trabajo de investigación.

A mí querida amiga y compañera Erika Castro, por todo su apoyo y cariño, por estar siempre presente en los momentos difíciles y motivarme en los días tristes, por escucharme y creer en mí. A Lorena Garnica, por ser mi equipo de trabajo y por su amistad, por todas las tardes de retas de ping pong, las horas de trabajo y estudio en la biblioteca y por las interminables pláticas en la hora del desayuno en la cafetería.

A todas las personas que fueron parte de este proceso tan complicado, pero al mismo tiempo tan enriquecedor. A todos los compañeros y amigos que conocí en CICESE o gracias a mi estancia en esta maravillosa institución. Siempre estaré agradecida con la vida por haberlos puesto en mi camino.

Tabla de contenido

| | pagina |
|---|-----------|
| Resumen en español..... | i |
| Resumen en inglés..... | ii |
| Dedicatorias..... | iii |
| Agradecimientos..... | iv |
| Lista de figuras..... | viii |
| Lista de tablas..... | xi |
| Capítulo 1. Introducción..... | 1 |
| 1.1 Antecedentes..... | 2 |
| 1.1.1 Factores que intervienen en composición bioquímica de microalgas..... | |
| 1.1.2 Cambios en la composición bioquímica de las microalgas inducidos por la irradiancia..... | 5 |
| 1.1.3 Efecto de la composición espectral en el cultivo de microalgas..... | 7 |
| 1.1.4 Características de componentes bioquímicos de las microalgas..... | 7 |
| 1.1.5 Alternativas de producción de lípidos..... | 9 |
| 1.1.6 Importancia de diatomeas en nutrición acuícola | 10 |
| 1.1.7 Requerimientos de componentes bioquímicos en acuicultura | 11 |
| 1.1.8 Características de <i>Amphora helenensis</i> y <i>Nitzschia thermalis</i> f. <i>curta</i> | 12 |
| 1.2 Justificación..... | 14 |
| 1.3 Hipótesis..... | 15 |
| 1.4 Objetivos..... | 16 |
| 1.4.1 Objetivo general..... | 16 |
| 1.4.2 Objetivos específicos..... | 16 |
| Capítulo 2. Metodología..... | 17 |
| 2.1 Origen de las cepas..... | 17 |
| 2.2 Mantenimiento de los cultivos..... | 17 |
| 2.3 Caracterización de la curva de crecimiento..... | 17 |
| 2.4 Efecto de la irradiancia sobre crecimiento y composición bioquímica..... | 18 |
| 2.5 Crecimiento poblacional..... | 18 |
| 2.5.1 Tasa específica de crecimiento..... | 19 |
| 2.5.2 Tiempo de duplicación de las células..... | 19 |
| 2.5.3 Medición de tamaño de las células..... | 19 |
| 2.6 Composición proximal..... | 20 |

| | |
|--|-----------|
| 2.6.1 Proteínas..... | 20 |
| 2.6.2 Carbohidratos..... | 20 |
| 2.6.3 Lípidos..... | 20 |
| 2.6.4 Peso seco y contenido de cenizas..... | 21 |
| 2.7 Pigmentos..... | 21 |
| 2.8 Eficiencia lumínica de la fotosíntesis..... | 21 |
| 2.9 Perfil de ácidos grasos..... | 22 |
| 2.10 Análisis estadístico..... | 22 |
| Capítulo 3. Resultados..... | 24 |
| 3.1 Efecto de la irradiancia en el crecimiento y tamaño celular..... | 24 |
| 3.2 Peso seco, contenido de cenizas y peso seco orgánico..... | 31 |
| 3.3 Composición proximal | 32 |
| 3.4 Pigmentos..... | 39 |
| 3.5 Eficiencia lumínica de la fotosíntesis..... | 43 |
| 3.6 Ácidos grasos..... | 48 |
| Capítulo 4. Discusión..... | 53 |
| 4.1 Crecimiento y tamaño celular | 53 |
| 4.2 Peso seco, contenido de cenizas y peso seco orgánico..... | 55 |
| 4.3 Composición proximal..... | 56 |
| 4.4 Pigmentos..... | 59 |
| 4.5 Eficiencia lumínica de la fotosíntesis..... | 61 |
| 4.6 Ácidos grasos | 63 |
| Capítulo 5. Conclusiones..... | 68 |
| Recomendaciones..... | 70 |
| Literatura citada..... | 71 |
| Anexos..... | 81 |

Lista de figuras

| Figura | Página |
|---|--------|
| 1 Valores promedio y desviación estándar de la densidad celular (Cél mL ⁻¹ x10 ⁶) de cultivos de <i>Nitzschia thermalis</i> f. <i>curta</i> mantenidos en irradiancias de 50 (■), 100 (●), 150 (▲), 200 (▼) y 250 (◆) μmol m ⁻² s ⁻¹ . ANCOVA de dos vías y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey, α=0.05 (efecto de irradiancia: a>b>c>d)..... | 24 |
| 2 Valores promedio y desviación estándar de la densidad celular (Cél mL ⁻¹ x10 ⁶) de cultivos de <i>Amphora helenensis</i> mantenidos en irradiancia de 50 (■), 100 (●), 150 (▲), 200 (▼) y 250 (◆) μmol m ⁻² s ⁻¹ . ANCOVA de dos vías y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey α=0.05 (efecto de irradiancia: a>b>c>d)..... | 25 |
| 3 Valores promedio y desviación estándar de la densidad óptica (680 nm) y pH de cultivos de <i>Nitzschia thermalis</i> f. <i>curta</i> mantenidos en irradiancias de 50 (■), 100 (●), 150 (▲), 200 (▼) y 250 (◆) μmol m ⁻² s ⁻¹ | 26 |
| 4 Valores promedio y desviación estándar de la densidad óptica (680 nm) y pH de cultivos de <i>Amphora helenensis</i> mantenidos en irradiancias de 50 (■), 100 (●), 150 (▲), 200 (▼) y 250 (◆) μmol m ⁻² s ⁻¹ | 12 |
| 5 Valores promedio y desviación estándar de la tasa de crecimiento (divisiones día ⁻¹) y el tiempo de generación (días) durante la fase exponencial de cultivos de <i>Nitzschia thermalis</i> f. <i>curta</i> mantenidos en irradiancias de 50, 100, 150, 200 y 250 μmol m ⁻² s ⁻¹ . Análisis de varianza de una vía y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey, α=0.05. Letras distintas indican diferencias significativas por efecto de la irradiancia (a>b)..... | 27 |
| 6 Valores promedio y desviación estándar de la tasa de crecimiento (divisiones día ⁻¹) y el tiempo de generación (días) durante la fase exponencial de cultivos de <i>Amphora helenensis</i> mantenidos en irradiancias de 50, 100, 150, 200 y 250 μmol m ⁻² s ⁻¹ . Análisis de varianza de una vía y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey, α=0.05. Letras distintas indican diferencias significativas por efecto de la irradiancia (a>b)..... | 28 |
| 7 Valores promedio y desviación estándar del largo y ancho de las células (μm) de cultivos de <i>Nitzschia thermalis</i> f. <i>curta</i> mantenidos en irradiancias de 50, 100, 150, 200 y 250 μmol m ⁻² s ⁻¹ durante la fase exponencial y estacionaria del crecimiento..... | 29 |
| 8 Valores promedio y desviación estándar del largo y ancho de las células (μm) de cultivos de <i>Amphora helenensis</i> mantenidos en irradiancias de 50, 100, 150, 200 y 250 μmol m ⁻² s ⁻¹ durante la fase exponencial y estacionaria del crecimiento..... | 30 |
| 9 Valores promedio y desviación estándar de peso seco total, peso de cenizas y peso orgánico de cultivos de <i>Nitzschia thermalis</i> f. <i>curta</i> mantenidos en irradiancias de 50, 100, 150, 200 y 250 μmol m ⁻² s ⁻¹ durante la fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey, α=0.05. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas por efecto de la irradiancia (a>b>c>d>e). Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas por efecto de la fase de crecimiento (A>B)..... | 32 |

- 10 Valores promedio y desviación estándar de peso seco total, peso de cenizas y peso seco orgánico de cultivos de *Amphora helenensis* mantenidos en irradiancias de 50, 100, 150, 200 y 250 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante la fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey, $\alpha=0.05$. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas por efecto de la irradiancia. Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas por efecto de la fase de crecimiento (A>B)..... 34
- 11 Valores promedio y desviación estándar del contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos (%) de cultivos de *Nitzschia thermalis* f. *curta* mantenidos en irradiancias de 50, 100, 150, 200 y 250 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante la fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey, $\alpha=0.05$. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas por efecto de la irradiancia (a>b>c>d>e>f). Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas por efecto de la fase de crecimiento (A>B)..... 36
- 12 Valores promedio y desviación estándar del contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos (%) de cultivos de *Amphora helenensis* mantenidos en irradiancias de 50, 100, 150, 200 y 250 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante la fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey, $\alpha=0.05$. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas por efecto de la irradiancia (a>b>c>d). Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas por efecto de la fase de crecimiento (A>B)..... 38
- 13 Valores promedio y desviación estándar del contenido de clorofila *a*, clorofila *c* y carotenos de cultivos de *Nitzschia thermalis* f. *curta* mantenidos en irradiancias de 50, 100, 150, 200 y 250 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante la fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey, $\alpha=0.05$. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas por efecto de la irradiancia (a>b>c>d>e). Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas por efecto de la fase de crecimiento (A>B)..... 40
- 14 Valores promedio y desviación estándar del contenido de clorofila *a*, clorofila *c* y carotenos de cultivos de *Amphora helenensis* mantenidos en irradiancias de 50, 100, 150, 200 y 250 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante la fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey, $\alpha=0.05$. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas por efecto de la irradiancia (a>b>c>d>e>f>h). Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas por efecto de la fase de crecimiento (A>B)..... 42
- 15 Valores promedio y desviación estándar de parámetros fotosintéticos de la fase exponencial y estacionaria de cultivos de *Nitzschia thermalis* f. *curta* mantenidos a diferentes niveles de irradiancia (50, 100, 150, 200 y 250 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$). Eficiencia fotosintética (α : $\mu\text{mol m}^{-3}\text{h}^{-1}$); índice de saturación lumínica (I_k : $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$); eficiencia cuántica (Fv/Fm); tasa máxima de transporte de electrones (ETR_{max}). Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey, $\alpha=0.05$. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas por efecto de la irradiancia (a>b>c>d>e>f). Números distintos indican diferencias significativas por efecto de la fase de crecimiento (1>2) Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas por efecto de la fase de crecimiento (A>B)..... 44

- 16 Valores promedio y desviación estándar de la tasa de transporte de electrones (ETR) de la fase exponencial y estacionaria de cultivos de *Nitzschia thermalis* f. *curta* mantenidos a diferentes niveles de irradiancia (50, 100, 150, 200 y 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Análisis de covarianza y prueba *a posteriori* de Tukey, $\alpha=0.05$. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas por efecto de la irradiancia ($a>b$)..... 45
- 17 Valores promedio y desviación estándar de parámetros fotosintéticos de la fase exponencial y estacionaria de cultivos de *Amphora helenensis* mantenidos a diferentes niveles de irradiancia (50, 100, 150, 200 y 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$). Eficiencia fotosintética (α : $\mu\text{mol m}^{-3} \text{h}^{-1}$); índice de saturación lumínica (I_k : $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$); eficiencia cuántica (F_v/F_m); tasa máxima de transporte de electrones (ETR_{max}). Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey, $\alpha=0.05$. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas por efecto de la irradiancia ($a>b>c>d>e>f$). Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas por efecto de la fase de crecimiento ($A>B$)..... 47
- 18 Valores promedio y desviación estándar de la tasa de transporte de electrones (ETR) de la fase exponencial y estacionaria de cultivos de *Amphora helenensis* mantenidos a diferentes niveles de irradiancia (50, 100, 150, 200 y 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$). Análisis de covarianza y prueba *a posteriori* de Tukey, $\alpha=0.05$. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas por efecto de la irradiancia ($a>b$)..... 48

Lista de tablas

| Figura | Página | |
|--------|---|----|
| 1 | Porcentaje del total de ácidos grasos identificados en cultivos de <i>Nitzschia thermalis</i> f. <i>curta</i> con cinco niveles de irradiancia (50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en la fase exponencial y estacionaria. Dónde: nd= no detectado. ΣSFA = sumatoria de ácidos grasos saturados. ΣMUFA =sumatoria de ácidos grasos monoinsaturados. ΣPUFA =sumatoria de ácidos grasos poliinsaturados. Prueba de Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas por efecto de irradiancia (a>b). Letras mayúsculas diferentes en superíndice indican diferencias significativas por efecto de fase de crecimiento (A>B)..... | 50 |
| 2 | Porcentaje del total de ácidos grasos identificados en cultivos de <i>Amphora helenensis</i> con cinco niveles de irradiancia (50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en la fase exponencial y estacionaria. Dónde: nd= no detectado. ΣSFA = sumatoria de ácidos grasos saturados. ΣMUFA =sumatoria de ácidos grasos monoinsaturados. ΣPUFA =sumatoria de ácidos grasos poliinsaturados. Prueba de Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$. Letras minúsculas diferentes en superíndice indican diferencias significativas por efecto de irradiancia (a>b). Letras mayúsculas diferentes en superíndice indican diferencias significativas por efecto de fase de crecimiento (A>B)..... | 52 |
| 3 | Resumen del análisis Prueba de Kruskal-Wallis de la del contenido de ácidos grasos de <i>Nitzschia thermalis</i> f. <i>curta</i> mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100, 150, 200 y 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, en la fase exponencial y estacionaria. Donde se muestra el valor de P para la fase de crecimiento e irradiancia..... | 81 |
| 4 | Resumen del análisis Prueba de Kruskal-Wallis de la del contenido de ácidos grasos de <i>Amphora helenensis</i> mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100, 150, 200 y 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, en la fase exponencial y estacionaria. Donde se muestra el valor de P para la fase de crecimiento e irradiancia..... | 82 |

Capítulo 1. Introducción

Las microalgas conforman un grupo de organismos diverso, que tienen la capacidad de realizar el proceso de la fotosíntesis, que a grandes rasgos consiste en la transformación de energía lumínica en energía química (Barsanti y Gualteri, 2014). Son productores primarios de la cadena trófica, por lo que son de gran importancia ecológica en los diferentes ambientes en los que se viven (García-Romeral *et al.*, 2017). Las microalgas tienen diversas aplicaciones tecnológicas, tales como aporte de aceites industriales, biorremediación, producción de biocombustibles, así como en la obtención de productos de interés en la industria farmacéutica, biotecnológica, cosmeceútica y acuícola (Barsanti y Gualteri, 2014).

El amplio uso de las microalgas es debido a que tienen la capacidad de producir y acumular diversos compuestos, entre ellos, pigmentos, biomoléculas como proteínas, carbohidratos y lípidos, además de diversos componentes bioactivos que poseen un alto valor económico (Barsanti y Gualteri, 2014). En la acuicultura las microalgas tienen un papel muy importante y son de gran interés, ya que se utilizan en diversas actividades en el área de nutrición. Estos microorganismos son usados como alimento vivo para moluscos y en algunas etapas del desarrollo de peces y crustáceos, además de emplearse para enriquecer alimento vivo (artemias y rotíferos) a causa del alto contenido de proteínas y lípidos de algunas especies (Barsanti y Gualteri, 2014; García-Romeral *et al.*, 2017).

Existe una gran variedad de especies de microalgas en México; sin embargo, el estudio del aislamiento y caracterización de nuevas especies es limitado (Hernández-Becerril, 2014). Por lo anterior es necesario realizar investigación con el fin de evaluar el potencial de las especies de microalgas presentes en el país para usos en la biotecnología, farmacéutica y en la acuicultura (Jiménez-Valera, 2016).

Las diatomeas son un grupo de microalgas eucariotas, formadas generalmente por una célula, pero en ciertos casos pueden crear aglomeraciones en forma de colonias. Las diatomeas se caracterizan por tener una cubierta de sílice y dos valvas con el nombre de frústula, son un grupo abundante del fitoplancton marino y son responsables de aproximadamente el 40% de la fijación del carbono en los océanos. Dentro de la diversidad de diatomeas existen especies planctónicas suspendidas en la columna de agua y otras que son bentónicas y viven adheridas a un sustrato (Soler-Onís, 2015).

Además de su importancia ecológica, las diatomeas son de gran valor en la acuicultura ya que poseen la capacidad de acumular diversos componentes bioquímicos como los lípidos y los ácidos grasos poliinsaturados que son requeridos en la alimentación de organismos acuícolas (Leal *et al.*, 2010). Las

diatomeas son habitualmente utilizadas como alimento vivo, para moluscos bivalvos en todas sus etapas de vida, y en crustáceos y peces, durante la etapa larvaria. Las diatomeas son usadas para la alimentación de zooplancton como rotíferos, copépodos y artemias (Rodríguez-Núñez *et al.*, 2015).

Las diatomeas bentónicas son un grupo de microalgas de gran importancia ecológica y con aplicaciones en diversas industrias ya que se compone de variedad de especies, estrategias, formas de vida y gran diversidad de ambientes (Zhang *et al.*, 2019). Este grupo de microalgas son indicadores de impacto ambiental y a causa de su importancia ecológica, sirven como estimadores de la riqueza de áreas naturales protegidas (Siqueiros-Beltrones *et al.*, 2017). Entre los géneros más conocidos de diatomeas y con amplio uso en la acuicultura se encuentran *Navicula*, *Nitzschia* y *Amphora* (Siqueiros, 1994; Leal *et al.*, 2010).

1.1 Antecedentes

1.1.1 Factores que intervienen en composición bioquímica de microalgas

El crecimiento y la composición bioquímica de las microalgas es regulado por diversos parámetros ambientales y de entre ellos destacan la temperatura, la salinidad, la disponibilidad de nutrientes, la calidad y cantidad de luz, así como la concentración de CO₂. Éstos factores pueden modificar el metabolismo de las microalgas y por lo tanto también la síntesis y acumulación de las macromoléculas (Juneja y Murphy, 2013; Barsanti y Gualteri, 2014; Sayanova *et al.*, 2017; Conceição *et al.*, 2020;). La temperatura es uno de los factores ambientales que tienen mayor influencia en el crecimiento y composición de las microalgas, ya que está relacionada con la actividad enzimática y la tasa metabólica, y su variación puede modificar el grado de insaturación de los ácidos grasos de la membrana celular (Lynch y Thompson, 1982; Ingebrigtsen y Hansen, 2015). Otro de los parámetros ambientales de gran relevancia es la disponibilidad de nutrientes ya que el nitrógeno, fósforo y carbono son elementos que determinan el crecimiento celular y metabolismo de las microalgas (Juneja y Murphy, 2013; Ghosh *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2019).

La luz se considera un parámetro ambiental determinante para el crecimiento de las microalgas, ya que los organismos fotosintéticos requieren llevar a cabo el proceso de síntesis de la glucosa partir de energía de la luz (Barsanti y Gualteri, 2014). La fotosíntesis se compone de dos procesos concatenados, la fase luminosa y el Ciclo de Calvin-Benson. Para que la primera etapa de la fotosíntesis se lleve a cabo, se

requiere de la incidencia de luz sobre la membrana de los tilacoides, donde se encuentran contenidos los pigmentos fotosintéticos. Cuando la luz incide, los pigmentos cosechadores (carotenoides y ficobilinas) transportan la energía por medio de un mecanismo de resonancia al complejo proteico llamado centro de reacción, donde en la parte central hay una molécula porfirica, la clorofila *a* que es la encargada de excitar los centros de reacción y así dar comienzo con la fase luminosa, que es un proceso de transportación energética por medio de excitación de complejos proteicos transmembranales. Por lo tanto, si la luz no está presente no se puede llevar a cabo la síntesis de compuestos orgánicos ya que no hay energía para que sucedan las reacciones de la fotosíntesis que terminan en la conversión de hidrógeno (H) libre en moléculas almacenadoras de energía, principalmente NADH⁺ y ATP (Taiz y Zeiger, 2002; Blankenship, 2014).

La luz es un fenómeno físico que consiste en la interacción de partículas subatómicas libres de masa llamadas fotones, que tienen comportamiento de onda y de partícula. Para propósitos de crecimiento de algas, puede estudiarse mediante dos componentes fundamentales, la irradiancia y la composición espectral, por lo que al modificarse estas variables causan alteraciones en la actividad fotosintética, en el metabolismo y en consecuencia en el crecimiento y en la composición bioquímica de las microalgas (Taiz y Zeiger, 2002; Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2002; Blankenship, 2014).

1.1.2 Cambios en la composición bioquímica de las microalgas inducidos por la irradiancia

Las microalgas habitan diversos ambientes, por lo que son sometidas a diferentes niveles en la intensidad de luz o irradiancia. Debido a las variaciones en la cantidad de luz que reciben en el medio ambientes natural, tienen la capacidad de modificar vías metabólicas, otras características fisiológicas y estructurales para hacer frente a las condiciones de estrés ambiental por la luz. A este proceso de respuesta a la luz, se le conoce como fotoaclimatación y es también realizado por las plantas superiores (Barsanti y Gualteri, 2014; Taiz y Zeiger, 2002).

Al modificar la irradiancia se producen cambios en la fotosíntesis, en la producción de pigmentos y por lo tanto en el crecimiento y en la composición bioquímica de las microalgas (Thompson, 1996; Khotimchenko y Yakovleva, 2005). La capacidad de adaptación de las células de microalgas a los cambios lumínicos puede variar entre especies, esto dependerá del ambiente en el que viven, las características del aparato fotosintético y del tipo de pigmentos. Se ha descrito para la especie de diatomea bentónica *Gyrosigma*

subsalinum, una tasa máxima de crecimiento a $11.4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, y la inhibición de crecimiento a partir de los $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mientras que para *Odontella litigiosa* el crecimiento máximo a una irradiancia de $\sim 100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y la inhibición de crecimiento en irradiancias mayores a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Longhi *et al.*, 2003). En *Chaetoceros gracilis* se ha descrito una mayor densidad de células a irradiancia de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con respecto de 30 y $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mientras que en *Chaetoceros constrictus* se obtuvo mayor tasa de crecimiento a mayor nivel irradiancia ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (González *et al.*, 2019).

En la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* se reportó por Chriemadha y Borowitzka (1994) que el contenido celular de proteínas incrementó al utilizar las mayores irradiancias de 286 y $1712 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con respecto de 56 y $212 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y en los carbohidratos el contenido celular aumentó en las irradiancias mayores al adicionar 5% de CO_2 . En el caso de la producción de lípidos y de ácidos grasos poliinsaturados, un estudio realizado con *Pavlova lutheri*, indicó un contenido de lípidos de $132.5 \text{ pg}\cdot\text{cel}^{-1}$ a irradiancia de $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, en comparación con $50.8 \text{ pg}\cdot\text{cel}^{-1}$ resultado del cultivo a $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se encontró un mayor porcentaje de DHA (ácido docosahexaenoico) de 7.44 ± 0.70 a un nivel de irradiancia de $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, comparativamente con el valor de 4.54 ± 0.06 obtenido a $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Carvalho y Malcata, 2005). En *Entomoneis paludosa* y *Nitzschia alexandrina* se documentó la estimulación de la producción de lípidos en irradiancias entre 100 y $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, en comparación a lo obtenido para *Staurisira* sp. donde se estimuló la síntesis de carbohidratos a los mismos valores de irradiancia (Cointet *et al.*, 2019).

Para el contenido de pigmentos se ha reportado que *Nitzschia palea* incrementó la producción de carotenoides con respecto al aumento de la irradiancia, al utilizar intensidades de luz de 40 , 75 , 100 , 200 , 300 y $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ según lo descrito por Willemoes y Mona (1991). En el contenido de clorofila *a* se registró una disminución al utilizar irradiancias de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($1.02 \mu\text{mol } 10^9 \text{ cél}^{-1}$) a $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($0.43 \mu\text{mol } 10^9 \text{ cél}^{-1}$). En otra investigación realizada por Conceição *et al.* (2020) para *Phaeodactylum tricornutum* se obtuvo que al tercer día de cultivo el contenido de clorofila *a* (67.19 mg g^{-1}) y *c* (15.1 mg g^{-1}) fue mayor al utilizar irradiancia de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con respecto de $750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Con respecto a los parámetros de eficiencia lumínica de la fotosíntesis, en *Amphora* cf. *coffeaiformis* se registró que a altas temperaturas (30 a $50 \text{ }^\circ\text{C}$) y niveles altos de irradiancia (500 a $1100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), se reduce la cantidad efectiva de rendimiento (F_v/F_m) que es definida como la eficiencia cuántica para operar por parte del fotosistema II (Salleh y McMinn, 2011). En una investigación realizada por Torres *et al.* (2014) se identificó para *Amphora* cf. *Coffeaiformis* y *Phaeodactylum tricornutum* una irradiancia de saturación

lumínica (I_k) mayor al realizarse los cultivos en invernaderos (luz solar) con respecto a la incubadora ($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

1.1.3 Efecto de la composición espectral en el cultivo de microalgas

Además de la irradiancia, la composición espectral de la luz es también un factor importante en el cultivo de microalgas, ya que se ha descrito puede modificar el crecimiento y la composición bioquímica de los organismos fotosintéticos (Abalde *et al.*, 1997; Sánchez-Saavedra *et al.*, 2015). En la fotosíntesis no todos los espectros de la luz pueden ser utilizados, ya que los diferentes pigmentos fotosintéticos tienen un espectro de absorción en una longitud de onda específica, a esta porción que puede ser absorbida por los pigmentos se denomina energía fotosintéticamente utilizable (PUR) (Blankenship, 2014).

La luz blanca es una mezcla de las longitudes de onda de los colores del arcoíris que van de los 400 a los 700 nm. Se ha reportado para la Haptofita *Tisochrysis lutea* la mayor producción de carbohidratos y de ácido eicosapentaenoico (EPA) en la fase exponencial del crecimiento al utilizar luz blanca con respecto a la luz azul, luz roja y luz verde (Sánchez-Saavedra *et al.*, 2015). En las diatomeas se registró para *Amphora* sp. que la longitud de onda de la luz modifica el crecimiento y la composición proximal y se reportó la mayor producción de proteínas en la luz blanca en comparación con la luz roja, verde, amarilla, azul y GroLux (Romero-Romero, 2015). Para *Nitzschia thermalis* y *Nitzschia laevis* cepa 1 se ha reportado un incremento de la irradiancia de saturación (I_k) y el contenido de clorofila *c* y carotenoides al utilizar luz blanca con respecto a la luz azul (Mercado *et al.*, 2004).

1.1.4 Características de los componentes bioquímicos en microalgas

Los principales componentes bioquímicos de las microalgas son las proteínas, lípidos y carbohidratos que constituyen aproximadamente el 90% del peso seco total y en menor medida los ácidos nucleicos, vitaminas y cenizas, sin embargo, su contenido puede variar debido a factores ambientales (Brown *et al.*, 1989; Abalde *et al.*, 1995).

Las proteínas son macromoléculas formadas por cadenas de aminoácidos y pueden estar compuestas de 20 aminoácidos diferentes, estas moléculas son esenciales para la célula ya que constituyen parte de la maquinaria y estructura celular (McKee y McKee, 2003). Las microalgas se caracterizan por tener contenidos elevados de proteínas (~50% del peso seco total), razón por la cual se han utilizado en la nutrición animal y humana. El valor de las proteínas en el ámbito de la nutrición está determinado en gran parte por la composición de aminoácidos que tiene, ya que algunos aminoácidos no pueden ser digeridos y absorbidos por los organismos que las consumen (Abalde *et al.*, 1995).

Los carbohidratos son moléculas orgánicas formadas principalmente de carbono, hidrógeno y oxígeno que se producen durante el proceso de la fotosíntesis y que sirven de reserva de energía, componentes estructurales y precursores de otras moléculas para la célula (McKee y McKee, 2003). En las microalgas los carbohidratos no son los componentes más abundantes, sin embargo, tienen un contenido importante, aproximado del 5-23%. Los polisacáridos presentes en las microalgas tienen una composición variable donde la glucosa es generalmente el componente más abundante (21-87%), y pueden acumularse como reserva energética en diversas formas, la más común de ellas en las diatomas es la crisolaminarina (Brown *et al.*, 1989; Abalde *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 1997).

Los pigmentos son moléculas de origen lipídico que están presentes en las plantas superiores y algas, éstos compuestos son necesarios en el proceso de la fotosíntesis para la captación de luz y la fotoprotección del aparato fotosintético (Taiz y Zeiger, 2002; McKee y McKee, 2002; Blankenship, 2014). Los principales pigmentos presentes en las microalgas son las clorofilas, los carotenoides y las ficobilinas (cianobacterias y algas rojas), sin embargo, el tipo de pigmento puede variar de acuerdo con el grupo de microalga (Brown *et al.*, 1989). La clorofila es un pigmento de color verde formado por un anillo de porfirina y una cadena hidrófoba de fitol, y son moléculas especializadas en la absorción de la luz que impulsan directamente las reacciones fotoquímicas. En las diatomeas están presentes la clorofila *a*, que tiene dos picos de absorción del espectro electromagnético del 400 al 500 nm y del 600 al 700 nm y la clorofila *c* que es un pigmento accesorio para la captación de la luz. Los carotenoides son moléculas isoprenoides de color anaranjado que sirven como accesorios en la captación de luz y protegen el aparato fotosintético del exceso de luz y que tienen un pico de absorción del espectro visible de 400 a 540 nm. En las diatomeas los carotenoides más comunes son el β -caroteno típico en la mayoría de los organismos fotosintéticos y otros más complejos como la fucoxantina y diadinoxantina (Abalde *et al.* 1995; Taiz y Zeiger, 2002).

