

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos Autor.

CICESE@ 2023. Todos los derechos reservados

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



**Maestría en Ciencias
en Acuicultura**

**Asimilación de diferentes fuentes de nitrógeno por la
microalga *Isochrysis galbana***

Tesis

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

Presenta:

Ruben Abraham Luna Ramirez

Ensenada, Baja California, México
2023

Tesis defendida por
Ruben Abraham Luna Ramirez

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Beatriz Cordero Esquivel
Codirectora de tesis

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Codirector de tesis

Dr. Misael Rosales Leija

Dra. Ernestina Castro Longoria



Dr. Roberto Cruz Flores
Coordinador del Posgrado en Ciencias en Acuicultura

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Director de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Ruben Abraham Luna Ramirez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura

Asimilación de diferentes fuentes de nitrógeno por la microalga *Isochrysis galbana*

Resumen aprobado por:

Dra. Beatriz Cordero Esquivel
Codirectora de tesis

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Codirector de tesis

La microalga marina *Isochrysis galbana* se caracteriza por su alto contenido de proteínas y lípidos, además, tiene la capacidad de sintetizar y almacenar ácidos grasos poliinsaturados como el DHA, EPA y ARA, todos ellos de gran valor nutricional y económico. Es muy utilizada en la acuicultura como alimento vivo para estadios larvales de moluscos bivalvos, abulones, camarones y de algunas especies de peces, así mismo se utiliza para el enriquecimiento de zooplancton, como los nauplios de *Artemia*; además, su uso se extiende a industrias como la alimenticia, farmacéutica, cosmeceútica y de energía. Actualmente existen ciertas limitaciones tecno-económicas, como el elevado costo de los medios de cultivo que no permiten explotar en su totalidad el alto potencial de las microalgas, sin embargo, en diversas investigaciones se ha abordado el uso de fertilizantes agrícolas como una alternativa a los medios de cultivo grado reactivo. En este estudio se realizó un cultivo estático a nivel semimasivo (15 L) con el objetivo de evaluar el efecto de distintas fuentes de nitrógeno en el crecimiento y la composición proximal de *I. galbana*. Para ello, se utilizaron tres medios de cultivo con distintas formas de nitrógeno, dos de ellos con base en fertilizantes agrícolas: el fertilizante granulado Plantafol™ (T20), que contiene nitratos, amonio y urea; y el fertilizante líquido Bayfolan Forte™ (BF), que contiene amonio y nitratos; adicionalmente, se utilizó como control el medio convencional “f/2”, que contiene nitratos. Se comparó su efecto en la producción de biomasa y composición proximal, así mismo, se evaluó la asimilación de las distintas fuentes de nitrógeno en un cultivo estático a nivel semimasivo (15 L). No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la producción de biomasa durante la fase de crecimiento exponencial, ni en el contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos entre los medios de cultivo. El amonio fue la fuente de nitrógeno preferida por *I. galbana*, en segundo lugar, se encuentran los nitratos y por último los nitritos.

Palabras clave: *Isochrysis galbana*, Asimilación, Nitrógeno, Fertilizantes Agrícolas

Abstract of the thesis presented by **Ruben Abraham Luna Ramirez** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture

Assimilation of different nitrogen sources by the microalgae *Isochrysis galbana*

Abstract approved by:

Dra. Beatriz Cordero Esquivel
Codirectora de tesis

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Codirector de tesis

The marine microalgae *Isochrysis galbana* is characterized by its high content of proteins and lipids, in addition, it has the capacity to synthesize and store polyunsaturated fatty acids such as DHA, EPA and ARA, all of them of great nutritional and economic value. It is widely used in aquaculture as live food for larval stages of bivalve mollusk, abalone, shrimp, and some species of fish, also it is used for the enrichment of zooplankton, such as artemia nauplii; in addition, its use extends to industries such as food, pharmaceutical, cosmeceutical and energy. Currently there are certain techno-economic limitations, such as the high cost of culture media that do not allow full use of microalgae, however, in various investigations the use of agricultural fertilizers has been addressed as an alternative to reagent grade culture media. In this study, a static culture was carried out at a semimassive level (15 L) with the objective of evaluate the effect of different sources of nitrogen on the growth and proximal composition of *I. galbana*. In order to achieve that objective, three culture media with different nitrogen species were used, two of them based on agricultural fertilizers: the granular fertilizer Plantafol (T20), that contains nitrates, ammonium and urea; and the liquid fertilizer Bayfolan Forte (BF), that contains ammonium and nitrates. In addition, the conventional medium "f/2", that contains nitrates, was used as control. Its effect on the production of biomass and proximal composition was compared, in addition, the assimilation of the different sources of nitrogen in a static culture at semimassive level was evaluated. No significant differences ($p > 0.05$) were found in the biomass production during the exponential growth phase and proximal composition between the culture media. Ammonium was the preferred nitrogen source of *I. galbana*, followed by nitrates and nitrites.

Keywords: *Isochrysis galbana*, Assimilation, Nitrogen, Agricultural fertilizer

Dedicatoria

A TODA MI FAMILIA, POR SU APOYO INCONDICIONAL

A YANETH ARENAS CON MUCHO AMOR.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) y al departamento de Acuicultura por aceptarme en la maestría y brindarme el conocimiento e instalaciones necesarias para desarrollar mi trabajo de tesis. Así mismo, por preocuparse por el bienestar de los estudiantes.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por confiar en mí y brindarme una beca que me permitió realizar mis estudios de posgrado.

A la Dra. Beatriz Cordero Esquivel por aceptarme como su estudiante, por brindarme su conocimiento, por poner a disposición su laboratorio para elaborar mi proyecto de investigación, por su paciencia, por ayudarme a resolver todos los problemas a los que me enfrenté durante este proyecto y por enseñarme el maravilloso mundo de las microalgas.