Los lípidos son biomoléculas caracterizadas por ser solubles en solventes apolares, pero no en agua. Se clasifican esencialmente en triaglicérols, ácidos grasos y sus derivados, ceras, fosfolípidos, esfingolípidos

e isoprenoides. Al ser un grupo heterogéneo de moléculas orgánicas, tienen diversas funciones y pueden actuar como reserva de energía, componentes estructurales celulares, señalizadores químicos, y algunos otros tipos de lípidos actúan como parte estructural de vitaminas y pigmentos (Mckee y Mckee, 2003).

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), también llamados PUFA (por sus siglas en inglés; Polyunsaturated fatty acids), son aquellos que presentan al menos dos enlaces dobles en sus átomos de carbono, a diferencia de los ácidos grasos saturados que no contienen dobles enlaces y los monoinsaturados que presentan solo un doble enlace en su estructura química (Wiktorowska-Owczarek *et al.*, 2015). Los AGPI se clasifican en Omega-3, Omega-6 y Omega-9, de acuerdo al sitio donde se encuentra el primer doble enlace en la cadena de carbonos desde el extremo metilo (Sahena *et al.*, 2009).

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga son esenciales en la alimentación de peces y otros organismos en cultivo, además de estar relacionados con la salud humana, ya que forman parte de la membrana celular, y son partícipes en sistemas de señalización que se llevan a cabo en las células (Hinzpeter *et al.*, 2006). Los AGPI de mayor importancia biológica se encuentran en los grupos omega-3, como el ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) y omega-6, a donde pertenece el ácido araquidónico (ARA) (Sahena *et al.*, 2009).

1.1.5 Alternativas de producción de lípidos

El principal aporte de ácidos grasos omega-3 es el aceite de pescado de origen marino (Hinzpeter *et al.*, 2006). La utilización de estos aceites está asociado con algunas problemáticas, como la contaminación con metales pesados, la variación en la composición, así como la disponibilidad de los organismos de donde son obtenidos debido al declive de las pesquerías (Leal-Medina *et al.*, 2017; Charles *et al.*, 2019) La cantidad de ácidos grasos que pueden ser extraídos de un pez depende de la especie, de sus hábitos alimenticios, época del año y región geográfica (Bonilla y Hoyos, 2018).

El consumo de pescado y sus derivados ha incrementado y con ello la demanda de ácidos grasos esenciales para cubrir las necesidades del sector acuícola por lo que se busca obtener ácidos grasos poliinsaturados a partir de otros medios para poder solventar la demanda tanto en acuicultura como en nutrición humana (Chakraborty y Raj, 2007). Desafortunadamente el aporte de lípidos no es abundante a causa principalmente del declive de la actividad pesquera por la sobreexplotación de los recursos, motivo por el

cual es importante el desarrollo biotecnológico para generar alternativas en la producción de AGPI, para su uso en nutrición humana y en la acuicultura (Valenzuela *et al.*, 2014).

Entre las alternativas para la producción de AGPI se encuentra el aceite de krill, típicamente obtenido a partir de *Euphasia superba* (Valenzuela *et al.*, 2014). El aceite resultante es considerado rico en omega-3, por contener altas proporciones de EPA y DHA, que a su vez, son de gran interés económico por sus propiedades nutricionales en la alimentación humana y animal (Valenzuela *et al.*, 2014).

Resultado de diversas investigaciones, se ha destacado el potencial de microalgas como suplementos alimenticios, por sus importantes componentes bioquímicos para la nutrición humana y animal, entre los se encuentran aminoácidos, pigmentos, ácidos grasos esenciales, vitaminas y polisacáridos (Kent *et al.*, 2015; Charles *et al.*, 2019; Rao *et al.*, 2020). Algunas microalgas alteran sus rutas metabólicas para la síntesis lipídica ante estrés ambiental, almacenan lípidos en la célula, principalmente triglicéridos, para lograr sobrevivir a los factores estresantes (Sharma *et al.*, 2012). Los lípidos sirven como protección para el fotosistema evitando el estrés fotooxidativo, que surge a partir de la formación de especies reactivas del oxígeno (De Jaeger *et al.*, 2014). Por estos motivos, las microalgas pueden llegar a producir grandes proporciones de AGPI de hasta el 20-50% del peso seco (Sharma *et al.*, 2012), específicamente de EPA y DHA, por lo que es una alternativa para la producción de ácidos grasos del tipo omega-3 y otros ácidos grasos esenciales (Hinzpeter *et al.*, 2006; Rao *et al.*, 2020).

1.1.6 Importancia de diatomeas en nutrición acuícola

Las diatomeas son microorganismos que tienen la capacidad de adaptarse a las condiciones ambientales adversas, presentando diversas estrategias fisiológicas a través de los cuales logran sobrevivir, principalmente ante deficiencias nutricionales, cambios en la temperatura, salinidad e intensidad luminosa. Uno de los productos que las diatomeas sintetizan ante condiciones adversas son los lípidos, entre otras biomoléculas (Sharma *et al.*, 2012; Cobos-Ruiz *et al.*, 2016).

Las diatomeas se utilizan como alimento vivo para organismos en cultivo, se usan en forma de pastas y harinas, debido a que poseen altos contenidos de proteínas, lípidos, carbohidratos y otros componentes bioquímicos. Además de la calidad nutricional de la biomasa de las diatomeas, la buena digestibilidad de

sus componentes, así como un buen perfil de aminoácidos, las hace también parte esencial de un adecuado suministro de proteínas para los organismos en cultivo (García-Romeral *et al.*, 2017).

El tamaño celular en las diatomeas es también una característica importante para poder ser utilizadas como alimento vivo en la acuicultura, ya que debe ser apropiado para poder ser ingeridas, en el caso de organismos filtradores se recomienda un tamaño de célula de 1-15 μm y en herbívoros de 10-100 μm (Jeffrey *et al.*, 1992). Por este motivo las diatomeas han sido utilizadas como alimento durante las primeras etapas de vida de diversas especies de abulón (Searcy-Bernal *et al.*, 1992), así como de otros organismos en cultivo como los moluscos durante todo su ciclo de vida, en estadios larvales de crustáceos y en peces (Müller-Feuga *et al.*, 2007; Barsanti y Gualteri, 2014).

1.1.7 Requerimientos de componentes bioquímicos en acuicultura

Las proteínas son componentes necesarios en la dieta de los organismos acuícolas ya que son una excelente fuente de nitrógeno y aminoácidos esenciales. Los requerimientos de proteínas varían en función de diversos factores como la edad del organismo, el ambiente en el que habita e incluso, factores genéticos. Se ha descrito que las larvas de moluscos requieren un contenido de proteínas del 30 al 60% del peso seco de las microalgas que consumen, para los crustáceos de 30 al 50% en diversos estadios de vida y para los peces el contenido de proteínas necesario en la dieta es del 40 al 60% (De Pauw y Persoone, 1988; Brown *et al.*, 1989).

Los carbohidratos no son los componentes de mayor importancia en la dieta de los organismos acuícolas, sin embargo, se requieren para reducir costos en la alimentación, ya que son el constituyente más barato de la dieta. En los moluscos se ha descrito que un contenido del 5 al 30% de carbohidratos en las microalgas tiene resultados favorables en el crecimiento y en el caso de crustáceos y peces se ha reportado buen crecimiento de 15-25% (Enright *et al.*, 1986; Brown *et al.*, 1989; Abalde *et al.*, 1995).

Los lípidos forman parte importante de la dieta en peces, ya que aportan ácidos grasos esenciales y contribuyen al transporte de vitaminas solubles en grasas. Los lípidos constituyen al rededor del 7-15% de su alimento en etapa adulta (Craig y Helfrich, 2009), mientras que en la etapa larvaria las microdietas están compuestas típicamente de 10-20%, y en las micro encapsuladas de hasta un 35% (Lazo *et al.*, 2000; Andrés y Aguilera, 2009). Además de la adición de lípidos, es necesario agregar AGPI en las dietas de estos

organismos para mantener el funcionamiento adecuado de los tejidos y para actuar como precursores de prostaglandinas y elementos hormonales de vital importancia en peces (Dionicio-Acedo *et al.*, 2017).

Los requerimientos tanto de lípidos y de ácidos grasos de los peces pueden variar de acuerdo a la etapa de desarrollo y al ambiente que habitan; si son marinos o dulceacuícolas (Oliva-Teles, 2012). En el caso de peces marinos, se ha documentado que es necesario adicionar ácidos grasos omega-3 en un aproximado de 0.5-2.0% de la dieta seca, constituidos principalmente por EPA y DHA (Craig y Helfrich, 2009). Los peces marinos no tienen la capacidad de producir omega-3 propiamente, al carecer de recursos enzimáticos para realizar el alargamiento y la saturación de otros ácidos grasos poliinsaturados como el ácido linoleico, a partir del cual, se pueden obtener ácidos grasos altamente insaturados como el EPA y DHA (Oliva-Teles, 2012).

Esto no sucede con los peces de agua dulce, ya que cuentan con la enzima delta-5-desaturasa que les permite llevar a cabo la conversión, pero no pueden producir ácido linoleico y por consecuencia requieren adicionarlo en el alimento, en un aproximado de 0.5-1.5% de la dieta seca (Craig y Helfrich, 2009).

En el grupo de moluscos, específicamente en el abulón que es un recurso de importancia económica acuícola, se ha descrito que los lípidos representan típicamente de 1.5-5.3% de su dieta, aunque los requerimientos pueden variar en función del tamaño del organismo y la etapa de desarrollo (Mau y Jha, 2018). En crustáceos, la diferencia en crecimiento se evidencia a partir del porcentaje de lípidos que son adicionados en la dieta, entre otros factores, caso del camarón donde el mayor crecimiento se obtiene de dietas que contienen de 5-6%, mientras que el crecimiento retardado se observa al adicionar más del 10% (National Research Council, 2011).

1.1.8 Características de *Nitzschia thermalis f. curta* y *Amphora helenensis*

El género de las diatomeas *Nitzschia* esta ampliamente distribuido, con más de 600 especies descritas que pueden habitar en diversos ambientes tanto marinos, dulceacuícolas y es común encontrarlas en aguas contaminadas con residuos orgánicos y en sitios con altas concentraciones de nitrógeno orgánico. Debido a su tolerancia a las aguas contaminadas es comúnmente utilizada como indicador ambiental. Generalmente las diatomeas de *Nitzschia* tienen una forma alargada, delgada y rígida pero algunas

especies pueden ser ovoides, se encuentran como células individuales, pero también pueden llegar a formar colonias (Lowe, 2003).

Las numerosas especies que constituyen el género *Nitzschia* tienen una gran variedad de formas y características taxonómicas que hacen complicada su identificación. Además, algunas especies pueden producir ácido domoico, una sustancia neurotóxica para los humanos, además de otras sustancias como compuestos halogenados (Lowe, 2003). También se ha descrito para algunas especies de *Nitzschia* la producción elevada de lípidos y especialmente de ácidos grasos poliinsaturados, donde uno de los más abundantes y de mayor importancia es el ácido eicosapentaenoico (EPA) (Wen y Chen, 2003; Chen *et al.* 2007; Demirel *et al.*, 2017). Además, se ha reportado que *Nitzschia* sp. puede producir proteínas con potencial para utilizarse como antioxidantes (Alzahrani *et al.*, 2017) y *Nitzschia laevis* para producir el pigmento fucoxantina y ácido eicosapentaenoico (EPA) (Lu *et al.*, 2019). Debido a su composición bioquímica y a su rápido crecimiento, las especies de *Nitzschia* se han utilizado para la alimentación de diversos organismos acuícolas (Chen *et al.*, 2007).

Una de las especies con potencial en la producción de ácidos grasos es *Nitzschia thermalis* f. *curta*, una diatomea que habita en el bentos marino, aislada de la región de Baja California. En un estudio realizado por Jiménez-Valera (2016) se evaluó su composición bioquímica y se caracterizó por un alto contenido del ácido graso docosahexaenoico (DHA: 3%) y una alta relación de EPA: DHA (0.2) que correspondió a los mayores valores de las 21 especies de microalgas aisladas y estudiadas en dicha investigación. Además, presentó un contenido de carbohidratos (5.1%) dentro del rango descrito para la utilización de microalgas como alimento en la acuicultura (5-30%) según Brown *et al.* (1989) y una tasa de crecimiento de 1.02 divisiones día⁻¹ y que correspondió a una de las mayores en las 16 especies de diatomeas estudiadas por Jiménez-Valera (2016).

El género *Amphora* es un grupo abundante y heterogéneo de diatomeas que se distribuye en ambientes dulceacuícolas y marinos y que comúnmente habitan en comunidades microbentónicas, y son epífitas por lo que pueden adherirse fuertemente al sustrato (Kocielek y Spaulding, 2003). Las diatomeas pertenecientes al género *Amphora* son regularmente utilizadas en la acuicultura, debido a sus características como tamaño celular, tasa de crecimiento, biomasa, valor nutricional y tolerancia a diversas condiciones ambientales (Meril *et al.*, 2019). Se ha descrito que *Amphora* sp. produce un contenido elevado de polifenoles, clorofila *a*, carotenoides y ácidos grasos poliinsaturados, entre otros compuestos bioactivos que pueden ser utilizados en diversas industrias (Boukhris *et al.*, 2017).

La especie *Amphora helenensis* pertenece al grupo de las diatomeas bentónicas, tiene morfología ráfida y pennada y se distribuye en ambientes principalmente marinos. Se tiene registro de la presencia de *Amphora helenensis* en Europa, Sudáfrica, Canadá y Oceanía, así como recientemente fue encontrada en la región de Baja California y Baja California Sur (Jiménez-Valera, 2016; López-Fuerte *et al.*, 2019).

La diatomea *Amphora helenensis* posee características que la hacen una buena opción para su uso biotecnológico: rápido crecimiento y tiempo de duplicación, además de ser sencilla de cultivar y de cosechar (Meril *et al.*, 2019). Diversas especies del género *Amphora* se han utilizado también en acuicultura como alimento vivo y para la producción de sustancias de importancia acuícola, como lo son los componentes bioquímicos (Meril *et al.*, 2019). Se ha descrito también la utilización de *Amphora helenensis* en cultivos del erizo de mar *Lytechinus variegatus* ya que ayuda beneficia el crecimiento de los organismos (Gibbs *et al.*, 2009; Gibbs *et al.*, 2015). *Amphora helenensis* fue aislada de Ensenada, Baja California por Jiménez-Valera (2016) y se describió como una buena opción para ser utilizada en la acuicultura debido a su rápido crecimiento, tamaño adecuado y alta producción de biomasa, además por tener un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (60.7%). Esta especie resultó tener el mayor valor del ácido graso eicosapentaenoico (EPA: 39.6%) de entre las 21 especies estudiadas en dicha investigación.

1.2 Justificación

Debido a la importancia que tienen las microalgas para la biotecnología y acuicultura, es de gran interés obtener información de estos organismos, con el fin de utilizarlos como alternativas para la producción de biomoléculas, compuestos bioactivos y pigmentos que puedan ser útiles en la nutrición humana y acuícola. A causa del aumento en la demanda de productos obtenidos a partir de peces marinos, como el aceite de pescado y el declive de las pesquerías registrado a partir la década de los 90's (FAO, 2002), es de gran relevancia estudiar especies de diatomeas bentónicas locales que permitan obtener recursos de gran valor como los ácidos grasos poliinsaturados y otros componentes bioquímicos. El utilizar especies de microalgas aisladas de la zona geográfica en donde serán utilizadas, tienen la ventaja de que están adaptados a las condiciones ambientales de la región y además evitará la introducción de especies.

Conocer el efecto que tiene la irradiancia en la composición bioquímica, en la tasa de crecimiento y en la actividad fotosintética de diatomeas bentónicas de Baja California, permitirá acrecentar el acervo

biológico de las especies de microalgas locales con potencial en biotecnología y acuicultura, particularmente en la producción de ácidos grasos poliinsaturados.

Por lo anterior, se estudiarán las diatomeas *Nitzschia thermalis* f. *curta* y *Amphora helenensis* que son aisladas de la región de Baja California, y sus cultivos se mantendrán a distintos niveles de irradiancia con el fin de adquirir información sobre las mejores condiciones de intensidad de luz para obtener mayor producción de biomasa y ácidos grasos poliinsaturados.

1.3 Hipótesis

1. La tasa de crecimiento de *Nitzschia thermalis* f. *curta* y *Amphora helenensis* se incrementará al mantener los cultivos a un mayor nivel de irradiancia ($250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).
2. El contenido de proteínas, lípidos, la eficiencia de fotosíntesis, el índice de saturación lumínica y el contenido total de ácidos grasos poliinsaturados tendrán una relación directa con el nivel de la irradiancia en los cultivos de *Nitzschia thermalis* f. *curta* y *Amphora helenensis*.
3. El contenido de carbohidratos y clorofila a tendrá una relación inversa con el nivel de la irradiancia en los cultivos de *Nitzschia thermalis* f. *curta* y *Amphora helenensis*.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la irradiancia en el crecimiento, la composición bioquímica y fotosíntesis de las diatomeas *Nitzschia thermalis* f. *curta* y *Amphora helenensis*.

1.4.2. Objetivos específicos

1. Evaluar el crecimiento (peso seco y número de células) en las diatomeas *Nitzschia thermalis* f. *curta* y *Amphora helenensis* cultivadas en cinco niveles de irradiancia (50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante la fase exponencial y estacionaria del crecimiento.
2. Evaluar la composición proximal, pigmentos y ácidos grasos en las diatomeas *Nitzschia thermalis* f. *curta* y *Amphora helenensis* cultivadas en cinco niveles de irradiancia (50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante la fase exponencial y estacionaria del crecimiento.
3. Evaluar la fotosíntesis en las diatomeas *Nitzschia thermalis* f. *curta* y *Amphora helenensis* cultivadas en cinco niveles de irradiancia (50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante la fase exponencial y estacionaria del crecimiento.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Origen de las cepas

Las dos cepas de diatomeas utilizadas fueron obtenidas de la colección del laboratorio de Biotecnología de Algas (BIOAL) ubicado en el Departamento de Acuicultura CICESE. Las especies de diatomeas que se usaron son *Amphora helenensis* y *Nitzschia thermalis* f. *curta* que fueron aisladas por Jiménez-Valera (2016) en el Estado de Baja California (B.C.), México. La diatomea *Amphora helenensis* fue aislada en la Bahía de Ensenada, Baja California (B.C.), México y *Nitzschia thermalis* f. *curta* fue aislada en San Quintín, B.C.

2.2 Mantenimiento de los cultivos

Las cepas de *Amphora helenensis* y *Nitzschia thermalis* f. *curta* se mantuvieron en cultivos monoespecíficos y en sistemas por lotes o “batch”. Los cultivos se realizaron en matraz Erlenmeyer de 125 mL con 100 mL de medio “f” descrito por Guillard y Ryther (1962). El medio de cultivo fue preparado con agua de mar y fue esterilizada a 120 °C y 1.05 kg cm⁻² durante 20 min. Los cultivos se mantuvieron en el Laboratorio húmedo central del Departamento de Acuicultura del CICESE. Las condiciones de mantenimiento de los cultivos fueron un recambio de medio semanal y agitación manual diaria. Las variables ambientales a las que se mantuvieron los cultivos fueron temperatura de 22.0 ± 1.0 °C y una irradiancia continua de 50 μmol m⁻² s⁻¹ provista por lámparas fluorescentes de luz fría (Sylvania F40 CV). La irradiancia de los cultivos fue medida con un sensor esférico (4π) Biospherical Instrument modelo QSL-100. El pH del medio de cultivo fue evaluado cada día con un potenciómetro Ohaus Starter 3100.

2.3 Caracterización de la curva de crecimiento

Para la caracterización de la curva de crecimiento de cada especie de diatomea se realizaron cultivos monoespecíficos y no axénicos en lotes y por triplicado. Los cultivos se realizaron en matraz Erlenmeyer

de 125 mL con 100 mL de medio "f" descrito por Guillard y Ryther (1962). La esterilización del medio y las condiciones ambientales de cultivo fueron las ya indicadas en la sección 2.2.

2.4 Efecto de la irradiancia sobre crecimiento y composición bioquímica

Para cada especie de diatomea se realizaron cultivos monoespecíficos y no axénicos en sistemas por lotes y por triplicado. Los cultivos se mantuvieron con medio "f" (Guillard y Ryther, 1962) en matraces Erlenmeyer de 1 L y con 800 ml de medio de cultivo. La esterilización del medio y las condiciones ambientales de cultivo fueron como ya se describió en la sección 2.2, excepto para la irradiancia. La irradiancia provista a los cultivos fue continua en cinco intensidades, a saber, 50, 100, 150, 200 y 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las intensidades de luz fueron ajustadas en una línea de igual irradiancia medida al centro de la base del matraz Erlenmeyer. Las mediciones de la irradiancia se efectuaron con el equipo indicado en la sección 2.2. La irradiancia fue proporcionada por lámparas fluorescentes como ya descrito en la sección 2.2. Los cultivos se realizaron sin adición de aire o de fuente de carbono.

2.5 Crecimiento poblacional

Para cada condición experimental y de forma diaria, se tomaron muestras de 1.5 mL para la evaluación del crecimiento poblacional de los cultivos. El crecimiento se evaluó por medio de mediciones de densidad óptica, utilizando un espectrofotómetro HACH DR6000 y a una longitud de onda de 680 nm. Además, se hicieron conteos del número de células con un hematocitómetro con una profundidad de 0.1 mm y con la ayuda de un microscopio compuesto. Para el cálculo de la densidad celular se utilizó la fórmula siguiente:

$$C = (N * 10000 * dil) \quad (1)$$

Donde C es la densidad de células por ml, N el promedio de células presentes en 1 mm^2 (0.1 μL), 10000 es el factor de conversión de 0.1 μL a 1 mL y dil el factor de dilución.

2.5.1 Tasa específica de crecimiento

La evaluación de la tasa específica de crecimiento de los cultivos se calculó por medio de la fórmula propuesta por Fogg y Thake (1987):

$$\mu = \frac{(\log_2 N_2) - (\log_2 N_1)}{(t_2 - t_1)} \quad (2)$$

Donde μ es la tasa de crecimiento específica, N_1 y N_2 concentración de células al tiempo 1 (t_1) y tiempo 2 (t_2) respectivamente, \log_2 corresponde al logaritmo de base dos de la concentración de células.

2.5.2 Tiempo de duplicación de las células

El tiempo de duplicación de las células fue calculado con la fórmula siguiente y descrita por Fogg y Thake (1987):

$$tg = \frac{1}{\mu} \quad (3)$$

Donde tg corresponde al tiempo de generación y μ la tasa de crecimiento específica descrita en el punto 2.4.1.

2.5.3 Medición de tamaño de las células

Se midió largo y ancho de células de los cultivos de *Amphora helenensis* y *Nitzschia thermalis* f. *curta* mantenidos en cada condición experimental, durante la fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Las mediciones del tamaño celular fueron efectuadas con el software ImagePro Plus versión 5.1 y un microscopio compuesto Olympus CX-31.

2.6 Composición proximal

Para el análisis de la composición proximal, se tomaron submuestras de los cultivos durante la fase media exponencial y la fase estacionaria del crecimiento. Para lo anterior, se tomaron alícuotas de 10 mL que fueron colectadas en filtros de fibra de vidrio de 24 mm de diámetro y con abertura de poro de 1 μm (Whatman GF/C). Una vez colectadas las muestras que fueron utilizadas para los análisis proximales se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta su posterior utilización.

2.6.1 Proteínas

Para el análisis de proteínas se llevó a cabo la extracción con hidróxido de sodio a través del método descrito por Malara y Charra (1972a). En la cuantificación de proteínas se usó el reactivo de Folin-Ciocalteu por medio del método de Lowry *et al.* (1951). Para la curva de calibración se usó como estándar suero de albúmina de bovino (98%).

2.6.2 Carbohidratos

La extracción de carbohidratos se realizó por el método descrito por Whyte (1987) al usar ácido sulfúrico al 0.5 N. La cuantificación de carbohidratos se realizó con fenol al 5% y ácido sulfúrico por medio de la técnica de Dubois *et al.* (1956) y Malara y Charra (1972b). Se utilizó glucosa como estándar para la curva de calibración.

2.6.3 Lípidos

Para la extracción de lípidos se siguió el método descrito por Blight y Dyer (1959), donde se utilizó cloroformo-metanol-agua. La cuantificación de los lípidos extraídos se realizó por la técnica de Pande *et*

al. (1963). Para realizar la curva de calibración se utilizó como estándar una solución al 99% de tripalmitina (C16:0).

2.6.4 Peso seco total, peso seco orgánico y contenido de cenizas

Se tomaron alícuotas de 15 mL de los cultivos en cada condición experimental y se colectaron en filtros de fibra de vidrio de 45 mm de diámetro y abertura de poro de 1 μm . La cuantificación del peso de las muestras fue basada en el método de Sorokin (1973) que considera el cálculo del peso seco total (PST), peso seco orgánico (PSO) y el peso de las cenizas (PC). Previo al filtrado de las muestras, fue necesario la incineración de los filtros en una mufla durante 4 horas a una temperatura de 490 °C. Los filtros con muestra se trasladaron a una estufa a 60 °C, por un tiempo necesario hasta tener valores de peso constante para obtener el PST. Posteriormente, los filtros se incineraron en una mufla durante 4 horas a una temperatura de 490 °C y se trasladaron nuevamente a una estufa a 60 °C hasta tener valores constantes para obtener PC. El cálculo del PSO se realizó por medio de la diferencia de los valores del PST menos los valores del PC.

2.7 Pigmentos

La extracción y cuantificación de los pigmentos (clorofila *a* y carotenoides) se efectuaron siguiendo el método descrito por Parsons *et al.* (1984). Para la extracción se utilizó acetona al 90% durante 24 horas a temperatura de 4°C y posteriormente se cuantificó la concentración de cada pigmento.

2.8 Eficiencia lumínica de la fotosíntesis

Para la evaluación de la actividad fotosintética se tomaron alícuotas de 15 mL de cultivo de cada tratamiento experimental y se evaluó el espectro *in vivo* en un barrido de longitud de onda de 400 a 700 nm con un espectrofotómetro HACH DR6000. Para la evaluación de fotosíntesis se utilizó un fluorímetro Walz, Junior PAM, y se realizaron curvas de luz con modulación de amplitud de pulso. Se calcularon la tasa

relativa de transporte de electrones (rETR), el rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (Fv/Fm), la irradiancia de saturación (I_k), tasa relativa de transporte de electrones máxima (rETR_m) y la eficiencia fotosintética (α) para cada tratamiento y de acuerdo con lo descrito en el método de Eilers y Peeters (1988).

2.9 Perfil de ácidos grasos

Para la evaluar la composición de ácidos grasos, fue necesario liofilizar las muestras a -50 °C y 0.11 kg cm² de presión. Posteriormente se realizó la extracción tomando como referencia lo descrito por Folch *et al.* (1957). Se llevó a cabo la metilación siguiendo el procedimiento descrito por Metcalfe *et al.* (1966). Las muestras de metil ésteres obtenidas fueron analizadas en el cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890 con una columna capilar Agilent J&W (30 m de longitud, 0.32 mm de diámetro y 0.25 μ m grosor de la película) y como gas acarreador el hidrógeno, además de un detector de ionización de flama (250 °C). La rampa de temperatura del horno inició en 120 °C incrementándose 9 °C por minuto hasta alcanzar 190 °C para después incrementar 3 °C por minuto hasta culminar en 230 °C. Se utilizó como estándar 37 Component, Supelco FAME Mix Sigma.

2.10 Análisis estadístico

Para el procesamiento estadístico de los datos obtenidos durante los ensayos, se probaron los supuestos necesarios para llevar a cabo estadística paramétrica, que corresponden a homogeneidad de varianzas u homocedasticidad, normalidad e independencia (Zar, 1984). Para las siguientes variables que no cumplieron con los supuestos de normalidad y homocedasticidad se realizó una transformación de datos: peso seco total (ln), clorofila *a* (Coseno), clorofila *c* (Seno), carotenos (ln) de *Amphora helenensis* y para peso orgánico (x^{-1}), clorofila *a* (x^{-1}), clorofila *c* (ln) y ETR_{max} (ln) de *Nitzschia thermalis* f. *curta*.

Las posibles diferencias en la densidad de células con respecto al tiempo en los cultivos mantenidos con distinta irradiancia, fue analizada por medio de un análisis de covarianza (ANCOVA), en donde la covariable fue el tiempo de cultivo.

Para hacer inferencia estadística sobre las variables de respuesta que fueron evaluadas se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías. En el ANOVA de dos vías, uno de los factores fue la irradiancia con cinco niveles (50, 100, 150, 200 y 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), mientras que la fase de crecimiento fue el segundo factor correspondientes a la fase exponencial y fase estacionaria del crecimiento. Las variables de respuesta que se analizaron para cada caso por un ANOVA de dos vías corresponden a la densidad de células, tasa específica de crecimiento, tiempo de generación, composición proximal (proteínas, carbohidratos y lípidos), pigmentos y tasa fotosintética. En el caso donde se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, se realizó una prueba a *posteriori* de Tukey, para identificar las diferencias entre los tratamientos. El perfil de ácidos grasos se analizó por una prueba de Kruskal-Wallis al no contar con los supuestos para realizar pruebas paramétricas.

El tratamiento estadístico de los datos fue realizado en la plataforma STATISTICA, con un nivel de confianza de 95% ($\alpha=0.05$) y análisis de una cola para disminuir el error β y las gráficas fueron realizadas en el programa Origin 8.5.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Efecto de la irradiancia en el crecimiento y tamaño celular

Las curvas de crecimiento *Nitzschia thermalis* f. *curta* presentaron el inicio de la fase exponencial de crecimiento el día 1 para cuatro de los tratamientos experimentales, con excepción del tratamiento de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ que inició el día 2. Se encontró que el significativamente ($F= 5.84, P=0.00$) mayor crecimiento de los cultivos de *Nitzschia thermalis* f. *curta* fue con la irradiancia de 150, 200 y 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 1).

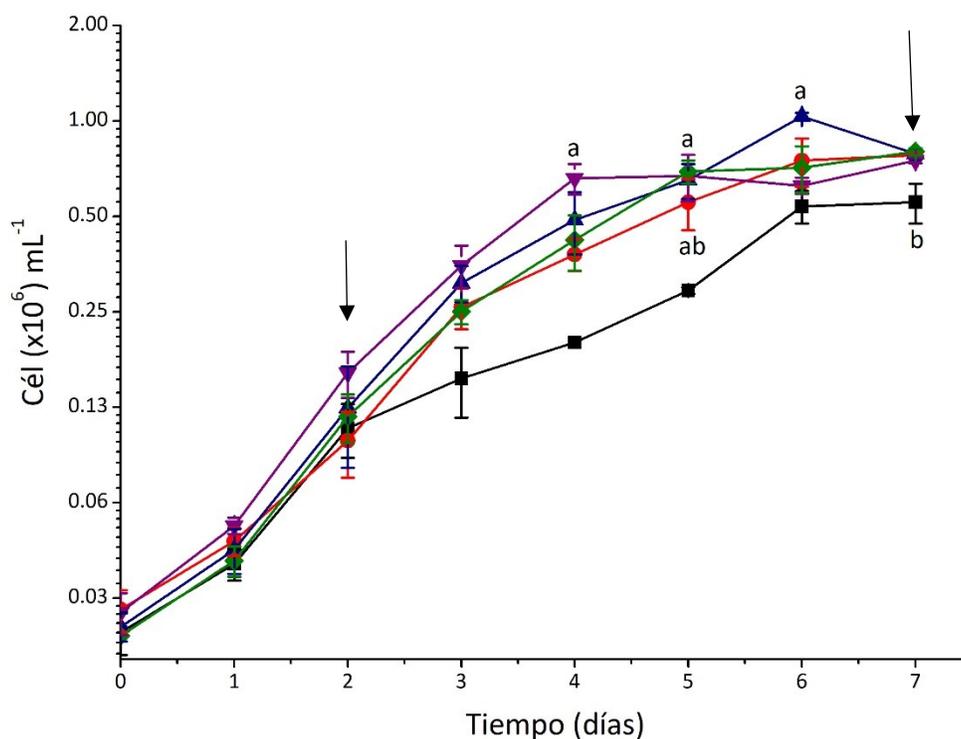


Figura 1. Valores promedio y desviación estándar de la densidad celular ($\text{Cél} \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$) de cultivos de *Nitzschia thermalis* f. *curta* mantenidos en irradiancia de (■), 100 (●), 150 (▲), 200 (▼) y 250 (◆) $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. ANCOVA y prueba *a posteriori* de Tukey, $\alpha=0.05$ (efecto de irradiancia: $a>b>c>d>e$). Las flechas indican la fecha de colecta de muestras en la fase exponencial y estacionaria del crecimiento.

Para *Amphora helenensis* las diferentes condiciones experimentales presentaron el inicio de la fase exponencial en el día 1 al día 4, con excepción del tratamiento de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ que terminó el día 3. Se encontró que el significativamente ($F=3.21$, $P=0.01$) mayor crecimiento de los cultivos de *Amphora helenensis* fue con la irradiancia de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 2).

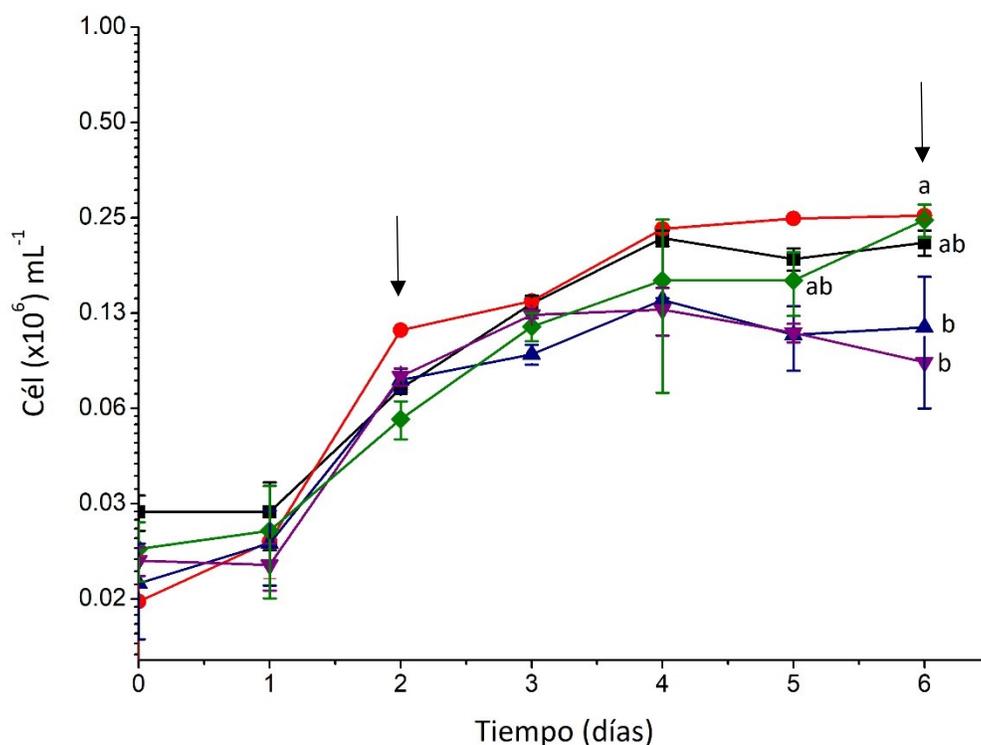


Figura 2. Valores promedio y desviación estándar de la densidad celular ($\text{Cél} \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$) de cultivos de *Amphora helenensis* mantenidos en irradiancias de 50 (■), 100 (●), 150 (▲), 200 (▼) y 250 (◆) $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. ANCOVA y prueba *a posteriori* de Tukey, $\alpha=0.05$ (efecto de irradiancia: $a>b>c>d$). Las flechas indican la fecha de colecta de muestras en la fase exponencial y estacionaria del crecimiento.

Los valores de pH de los cultivos de *Nitzschia thermalis* f. *curta* en los diferentes tratamientos experimentales, mostraron un incremento a partir del día 3 y hasta el día 6 en todas las condiciones experimentales. Los menores valores de pH se presentaron en el tratamiento de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con un valor mínimo de 8.40 (día 2) y valor máximo de 9.06 (día 7) (Figura 3).

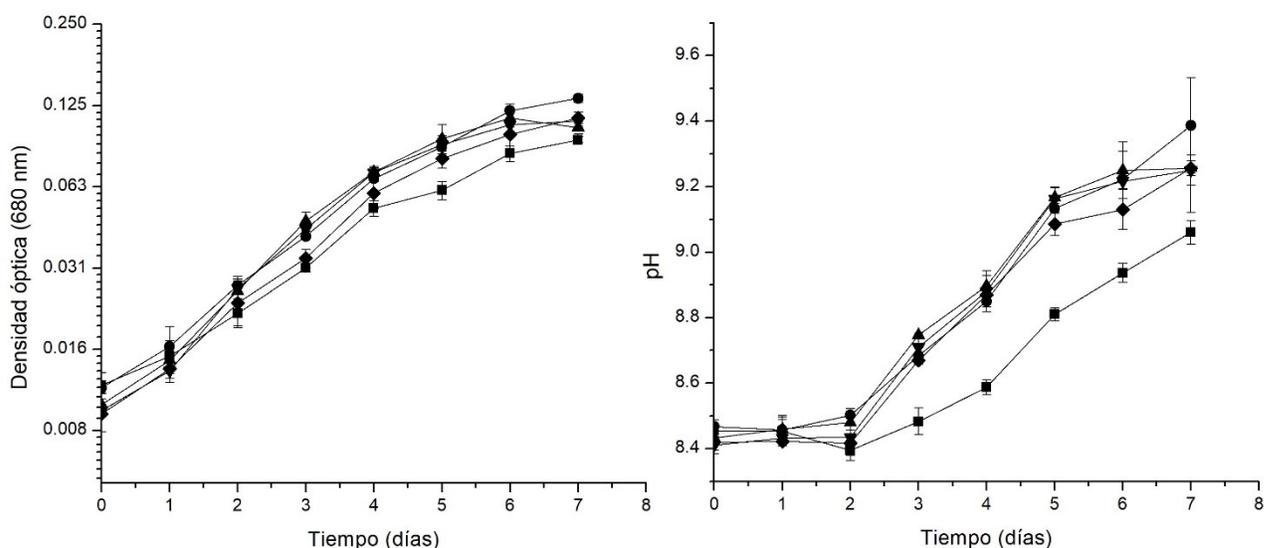


Figura 3. Valores promedio y desviación estándar de la densidad óptica (680 nm) y pH de cultivos de *Nitzschia thermalis f. curta* mantenidos en irradiancias de 50 (■), 100 (●), 150 (▲), 200 (▼) y 250 (◆) $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

En los cultivos de *Amphora helenensis* los valores del pH en los diferentes tratamientos mostraron un incremento el día 3 del cultivo y manteniéndose en valores similares hasta el día 5 en todos los tratamientos experimentales. Los valores de pH fluctuaron en todos los tratamientos en valores entre 8.52 y 8.77 (Figura 4).

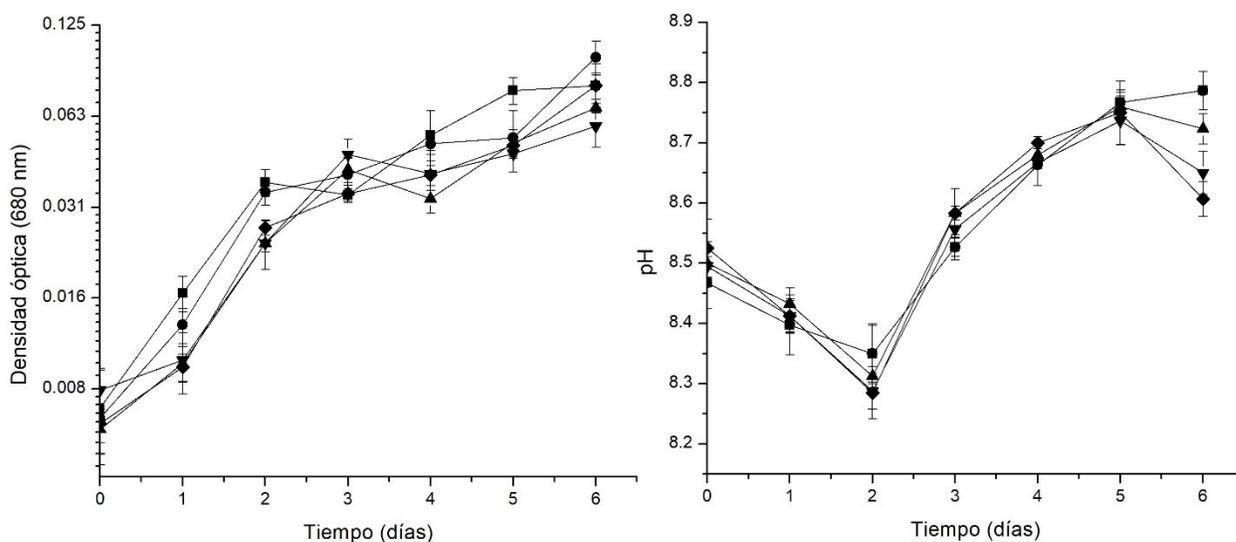


Figura 4. Valores promedio y desviación estándar de la densidad óptica (680 nm) y pH de cultivos de *Amphora helenensis* mantenidos en irradiancias de 50 (■), 100 (●), 150 (▲), 200 (▼) y 250 (◆) $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

La tasa de crecimiento de *Nitzschia thermalis* f. *curta* mostró diferencias significativas por efecto de la irradiancia ($F=27.07$, $P=0.00$). Los mayores valores de la tasa de crecimiento se presentaron en el tratamiento de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (1.35 ± 0.10 divisiones día⁻¹) y de $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (1.28 ± 0.06 divisiones día⁻¹). El tiempo de generación mostró diferencias significativas entre las distintas irradiancias ($F=16.59$, $P=0.00$). Los mayores valores del tiempo de generación se registraron en la irradiancia de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (1.31 ± 0.21 días) y $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (1.26 ± 0.08 días) (Figura 5).

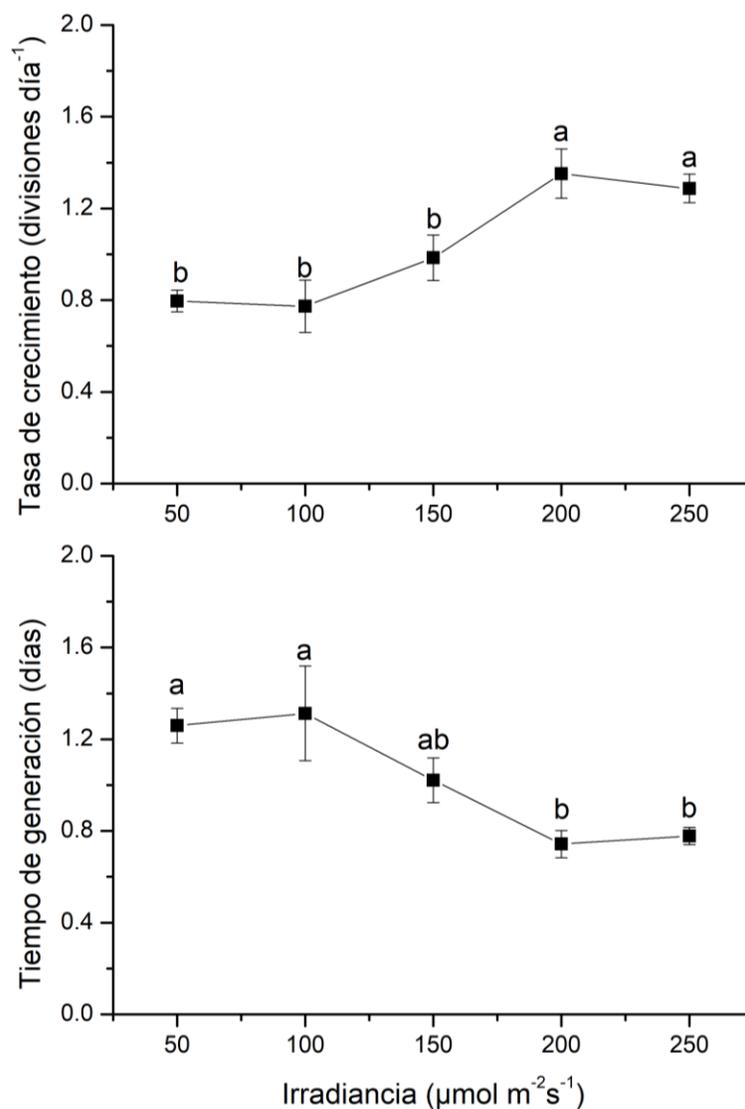


Figura 5. Valores promedio y desviación estándar de la tasa de crecimiento (divisiones día⁻¹) y el tiempo de generación (días) durante la fase exponencial de cultivos de *Nitzschia thermalis* f. *curta* mantenidos en irradiancias de 50, 100, 150, 200 y $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey, $\alpha=0.05$. Letras distintas indican diferencias significativas por efecto de la irradiancia ($a>b$).

Los cultivos de *Amphora helenensis* mostraron diferencias significativas en la tasa de crecimiento por efecto de la irradiancia ($F=4.93$, $P=0.01$) y los mayores valores se registraron en el tratamiento de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (1.078 ± 0.122 divisiones día⁻¹). El tiempo de generación expuso diferencias significativas por efecto de la irradiancia ($F=4.99$, $P=0.01$), los valores mayores se presentaron en la irradiancia de $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (1.57 ± 0.36 días) (Figura 6).

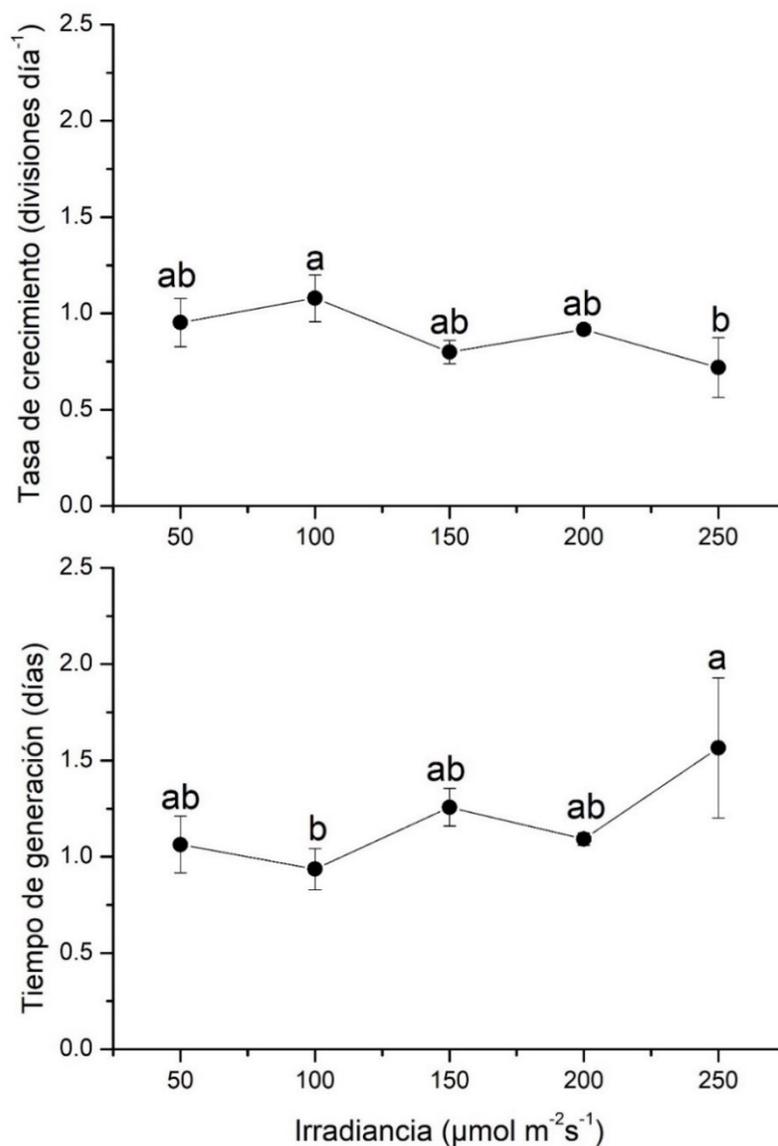


Figura 6. Valores promedio y desviación estándar de la tasa de crecimiento (divisiones día⁻¹) y el tiempo de generación (días) durante la fase exponencial de cultivos de *Amphora helenensis* mantenidos en irradiancias de 50, 100, 150, 200 y 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey, $\alpha=0.05$. Letras distintas indican diferencias significativas por efecto de la irradiancia ($a>b$).

El largo de las células de los cultivos de *Nitzschia thermalis* f. *curta* no mostró diferencias significativas por efecto de la irradiancia ($F=2.36$, $P=0.05$) y tampoco por la fase de crecimiento ($F=3.77$, $P=0.5$). Los valores mayores de largo celular se registraron en los tratamientos de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($21.83 \pm 2.19 \mu\text{m}$), $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($21.95 \pm 2.20 \mu\text{m}$) y $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($21.86 \pm 2.16 \mu\text{m}$) en la fase estacionaria pero no fueron significativos. El ancho de las células en *Nitzschia thermalis* f. *curta* no mostró diferencias significativas por efecto de irradiancia ($F=0.45$, $P=0.77$) y por fase de crecimiento ($F=2.65$, $P=0.10$) (Figura 7).

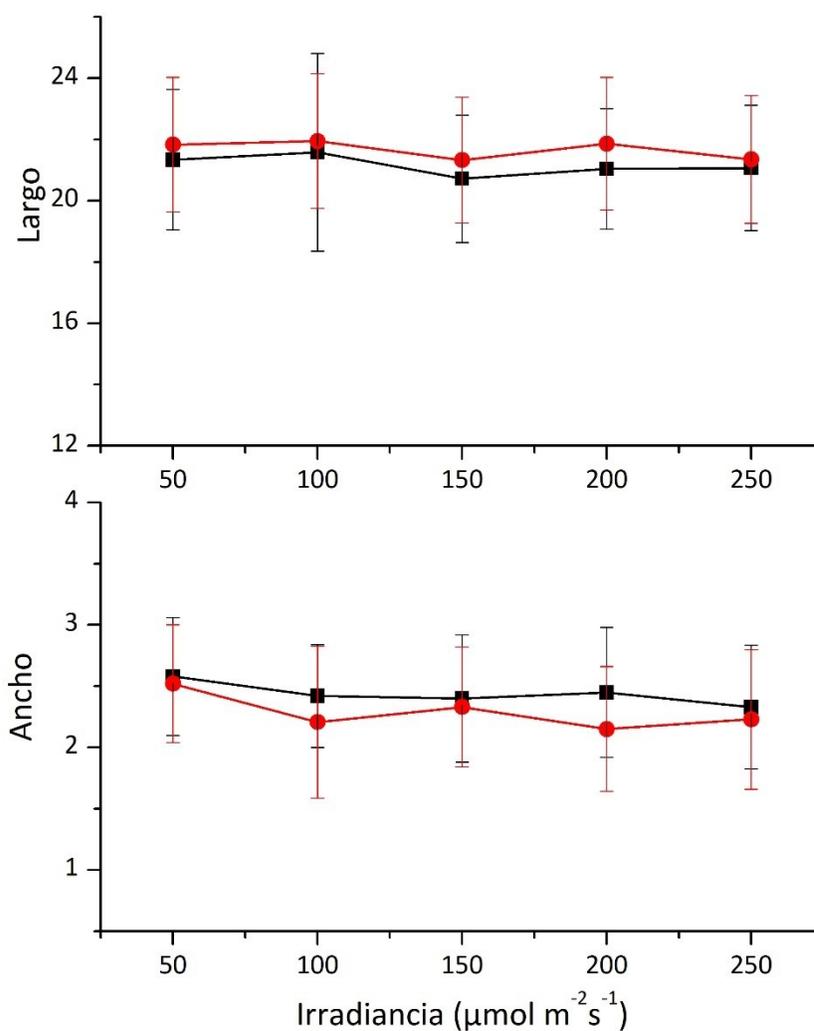


Figura 7. Valores promedio y desviación estándar del largo y ancho de las células (μm) de cultivos de *Nitzschia thermalis* f. *curta* mantenidos en irradiancias de 50, 100, 150, 200 y 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante la fase exponencial (■) y estacionaria (●) del crecimiento.

El largo de las células en los cultivos de *Amphora helenensis* no mostró diferencias significativas por efecto de la irradiancia ($F= 12.18$, $P=0.05$) y tampoco por las fases de crecimiento $F=0.06$, $P=0.80$). Respecto al ancho de las células de *Amphora helenensis* no se mostraron diferencias significativas por efecto de las fases de crecimiento ($F=1.85$, $P=0.17$) ni de irradiancia ($F= 1.65$, $P=0.16$) (Figura 8).

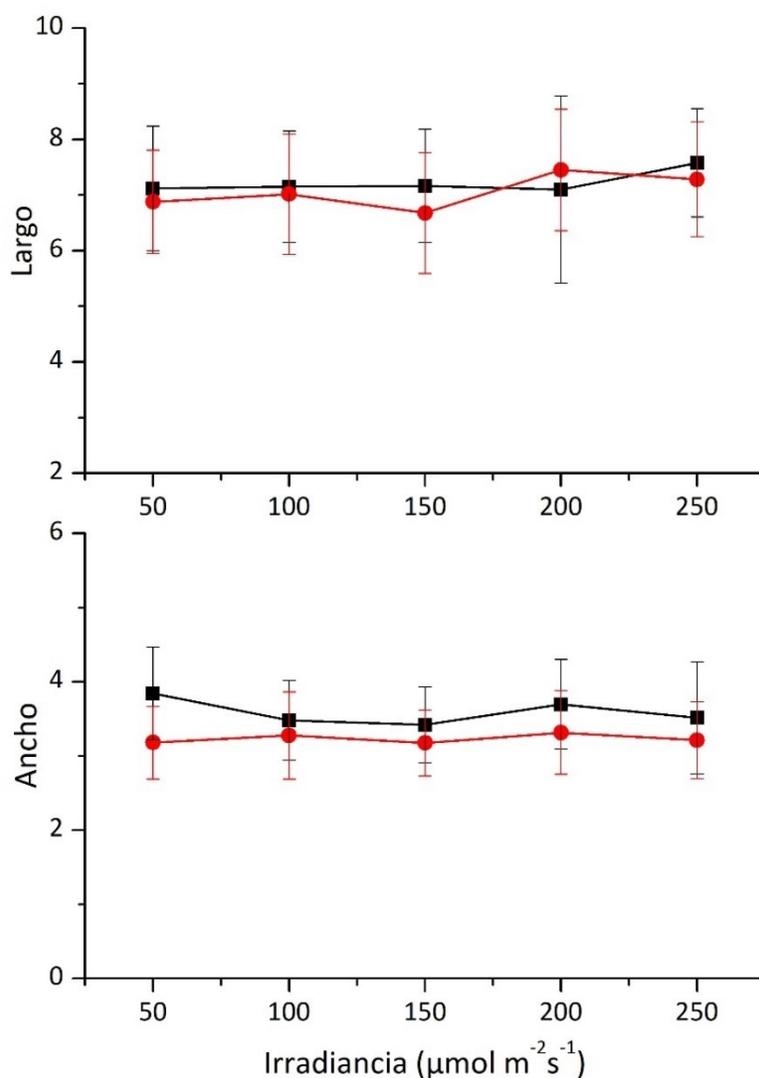


Figura 8. Valores promedio y desviación estándar del largo y ancho de las células (μm) de cultivos de *Amphora helenensis* mantenidos en irradiancias de 50, 100, 150, 200 y 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante la fase exponencial (■) y estacionaria (●) del crecimiento.

3.2 Peso seco, contenido de cenizas y peso orgánico

Para los valores de peso seco total obtenidos para *Nitzschia thermalis* f. *curta* se observan diferencias significativas por efecto de las fases de crecimiento ($F= 474.88$, $P=0.00$) y de la irradiancia ($F= 474.88$, $P=0.00$). Los valores mayores de peso seco total se registraron en la irradiancia de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la fase estacionaria ($298.33 \pm 5.89 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Figura 9).

Los valores de peso de cenizas obtenidos de *Nitzschia thermalis* f. *curta* expusieron diferencias significativas por efecto de las fases de crecimiento ($F= 245.98$, $P=0.00$) y la irradiancia ($F=51.34$, $P=0.00$), mostrando los mayores valores en los tratamientos de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($211.89 \pm 2.11 \mu\text{g mL}^{-1}$) y $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($211.44 \pm 3.67 \mu\text{g mL}^{-1}$) en la fase estacionaria (Figura 9).

En los valores de peso seco orgánico de *Nitzschia thermalis* f. *curta* se mostraron diferencias significativas por efecto de las fases de crecimiento ($F= 42.84$, $P=0.00$) y nivel de irradiancia ($F= 1018.33$, $P=0.00$). Los valores mayores se encontraron durante la fase estacionaria en la irradiancia de $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($86.89 \pm 2.22 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Figura 9).

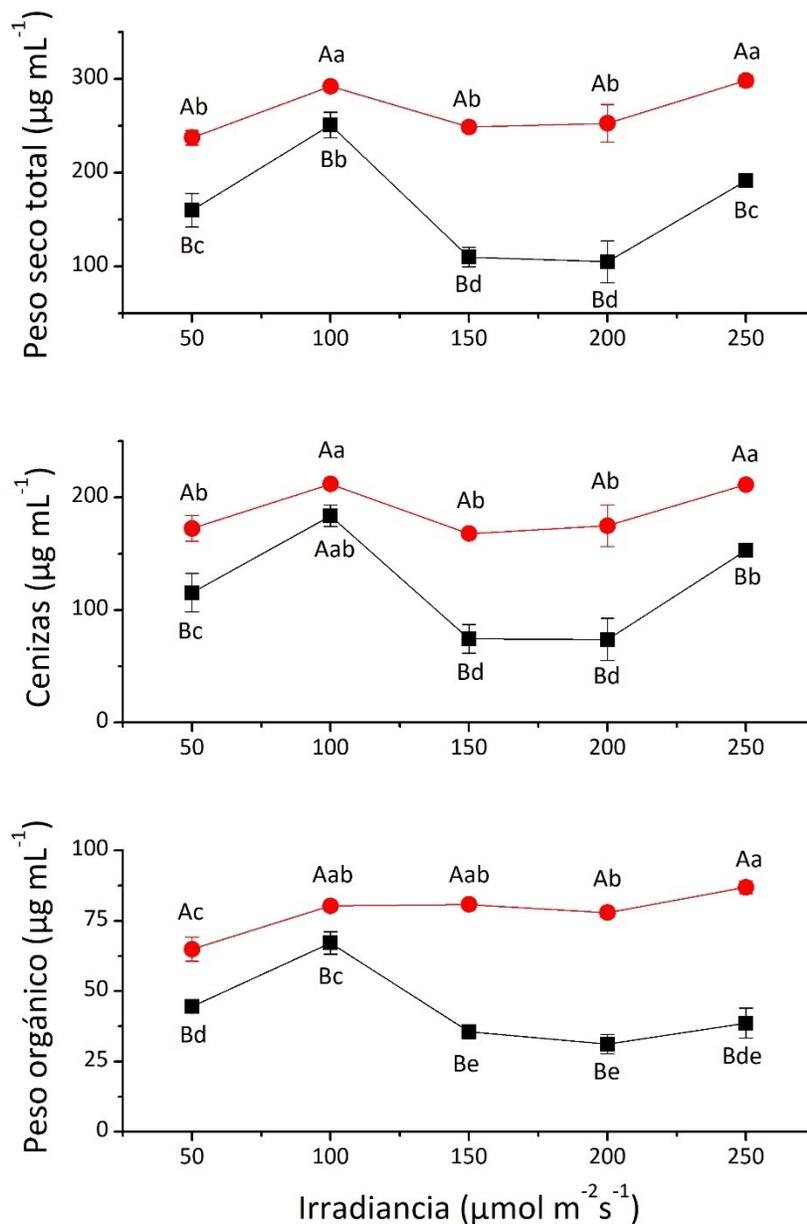


Figura 9. Valores promedio y desviación estándar de peso seco total, peso de cenizas y peso orgánico de cultivos de *Nitzschia thermalis* f. *curta* mantenidos en irradiancias de 50, 100, 150, 200 y 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante la fase exponencial (■) y estacionaria (●) del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey, $\alpha=0.05$. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas por efecto de la irradiancia (a>b>c>d>e). Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas por efecto de la fase de crecimiento (A>B).

En los cultivos de *Amphora helenensis* se obtuvieron valores de peso seco total significativamente diferentes por efecto de la fase de crecimiento ($F=66.88$, $P=0.00$), mostrando los mayores valores en la fase estacionaria (Figura 10); sin embargo, no se encontraron diferencias significativas para esta especie por efecto de la irradiancia ($F=2.60$, $P=0.05$).

Los valores del peso de cenizas en *Amphora helenensis* no mostraron diferencias significativas por efecto de las fases de crecimiento ($F=0.16$, $P=0.68$) y el nivel de irradiancia ($F=1.33$, $P=0.29$).

El peso seco orgánico de los cultivos de *Amphora helenensis* mostró diferencias significativas por efecto de la fase de crecimiento ($F=82.85$, $P=0.00$) pero no por efecto de la irradiancia ($F=2.73$, $P=0.05$). Los mayores valores de peso seco orgánico para esta especie se presentaron en la fase de crecimiento estacionaria (Figura 10).

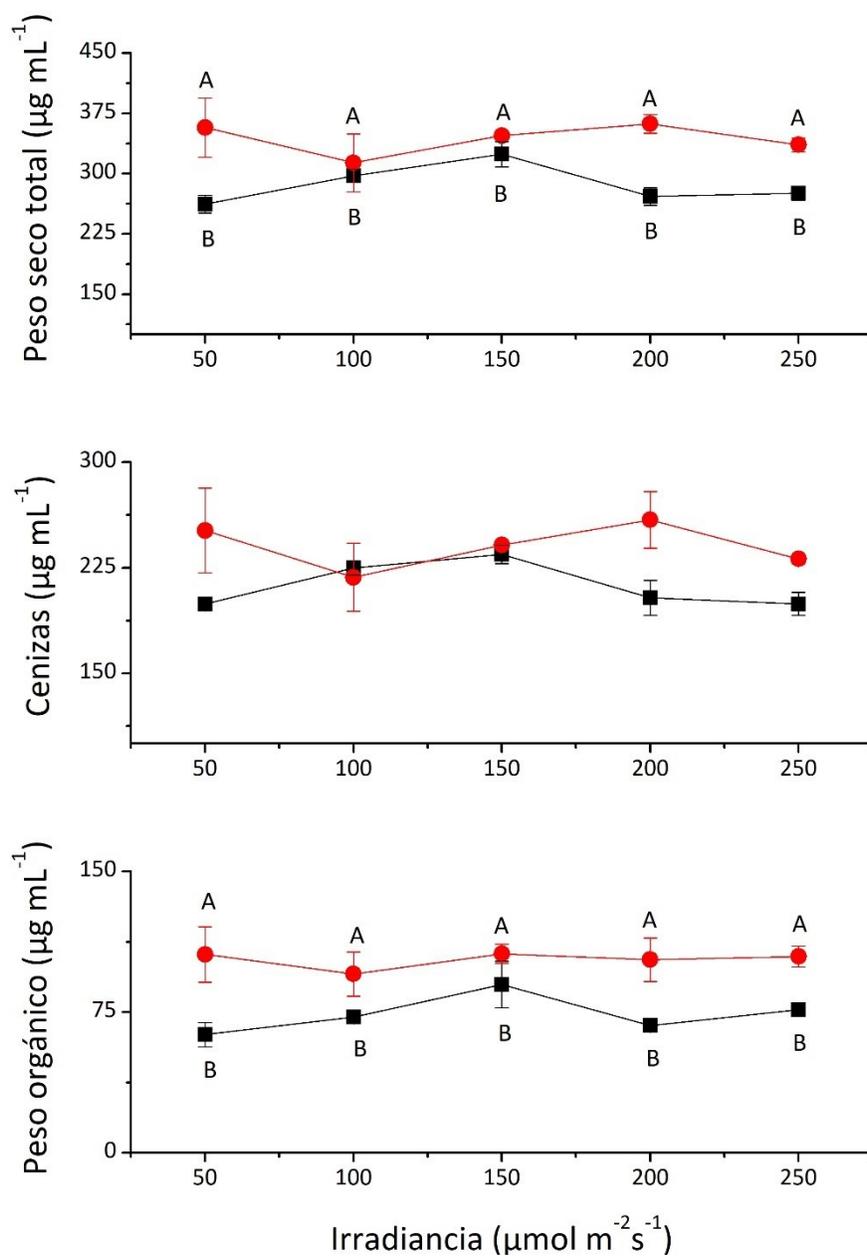


Figura 10. Valores promedio y desviación estándar de peso seco total, peso de cenizas y peso seco orgánico de cultivos de *Amphora helenensis* mantenidos en irradiancias de 50, 100, 150, 200 y 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante la fase exponencial (■) y estacionaria (●) del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey, $\alpha=0.05$. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas por efecto de la irradiancia. Números distintos indican diferencias significativas por efecto de la fase de crecimiento (A>B).

3.3 Composición proximal

El porcentaje de proteínas de *Nitzschia thermalis* f. *curta* mostró diferencias significativas por efecto de la irradiancia ($F= 68.96$, $P=0.00$), al igual que por efecto de la fase de crecimiento ($F= 1812$, $P=0.00$). Los mayores porcentajes de proteínas se presentaron en el tratamiento de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la fase estacionaria ($29.14 \pm 0.84\%$) (Figura 11).

El contenido de carbohidratos de *Nitzschia thermalis* f. *curta* expuso diferencias significativas por efecto de la irradiancia y por la fase de crecimiento (Interacción irradiancia*fase de crecimiento, $F=71.02$, $P=0.00$). El tratamiento de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de la fase exponencial ($18 \pm 0.87\%$) mostró los valores mayores de porcentaje de carbohidratos para esta especie (Figura 11).

El contenido de lípidos en el cultivo de *Nitzschia thermalis* f. *curta* presentó diferencias significativas por efecto de la irradiancia y la fase de crecimiento (Interacción irradiancia*fase de crecimiento, $F=27.76$, $P=0.00$). La mayor producción de lípidos se registró en las irradiancias de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($41.90 \pm 3.85\%$) y $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($34.86 \pm 5.02\%$) en la fase exponencial (Figura 11).

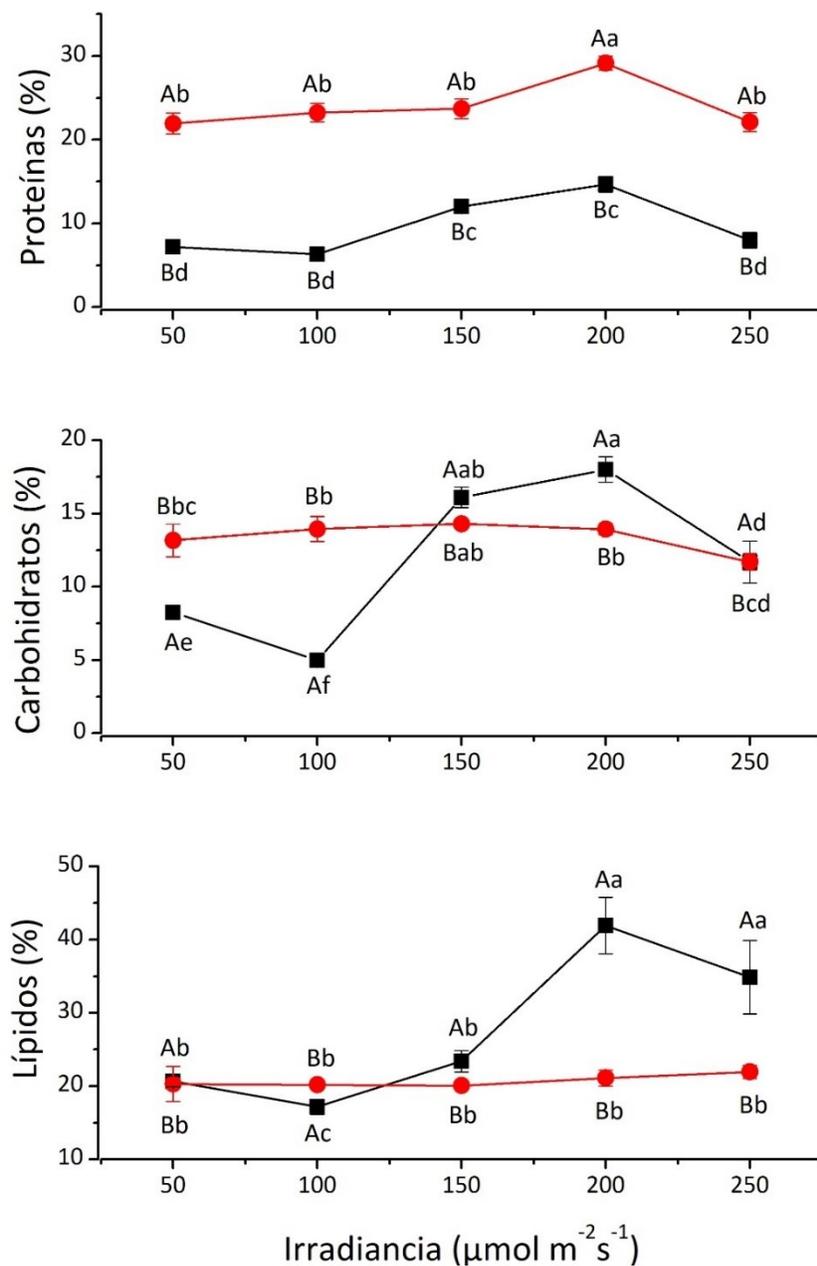


Figura 11. Valores promedio y desviación estándar del contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos (%) de cultivos de *Nitzschia thermalis* f. *curta* mantenidos en irradiancias de 50, 100, 150, 200 y 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante la fase exponencial (■) y estacionaria (●) del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey, $\alpha=0.05$. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas por efecto de la irradiancia ($a>b>c>d>e>f$). Letras mayúsculas indican diferencias significativas por efecto de la fase de crecimiento ($A>B$).

En los cultivos de *Amphora helenensis* se obtuvieron valores de porcentaje de proteínas significativamente diferentes por efecto de la irradiancia ($F= 8.12$, $P=0.00$) y fase de crecimiento ($F= 767.16$, $P=0.00$). Los tratamientos de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($10.57 \pm 0.62\%$) y $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($9.66 \pm 0.58\%$) en la fase estacionaria mostraron los porcentajes mayores de proteínas para esta especie (Figura 12).

En el cultivo de *Amphora helenensis* el contenido de carbohidratos mostró diferencias significativas por efecto de la irradiancia y por la fase de crecimiento (Interacción irradiancia*fase de crecimiento, $F=16.59$, $P=0.00$). El mayor contenido de carbohidratos se registró en la irradiancia de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($8.24 \pm 0.84\%$) en la fase estacionaria (Figura 12).

En el cultivo de *Amphora helenensis* se evaluaron diferencias significativas en los porcentajes de lípidos por efecto de la irradiancia ($F=8.45$, $P=0.00$) y la fase de crecimiento ($F= 297.90$, $P=0.00$). La mayor producción de lípidos para esta especie se registró en la irradiancia de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($22.57 \pm 2.95\%$) en la fase exponencial (Figura 12).

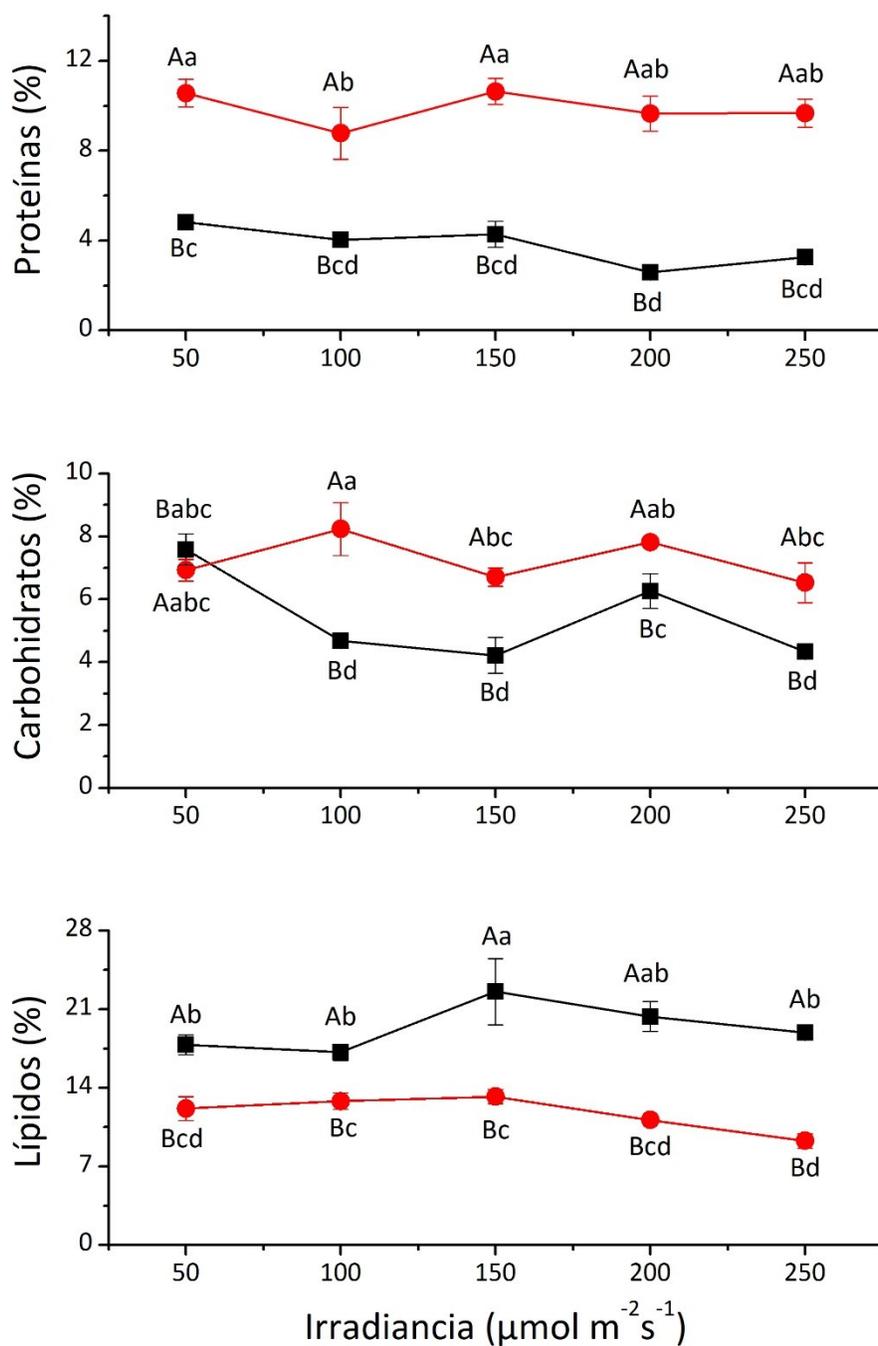


Figura 12. Valores promedio y desviación estándar del contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos (%) de cultivos de *Amphora helenensis* mantenidos en irradiancias de 50, 100, 150, 200 y 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante la fase exponencial (■) y estacionaria (●) del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey, $\alpha=0.05$. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas por efecto de la irradiancia ($a>b>c>d$). Letras mayúsculas indican diferencias significativas por efecto de la fase de crecimiento $A>B$).

3.4 Pigmentos

El contenido de clorofila *a* de *Nitzschia thermalis* f. *curta* se modificó significativamente por efecto de la irradiancia ($F=39.90$, $P=0.00$) y por la fase de crecimiento ($F=1807.50$, $P=0.00$). La mayor producción de clorofila *a* para esta especie se presentó en la irradiancia de $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en la fase estacionaria ($386.27 \pm 33.98 \mu\text{g L}^{-1}$) (Figura 13).

La clorofila *c* de *Nitzschia thermalis* f. *curta* mostró diferencias significativas por efecto de la irradiancia ($F=37.81$, $P=0.00$) y por la fase de crecimiento ($F=4708.66$, $P=0.00$). Los mayores valores de clorofila *c* se presentaron en los tratamientos de $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($75.64 \pm 0.35 \mu\text{g L}^{-1}$), $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($64.08 \pm 13.58 \mu\text{g L}^{-1}$) y $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($51.81 \pm 16.56 \mu\text{g L}^{-1}$) en la fase estacionaria (Figura 13).

El contenido de carotenos en el cultivo de *Nitzschia thermalis* f. *curta* mostró diferencias significativas por efecto de la irradiancia ($F=8.81$, $P=0.00$) y por la fase de crecimiento ($F=1808.19$, $P=0.00$). Los valores mayores de carotenos se presentaron en la irradiancia de $250 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en la fase estacionaria ($177 \pm 1.94 \mu\text{g L}^{-1}$) (Figura 13).

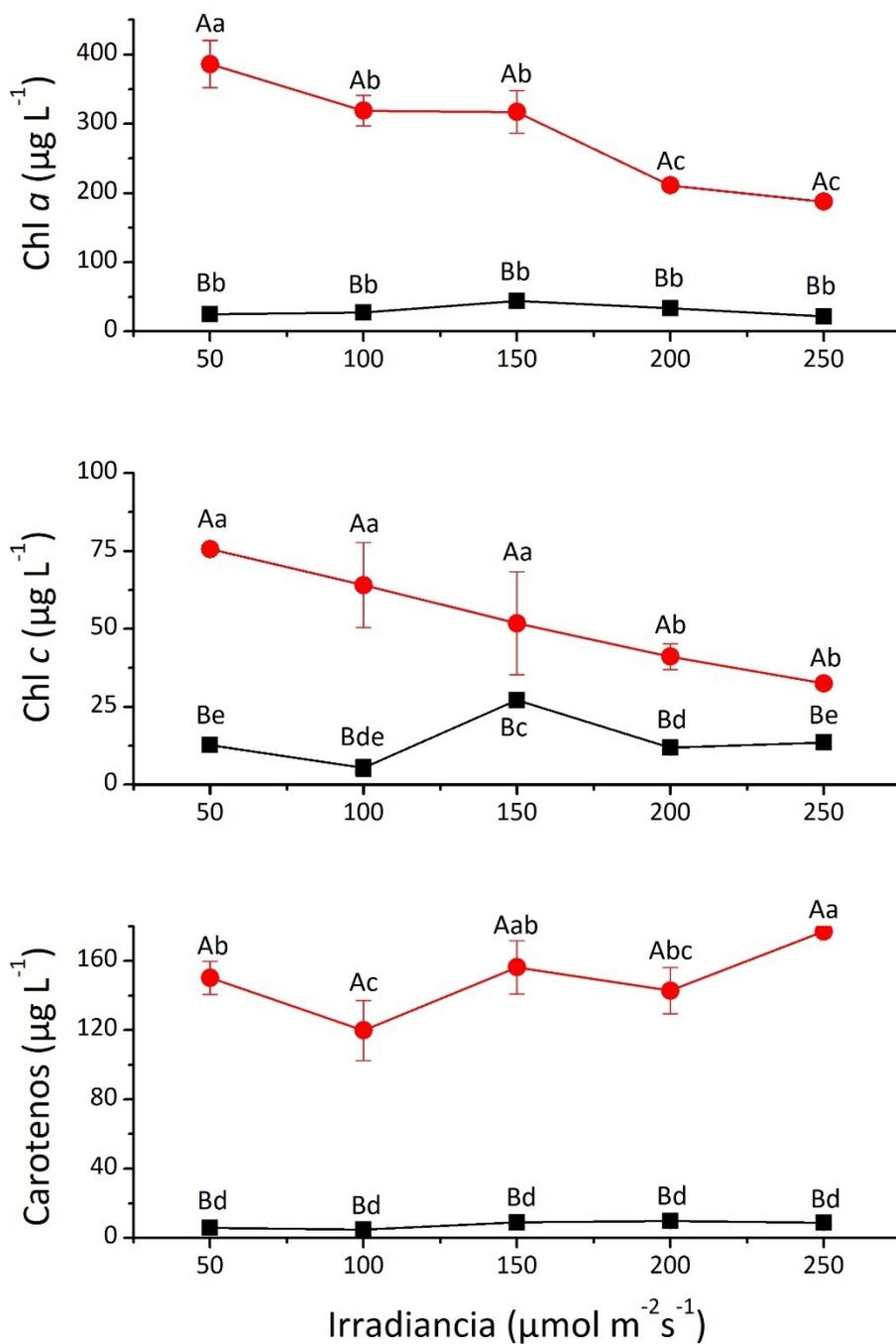


Figura 13. Valores promedio y desviación estándar del contenido de clorofila *a*, clorofila *c* y carotenos de cultivos de *Nitzschia thermalis* f. *curta* mantenidos en irradiancias de 50, 100, 150, 200 y 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante la fase exponencial (■) y estacionaria (●) del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey, $\alpha=0.05$. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas por efecto de la irradiancia ($a>b>c>d>e$). Letras mayúsculas indican diferencias significativas por efecto de la fase de crecimiento ($A>B$).

En el cultivo de *Amphora helenensis* el contenido de clorofila *a* presentó diferencias significativas por efecto de la irradiancia ($F=5.84$, $P=0.00$) y la fase de crecimiento ($F=1.71$, $P=0.00$). Los mayores valores de clorofila *a* para esta especie se obtuvieron en la irradiancia de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la fase estacionaria ($314 \pm 11.81 \mu\text{g L}^{-1}$) (Figura 14).

El contenido de clorofila *c* mostró diferencias significativas por efecto de la irradiancia y la fase de crecimiento (Irradiancia*fase de crecimiento, $F=14.56$, $P=0.00$). Los valores mayores de clorofila *c*, se obtuvieron en la irradiancia de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la fase estacionaria ($155 \pm 44.84 \mu\text{g L}^{-1}$) (Figura 14).

El contenido de carotenos expuso diferencias significativas por efecto de la irradiancia ($F=43.43$, $P=0.00$), fase de crecimiento ($F=788.301$, $P=0.00$). El tratamiento de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la fase estacionaria ($113.57 \pm 12.4 \mu\text{g L}^{-1}$) mostró los valores mayores de contenido de carotenos para esta especie (Figura 14).

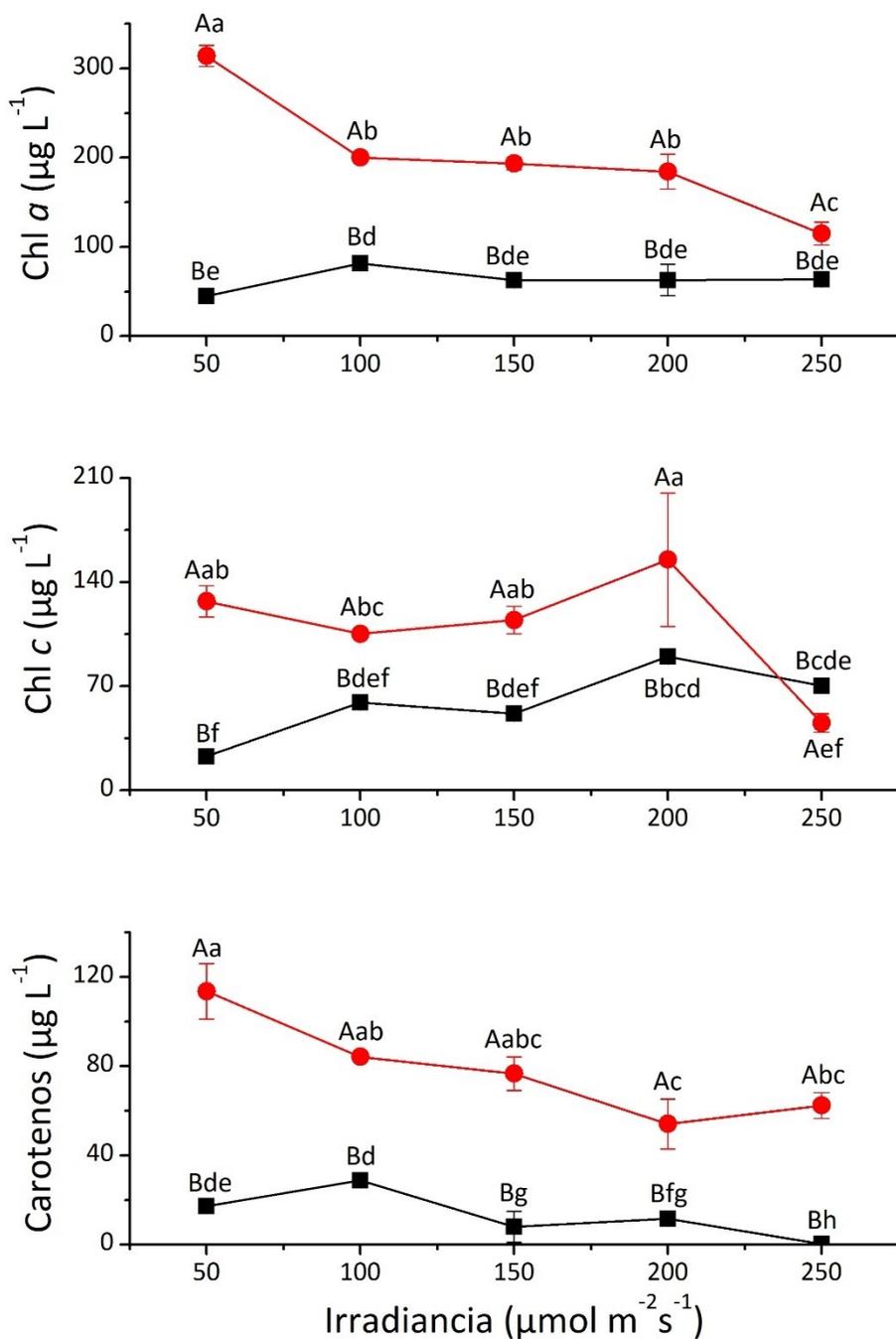


Figura 14. Valores promedio y desviación estándar del contenido de clorofila *a*, clorofila *c* y carotenos de cultivos de *Amphora helenensis* mantenidos en irradiancias de 50, 100, 150, 200 y 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante la fase exponencial (■) y estacionaria (●) del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey, $\alpha=0.05$. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas por efecto de la irradiancia ($a>b>c>d>e>f>h$). Letras mayúsculas indican diferencias significativas por efecto de la fase de crecimiento ($A>B$).

3.5 Eficiencia lumínica de la fotosíntesis

La eficiencia fotosintética (α) en el cultivo de *Nitzschia thermalis* f. *curta* presentó diferencias significativas por efecto de la irradiancia y la fase de crecimiento (Interacción irradiancia*fase de crecimiento, $F=42.64$, $P=0.00$). Los valores mayores de α se obtuvieron en el tratamiento de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la fase exponencial ($0.176 \pm 0.008 \mu\text{mol m}^{-3} \text{h}^{-1}$) (Figura 15).

El índice de saturación lumínica (I_k) de *Nitzschia thermalis* f. *curta* mostró diferencias significativas por efecto de la irradiancia y la fase de crecimiento (Irradiancia*fase de crecimiento, $F=77.35$, $P=0.00$). Los valores mayores de I_k se registraron en la fase exponencial en la irradiancia de $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($1414.22 \pm 77.4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Figura 15).

En el cultivo de *Nitzschia thermalis* f. *curta* la eficiencia cuántica (F_v/F_m) no mostró diferencias significativas por efecto de la fase de crecimiento ($F=0.69$, $P=0.41$), sin embargo, si se presentaron diferencias significativas por efecto de la irradiancia (Interacción irradiancia*fase de crecimiento, $F=14.22$, $P=0.00$). Los valores mayores de F_v/F_m se registraron en la fase estacionaria en el tratamiento de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (0.674 ± 0.01) (Figura 15).

La tasa máxima de transporte de electrones (ETR_{max}) de *Nitzschia thermalis* f. *curta* mostró diferencias significativas por efecto de la irradiancia ($F=95.16$, $P=0.00$) y la fase de crecimiento ($F=874.35$, $P=0.00$). Los valores mayores de ETR_{max} para esta especie se registraron en la fase exponencial en los tratamientos de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (166.9 ± 47.6) y $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (155.6).

En la tasa de transporte de electrones (ETR) de *Nitzschia thermalis* f. *curta* se mostraron diferencias significativas por efecto de la irradiancia ($F=16.59$, $P=0.00$) donde los valores mayores se presentaron en la irradiancia de $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la fase exponencial y en $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la fase estacionaria (Figura 16).

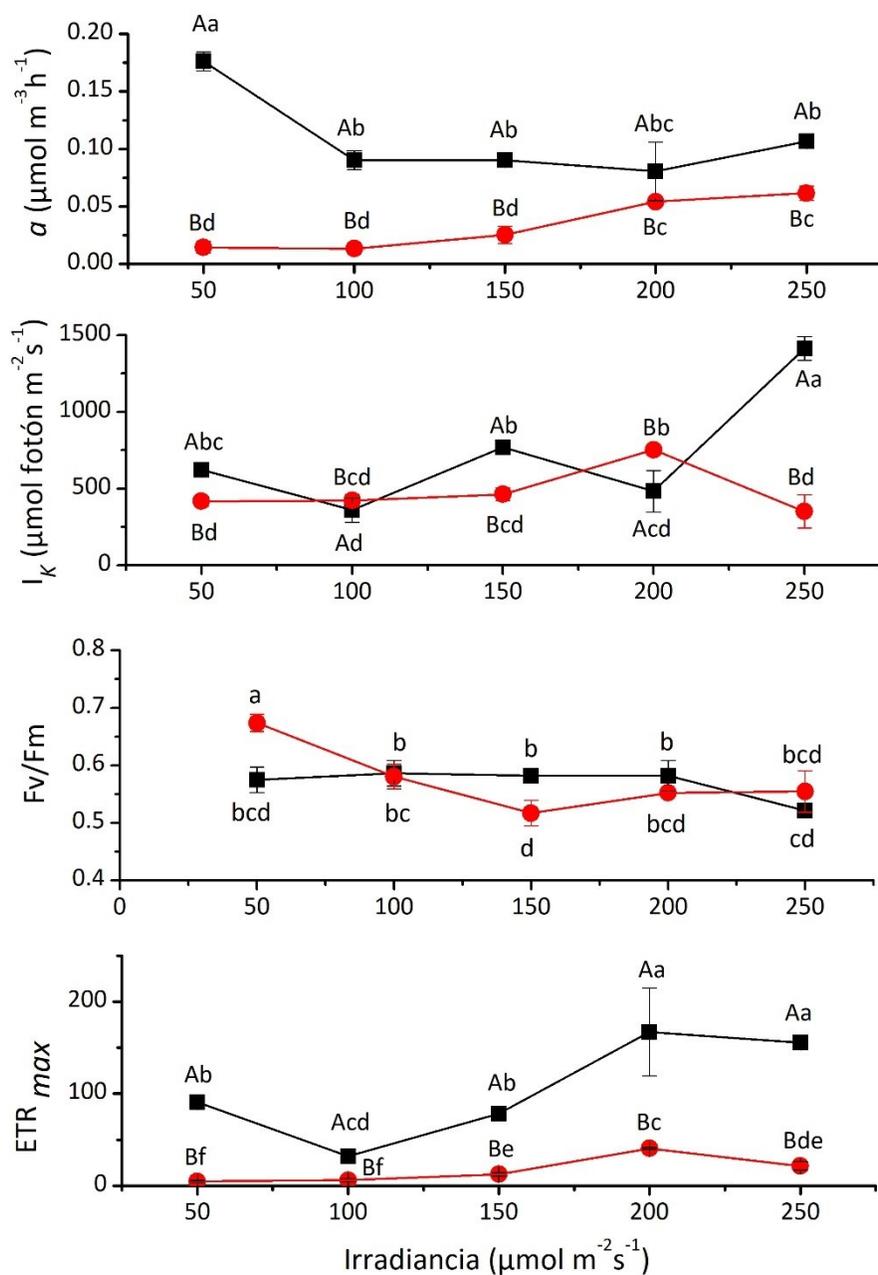


Figura 15. Valores promedio y desviación estándar de parámetros fotosintéticos de la fase exponencial (■) y estacionaria (●) de cultivos de *Nitzschia thermalis f. curta* mantenidos a diferentes niveles de irradiancia (50, 100, 150, 200 y 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$). Eficiencia fotosintética (α : $\mu\text{mol m}^{-3} \text{h}^{-1}$); índice de saturación lumínica (I_k : $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$); eficiencia cuántica (F_v/F_m); tasa máxima de transporte de electrones (ETR_{max}). Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey, $\alpha=0.05$. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas por efecto de la irradiancia ($a>b>c>d>e>f$). Letras mayúsculas indican diferencias significativas por efecto de la fase de crecimiento ($A>B$).

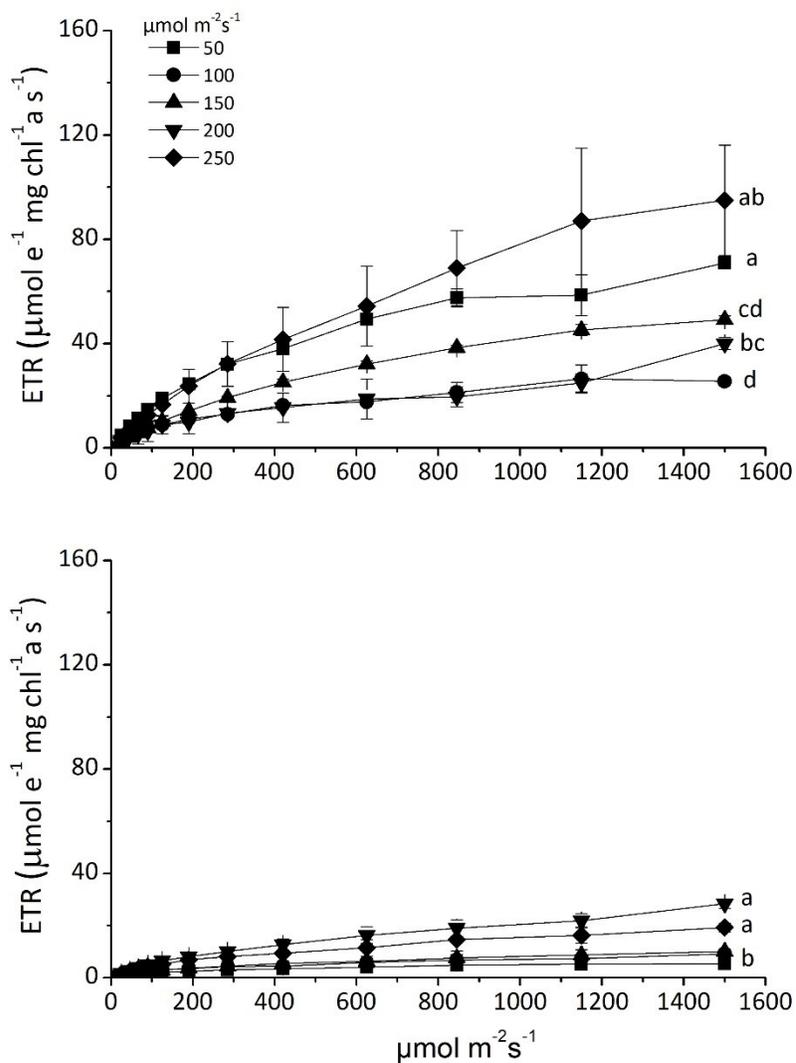


Figura 16. Valores promedio y desviación estándar de la tasa de transporte de electrones (ETR) de la fase exponencial y estacionaria de cultivos de *Nitzschia thermalis f. curta* mantenidos a diferentes niveles de irradiancia (50, 100, 150, 200 y 250 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$). Análisis de covarianza y prueba *a posteriori* de Tukey, $\alpha=0.05$. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas por efecto de la irradiancia ($a>b$).

La eficiencia fotosintética (α) en el cultivo de *Amphora helenensis* presentó diferencias significativas por efecto de la irradiancia y la fase de crecimiento (Interacción irradiancia*fase de crecimiento $F=254.05$, $P=0.00$). Los valores mayores de α se obtuvieron en el tratamiento de 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($2.99 \pm 0.008 \mu\text{mol m}^{-3}\text{h}^{-1}$) en la fase exponencial (Figura 17).

El índice de saturación lumínica (I_k) de *Amphora helenensis* mostró diferencias significativas por efecto de la irradiancia y la fase de crecimiento (Interacción irradiancia*fase de crecimiento $F=14.29$, $P=0.00$). Los valores mayores de I_k se obtuvieron en la irradiancia de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la fase exponencial ($2292 \pm 228.40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Figura 17).

La eficiencia cuántica (F_v/F_m) no presentó diferencias significativas por efecto de la fase de crecimiento ($F=0.35$, $P=0.55$) sin embargo, se tuvieron diferencias significativas por efecto de la irradiancia e interacción (irradiancia*fase de crecimiento $F=254.05$, $P=0.00$). Los valores mayores de F_v/F_m se registraron en el tratamiento de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la fase exponencial (0.546 ± 0.02) y estacionaria (0.526 ± 0.02) (Figura 17).

La tasa máxima de transporte de electrones (ETR_{max}) de *Amphora helenensis* mostró diferencias significativas por efecto de la irradiancia y la fase de crecimiento (Interacción irradiancia*fase de crecimiento $F=29.55$, $P=0.00$). Los valores mayores de ETR_{max} para esta especie se registraron en la fase exponencial en la irradiancia de $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (347 ± 51.20) (Figura 17).

La tasa de transporte de electrones (ETR) para esta especie presentó diferencias significativas por efecto de la irradiancia (Exponencial $F=19.79$, $P=0.00$, estacionaria $F=39.22$, $P=0.00$), donde los valores mayores se mostraron en el tratamiento de $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de la fase exponencial y en los tratamientos de $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de la fase estacionaria (Figura 18).

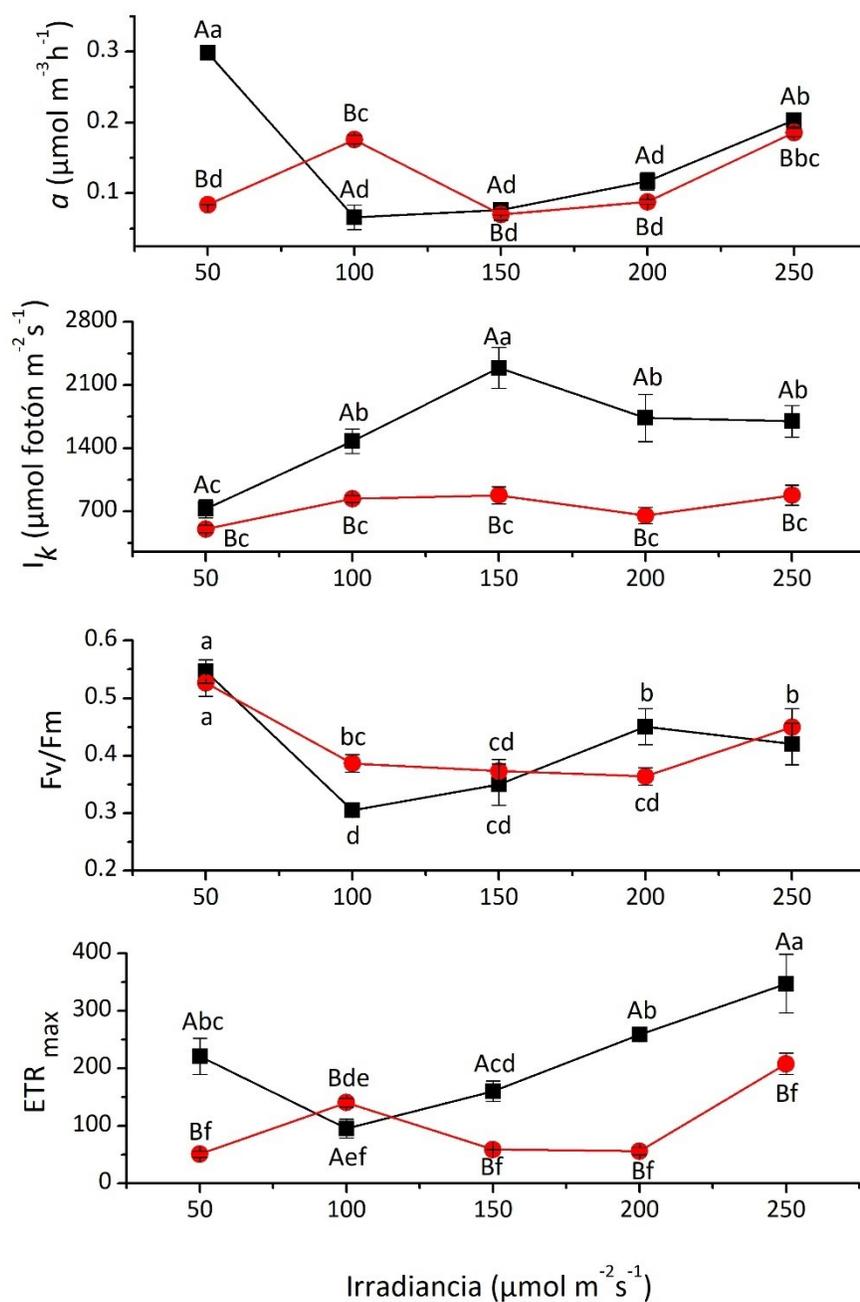


Figura 17. Valores promedio y desviación estándar de parámetros fotosintéticos de la fase exponencial (■) y estacionaria (●) de cultivos de *Amphora helenensis* mantenidos a diferentes niveles de irradiancia (50, 100, 150, 200 y 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$). Eficiencia fotosintética (α : $\mu\text{mol m}^{-3} \text{h}^{-1}$); índice de saturación lumínica (I_k : $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$); eficiencia cuántica (Fv/Fm); tasa máxima de transporte de electrones (ETR_{max}). Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey, $\alpha=0.05$. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas por efecto de la irradiancia (a>b>c>d>e>f). Letras mayúsculas indican diferencias significativas por efecto de la fase de crecimiento (A>B).

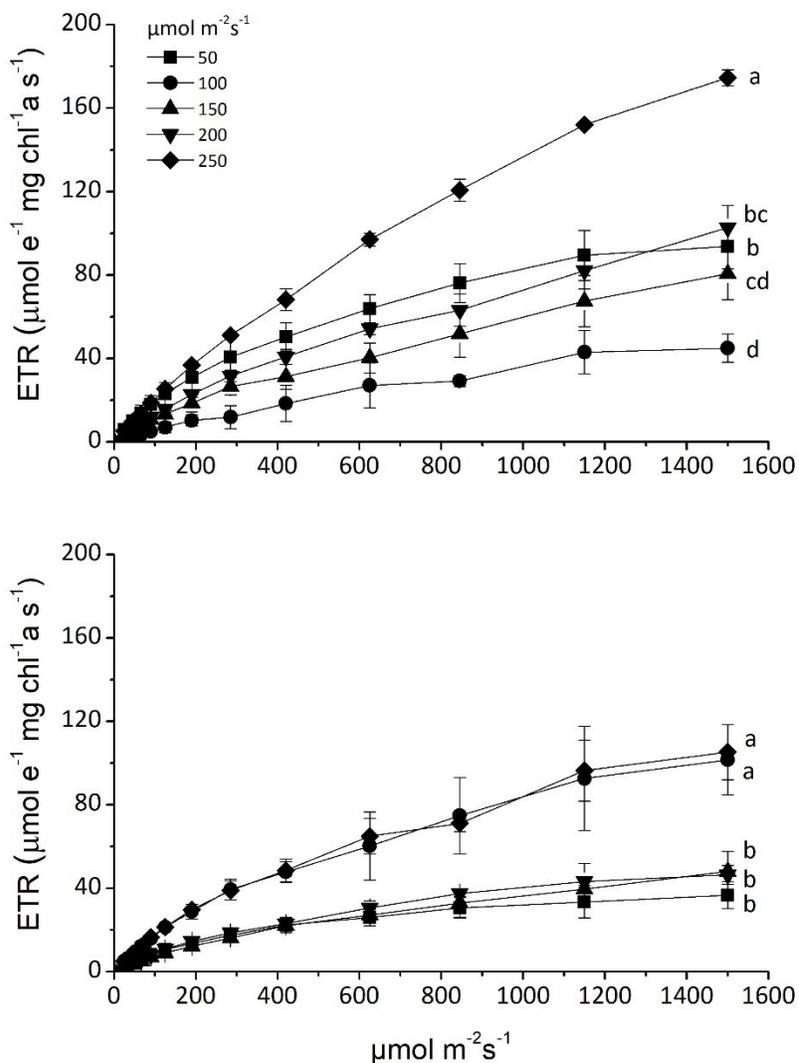


Figura 18. Valores promedio y desviación estándar de la tasa de transporte de electrones (ETR) de la fase exponencial y estacionaria de cultivos de *Amphora helenensis* mantenidos a diferentes niveles de irradiancia (50, 100, 150, 200 y 250 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$). Análisis de covarianza y prueba *a posteriori* de Tukey, $\alpha=0.05$. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas por efecto de la irradiancia ($a>b$).

3.6 Ácidos grasos

La mayor concentración de ácidos grasos saturados (SFA) para *Nitzschia thermalis* f. *curta* fue en el ácido graso C16:0 para todos los tratamientos y los valores mayores se presentaron en la irradiancia de 200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (27.92%) y de 250 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (28.55%) en la fase exponencial, sin embargo, no hubo diferencias significativas por efecto de la irradiancia ($P=0.85$), pero sí, por la fase de crecimiento ($P=0.00$).

Tabla 1. Porcentaje del total de ácidos grasos identificados en cultivos de *Nitzschia thermalis* f. *curta* con cinco niveles de irradiancia (50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en la fase exponencial y estacionaria. Dónde: nd= no detectado. SFA= ácidos grasos saturados. MUFA= ácidos grasos monoinsaturados. PUFA= ácidos grasos poliinsaturados. Prueba Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$. Letras minúsculas diferentes en superíndice indican diferencias significativas por efecto de irradiancia (a>b). Letras mayúsculas diferentes en superíndice indican diferencias significativas por efecto de fase de crecimiento (A>B).

| Ácido graso | Exponencial | | | | | Estacionaria | | | | |
|--------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 |
| SFA | | | | | | | | | | |
| C6:0 | 0.14 ^A | nd | 0.05 ^A | 0.12 ^A | 0.07 ^A | 0.03 ^B | 0.03 ^B | 0.02 ^B | 0.03 ^B | 0.04 ^B |
| C8:0 | 0.03 ^B | nd | 0.01 ^B | 0.02 ^B | 0.01 ^B | 0.05 ^A | 0.04 ^A | 0.05 ^A | 0.03 ^A | 0.04 ^A |
| C10:0 | nd | nd | 0.02 ^B | 0.01 ^B | 0.01 ^B | 3.67 ^A | 2.34 ^A | 1.24 ^A | 3.35 ^A | 2.35 ^A |
| C11:0 | 0.08 | 0.04 | 0.05 | 0.04 | 0.04 | 0.01 | 0.03 | 0.01 | 0.01 | nd |
| C12:0 | 0.31 ^A | 0.20 ^A | 0.15 ^A | 0.13 ^A | 0.07 ^A | 0.05 ^B | 0.05 ^B | 0.04 ^B | 0.12 ^B | 0.04 ^B |
| C13:0 | 4.31 ^B | 0.71 ^B | 1.50 ^B | 0.92 ^B | 0.12 ^B | 5.97 ^A | 5.40 ^A | 4.84 ^A | 6.36 ^A | 7.38 ^A |
| C14:0 | 4.85 ^A | 4.90 ^A | 4.37 ^A | 3.75 ^A | 2.95 ^A | 3.31 ^B | 3.28 ^B | 3.41 ^B | 3.29 ^B | 3.75 ^B |
| C15:0 | 0.58 ^{ab} | 0.62 ^{ab} | 0.59 ^a | 0.46 ^{ab} | 0.46 ^b | 0.46 ^{ab} | 0.54 ^{ab} | 0.63 ^a | 0.55 ^{ab} | 0.44 ^b |
| C16:0 | 19.34 ^A | 25.17 ^A | 25.40 ^A | 27.92 ^A | 28.55 ^A | 17.17 ^B | 17.92 ^B | 17.88 ^B | 17.88 ^B | 17.48 ^B |
| C17:0 | 6.28 ^{Ba} | 2.74 ^{Bab} | 3.83 ^{Bab} | 1.80 ^{Bb} | 1.72 ^{Bab} | 6.99 ^{Aa} | 5.99 ^{Aab} | 4.32 ^{Aab} | 3.61 ^{Ab} | 8.56 ^{Ab} |
| C18:0 | 5.03 | 10.76 | 4.88 | 7.42 | 2.31 | 0.45 | 0.76 | 2.12 | 1.06 | 1.07 |
| C20:0 | 0.45 | 0.72 | nd | 0.20 | 0.08 | 0.03 | 0.23 | 0.14 | 0.41 | 0.42 |
| C21:0 | 2.51 ^B | 1.82 ^B | 2.86 ^B | 2.14 ^B | 2.31 ^B | 4.68 ^A | 5.13 ^A | 5.27 ^A | 4.30 ^A | 4.14 ^A |
| C22:0 | 0.48 ^{ab} | 0.22 ^{ab} | 0.21 ^{ab} | 0.33 ^a | 0.21 ^b | 0.27 ^{ab} | 0.33 ^{ab} | 0.41 ^{ab} | 0.50 ^a | 0.26 ^{ab} |
| C23:0 | 0.33 ^B | 0.29 ^B | 0.21 ^B | 0.15 ^B | 0.14 ^B | 0.31 ^A | 0.47 ^A | 0.32 ^A | 0.51 ^A | 0.35 ^A |
| C24:0 | 0.98 | 0.92 | 0.92 | 1.35 | 1.46 | 1.12 | 1.19 | 1.27 | 1.04 | 0.71 |
| MUFA | | | | | | | | | | |
| C14:1 | 0.08 ^{Aab} | 0.10 ^{Aab} | 0.10 ^{Aab} | 0.09 ^{Aa} | 0.06 ^{Ab} | 0.03 ^{Bab} | 0.06 ^{Bab} | 0.03 ^{Bab} | 0.37 ^{Ba} | nd |
| C15:1 | nd | nd | 0.02 | nd | nd | 0.05 | 0.05 | 0.06 | 0.06 | 0.06 |
| C16:1 | 17.61 | 14.65 | 21.92 | 19.34 | 20.48 | 20.29 | 18.67 | 18.50 | 16.93 | 20.20 |
| C17:1 | 0.61 ^{ab} | 0.41 ^b | 0.35 ^a | 0.30 ^{ab} | 0.76 ^a | 0.08 ^{ab} | 0.73 ^b | 0.13 ^a | 0.81 ^{ab} | 0.12 ^a |
| C24:1 | 0.64 | 0.59 | 0.61 | 0.67 | 0.82 | 0.52 | 0.76 | 0.80 | 0.81 | 0.84 |
| C18:1n9 C | 5.31 | 13.62 | 5.07 | 8.82 | 3.35 | 1.40 | 1.31 | 2.46 | 2.33 | 2.02 |
| C18:1n9 C | 2.86 | nd | 3.27 | 0.34 | nd | 1.96 | 2.47 | 2.57 | 2.31 | 2.14 |
| C18:1n9 T | 0.41 ^A | 4.82 ^A | nd | 2.89 ^A | 3.38 ^A | nd | nd | nd | nd | nd |
| C20:1n9 | nd | 0.67 ^{ab} | nd | nd | 0.07 ^a | 0.15 ^b | 0.21 ^{ab} | 0.33 ^a | 0.41 ^{ab} | 0.18 ^a |
| C22:1n9 | 0.23 ^{ab} | 0.36 ^{ab} | nd | 0.26 ^a | nd | 0.03 ^{ab} | 0.04 ^{ab} | nd | 0.13 ^a | 0.05 ^b |
| PUFA | | | | | | | | | | |
| C18:2n6 C | 0.98 | 0.61 | 0.36 | 1.12 | 1.56 | 0.87 | 0.88 | 1.06 | 1.16 | 1.20 |
| C18:2n6 T | 1.39 | 0.23 | 0.82 | 0.31 | 0.31 | 0.56 | 0.58 | 0.58 | 0.72 | 0.81 |
| C18:3n6 | 1.46 ^B | 0.59 ^B | 0.88 ^B | 0.51 ^B | 0.58 ^B | 1.01 ^A | 0.93 ^A | 0.93 ^A | 0.95 ^A | 0.89 ^A |
| C18:3n3 | 2.57 | 0.16 | 1.35 | 0.82 | 2.53 | 1.46 | 1.70 | 1.69 | 1.70 | 1.67 |
| C20:2n6 | nd | nd | nd | 0.16 ^a | 0.05 ^{ab} | 0.05 ^b | 0.06 ^{ab} | nd | 0.31 ^a | 0.05 ^{ab} |
| C20:3n6 | 0.26 | 0.12 | 0.26 | 0.19 | 0.16 | 0.28 | 0.28 | 0.32 | 0.30 | 0.29 |
| C20:3n3 | 0.57 ^A | 0.12 ^A | 0.20 ^A | 0.15 ^A | 0.05 ^A | 0.03 ^B | 0.04 ^B | nd | 0.09 ^B | nd |
| C20:4n6 ARA | 2.07 ^B | 1.50 ^B | 2.36 ^B | 1.76 ^B | 1.91 ^B | 3.86 ^A | 4.22 ^A | 4.34 ^A | 3.54 ^A | 3.41 ^A |
| C20:5n3 EPA | 15.53 ^B | 10.95 ^B | 15.00 ^B | 13.05 ^B | 20.18 ^B | 18.48 ^A | 18.79 ^A | 18.55 ^A | 19.12 ^A | 16.50 ^A |
| C22:2n6 | 0.04 ^B | 0.07 ^B | nd | nd | nd | 0.09 ^A | 0.14 ^A | 0.17 ^A | 0.13 ^A | 0.09 ^A |
| C22:6n3 DHA | 1.68 ^B | 1.31 ^B | 2.04 ^B | 2.08 ^B | 2.92 ^B | 2.81 ^A | 4.29 ^A | 3.87 ^A | 4.40 ^A | 2.12 ^A |
| ΣSFA | 45.70 | 49.10 | 45.06 | 46.77 | 40.50 | 44.58 | 43.73 | 41.97 | 43.05 | 47.04 |
| ΣMUFA | 27.67 | 35.13 | 31.24 | 32.61 | 28.86 | 24.48 | 24.24 | 24.84 | 23.79 | 25.62 |
| ΣPUFA | 26.55 | 15.67 | 23.26 | 20.15 | 30.26 | 29.50 | 31.93 | 31.52 | 32.42 | 27.03 |

El mayor porcentaje de los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) se presentó en el C16:1, no obstante, no se presentaron diferencias significativas en el ácido graso por efecto de la irradiancia ($P=0.25$) y por la fase de crecimiento ($P=0.25$). No se detectó el contenido del ácido graso C18:1n9 T en la mayoría de las condiciones experimentales y el ácido graso C15:1 en los tratamientos de la fase exponencial.

En los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) la mayor concentración fue en el ácido graso C20:5n3 (EPA) y los valores mayores se presentaron en el tratamiento de $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (20.18%) en la fase exponencial, sin embargo, no se mostraron diferencias significativas por efecto de la irradiancia ($P=0.85$), únicamente de la fase exponencial ($P=0.00$). Se observó la presencia de C20:4n6 (ARA) donde los valores mayores fueron en el tratamiento de 150 (4.34%) $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la fase estacionaria, no obstante, no se registraron diferencias significativas por efecto de la irradiancia ($P=1.00$), pero sí por la fase de crecimiento ($P=0.00$). Se detectó la presencia de C22:6n3 (DHA) donde la mayor concentración se presentó en el tratamiento de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (4.40%) en la fase estacionaria, sin mostrar diferencias significativas debido a la irradiancia ($P=0.85$). Se observó la ausencia del ácido graso C18:1n9 T en todos los tratamientos de la fase estacionaria.

El mayor porcentaje de ácidos grasos saturados (SFA) para *Amphora helenensis* fue en el ácido graso C13:0 en la mayoría de los tratamientos, donde los valores mayores se mostraron en el tratamiento de $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (19.50%) en la fase exponencial y de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (18.16%) en la fase estacionaria, sin embargo, no se presentaron diferencias significativas por efecto de la irradiancia ($P=0.06$) y la fase de crecimiento ($P=0.40$).

La mayor concentración de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) fue en el ácido graso C16:1 para todos los tratamientos y los valores mayores se observaron en la irradiancia de $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la fase estacionaria (24.65%), no obstante, no se mostraron diferencias significativas por efecto de la irradiancia ($P=0.06$) y la fase de crecimiento ($P=0.85$).

La mayor concentración de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) se presentó en el ácido graso C20:5n3 (EPA) en todos los tratamientos y fue mayor en la irradiancia de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la fase exponencial (28.42%) y de $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la fase estacionaria (24.40%), sin embargo, no se mostraron diferencias significativas debido a la irradiancia ($P=0.85$) pero sí por la fase de crecimiento ($P=0.01$), que fue mayor en la fase exponencial.

Tabla 2. Porcentaje del total de ácidos grasos identificados para *Amphora helenensis* con cinco niveles de irradiancia (50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en la fase exponencial y estacionaria. Dónde: nd= no detectado. SFA= ácidos grasos saturados. MUFA= ácidos grasos monoinsaturados. PUFA= ácidos grasos poliinsaturados. Prueba Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$. Letras minúsculas diferentes en superíndice indican diferencias significativas por efecto de irradiancia (a>b). Letras mayúsculas diferentes en superíndice indican diferencias significativas por efecto de fase de crecimiento (A>B).

| Ácido graso | Exponencial | | | | | Estacionaria | | | | |
|--------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 |
| SFA | | | | | | | | | | |
| C6:0 | 0.20 | 0.36 | 0.41 | 0.39 | 0.80 | 1.22 | 0.26 | 0.49 | 0.16 | 2.51 |
| C8:0 | 0.20 | 0.39 | 0.55 | 0.43 | 0.35 | 0.21 | 0.18 | 0.22 | 0.23 | 0.05 |
| C10:0 | nd | 2.71 | 2.42 | 6.09 | 8.67 | 7.97 | 8.18 | 12.25 | 6.34 | 0.02 |
| C11:0 | 0.02 ^B | 0.02 ^B | 0.02 ^B | 0.05 ^B | 0.04 ^B | 0.04 ^A | 0.03 ^A | 0.06 ^A | 0.06 ^A | 0.03 ^A |
| C12:0 | 0.07 | 0.07 | 0.06 | 0.14 | 0.10 | 0.11 | 0.12 | 0.12 | 0.13 | 0.08 |
| C13:0 | 1.82 | 2.61 | 2.40 | 11.80 | 19.50 | 18.16 | 12.18 | 14.86 | 11.14 | 2.18 |
| C14:0 | 7.60 | 8.24 | 7.90 | 6.96 | 7.26 | 6.08 | 5.75 | 6.24 | 8.05 | 7.98 |
| C15:0 | 0.99 ^A | 1.06 ^A | 0.96 ^A | 0.56 ^A | 0.55 ^A | 0.38 ^B | 0.41 ^B | 0.41 ^B | 0.45 ^B | 0.75 ^B |
| C16:0 | 9.55 ^b | 10.57 ^{Ab} | 12.57 ^a | 12.68 ^{ab} | 12.07 ^{ab} | 11.79 ^b | 12.33 ^{ab} | 12.89 ^a | 12.72 ^{ab} | 9.74 ^{ab} |
| C17:0 | 6.01 | 6.55 | 7.29 | 4.35 | 2.81 | 2.60 | 2.80 | 2.85 | 4.03 | 5.69 |
| C18:0 | 1.76 ^{ab} | 1.35 ^{ab} | 1.01 ^b | 5.07 ^a | 1.30 ^b | 1.61 ^{ab} | 1.45 ^{ab} | 1.76 ^b | 2.88 ^a | 0.49 ^b |
| C20:0 | 0.49 | 0.90 | 0.29 | 0.21 | 0.29 | 0.33 | 1.03 | 0.14 | 0.56 | 0.05 |
| C21:0 | 5.15 | 4.09 | 4.10 | 2.93 | 2.08 | 2.25 | 2.56 | 2.96 | 1.98 | 5.07 |
| C22:0 | nd | 1.00 ^a | nd | 0.21 ^a | 0.05 ^{ab} | 0.08 ^{ab} | 0.10 ^a | 0.04 ^b | 0.10 ^a | 0.03 ^{ab} |
| C23:0 | 0.18 ^{ab} | 0.87 ^a | nd | 0.14 ^{ab} | 0.06 ^b | 0.11 ^{ab} | nd | 0.10 ^b | 0.14 ^{ab} | 0.06 ^b |
| C24:0 | 0.64 ^A | 0.97 ^A | 1.17 ^A | 0.63 ^A | 0.57 ^A | 0.42 ^B | 0.48 ^B | 0.53 ^B | 0.59 ^B | 0.70 ^B |
| MUFA | | | | | | | | | | |
| C14:1 | 0.11 | 0.14 | 0.54 | 0.07 | 0.08 | 0.11 | 0.08 | 0.05 | 0.26 | 0.06 |
| C15:1 | 0.10 | 0.09 | 0.11 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.03 | 0.04 | 0.13 |
| C16:1 | 21.12 | 20.98 | 21.42 | 18.35 | 19.48 | 18.80 | 16.65 | 16.63 | 22.03 | 24.65 |
| C17:1 | 0.49 | 0.50 | 0.84 | 0.36 | 0.23 | 0.12 | 0.17 | 0.49 | 0.31 | 0.55 |
| C24:1 | 0.45 ^A | 0.49 ^A | 0.58 ^A | 0.45 ^A | 0.28 ^A | 0.19 ^B | 0.21 ^B | 0.23 ^B | 0.37 ^B | 0.55 ^B |
| C18:1n9 C | 3.09 | 3.77 | 1.96 | 2.65 | 2.51 | 2.05 | 4.24 | 4.56 | 4.15 | 2.12 |
| C18:1n9 T | 1.70 | 1.58 | 1.86 | 1.63 | 1.38 | 0.90 | 1.53 | 1.19 | 1.55 | 1.49 |
| C20:1n9 | 0.50 ^{ab} | 0.52 ^a | 0.27 ^b | 0.24 ^{ab} | 0.25 ^b | 0.51 ^{ab} | 0.87 ^a | 0.29 ^b | 0.54 ^{ab} | 0.17 ^b |
| C22:1n9 | nd | 0.44 ^a | nd | 0.11 ^{ab} | 0.11 ^b | 0.13 ^b | 0.18 ^a | 0.14 ^b | 0.11 ^{ab} | 0.04 ^b |
| PUFA | | | | | | | | | | |
| C18:2n6 C | 0.82 ^{Bab} | 1.35 ^{Ba} | 0.68 ^{Bab} | 0.51 ^{Bb} | 0.62 ^{Bb} | 0.80 ^{Aab} | 2.47 ^{Aa} | 1.88 ^{Aab} | 1.32 ^{Ab} | 0.56 ^{Ab} |
| C18:2n6 T | 0.09 | nd | 0.05 | 0.22 | nd | nd | 0.07 | 0.10 | 0.16 | 0.20 |
| C18:3n6 | 0.45 ^B | 0.50 ^B | 0.57 ^B | 0.66 ^B | 0.62 ^B | 0.71 ^A | 0.74 ^A | 0.78 ^A | 0.75 ^A | 0.34 ^A |
| C18:3n3 | 0.55 ^{ab} | 0.62 ^a | 0.43 ^{ab} | 0.34 ^b | 0.26 ^b | 0.35 ^{ab} | 0.61 ^a | 2.36 ^{ab} | 0.30 ^b | 0.37 ^b |
| C20:2n6 | nd | 0.13 | 0.14 | 0.03 | 0.04 | 0.24 | 0.45 | 0.13 | 0.24 | 0.12 |
| C20:3n6 | nd | 0.23 | 0.22 | 0.25 | 0.24 | 0.26 | 0.33 | 0.31 | 0.29 | 0.23 |
| C20:3n3 | nd | 0.08 | nd | 0.38 | 0.26 | 0.15 | 0.23 | 0.26 | 0.24 | |
| C20:4n6 ARA | 4.24 | 3.37 | 4.81 | 1.75 | 2.37 | 1.86 | 2.11 | 1.83 | 1.63 | 4.18 |
| C20:5n3 EPA | 28.42 ^A | 23.49 ^A | 25.92 ^A | 20.12 ^A | 19.52 ^A | 16.51 ^B | 18.32 ^B | 15.08 ^B | 20.02 ^B | 27.40 ^B |
| C22:2n6 | nd | 0.10 | nd | 0.03 | nd | nd | 0.12 | 0.07 | nd | nd |
| C22:6n3 DHA | 0.36 | 0.50 | 0.37 | 0.06 | 0.41 | 0.63 | 3.09 | 0.19 | 0.47 | 0.15 |
| ΣSFA | 34.68 | 41.77 | 41.15 | 52.62 | 56.51 | 53.35 | 47.86 | 55.91 | 49.56 | 35.43 |
| ΣMUFA | 27.56 | 28.52 | 27.59 | 23.88 | 24.34 | 22.82 | 23.94 | 23.60 | 29.35 | 29.77 |
| ΣPUFA | 34.94 | 30.38 | 33.19 | 24.35 | 24.35 | 21.50 | 28.55 | 22.99 | 25.42 | 33.56 |

Se observó la presencia del ácido graso C20:4n6 (ARA) donde los valores mayores se presentaron en la irradiancia de 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la fase exponencial (4.81%) y también la presencia del ácido graso

C22:6n3 (DHA) con mayor concentración en la irradiancia de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la fase estacionaria (3.09%). No obstante, el C20:4n6 (ARA) y C22:6n3 (DHA) no mostraron diferencias significativas por efecto de la fase de crecimiento ($P=0.05$ ARA, $P=0.15$ DHA) e irradiancia ($P=0.06$ ARA, $P=0.06$ DHA). Se registró la ausencia del ácido graso C22:2n6 en la mayoría de los tratamientos de fase exponencial y fase estacionaria.

Capítulo 4. Discusión

En este trabajo de investigación el crecimiento (densidad celular y tasa de crecimiento) de *Nitzschia thermalis* f. *curta* y *Amphora helenensis* se modificó por efecto de la irradiancia y fue mayor para *N. thermalis* en los tratamientos de 200 y 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y para *A. helenensis* en 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La composición proximal de *Nitzschia thermalis* f. *curta* y *Amphora helenensis* varió en función de la irradiancia y la fase de crecimiento de los cultivos. Para *Nitzschia thermalis* f. *curta* el contenido de lípidos se incrementó en las irradiancias mayores (200 y 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y para *Amphora helenensis* fue mayor en 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la fase exponencial para ambas especies. El contenido de clorofila *a* para *Nitzschia thermalis* f. *curta* y *Amphora helenensis* incrementó al utilizar las irradiancias menores (50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en la fase estacionaria tanto. Los parámetros de la eficiencia lumínica de la fotosíntesis para ambas especies se modificaron por el efecto de la irradiancia y la fase de crecimiento, a excepción de la eficiencia cuántica (F_v/F_m) que solo varió debido a la irradiancia. En el contenido de ácidos grasos poliinsaturados de *Nitzschia thermalis* f. *curta* y *Amphora helenensis*, se obtuvieron los ácidos de mayor importancia en la nutrición, el ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido araquidónico (ARA) y ácido docosahexaenoico (DHA) pero no se modificaron por efecto de la irradiancia.

4.1 Crecimiento

La densidad celular de los cultivos de *Nitzschia thermalis* f. *curta* presentó diferencias por efecto de la irradiancia por lo que muestran preferencia para reproducirse en los tratamientos de 150, 200 y 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La mayor tasa de crecimiento obtenida para esta especie se registró en las irradiancias de 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (1.35 divisiones día⁻¹) y 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (1.28 divisiones día⁻¹), y los valores obtenidos fueron superiores a lo reportado por Jiménez-Valera (2016) para la misma especie en irradiancia de 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (1.02 divisiones día⁻¹). Estas diferencias pueden estar asociadas a los factores ambientales utilizados en los ensayos y a la densidad inicial de los cultivos.

Para los cultivos de *Amphora helenensis* la densidad celular se modificó por efecto de las intensidades de luz, presentando los valores mayores en irradiancia de 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, al igual de lo que resultó para la tasa de crecimiento (1.07 divisiones día⁻¹). Los resultados obtenidos en *A. helenensis* son similares a lo descrito por Leyva-García (2013) para *Phaeodactylum tricornutum* que presentó una tasa de crecimiento mayor en la irradiancia de 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (0.90 divisiones día⁻¹) en comparación con el tratamiento de

50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (0.79 divisiones día⁻¹). Los valores mayores de la tasa de crecimiento obtenidos en este estudio para *A. helenensis* son superiores a los presentados por Jiménez-Valera en 2016 para *Amphora* sp. con la misma irradiancia utilizada (0.63 divisiones día⁻¹), sin embargo, las diferencias encontradas pueden deberse a otras variables ambientales y condiciones de cultivo.

Kurpan-Nogueria *et al.* (2014) encontraron que la tasa de crecimiento y la densidad celular de *Isochrysis galbana* fue mayor en irradiancias de 300 (1.1 divisiones día⁻¹) y 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (1.2 divisiones día⁻¹) comparada con 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (0.8 divisiones día⁻¹) similar a lo que sucedió en esta investigación para *N. thermalis* f. *curta* donde la tasa de crecimiento mayor se encontró en el tratamiento de 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y contrario a lo presentado en *A. helenensis*, donde la tasa de crecimiento fue mayor en las irradiancias menores. Los resultados obtenidos para *N. thermalis* f. *curta* en este estudio son distintos a los reportados por Ramírez *et al.* (2015) para *Nitzschia ephitemioides* y *Nitzschia* sp. en donde no se presentaron cambios por efecto en la irradiancia en densidad celular y tasa de crecimiento. Sin embargo, en dicho estudio se evaluaron irradiancias únicamente de 40, 80 y 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ lo que sugiere una tolerancia de la especie en ese rango de intensidad de luz, similar a lo mostrado en esta investigación, ya que no se presentó diferencia en la tasa de crecimiento en los tratamientos de 50, 100 y 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, pero sí en irradiancias de 200 y 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Por lo tanto, el crecimiento de *N. thermalis* f. *curta* se favorece en las irradiancias mayores utilizadas en esta investigación, mientras que el crecimiento de *A. helenensis* muestra una tendencia a la inversa; mayor tasa de crecimiento en irradiancias menores. Estas diferencias posiblemente radican en las condiciones ambientales en las que se desarrollan en su hábitat natural, incluso a pesar de ser diatomeas bentónicas y ser aisladas de la misma región se ha descrito que la capacidad de fotoaclimatación es distinta en las diatomeas de acuerdo con su distribución espacial y las fluctuaciones climáticas del sitio en las que habitan naturalmente (Lavaud *et al.*, 2007).

El largo celular de *Nitzschia thermalis* f. *curta* no se modificó por efecto de la irradiancia y tampoco por la fase de crecimiento. Para el ancho de las células, los valores disminuyeron al incrementar la irradiancia y fueron mayores en la fase exponencial, sin embargo, las diferencias no fueron significativas. Estos resultados pueden indicar que las células de *Nitzschia thermalis* f. *curta* no acumulan grandes cantidades de compuestos de reserva, como lípidos neutros, que promueven el ensanchamiento de las células, sino que pueden utilizar la energía para llevar a cabo otros procesos metabólicos. El largo de las células registrado en los tratamientos de *Nitzschia thermalis* f. *curta* fue de 21.04 a 22.84 μm , similar a lo reportado por Kawamura *et al.* (1998) para *Nitzschia* sp. (22.6 μm) y mayor a lo obtenido para *Nitzschia*

ovalis (11.7 μm). De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, el largo celular de *Nitzschia thermalis* f. *curta* se encuentra en el rango descrito para ser utilizada como alimento en la acuicultura para organismos herbívoros (10 a 100 μm) según Jeffrey *et al.* (1992).

Para *Amphora helenensis* el largo celular fue mayor en la fase exponencial e incrementó con respecto a la irradiancia, mientras que el ancho de las células aumentó en la irradiancia más baja (50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en la fase exponencial, sin embargo, la variación no fue significativa. Para el ancho de las células de *Amphora helenensis*, no se presentó variación por efecto de la fase de crecimiento ni de la irradiancia. Esto al igual que en *Nitzschia thermalis* f. *curta* posiblemente indica la poca acumulación de sustancias de reserva en forma de carbohidratos o de lípidos que son los principales componentes almacenados por las células. Los valores de largo celular obtenidos por *Amphora helenensis* son 6.68 a 7.58 μm , tamaño adecuado para ser utilizada como alimento vivo de organismos acuícolas filtradores (1 a 15 μm) de acuerdo con Jeffrey *et al.* (1992).

4.2 Peso seco total, cenizas y peso orgánico

Los cultivos de *Nitzschia thermalis* f. *curta* mostraron valores mayores de peso seco total por influencia de la fase de crecimiento y la irradiancia. La fase estacionaria favoreció el peso seco total en la irradiancia de 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ resultados que difieren con lo mencionado por Romero-Romero (2015) quien encontró en *Amphora helenensis* los pesos mayores en la fase exponencial en cultivos mantenidos en condiciones similares. En los cultivos de *Amphora helenensis* no se modificó el peso seco total por influencia de la irradiancia al igual que en lo descrito por Chávez-Medrano (2008) para la diatomea *Navicula incerta* donde no se encontraron diferencias por efecto de la intensidad de luz. Sin embargo, los valores de peso seco total para *Amphora helenensis* se incrementaron con los días del cultivo, distinto a lo reportado por Romero-Romero en 2015 para *Amphora* sp. en condiciones ambientales similares.

El contenido de cenizas para *Nitzschia thermalis* f. *curta* se modificó con la fase de crecimiento y con la irradiancia. Los valores mayores se observaron al mantener los cultivos en irradiancias de 100 (211.89 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y 250 (211.44 $\mu\text{g mL}^{-1}$) $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la fase estacionaria, contrario a lo descrito por Jiménez-Valera (2016) para la misma especie y Romero-Romero (2015) para *Amphora* sp., quienes observaron el mayor contenido de cenizas en la fase exponencial. Sin embargo, se ha descrito previamente que los mayores

contenidos de cenizas en diatomeas son encontrados en la fase estacionaria e incrementan con los días de cultivo (Panggabean *et al.*, 2013), lo que coincide con lo registrado para *Nitzschia thermalis* f. *curta*.

Para *Amphora helenensis* en este estudio no se modificó el contenido de cenizas por influencia de la fase de crecimiento y por la irradiancia. Los resultados mostrados para esta especie son similares a lo mencionado por Chávez-Medrano (2008) quien no encontró diferencias en el contenido de cenizas en la diatomea *Navicula incerta* por efecto de la irradiancia. Además de la biomasa, otro factor importante que puede provocar la modificación en el contenido de cenizas son las sales del medio, principalmente en las especies marinas como es el caso de *Nitzschia thermalis* f. *curta* y de *Amphora helenensis*, lo cual sucede debido a que las microalgas pueden incorporar las sales del medio a las células (Abalde *et al.*, 1995).

El peso orgánico de *Nitzschia thermalis* f. *curta* se modificó por efecto de la fase de crecimiento y por la irradiancia, donde los valores se incrementaron por influencia de la fase estacionaria en el tratamiento de $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Chávez-Medrano (2008) observó el peso orgánico mayor en *Navicula incerta* en la fase estacionaria, comparado con la fase exponencial, por lo que son similares con lo descrito en esta investigación. Kurpan-Nogueria *et al.* (2014) reportaron un incremento en el peso orgánico de la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* por efecto de las irradiancias mayores (300 y $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en contraste con la irradiancia menor ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), resultados similares a lo registrado en esta investigación para *Nitzschia thermalis* f. *curta*.

En *Amphora helenensis* no se modificó el peso orgánico por efecto de la fase del cultivo e irradiancia, lo que difiere con lo mencionado por Jiménez-Valera (2015), quien observó mayor peso orgánico en la fase exponencial para la misma especie en condiciones similares de cultivo. Por otro lado, Chávez-Medrano (2008) no encontró diferencias en el peso orgánico por efecto de la irradiancia en *Navicula incerta*, similar a lo observado para *Amphora helenensis*. Posiblemente estos resultados son debido a que hay otros componentes bioquímicos en las microalgas, además de las proteínas, lípidos y carbohidratos, como son los ácidos nucleicos, que pueden estar presentes de 1 a 10% en las células (Fábregas *et al.* 1986; Brown *et al.*, 1989).

4.3 Composición proximal

El contenido de proteínas para *Nitzschia thermalis* f. *curta* fue de 6.31 al 29.14% y para *Amphora helenensis* se registraron valores de 2.58 al 10.64%. De acuerdo con diversos autores, las proteínas son el componente

dominante en las microalgas que pueden contener hasta el 60% del peso seco (Brown *et al.*, 1989), sin embargo, en las diatomeas puede variar de acuerdo con la especie y los factores ambientales, como la irradiancia y la disponibilidad de nutrientes (Courtois *et al.*, 2012; Abalde *et al.*, 1995). Según se ha descrito De Pauw y Persoone (1988) para larvas de moluscos, el requerimiento adecuado de proteínas en una dieta microalgal es del 30 al 60% del peso seco, por lo que *Nitzschia thermalis* f. *curta* contiene valores cercanos a los requeridos, sin embargo, este requerimiento puede variar en función de la especie de molusco. Para *Amphora helenensis* los porcentajes obtenidos de proteínas fueron menores, lo que puede ser ocasionado por el incremento de otros componentes bioquímicos como los lípidos, debido a la irradiancia utilizada en los ensayos.

El porcentaje de proteínas de *Nitzschia thermalis* f. *curta* obtenido en este estudio fue mayor durante de la fase estacionaria en irradiancia de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (29.14%) y para *Amphora helenensis* el contenido de proteínas incrementó en la fase estacionaria en los tratamientos de 50 (10.57%) y 100 (9.66%) $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Estos resultados no concuerdan con lo reportado por Romero-Romero (2015), quien encontró para *Amphora* sp. mayor contenido de proteínas en la fase exponencial, estas diferencias pudieran ser debido la cantidad de inóculo utilizados en los bioensayos.

Se ha descrito por diversos autores que el contenido de proteínas en las microalgas es inverso al contenido de lípidos y carbohidratos (Brown *et al.*, 1997), lo que coincide con los resultados en esta investigación, y que podría explicar el incremento de proteínas en la fase estacionaria, debido a que los lípidos y carbohidratos decrecieron al aumentar los días de cultivo. Tanto en los cultivos de *Nitzschia thermalis* f. *curta* como de *Amphora helenensis* los resultados observados difieren con lo detallado por Jiménez-Valera en 2016 para *Amphora* sp. y *Nitzschia* sp. bajo condiciones de irradiancia de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, quien no registró diferencias por efecto de la fase de crecimiento en el porcentaje de proteínas.

El contenido de carbohidratos para *Nitzschia thermalis* f. *curta* fue de 4.97 al 18% y para *Amphora helenensis* de 4.21 al 8.24%. En ambas especies los valores obtenidos son cercanos a lo reportado para el contenido promedio de carbohidratos en microalgas (5 al 23%) y que pueden variar en las condiciones de cultivo (Brown *et al.*, 1997). Se tiene registro del contenido de carbohidratos en las microalgas requerido para la alimentación de moluscos bivalvos que es de 5 al 30%, por lo que *Nitzschia thermalis* f. *curta* y *Amphora helenensis* presentaron valores superiores en algunos de sus tratamientos (Abalde *et al.*, 1995).

El contenido de carbohidratos en los cultivos de *Nitzschia thermalis* f. *curta* fue mayor durante la fase exponencial de crecimiento en irradiancia de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (18%), contrario a lo que reporta Jiménez-

Valera (2016) para la misma especie y con nivel de irradiancia de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, quien encontró un porcentaje mayor en la fase estacionaria (5.1%) con respecto a la exponencial (4.4%). La misma tendencia en la fase de crecimiento se presentó para *Amphora helenensis*, ya que el porcentaje mayor de carbohidratos se registró durante la fase exponencial en la irradiancia de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (8.24%).

El incremento en la acumulación de carbohidratos en *Nitzschia thermalis* f. *curta* en la fase exponencial al aumentar la irradiancia posiblemente es debido a que la diatomea acumula las sustancias de reserva energética en forma de carbohidratos y no en forma de lípidos ya que se ha mencionado que la crisolaminarina, el cual es un carbohidrato de reserva, es uno de los principales productos de la fotosíntesis en las diatomeas (Abalde, 1995; Gonçalves *et al.*, 2013).

El contenido de lípidos para *Nitzschia thermalis* f. *curta* en los distintos tratamientos se registró de 17.15 al 41.90% y para *Amphora helenensis* fue de 9.27 al 22.57%. La composición de lípidos en microalgas es muy variable, ya que se pueden presentar desde 1 al 40% en condiciones normales de cultivo, sin embargo, bajo estrés ambiental puede llegar hasta el 80% del peso seco, los principales factores que afectan la composición de lípidos son la disponibilidad de nutrientes, la luz y la temperatura (Paoletti, 1976; Shifrim y Chrisholm, 1980). Los porcentajes registrados en las microalgas que se utilizan para la alimentación con mejores resultados de crecimiento en crustáceos y peces son de 10 al 20% (Abalde *et al.*, 1995), por lo que la mayoría de los tratamientos de *Nitzschia thermalis* f. *curta* y *Amphora helenensis* obtuvieron valores de lípidos dentro del rango descrito.

El contenido de lípidos de los cultivos de *Nitzschia thermalis* f. *curta* mostró una disminución al avanzar los días de cultivo y un incremento al aumentar la irradiancia, por lo que los valores mayores se presentaron en la fase exponencial en los tratamientos de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (41.90%) y $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (34.86), lo que coincide con lo descrito por Jiménez-Valera (2016) quien reportó mayor porcentaje de lípidos en la fase exponencial (14.6%) con respecto a la estacionaria (7.8%). Estos resultados mostrados en esta investigación pueden deberse a la producción de lípidos polares durante la fase exponencial, los cuales son componentes de membrana y están constituidos principalmente por ácidos grasos poliinsaturados y son necesarios para el crecimiento de las células microalgales y por el contrario no se están produciendo lípidos neutros que son aquellos que se utilizan como reserva energética (generalmente triaglicéridos). Por su parte, Chávez-Medrano (2008) menciona que el porcentaje de lípidos en diatomeas se ve modificado debido a la irradiancia utilizada en los cultivos, lo que concuerda con lo obtenido en este estudio.

Los valores obtenidos para *Amphora helenensis* mostraron mayor contenido de lípidos en la fase exponencial en el tratamiento de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (22.57%), similar a lo registrado por Romero-Romero en 2015 para *Amphora* sp., quien encontró mayor producción de lípidos en la fase exponencial con respecto a la fase estacionaria para esta misma especie bajo irradiancia de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y luz blanca.

En *Amphora helenensis* y *Nitzschia thermalis* f. *curta* la producción de lípidos fue mayor en la fase exponencial, lo puede ser debido a que durante esta fase las microalgas utilizan la energía para el crecimiento, por lo tanto, incrementa la síntesis de lípidos estructurales que conforman las membranas celulares y por consiguiente el contenido total de lípidos.

En *Amphora helenensis* se presentó la disminución del contenido de lípidos en la irradiancia mayor, lo que puede ser consecuencia de la fotooxidación por el exceso de luz al cual está sometido el aparato fotosintético de acuerdo con Gonçalves *et al.* (2013). En este proceso, debido a los altos niveles de irradiancia la clorofila se encuentra excitada e inestable por lo que reacciona con el oxígeno que esta disuelto, transfiriéndole energía que se utiliza para la formación de otras moléculas y, por lo tanto, disminuyendo la producción de ácidos grasos (Falkowski y Raven, 2007).

4.4 Pigmentos

El contenido de clorofila *a* de *Nitzschia thermalis* f. *curta* fue mayor en la fase estacionaria ($386.27 \mu\text{g L}^{-1}$), contrario a lo indicado por Romero-Romero (2015), quien encontró mayor concentración de clorofila *a* en la fase exponencial para *Amphora* sp. bajo irradiancia de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y luz blanca. En el caso de *Amphora helenensis*, los resultados obtenidos en esta investigación muestran una tendencia similar a lo registrado para *Nitzschia thermalis* f. *curta*, ya que se presentaron mayores valores de clorofila *a* en la fase estacionaria ($314 \mu\text{g L}^{-1}$). Esto sucede debido a que durante la fase estacionaria la densidad celular de los cultivos es mayor que en la fase exponencial, lo que produce un efecto sombra entre las células, por lo tanto, se requiere producir mayor cantidad de clorofila *a* para maximizar la captación de luz (Spilling y Seppälä, 2012).

Algunos autores como Conceição *et al.* (2020), Falkowski y Owens (1980) y Lafarga-de la Cruz *et al.* (2006) han reportado para diversas especies de microalgas que la irradiancia puede modificar la producción de clorofila y otros pigmentos. Los resultados aquí obtenidos para *Nitzschia thermalis* f. *curta* mostraron

mayor concentración de clorofila *a* en la irradiancia menor, tendencia similar a lo descrito por Falkowski y Owens (1980) para *Dunaliella tertiolecta* (clorofícea) y *Skeletonema costatum* (diatomea), ya que se incrementó el contenido de clorofila *a* al disminuir la irradiancia, lo cual sucede como una adaptación para optimizar la captación de luz. Los resultados presentados para *Amphora helenensis* coinciden con lo descrito anteriormente y con lo obtenido por Lafarga-de la Cruz *et al.* (2006) para *Rhodomonas* sp., al mostrar mayor concentración de clorofila *a* en irradiancias menores. Esto sucede debido a que, bajo condiciones de luz limitadas, las microalgas al requerir de energía luminosa para llevar a cabo sus procesos metabólicos poseen estrategias para maximizar la cosecha de luz, por lo que aumentan la síntesis de clorofila o incrementan el número de unidades fotosintéticas (Falkowski y Owens, 1980).

Una tendencia similar a la clorofila *a* se presentó en la clorofila *c* para *Nitzschia thermalis* f. *curta*, donde se modificó su contenido por efecto de la irradiancia y la fase de crecimiento. El contenido de clorofila *c* incrementó al disminuir la irradiancia en la fase estacionaria, donde fue mayor. Para *Amphora helenensis* la producción de clorofila *c* fue mayor la fase estacionaria y disminuyó en la irradiancia mayor. La clorofila *c* es un pigmento accesorio para la captación de luz presente en las diatomeas, por lo que a bajas intensidades luminosas las células de las microalgas requieren aumentan su producción para cosechar la mayor cantidad de luz posible (Kuczynska *et al.*, 2015).

Los carotenoides son pigmentos producidos por las células de las microalgas como accesorios en la captación de luz para la fotosíntesis y para la fotoprotección del aparato fotosintético cuando la intensidad de luz es elevada (Abalde *et al.* 1999). El contenido mayor de carotenos para *Nitzschia thermalis* f. *curta* fue bajo irradiancia de $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y para *Amphora helenensis* de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la fase estacionaria para ambas especies. Estos resultados difieren a lo reportado por Romero-Romero (2015) para la especie de *Amphora* sp., quien encontró mayor concentración de carotenos durante la fase exponencial con respecto a la fase estacionaria. Se han reportado por otros autores tendencias similares ya que durante la fase exponencial la densidad celular de los cultivos microalgales es baja, por lo que no se presenta el efecto de auto sombreado entre las células y por lo tanto las microalgas producen pigmentos de fotoprotección ya que requieren protegerse de la luz excesiva para evitar daños en el aparato fotosintético (Spilling y Seppälä, 2012). Por otro lado, los resultados de *Nitzschia thermalis* f. *curta* y *Amphora helenensis* en este estudio, son similares a los reportados por Carreto y Catoggio (1976), para la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* donde los carotenoides incrementaron en la fase estacionaria con respecto a la fase exponencial.

Diversos autores han señalado a la irradiancia como uno de los factores ambientales que afectan la producción y los niveles de carotenoides en microalgas (Vo *et al.*, 2017; Abalde *et al.*, 1995; Abalde *et al.*, 1999). Los resultados obtenidos para *Nitzschia thermalis* f. *curta* coinciden con Wiliemoes y Mona (1991) que compararon 40, 75, 100, 200, 300 y 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en *Nitzschia palea* y encontraron un incremento de carotenos en las irradiancias mayores, esto como una estrategia para mitigar el daño que puede provocar el exceso de luz en el aparato fotosintético. Se conoce que bajo intensidades de luz muy elevadas puede presentarse la fotoinhibición y la inactivación parcial o total del del aparato fotosintético, por lo cual las células producen pigmentos de protección como los carotenoides, que evitan que estos daños ocurran disipando el exceso de energía luminosa (Kuczynska *et al.*, 2015).

La tendencia observada en *Amphora helenensis* es similar a lo mencionado por Conceição *et al.* (2020) para *Phaeodactylum tricornutum* y Chaneva *et al.* (2007) para *Arthronema africanum*, quienes reportaron el incremento de carotenos al decrecer la irradiancia. Estos resultados podrían indicar la posible destrucción de los pigmentos accesorios debido a las intensidades de luz muy elevadas que produce un gran estrés lumínico en el aparato fotosintético. Esto indica la baja tolerancia de *Amphora helenensis* a las irradiancias mayores utilizadas en esta investigación, lo que no sucede en *Nitzschia thermalis* f. *curta* quien mostró mayor adaptación a intensidades de luz elevadas.

4.5 Eficiencia lumínica de la fotosíntesis

Los valores elevados de la eficiencia fotosintética denotan un mayor flujo de electrones y una mejor utilización de la luz en los organismos fotosintéticos (Cullen y Davis, 2003). En el cultivo de *Nitzschia thermalis* f. *curta* los valores de eficiencia fotosintética (α) disminuyeron respecto a las mayores irradiancias en la fase exponencial, mientras que en la fase estacionaria se presentó una tendencia contraria, incrementando al aumentar la irradiancia. Para *Amphora helenensis* la eficiencia fotosintética incrementó en la irradiancia menor y fue mayor en la fase exponencial, estos resultados posiblemente son debido a que las altas irradiancias pueden propiciar la inhibición de la eficiencia fotosintética como lo describió South y Whittick (2009) y Torres *et al.* (2014).

La irradiancia de saturación lumínica (I_k) para *Nitzschia thermalis* f. *curta* incrementó en irradiancia de 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de la fase exponencial, lo que indica una posible adaptación de estas células a irradiancias altas ya que se ha descrito que las microalgas adaptadas a intensidades de luz elevadas pueden presentar

un I_k mayor (Dubinsky *et al.* 1986). En un estudio realizado por Torres *et al.* (2014) para las diatomeas *Phaeodactylum tricornutum* y *Amphora coffeaeformis* se observó un incremento de hasta el 80% en el I_k con respecto al aumento de la irradiancia. Para *Amphora helenensis* el I_k mayor se presentó en la irradiancia de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la fase exponencial y disminuyó en las irradiancias mayores. Estos resultados podrían indicar que las células de *Amphora helenensis* se encuentran adaptadas a dichas intensidades de luz.

El rendimiento cuántico del fotosistema II (Fv/Fm) es un parámetro que denota el estrés fisiológico presente en las células de las microalgas, principalmente cuando es producido por la limitación de nutrientes y por la irradiancia, sin embargo, no es exclusivo de estos factores ambientales (Parkhill *et al.*, 2001). Para *Nitzschia thermalis* f. *curta* el Fv/Fm mayor se presentó en la irradiancia menor en la fase estacionaria y en *Amphora helenensis* se encontró una tendencia similar, incrementando el Fv/Fm con la irradiancia más baja en ambas fases de crecimiento. Posiblemente estos resultados indican que ambas especies de diatomeas se encuentran bajo estrés fisiológico por efecto de las mayores irradiancias utilizadas en los bioensayos ya que previamente se ha mencionado que en las microalgas bajo condiciones de estrés continuas el Fv/Fm tiende a disminuir (Suggest *et al.*, 2009). De acuerdo con Almazán-Becerril y García-Mendoza (2008), la reducción del Fv/Fm depende de la irradiancia que reciben las células de las microalgas, por lo que a mayor intensidad de luz tiende a disminuir el Fv/Fm, sin embargo, los valores pueden variar en función del grupo de microalgas y de la especie, debido a las condiciones ambientales del sitio donde habitan.

Los valores normales de Fv/Fm establecidos para las microalgas van de 0.6 al 0.8, pero pueden variar según el grupo y la especie (Cullen y Davis, 2003), por lo tanto, valores menores a los descritos anteriormente podrían indicar estrés fisiológico debido a los factores ambientales, en el caso de este estudio, la irradiancia. Los resultados obtenidos en esta investigación coinciden con Dong *et al.* (2016) para la diatomea *Thalassiosira pseudonana* quienes reportaron un decremento en el Fv/Fm con respecto al aumento de la irradiancia como respuesta al estrés fisiológico por la intensidad de luz elevada utilizada en los cultivos ($800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con respecto a $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

La tasa de transporte de electrones máxima (ETR_{max}) para *Nitzschia thermalis* f. *curta* incrementó con respecto a la irradiancia en la fase exponencial, tendencia similar a lo obtenido para *Amphora helenensis*. En un estudio realizado por Torres *et al.* (2014) para las diatomeas *Phaeodactylum tricornutum* y *Amphora coffeaeformis* reportaron un aumento en el ETR_{max} en condiciones de mayor irradiancia (luz solar en exterior con respecto a $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante la fase exponencial. Esto denota la gran flexibilidad

fotosintética y las diversas estrategias de fotoaclimatación que tienen las diferentes especies de diatomeas para adaptarse a las distintas condiciones de luz a las que pueden ser sometidas en su medio natural debido a la variación de las condiciones ambientales.

4.6 Ácidos grasos

La composición de ácidos grasos de *Nitzschia thermalis* f. *curta* en los diversos tratamientos utilizados en esta investigación mostraron porcentajes de ácidos grasos saturados (SFA) de 43.05 al 49.10%, en los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) 23.79 al 35.13% y en los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de 15.67 al 32.42%. Los valores de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) incrementaron en la irradiancia mayor en la fase exponencial y en la fase estacionaria disminuyó el contenido de PUFA en el nivel de irradiancia más elevada.

El perfil de ácidos grasos de *Amphora helenensis* en las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo mostraron porcentajes de ácidos grasos saturados (SFA) de 34.68 al 56.51%, en ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) de 22.82 al 29.77% y en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de 21.50 al 34.94%. De manera general, los valores totales de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) registraron una tendencia inversa con respecto al nivel de irradiancia en la fase de crecimiento exponencial, mientras que en el crecimiento estacionario el contenido de PUFA incrementó proporcionalmente con respecto al aumento del nivel de irradiancia.

Según lo mencionado por Govindan *et al.* (2021) para el perfil de ácidos grasos de *Amphora oculata*, los SFA fueron los más abundantes (55.1%), seguido de los MUFA (44.5%) y los PUFA (10.6%), los porcentajes obtenidos concuerdan con lo registrado para *Amphora helenensis* en el contenido de SFA, sin embargo, para MUFA y PUFA los valores fueron más bajos. Estas diferencias pueden ser debidas a las condiciones de cultivo que fueron utilizadas y a la variación en la producción y acumulación de ácidos grasos en diatomeas del mismo género, según describió Chan (2012).

Conceição *et al.* (2020) reportaron para *Phaeodactylum tricornutum* un incremento en los ácidos grasos saturados con el aumento de la irradiancia, contrario a los ácidos grasos poliinsaturados que disminuyeron al aumentar la intensidad de luz, donde los niveles menores de irradiancia fueron de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y los mayores de $750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se ha descrito por otros autores que en las diatomeas al disminuir la

irradiancia incrementan los lípidos polares los cuales están asociadas a las membranas de los cloroplastos, mientras que al incrementar la intensidad de luz se produce un aumento en los triagliceroles, forma en la que las microalgas acumulan los ácidos grasos para reserva energética y constituidos principalmente por ácidos grasos saturados (SFA) (Kurpan-Nogueira *et al.*, 2014).

Diversos autores han mencionado que las bajas irradiancias (50 a $150 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) promueven la producción ácidos grasos poliinsaturados en microalgas ya que forman parte de componentes estructurales de los cloroplastos, por lo tanto, si aumentan los pigmentos fotosintéticos se esperaría un incremento en ácidos grasos poliinsaturados, mientras que las mayores irradiancias propiciarían una mayor producción de ácidos grasos saturados (Conceição *et al.*, 2020; Spilling y Seppälä, 2012; Kurpan-Nogueira *et al.*, 2014; Brown *et al.*, 1996). Un cultivo con una densidad elevada puede tener un efecto similar a las bajas irradiancias debido al efecto de autosombreado de las células. De acuerdo con Brown *et al.* (1989) el aumento del nivel de irradiancia puede incrementar la insaturación de los ácidos grasos en los cultivos de microalgas.

La fase de crecimiento interviene en la composición de ácidos grasos de las microalgas, según lo descrito por Liang y Miao (2005) para diversas diatomeas marinas donde los porcentajes para *Nitzschia closterium* incrementaron en los SFA (26.14% a 36.33%) y MUFA (29.86% a 45.06%) en la fase estacionaria con respecto a la fase exponencial, mientras que los PUFA disminuyeron (37.34% a 16.26%). Esto sucede debido a que las células de las microalgas acumulan lípidos principalmente en forma de triagliceroles que son parte de los ácidos grasos saturados, mientras que los ácidos grasos poliinsaturados son parte estructural de las células, por lo que se encuentran en mayores cantidades durante la fase exponencial.

Entre los ácidos grasos saturados registrados en *Nitzschia thermalis* f. *curta* y *Amphora helenensis* que se presentaron en todos los tratamientos son el C16:0 y el C18:0 y que han sido descritos por ser esenciales en el proceso de síntesis de ácidos grasos; además éstos son importantes para la posterior producción de ácidos grasos poliinsaturados (Chen, 2007; Wen y Chen, 2003). Para *Nitzschia thermalis* f. *curta* en el ácido graso C16:0 se registraron valores de 17.17 al 28.55%, por lo que resultó ser el SFA más abundante, y el C18:0 mostró una concentración del 0.45 al 10.76%. Para *Amphora helenensis* en el C16:0 se registraron de 9.55 al 12.79%, en el C18:0 concentraciones de 0.49 al 2.88% y el SFA más abundante fue el C13:0 con valores que oscilan de 2.18 al 18.16%. Se reportó para otras especies de diatomeas bentónicas la presencia de estos ácidos grasos saturados, en *Amphora exigua* y *Amphora bigibba* con una concentración de C16:0 del 9.81 al 16.07% y el C18:0 del 1.75 al 8.05% y para *Nitzschia panduriformis* y *Nitzschia grossestriata* el C16:0 con un contenido de 10.18 al 25.11% y el C18:0 del 5.54 al 32.24% (Chen, 2012). Los resultados

obtenidos en este estudio para *Nitzschia thermalis* f. *curta* y *Amphora helenensis* coinciden con los valores de referencia para el contenido de ácidos grasos anteriormente descritos por Chen (2012) para otras especies del género *Amphora* y *Nitzschia*.

Uno de los ácidos grasos poliinsaturados de mayor importancia en la nutrición acuícola es el ácido eicosapentaenoico (C20:5n3 EPA) que se presentó en todos los tratamientos de *Nitzschia thermalis* f. *curta*, en porcentajes de 10.95 al 19.12% bajo los distintos tratamientos experimentales. Los mayores contenidos de EPA se registraron en la fase estacionaria, sin embargo, no se modificó la producción de EPA debido a la irradiancia. Para los cultivos de *Amphora helenensis* el ácido eicosapentaenoico (C20:5n3 EPA) se presentó en todas las condiciones experimentales de esta investigación en un contenido del 15.08 al 28.42%. El contenido de EPA en los cultivos de *Amphora helenensis* fue mayor en la fase exponencial y presentó una tendencia inversa con respecto al incremento del nivel de irradiancia, sin embargo, las diferencias por efecto de la irradiancia no fueron significativas. Los valores mayores de este ácido graso en la fase exponencial pueden ser debidas a que el EPA juega un papel importante en las membranas de los tilacoides, por lo que está presente en la fase exponencial cuando las células invierten la energía para el crecimiento (Qiao *et al.* 2016). Se ha reportado en la diatomea *Skeletonema costatum* la mayor producción de EPA al utilizar niveles de irradiancia elevadas ($340 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en la fase estacionaria del crecimiento en (Guihéneuf *et al.*, 2009), lo que difiere con los resultados obtenidos para *Amphora helenensis* y para *Nitzschia thermalis* f. *curta* donde no se modificó el contenido de EPA por efecto de la irradiancia.

De acuerdo con Rasmussen y Morrissey (2007) las diatomeas contienen niveles de EPA aproximados de 15% a 30%, por lo que los resultados obtenidos en este estudio para *Nitzschia thermalis* f. *curta* en algunas condiciones experimentales están por debajo de estos valores, sin embargo, la mayoría de los tratamientos está dentro del rango descrito. Estos resultados pueden ser atribuidos a las diversas tendencias que presentan las diatomeas para producir y acumular ácidos grasos, lo cual en muchas ocasiones es especie-específico (Chen, 2012). Se reportó para *Nitzschia laevis* la presencia de un 79% de EPA en el total de ácidos grasos analizados (Chen *et al.*, 2007) por lo que los valores registrados en esta investigación están por debajo, sin embargo, estas diferencias pueden deberse al tipo de cultivo utilizado ya que el mayor porcentaje de EPA fue obtenido en cultivos heterotróficos lo que difiere con lo realizado en esta investigación. Para *Amphora helenensis* el contenido de EPA de los tratamientos experimentales está dentro de los valores promedio descritos anteriormente por Rasmussen y Morrissey (2007). Se ha encontrado para otras especies como *Amphora exigua* un contenido de EPA del 5 al 13%, por lo que los resultados obtenidos en esta investigación son mayores a los registrados en otras especies del mismo

género. Estos resultados pueden atribuirse a las condiciones ambientales utilizadas en el cultivo, ya que según lo describió Chen (2012), la producción de ácidos grasos en las diatomeas puede variar por diversos factores ambientales como la irradiancia, la temperatura y la disponibilidad de nutrientes y los días de cultivo.

En *Nitzschia thermalis* f. *curta* la concentración de ácido docosahexaenoico (C22:6n3 DHA) mostró valores de 1.31 al 4.40% en sus diversas condiciones experimentales e incrementó en la fase estacionaria y no se modificó por efecto de la irradiancia. El ácido araquidónico (C20:4n6 ARA) se registró en todos los tratamientos experimentales con valores de 1.50 al 4.34% y la concentración de ARA aumentó en la fase estacionaria y no se presentaron modificaciones debido a la irradiancia. El ácido docosahexaenoico (C22:6n3 DHA) en *Amphora helenensis* mostró valores de 0.06 al 3.09% donde la mayor concentración fue bajo irradiancia de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en ambas fases de crecimiento, sin embargo, la diferencias obtenidas por efecto de la irradiancia y fase de crecimiento no fueron significativas. El ácido araquidónico (C20:4n6 ARA) para *Amphora helenensis* presentó valores de 1.63 al 4.81% pero no se modificó debido a la irradiancia y la fase de crecimiento. Ambos ácidos grasos poliinsaturados son necesarios en la nutrición de organismos acuícolas, por lo tanto, es importante que las microalgas que se utilizan para la alimentación en la acuicultura puedan producirlos en las cantidades requeridas.

El porcentaje de ácido araquidónico (C20:4n6 ARA) mostrado en diatomeas es de 0 al 4% y en el ácido docosahexaenoico (C22:6n3 DHA) se reportan valores bajos, de aproximadamente 1.5% aunque puede variar entre las diversas especies (Brown *et al.*, 1997). Lo observado en *Nitzschia thermalis* f. *curta* para el C20:4n6 ARA coincide con lo descrito anteriormente por Brown *et al.* (1997), ya que los valores se encuentran en el rango promedio (0 al 4%), lo mismo que mostró *Amphora helenensis*. Para *Nitzschia thermalis* f. *curta* el porcentaje de C22:6n3 DHA obtenido se encuentra por encima de los valores promedio, contrario a lo sucedido en *Amphora helenensis* donde el contenido de C22:6n3 DHA es menor a los valores de referencia. Los bajos porcentajes de docosahexaenoico (C22:6n3 DHA) en *Amphora helenensis* coinciden con Chen (2012), donde *Amphora exigua* no mostró niveles detectables de C22:6n3 DHA y *Amphora bigibba* registró valores de 0.03 a 1.53%. Estos resultados sugieren que *Amphora* es un género de diatomeas con una tendencia de producir bajos contenidos de ácido docosahexaenoico, en comparación con otros grupos de diatomeas.

Qiao *et al.* (2016) encontraron para *Phaeodactylum tricornutum* un incremento en el porcentaje de C22:6n3 DHA con respecto a la irradiancia en la fase estacionaria, lo que coincide para *Nitzschia thermalis* f. *curta*. Asimismo, los autores reportaron el aumento de MUFA y la disminución de PUFA al incrementar

la irradiancia. Según Paoletti (1976) los factores ambientales pueden modificar la proporción de ácidos grasos. De acuerdo con diversos autores, los fosfolípidos y glicolípidos (componentes de membrana celular) y los triagliceroles (sustancias de reserva energética) son los lípidos más abundantes en las microalgas y pueden variar según los factores ambientales como la luz (Abalde *et al.*, 1995).

Finalmente, *Nitzschia thermalis* f. *curta* y *Amphora helenensis* contienen los ácidos grasos poliinsaturados requeridos para ser especies consideradas en la alimentación de organismos acuícolas, principalmente debido a la abundante presencia del ácido eicosapentaenoico (EPA).

Capítulo 5. Conclusiones

- Para *Nitzschia thermalis* f. *curta* los altos valores de irradiancia (200 y 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) incrementaron la densidad celular, la tasa de crecimiento y el tiempo de generación. El peso orgánico en *Nitzschia thermalis* f. *curta* se modificó por efecto de la irradiancia y durante la fase estacionaria incrementó con respecto a los mayores valores de la irradiancia.
- La composición proximal de *Nitzschia thermalis* f. *curta* es influenciada por la irradiancia y fase de crecimiento: la irradiancia de 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ produjo un incremento de proteínas en la fase estacionaria, mientras que los carbohidratos aumentaron en la fase exponencial. El porcentaje de lípidos incrementó con la magnitud de la irradiancia y disminuyó en la fase estacionaria.
- El contenido de pigmentos de *Nitzschia thermalis* f. *curta* se modificó por efecto de la fase de crecimiento y de la irradiancia. El contenido de clorofila *a* y *c* incrementaron en las bajas irradiancias en la fase estacionaria (50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), mientras que el contenido de carotenos aumentó con las altas irradiancias en la fase estacionaria (250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).
- La eficiencia fotosintética (α) de *Nitzschia thermalis* f. *curta* aumentó en los cultivos mantenidos a 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la fase exponencial. El índice de saturación lumínica (I_k) y la tasa máxima de transporte de electrones (ETR_{max}) incrementaron en las mayores irradiancias en la fase exponencial. La eficiencia cuántica (F_v/F_m) disminuyó con los mayores niveles de la irradiancia (150, 200 y 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), pero sin efecto por la fase de crecimiento.
- En todos los tratamientos de *Nitzschia thermalis* f. *curta* se presentaron los ácidos grasos C16:0, C16:1, C20:4n6 ARA, C20:5n3 EPA, C22:6n3 DHA que son esenciales en la nutrición acuícola. El mayor porcentaje de PUFA fue el C20:5n3 EPA y la producción de C22:6n3 DHA, C20:4n6 ARA y C20:5n3 EPA en los cultivos de *Nitzschia thermalis* f. *curta* fueron mayores en la fase estacionaria pero no se modificaron por efecto de la irradiancia.
- Para *Amphora helenensis* los bajos valores de irradiancia (100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) incrementaron la densidad celular, la tasa de crecimiento y el tiempo de generación. El peso orgánico en *Amphora helenensis* incrementó en la fase estacionaria, pero no se modificó por efecto de la irradiancia.

- La composición proximal de *Amphora helenensis* es influenciada por la irradiancia y la fase de crecimiento: la fase estacionaria produjo un aumento de proteínas en irradiancias de 50 y 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mientras que los carbohidratos aumentaron en 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. El porcentaje de lípidos se incrementó en irradiancia de 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la fase exponencial.
- En *Amphora helenensis* el contenido de clorofila *a* y de carotenos se incrementaron en las bajas irradiancias (50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en la fase estacionaria.
- Para *Amphora helenensis* en la fase exponencial se incrementó la eficiencia fotosintética (α) en las menores irradiancias (50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), el índice de saturación lumínica (I_k) en irradiancia de 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y la tasa máxima de transporte de electrones (ETR_{max}) en las mayores irradiancias (250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). La eficiencia cuántica (F_v/F_m) de *Amphora helenensis* disminuyó con los menores niveles (50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de la irradiancia, pero sin efecto por la fase de crecimiento.
- En todos los tratamientos de *Amphora helenensis* se registraron los ácidos grasos C16:0, C16:1, C20:4n6 ARA, C20:5n3 EPA y C22:6n3 DHA que son esenciales en la nutrición de los organismos acuícolas. El mayor porcentaje de PUFA se presentó en el ácido graso C20:5n3 EPA y la producción de C22:6n3 DHA, C20:5n3 EPA y ARA en los cultivos de *Amphora helenensis* no se modificó por efecto de la irradiancia. El contenido de C20:5n3 EPA fue mayor en la fase exponencial.

Recomendaciones

- Utilizar la biomasa de *Amphora helenensis* y *Nitzschia thermalis* f. *curta* cultivadas bajo diferentes condiciones de irradiancia para realizar bioensayos de alimentación en organismos acuícolas.
- Evaluar el efecto de la composición espectral y el fotoperiodo en los cultivos de *Amphora helenensis* y *Nitzschia thermalis* f. *curta* para obtener la mayor producción de biomasa y de ácidos grasos poliinsaturados.
- Evaluar el efecto en el perfil de ácidos grasos de *Amphora helenensis* y *Nitzschia thermalis* f. *curta* de otras variables ambientales como la temperatura y la disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo.
- Realizar investigación sobre otras diatomeas bentónicas aisladas de la región en condiciones controladas de laboratorio, para evaluar su biomasa y composición bioquímica, así como su posible uso en la acuicultura.

Literatura citada

- Almazán-Becerreil, A., García-Mendoza, E. 2008. Maximum efficiency of charge separation of photosystem II of the phytoplankton community in the Eastern Tropical North Pacific off Mexico: A nutrient stress diagnostic tool?. *Ciencias Marinas*, 34(1), 29–43.
- Alzahrani, M.A.J., Perera, C.O., Hemar, Y. 2017. Production of bioactive proteins and peptides from the diatom *Nitzschia laevis* and comparison of their in vitro antioxidant activities with those from *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris*. *International Journal of Food Science & Technology*, 53(3), 676–682.
- Andrés, L., Aguilera, R. 2009. Avances y perspectivas en microdietas para larvas de peces. *Revista AquaTIC*, (30), 1–18.
- Abalde, J., Cid, A., Fidalgo, P., Torres, E., Herrero, C. 1995. *Microalgas: cultivo y aplicaciones*. Universidade da Coruña, A Coruña. 205 pp.
- Abalde, J., Orosa-García, M., Torres, E., Cid, A. 1999. Biotecnología y aplicaciones de microorganismos pigmentados. IV Simposio Científico en Biología Celular y Molecular, 95-117.
- Barsanti, L., Gualtieri, P. 2014. *Algae: Anatomy, biochemistry, and biotechnology*. CRC Press, Boca Raton. 362 pp.
- Blankenship, R.E. 2014. *Molecular mechanisms of photosynthesis*. Wiley Blackwell, Oxford. 312 pp.
- Blight, E.G., Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911–917.
- Bonilla, J., Hoyos, J.L. 2018. Method of oxidising mercaptans, thiophenic compounds and derivatives thereof in petrol, kerosene and diesel fractions. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 19(3), 621-644.
- Boukhris, S., Athmouni, K., Hamza-Mnif, I., Siala-Elleuch, R., Ayadi, H., Nasri, M., Sellami-Kamoun, A. 2017. The potential of a brown microalga cultivated in high salt medium for the production of high-value compounds. *BioMed Research International*, 2017, 1–10.
- 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, 64-73.
- Brown, M.R, Jeffrey, S.W., Garland, C.D. 1989. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture, a literature review. CSIRO Marine Laboratories, Hobart. 49 pp.
- Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K., Dunstan, G. A. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151(1-4), 315-331.

- Carreto, J.I., Catoggio, J.A. 1976. Variations in pigment contents of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* during growth. *Marine Biology*, 36(2), 105–112.
- Carvalho, A.P., Malcata, F.X. 2005. Optimization of ω -3 fatty acid production by microalgae: crossover effects of CO₂ and light intensity under batch and continuous cultivation modes. *Marine Biotechnology*, 7(4), 381–388.
- Chakraborty, K., Raj, R.P. 2007. Eicosapentaenoic acid enrichment from sardine oil by argentation chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(18), 7586–7595.
- Chaneva, G., Furnadzhieva, S., Minkova, K., Lukavsky, J. 2007. Effect of light and temperature on the cyanobacterium *Arthronema africanum* - a prospective phycobiliprotein-producing strain. *Journal of Applied Phycology*, 19(5), 537–544.
- Charles, C.N., Msagati, T., Swai, H., Chacha, M. 2019. Microalgae: an alternative natural source of bioavailable omega-3 DHA for promotion of mental health in East Africa. *Scientific African*, 6, 1-4.
- Chávez-Medrano, C.I. 2008. Efecto de distintas variables ambientales en la fisiología y composición bioquímica de *Navicula incerta*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 129 pp.
- Chen, G., Jiang, y., Chen, F. 2007. Fatty acid and lipid class composition of the eicosapentaenoic acid-producing microalga, *Nitzschia laevis*. *Food Chemistry*, 104(4), 1580–1585.
- Chen, Y.C. 2012. The biomass and total lipid content and composition of twelve species of marine diatoms cultured under various environments. *Food Chemistry*, 131(1), 211-219.
- Chriamadha, T., Borowitzka, M.A. 1994. Effect of cell density and irradiance on growth, proximate composition and eicosapentaenoic acid production of *Phaeodactylum tricornutum* grown in a tubular photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*, 6(1), 67–74.
- Cobos-Ruiz, M., Paredes-Rodríguez, J.D., Castro-Gómez, J.C. 2016. Inducción de la producción de lípidos totales en microalgas sometidas a estrés nutritivo. *Acta Biológica Colombiana*, 21(1), 17–26.
- Cointet, E., Wielgosz-Collin, G., Bougaran, G., Rabesaotra, V., Gonçalves, O., Méléder, V. 2019. Effects of light and nitrogen availability on photosynthetic efficiency and fatty acid content of three original benthic diatom strains. *Public Library of Science*, 14(11), 1-28.
- Conceição, D., Lopes, R.G., Derner, R.B. *et al.* 2020. The effect of light intensity on the production and accumulation of pigments and fatty acids in *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Applied Phycology*, 32, 1017–1025.
- Craig, S. and Helfrich, L.A. 2009. Understanding fish nutrition, feeds and feeding. Virginia Cooperative Extension, Virginia Polytechnic Institute and State University. 240-256 pp.

- Cullen, J., Davis, R. 2003. The blank can make a big difference in oceanographic measurements. *Limnology and Oceanography Bulletin*, 12(2), 29-35.
- De Jaeger, L., Verbeek, R.E.M., Draaisma, R.B., Martens, D.E., Springer, J., Eggink, G., Wijffels, R.H. 2014. Superior triacylglycerol (TAG) accumulation in starchless mutants of *Scenedesmus obliquus*: (I) mutant generation and characterization. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 1-11.
- Demirel, Z., Imamoglu, E., Conk-Dalay, M. 2017. Screening of fatty acid composition in *Nitzschia* sp. *Turkish Journal of Biochemistry*, 42(3), 273-277.
- De Pauw, N., Persoone, G. 1988. *Microalgae for aquaculture*. Cambridge University Press, Cambridge. 477 pp.
- Dionicio-Acedo, J., Rosado-Salazar, M., Flores-Mego, J., Flores-Ramos, L., Aguirre-Velarde, A. 2017. Evaluation of commercial diets on growth and its effect on muscle biochemical composition of juvenile Peruvian grunt, *Anisotremus scapularis* (Tschudi, 1846) (Familia: Haemulidae). *Latin American Journal of Aquatic Research*, 45(2), 410–420.
- Dong, H.-P., Dong, Y.-L., Cui, L., Balamurugan, S., Gao, J., Lu, S.-H., Jiang, T. 2016. High light stress triggers distinct proteomic responses in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana*. *BioMed Central Genomics*, 17(1), 1-14.
- Dubinsky, Z., Falkowski, P.G., Wyman, K. 1986. Light harvesting and utilization by phytoplankton. *Plant Cell Physiology*, 27(7), 1335-1349.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P. A., Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 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.
- Enright, C.T., Newkirk, G.F., Craigie, J.S., Castell, J.D. 1986. Evaluation of phytoplankton as diets for juvenile *Ostrea edulis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 96(1), 1–13.
- Fábregas, J., Herrero, C., Abalde, J., Liaño, R., Cabezas, B. 1986. Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with high nutrient concentrations. *Aquaculture*, 53(3-4), 187- 199 .
- Falkowski, P.G., Owens, T.G. 1980. Light-Shade Adaptation: two strategies in marine phytoplankton. *Plant physiology*, 66(4), 592–595.
- Falkowski, P.G., Raven, J.A. 2007. *Aquatic Photosynthesis*. Princeton University Press, Princeton. 488 pp.
- FAO. 2002. *Inland capture fishery statistics of Southeast Asia: current status and information needs*. Oficina Regional de la FAO para Asia y el Pacífico, Bangkok. 121 pp.

- Fogg, G.E., Thake, B. 1987. Algal culture and phytoplankton ecology (3a ed.). University of Wisconsin Press, Londres. 269 pp.
- Folch, J., Lees M., Stanley, G.H.S. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497-509.
- García-Romeral, J., Pavía-Gómez, M., García-Sanz, T., Chirivella-Martorell, J., Serrano-Aroca, Á. 2017. Principios de Biotecnología y Bioingeniería en el cultivo de microalgas: importancia, problemas tecnológicos, tipos y sistemas de cultivos, crecimiento, factores limitantes, selección, aislamiento, escalado y caracterización bioquímica. *Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación*, 9, 115-125.
- Geider, R., Platt, T., Raven, J. 1986. Size dependence of growth and photosynthesis in diatoms: A synthesis. *Marine Ecology Progress Series*, 30(1), 93-104.
- Ghosh, A., Sarkar, S., Gayen, K., Bhowmick, T.K. 2019. Effects of carbon, nitrogen and phosphorous supplements on growth and biochemical composition of *Podohedriella* sp. (MCC44) isolated from North-East India. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 39(4), 1-12.
- Gibbs, V.K., Heflin, L.E., Jones, W.T., Powell, M.L., Lawrence, A.L., Makowsky, R., Watts, S.A. 2015. Optimizing dietary levels of menhaden and soybean oils and soybean lecithin for pre-gonadal somatic growth in juveniles of the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *Aquaculture*, 446, 198–205.
- Gibbs, V.K., Watts, S.A., Lawrence, A.L., Lawrence, J.M. 2009. Dietary phospholipids affect growth and production of juvenile sea urchin *Lytechinus variegatus*. *Aquaculture*, 292(1-2), 95–103.
- Gonçalves, A., Pires, J.C.M., Simões, M. 2013. Lipid production of *Chlorella vulgaris* and *Pseudokirchneriella subcapitata*. *International Journal of Energy and Environmental Engineering*, 4(14), 1-6.
- González, F., Saez, K., Vega, M.E., Bizama, B., Becerra, J., López, I., Hernández, V., Silva, M. 2019. Efectos de nitrato e irradiación en la producción de ácidos grasos en microalgas destinadas a la alimentación de larvas y reproductores, en cultivo experimental cerrado. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 54(1), 91-106.
- Govindan, N., Maniam, G.P., Ab-Rahim, M.H., Sulaiman, A.Z., Ajit, A., Chatsungnoen, T., Chisti, Y. 2021. Production of renewable lipids by the diatom *Amphora copulata*. *Fermentation*, 7(37), 1-21.
- Guihéneuf, F., Mimouni, V., Ulmann, L., Tremblin, G. 2009. Combined effects of irradiance level and carbon source on fatty acid and lipid class composition in the microalga *Pavlova lutheri* commonly used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 369(2), 136–143.
- Guillard, R.L.L., Ryther, J.H. 1962. Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal Microbiology*, 8(2), 229-239.

- Hernández-Becerril, D.U. 2014. Biodiversidad de algas planctónicas marinas (Cyanobacteria, Prasinophyceae, Euglenophyta, Chrysophyceae, Dictyochophyceae, Eustigmatophyceae, Parmophyceae, Raphidophyceae, Bacillariophyta, Cryptophyta, Haptophyta, Dinoflagellata) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 44-53.
- Hinzpeter, B.I., Shene, C., Masson, L. 2006. Alternativas biotecnológicas para la producción de ácidos grasos poliinsaturados omega-3. *Grasas y Aceites*, 57(3), 336-342.
- Huang, Y., Luo, L., Xu, K., Wang, X.C. 2019. Characteristics of external carbon uptake by microalgae growth and associated effects on algal biomass composition. *Bioresource Technology*, 292, 1-8.
- Ingebrigtsen, R.A., Hansen, E., Andersen, J.H., Eilertsen, H.C. 2015. Light and temperature effects on bioactivity in diatoms. *Journal of Applied Phycology*, 28(2), 939–950.
- Jeffrey, S.W., LeRoi, J-M., Brown, M.R. 1992. Characteristics of microalgal species for Australian mariculture. En: G. L. Allan and W. Dall (Editors), *Proceedings of the National Aquaculture Workshops*, Pt. Stephens, Australia. 164-17 pp.
- Jiménez-Valera, S. 2016. Aislamiento y caracterización bioquímica de microalgas de Baja California como alternativas para la producción de lípidos. Tesis de Doctorado en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 191 pp.
- Juneja, A., Ceballos, R., Murthy, G. 2013. Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: A Review. *Energies*, 6(9), 4607–4638.
- Kawamura, T., Roberts, R.D., Nicholson, C. M. 1998. Factors affecting the food value of diatom strains for post-larval abalone *Haliotis iris*. *Aquaculture*, 160(1-2), 81–88.
- Kent, M., Welladsen, H.M., Mangott, A., Li, Y. 2015. Nutritional evaluation of Australian microalgae as potential human health supplements. *PLoS ONE*, 10(2), 1–14.
- Khotimchenko, S., Yakovleva, I. 2005. Lipid composition of the red alga exposed to different levels of photon irradiance. *Phytochemistry*, 66(1), 73–79.
- Kociolek, J.P., Spaulding, S.A. 2003. Eunotioid and asymmetrical naviculoid diatoms. *Freshwater Algae of North America*, 655–668.
- Kuczynska, P., Jemiola-Rzeminska, M., Strzalka, K. 2015. Photosynthetic pigments in diatoms. *Marine Drugs*, 13(9), 5847–5881.
- Kurpan- Nogueira, D.P., Silva, A.F., Araújo, O.Q.F., Chaloub, R.M. 2015. Impact of temperature and light intensity on triacylglycerol accumulation in marine microalgae. *Biomass and Bioenergy*, 72, 280–287.

- Lafarga-de la Cruz, F., Valenzuela-Espinoza, E., Millán-Núñez, R., Trees, C.C., Santamaría-del-Ángel, E., Núñez-Cebrero, F. 2006. Nutrient uptake, chlorophyll *a* and carbon fixation by *Rhodomonas* sp. (Cryptophyceae) cultured at different irradiance and nutrient concentrations. *Aquacultural Engineering*, 35(1), 51–60.
- Lazo, J.P., Dinis, M.T., Holt, G.J., Faulk, C., Arnold, C.R. 2000. Co-feeding microparticulate diets with algae: toward eliminating the need of zooplankton at first feeding in larval red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture*, 188, 339–351.
- Lavaud, J., Strzepek, R.F., Kroth, P.G. 2007. Photoprotection capacity differs among diatoms: Possible consequences on the spatial distribution of diatoms related to fluctuations in the underwater light climate. *Limnology and Oceanography*, 52(3), 1188–1194.
- 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 Ión, Investigación, Optimización y Nuevos procesos en Ingeniería*, 91–103.
- Leyva-García, D.I. 2013. Evaluación del contenido de fenoles totales, lípidos y ensayos de evaluación de la actividad antioxidante en la microalga *Phaeodactylum tricornutum* mantenida en distintas condiciones de cultivo. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 65 pp.
- Li, X., Li, W., Zhai, J., Wei, H., Wang, Q. 2018. Effect of ammonium nitrogen on microalgal growth, biochemical composition and photosynthetic performance in mixotrophic cultivation. *Bioresource Technology*, 273, 368–376.
- Liang, Y., Mai, K. 2005. Effect of growth phase on the fatty acid compositions of four species of marine diatoms. *Journal of Ocean University of China*, 4(2), 157–162.
- Longhi, M.L., Schloss, I.R., Wiencke, C. 2003. Effect of irradiance and temperature on photosynthesis and growth of two Antarctic benthic diatoms, *Gyrosigma subsalinum* and *Odontella litigiosa*. *Botánica Marina*, 46(3), 276–284.
- Lowe, R.L. 2003. Keeled and canalled raphid diatoms. *Freshwater Algae of North America*, 669–684.
- Lowry, O.H., Rosebrugh, H.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275.
- López-Fuerte, F.O., Siqueiros-Beltrones, D.A., Jakes-Cota, U., Tripp-Valdéz, A. 2019. New records of marine diatoms for the American continent found on stone scorpionfish scorpaena mystes (Scorpaenidae) in Mexican shores. *Open Journal of Marine Science*, 9, 98–112.
- Lu, X., Liu, B., He, Y., Guo, B., Sun, H., Chen, F. 2019. Novel insights into mixotrophic cultivation of *Nitzschia laevis* for co-production of fucoxanthin and eicosapentaenoic acid. *Bioresource Technology*, 294, 122–145.

- Lynch, D.V., Thompson, G.A., Jr. 1982. Low temperature-induced alterations in the chloroplast and microsomal membranes of *Dunaliella salina*. *Plant Physiology*, 69, 1369–1375.
- Malara, G., Charra, R. 1972a. Dosages des proteines particulaires selon la méthode de Lowry. Université de Paris. Station Zoologique. Villefranche-Sur-Mer. Notes de Travail, (6), 11.
- Malara, G., Charra, R. 1972b. Dosages des glucides particulaires de phytoplankton selon la methode de Dubois. Université de Paris. Station Zoologique. Villefranche-Sur-Mer. Notes de Travail, (6), 12.
- Mau, A., Jha, R. 2018. Aquaculture of two commercially important molluscs (abalone and limpet): existing knowledge and future prospects. *Reviews in Aquaculture*, 10(3), 611–625.
- Mckee, T., Mckee, J. 2014. Bioquímica. Las bases moleculares de la vida (5ta ed). McGRAW-HILL, México DF. 773 pp.
- Mercado, J.M., Sánchez-Saavedra, M.P., Correa-Reyes, G., Lubián, L., Montero, O., Figueroa, F.L. 2004. Blue light effect on growth, light absorption characteristics and photosynthesis of five benthic diatom strains. *Aquatic Botany*, 78(3), 265–277.
- Meril, D., Selvakumaran, J., Kumar-Sundarraaj, D., Perumal, S. 2019. Effect in different media composition on growth, biomass and photosynthetic pigment of *Amphora* sp. (Bacillariophyceae) a microcosm approach. *Journal of Advanced Scientific Research*, 10(3), 52-56.
- Metcalf, L.D., Schmitz, A.A., Pelka, J.R. 1966. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Analytical Chemistry*, 38, 514-515.
- Müller-Feuga, A., Moaly, J., Kaas, R. 2007. The microalgae of aquaculture. En: Stottrup, J.G., McEvoy, L.A. (eds.). *Live feeds in marine aquaculture*. Blackwell Science, Oxford. 207–252 pp.
- National Research Council (U.S.). Committee on the nutrient requirements of fish and shrimp. 2011. *Nutrient requirements of fish and shrimp*. National Academies Press.
- Oliva-Teles, A. 2012. Nutrition and health of aquaculture fish. *Journal of Fish Diseases*, 35(2), 83–108.
- Pande, S.V., Khan, R.P., Venkitasubramanian, T.A. 1963. Microdetermination of lipids and serum total acids. *Analytical Biochemistry*, 6, 415-423.
- Panggabean, L.M.G., Rasyid, A., Duniani, Z., Meliana, Y., Kurniasih, D.I. 2013. Triglyceride composition of sixteen strains of marine diatom. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*, 5(1), 162-169.
- Paoletti, C., Pushparaj, B., Florenzano, G., Capella, P., Lercker, G. 1976. Unsaponifiable matter of green and blue-green algal lipids as a factor of biochemical differentiation of their biomasses: I. Total unsaponifiable and hydrocarbon fraction. *Lipids*, 11, 258–265.

- 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., Maita, Y., Lalli, C.M. 1984. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. Pergamon Press, Oxford. 173 pp.
- Qiao, H., Cong, C., Sun, C., Li, B., Wang, J., Zhang, L. 2016. Effect of culture conditions on growth, fatty acid composition and DHA/EPA ratio of *Phaeodactylum tricornutum*. *Aquaculture*, 452, 311–317.
- Rao, A., Briskey, D., Nalley, J.O., Ganuza, E. 2020. Omega-3 eicosapentaenoic acid (EPA) rich extract from the microalga *Nannochloropsis* decreases cholesterol in healthy individuals: a double-blind, randomized, placebo-controlled, three-month supplementation study. *Nutrients*, 12(6), 1-14.
- Rasmussen, R.S., Morrissey, M.T. 2007. Marine biotechnology for production of food ingredients. *Advances in Food and Nutrition Research*, 52, 237–292.
- Rodríguez-Núñez, K., Toledo, P., Arias, S. 2015. Aislamiento de dos especies de diatomeas con potencial acuícola (Bacillariophyceae) en el Pacífico de Costa Rica. *Research Journal of the Costa Rican Distance Education University*, 8(1), 93-98.
- Romero-Romero, C.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.
- Ramírez, E.E., González, M.A., Cifuentes, A.S., Inostroza, I., Urrutia, R.E. 2015. Culture and growth of two benthic diatoms species isolated from the Salar del Huasco (North of Chile, 20° S) at different conditions of temperature, light and nutrient. *Gayana Botánica*, 72(2), 165-176.
- Sahena, F., Zaidul, I.S. M., Jinap, S., Saari, N., Jahurul, H. A., Abbas, K.A., Norulaini, N.A. 2009. PUFAs in fish: Extraction, fractionation, importance in health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(2), 59–74.
- Salleh, S., McMinn, A. 2011. The effects of temperature on the photosynthetic parameters and recovery of two temperate benthic microalgae, *Amphora* cf. *coffeaformis* and *Cocconeis* cf. *sublittoralis* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 47(6), 1413–1424.
- Sánchez-Saavedra, M.P., Voltolina, D. 2002. Effect of photon fluence rates of white and blue-green light on growth efficiency and pigment content of three diatom species in batch cultures. *Ciencias Marinas*, 28(3), 273-279.
- Sánchez-Saavedra, M. P., Castro-Ochoa, F.Y., Nava-Ruiz, V.M., Ruiz-Güereca, D.A., Villagómez-Aranda, A.L., Siqueiros-Vargas, F., Molina-Cárdenas, C.A. 2018. Effects of nitrogen source and irradiance on *Porphyridium cruentum*. *Journal of Applied Phycology*, 30(2), 783–792.

- Sánchez-Saavedra, M.P., Maeda-Martínez, A.N., Acosta-Galindo, S. 2015. Effect of different light spectra on the growth and biochemical composition of *Tisochrysis lutea*. *Journal of Applied Phycology*, 28(2), 839–847.
- Searcy-Bernal, R., Salas-Garza, A., Flores-Aguilar, R., Hinojosa-Rivera, P. 1992. Simultaneous comparison of methods for settlement and metamorphosis induction in the red abalone (*Haliotis rufescens*). *Aquaculture*, 105, 241-250.
- Sharma, K.K., Schuhmann, H., Schenk, P.M. 2012. High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *Energies*, 5(5), 1532–1553.
- Shifrin, N.S, Chisholm, S.W. 1980. Phytoplankton lipids: environmental influences on production and possible commercial applications. En: Shelef, G., Soeder, C.J. (Ed). *Algae Biomass*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam. 627– 645 pp.
- Shishlyannikov, S.M., Klimenkov, I.V., Bedoshvili, Y.D., Mikhailov, I., Gorshkov, A.G. et al. 2014. Effect of mixotrophic growth on the ultrastructure and fatty acid composition of the diatom *Synedra acus* from Lake Baika. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 21(15), 1-8.
- Siqueiros, D. 1994. Asociaciones de diatomeas bentónicas marinas; Análisis de su estructura y aplicación. Universidad Autónoma de Baja California Sur, Tópicos Selectos sobre Microalgas, Serie Científica 2(1), 59-71.
- Siqueiros-Beltrones, D., Argumedo-Hernández, U., López-Fuerte F.O. 2017. Diversidad de especies de diatomeas bentónicas en la laguna Guerrero Negro (Reserva de la Biosfera El Vizcaíno), península de Baja California. *México Revista Mexicana de Biodiversidad*, 88, 21–35.
- Soler-Onís, E. 2015. Estudio de las diatomeas (Heterokontophyta, Bacillariophyceae) del bosque húmedo subtropical del Barranco de Azuaje, Gran Canaria, Islas Canarias. Doctorado en Gestión de Recursos Marinos. Universidad de Las Palmas de la Gran Canaria. 346 pp.
- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. En: Stein, J. (Ed.) *Handbook of phycological methods. Physiological and biochemical methods*. Cambridge University Press, London.321-343 pp.
- South, G.R., Whittick, A. 2009. Physiology and biochemistry. En: Hutner, S.H. (Ed.) *An introduction to phycology*. John Wiley & Sons. 163-170 pp.
- Spilling K., Seppälä J. 2012. Photobiology and lipid metabolism in algae. En: Gordon R., Seckbach J. (Ed). *The science of algal fuels. Cellular origin, life in extreme habitats and astrobiology*. Springer, Dordrecht. 3-20 pp.
- Suggett, D.J., Moore, C.M., Hickman, A.E. Geider, R.J. 2009. Interpretation of fast repetition rate (FRR) fluorescence: signatures of phytoplankton community structure versus physiological state. *Marine Ecology Progress Series*, 376, 1–19.

- Taiz, L., Zeiger, E. 2002. Plant Physiology. (3rd ed). Sinauer Associates, Massachusetts. 690 pp.
- Thompson, Jr., G.A. 1996. Lipids and membrane function in green algae. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1302, 17–45.
- Torres, M., Ritchie, R., Lilley, R.M., Grillet, C., Larkum, A. 2014. Measurement of photosynthesis and photosynthetic efficiency in two diatoms. *New Zealand Journal of Botany*, 52(1), 6–27.
- Valenzuela, B.A., Valenzuela, B.R., Sanhueza, C.J., de la Barra, D.F., Morales, I.G. 2014. Phospholipids from marine origin: A new alternative for supplementing omega-3 fatty acids. *Revista Chilena de Nutricion*, 41(4), 433-438.
- Vo, T., Tran, S., Nguyen, P., Mai, T. 2017. Growth, carotenoid production, antioxidant capacity and lipid accumulation of *Haematococcus* sp. under different light intensities. *American Journal of Plant Biology*, 2(4), 142-147.
- Wen, Z.-Y., Chen, F. 2003. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnology Advances*, 21(4), 273–294.
- Whyte, J.N.C. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture*, 60, 231-241.
- Wiktorowska-Owczarek, A., Berezińska, M., Nowak, J.Z. 2015. PUFAs: Structures, metabolism and functions. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 24(6), 931–941.
- Willemoes, M., Mona, E. 1991. Relationship between growth irradiance and the xanthophyll cycle pool in the diatom *Nitzschia palea*. *Physiologia plantarum*, 83, 449-456.
- Zar J.H. 1984. *Biostatistical Analysis*. (3a ed.). Prentice-hall, Inc., Englewood Cliffs. 718 pp.
- Zhang, Y., Tao, J., Wang, J., Ding, L., Ding, C., Li, Y., Zhou, Q., Li, D., Zhang, H. 2019. Trends in diatom research since 1991 based on topic modeling. *Microorganisms*, 7(8), 213, 1-13.

Anexo 1

Ácidos grasos

Tabla 3. Resumen del análisis Prueba de Kruskal-Wallis de la del contenido de ácidos grasos de *Nitzschia thermalis* f. *curta* mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100, 150, 200 y 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, en la fase exponencial y estacionaria. Donde se muestra el valor de *P* para la fase de crecimiento e irradiancia.

| Ácido graso | Fase (<i>P</i>) | Irradiancia(<i>P</i>) |
|-------------|-------------------|-------------------------|
| C6:0 | 0.00 | 0.05 |
| C8:0 | 0.00 | 0.40 |
| C10:0 | 0.00 | 1.00 |
| C11:0 | 0.00 | 0.05 |
| C12:0 | 0.00 | 0.25 |
| C13:0 | 0.00 | 0.05 |
| C14:0 | 0.00 | 0.40 |
| C15:0 | 0.27 | 0.00 |
| C16:0 | 0.00 | 0.85 |
| C17:0 | 0.01 | 0.01 |
| C18:0 | 0.00 | 0.25 |
| C20:0 | 0.71 | 0.05 |
| C21:0 | 0.00 | 1.00 |
| C22:0 | 0.27 | 0.01 |
| C23:0 | 0.00 | 0.25 |
| C24:0 | 0.27 | 0.40 |
| C14:1 | 0.00 | 0.01 |
| C16:1 | 0.27 | 0.25 |
| C17:1 | 0.71 | 0.03 |
| C24:1 | 0.06 | 0.05 |
| C18:1n9 C | 0.27 | 0.15 |
| C18:1n9 T | 0.00 | 1.00 |
| C20:1n9 | 0.27 | 0.00 |
| C22:1n9 | 0.71 | 0.28 |
| C18:2n6 C | 0.27 | 0.05 |
| C18:2n6 T | 0.27 | 0.40 |
| C18:3n6 | 0.01 | 0.09 |
| C18:3n3 | 0.27 | 0.85 |
| C20:2n6 | 0.06 | 0.00 |
| C20:3n6 | 0.06 | 0.03 |
| C20:3n3 | 0.00 | 0.01 |
| C20:4n6 ARA | 0.00 | 1.00 |
| C20:5n3 EPA | 0.00 | 0.85 |
| C22:2n6 | 0.00 | 0.85 |
| C22:6n3 DHA | 0.00 | 0.85 |

Anexo 2

Ácidos grasos

Tabla 4. Resumen del análisis Prueba de Kruskal-Wallis de la del contenido de ácidos grasos de *Amphora helenensis* mantenidos en sistemas por lotes a una irradiancia de 50, 100, 150, 200 y 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, en la fase exponencial y estacionaria. Donde se muestra el valor de *P* para la fase de crecimiento e irradiancia.

| Ácido graso | Fase (<i>P</i>) | Irradiancia (<i>P</i>) |
|-------------|-------------------|--------------------------|
| C6:0 | 0.71 | 0.09 |
| C8:0 | 0.05 | 0.05 |
| C10:0 | 0.06 | 0.40 |
| C11:0 | 0.01 | 0.40 |
| C12:0 | 0.06 | 0.05 |
| C13:0 | 0.06 | 0.40 |
| C14:0 | 0.27 | 0.85 |
| C15:0 | 0.00 | 0.25 |
| C16:0 | 0.27 | 0.01 |
| C17:0 | 0.06 | 0.85 |
| C18:0 | 0.27 | 0.00 |
| C20:0 | 0.27 | 0.15 |
| C21:0 | 0.06 | 0.40 |
| C22:0 | 0.27 | 0.00 |
| C23:0 | 0.71 | 0.00 |
| C24:0 | 0.01 | 0.85 |
| C14:1 | 0.06 | 0.25 |
| C15:1 | 0.05 | 0.05 |
| C16:1 | 0.06 | 0.85 |
| C17:1 | 0.27 | 0.15 |
| C24:1 | 0.01 | 0.85 |
| C18:1n9 C | 0.06 | 0.15 |
| C18:1n9 T | 0.27 | 0.85 |
| C20:1n9 | 0.71 | 0.00 |
| C22:1n9 | 0.06 | 0.01 |
| C18:2n6 C | 0.01 | 0.00 |
| C18:2n6 T | 0.27 | 0.05 |
| C18:3n6 | 0.01 | 0.15 |
| C18:3n3 | 0.71 | 0.00 |
| C20:2n6 | 0.06 | 0.05 |
| C20:3n6 | 0.27 | 0.05 |
| C20:3n3 | 0.06 | 0.05 |
| C20:4n6 ARA | 0.06 | 0.05 |
| C20:5n3 EPA | 0.01 | 0.85 |
| C22:2n6 | 0.23 | 0.07 |
| C22:6n3 DHA | 0.06 | 0.15 |