Al Dr. Benjamín Barón Sevilla por ser mi codirector, por brindarme su conocimiento, por permitirme utilizar su laboratorio y sus fotobiorreactores planos, por sus recomendaciones y consejos.

Al Dr. Misael Rosales Leija por formar parte del comité de tesis, por su gran ayuda en el análisis estadístico de mi trabajo de investigación y por sus recomendaciones.

A la Dra. Ernestina Castro Longoria por aceptar ser parte de mi comité de tesis, por sus recomendaciones y consejos que fueron de gran ayuda para la realización de este proyecto de investigación.

A los docentes del posgrado en Acuicultura, por introducirme en esta hermosa rama de la ciencia, por brindar sus clases con gusto y dedicación, y por resolver mis dudas.

A mi familia por apoyarme, aconsejarme, por ayudarme a alcanzar mis metas y sobre todo por su amor.

A Yaneth Arenas por acompañarme en esta etapa de mi vida, por hacer que el trabajo en laboratorio fuera mucho más fácil, por estar siempre ahí y brindarme su apoyo y consejo.

A Narda, Alex y Ramiro, por acompañarme en el transcurso de la maestría, por su ayuda y amistad.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas	ix
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Justificación	6
1.2 Hipótesis.....	7
1.3 Objetivos	7
1.3.1 Objetivo general.....	7
1.3.2 Objetivos específicos.....	7
Capítulo 2. Metodología.....	8
2.1 Origen de la cepa.....	8
2.2 Cultivo de <i>I. galbana</i>	8
2.3 Evaluación de medios de cultivo con base en fertilizantes agrícolas.....	9
2.4 Análisis del consumo de nutrientes	10
2.5 Cuantificación de la concentración celular	10
2.6 Peso seco total (PST) y orgánico (PO)	11
2.7 Análisis de la composición proximal de <i>I. galbana</i>	12
2.8 Análisis estadístico	12

Capítulo 3. Resultados	13
3.1 Crecimiento de <i>I. galbana</i> a nivel semi masivo (15 L).....	13
3.1.1 Concentración celular (cél mL ⁻¹) de <i>I. galbana</i> a nivel semi masivo	13
3.1.2 Peso seco total (PST) y orgánico (PSO) de <i>I. galbana</i> a nivel semi masivo	14
3.2 Composición proximal de <i>I. galbana</i>	16
3.3 Consumo de nutrientes durante el cultivo de <i>I. galbana</i>	18
3.4 Costos de los medios de cultivo y rendimiento en la producción de <i>I. galbana</i>	21
Capítulo 4. Discusión.....	23
Capítulo 5. Conclusiones	30
Literatura citada	31

Lista de figuras

Figura	Página
1. Crecimiento de <i>Isochrysis galbana</i> cultivada a nivel semi masivo con los medios alternativos BF, T20 y el medio control "f/2". Las barras verticales indican la desviación estándar (n=3).	14
2. Peso seco total unitario (PSTU) de <i>Isochrysis galbana</i> cultivada a nivel semi masivo con dos medios elaborados con fertilizantes agrícolas (BF y T20) y con el medio control "f/2". Las barras verticales indican la desviación estándar (n=3).	15
3. Peso seco total unitario (PSOU) de <i>Isochrysis galbana</i> cultivada a nivel semi masivo con dos medios elaborados con fertilizantes agrícolas (BF y T20) y con el medio control "f/2". Las barras verticales indican la desviación estándar (n=3).	15
4. Contenido de proteínas de <i>Isochrysis galbana</i> (pg cél ⁻¹ con base en el PSOU) cultivada a nivel semi masivo (15 L) con los medios alternativos BF, T20, y con el medio control "f/2". Las barras verticales indican la desviación estándar (n= 3).	16
5. Contenido de lípidos de <i>Isochrysis galbana</i> (pg cél ⁻¹ con base en PSOU) cultivada a nivel semi masivo (15 L) con los medios alternativos BF, T20 y con el medio control "f/2". Las barras verticales indican la desviación estándar (n=3).	17
6. Contenido de carbohidratos de <i>Isochrysis galbana</i> (pg cél ⁻¹ con base en PSOU) cultivada a nivel semi masivo (15 L) con los medios alternativos BF, T20 y con en el medio control "f/2". Las barras verticales indican la desviación estándar (n=3).	17
7. Concentración residual y consumo de nitratos durante el cultivo de <i>Isochrysis galbana</i> cultivada en los medios alternativos BF y T20 y en el medio control "f/2". barras verticales indican la desviación estándar (n = 3).	18
8. Concentración residual y consumo de amonio (NAT) durante el cultivo semi masivo de <i>Isochrysis galbana</i> utilizando los medios alternativos BF y T20. Las barras verticales indican la desviación estándar (n=3).	19
9. Concentración residual y consumo de nitritos durante el cultivo de <i>Isochrysis galbana</i> con los medios alternativos BF y T20 y con el medio "f/2" como control. Las barras verticales indican la desviación estándar (n=3).	20
10. Concentración residual y consumo de fosfatos durante el cultivo de <i>Isochrysis galbana</i> a nivel semi masivo (15 L) con los medios alternativos BF y T20 y con el medio control "f/2". Las barras verticales indican la desviación estándar (n = 3).	20

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Desempeño de medios de cultivo comúnmente utilizados en el cultivo de microalgas para la producción de biomasa, comparados con medios de cultivo con base en fertilizantes agrícolas (FA).....	4
2. Efectos de la limitación de nitrógeno en el cultivo de distintas especies de microalgas. La concentración de nitrógeno comúnmente utilizada en cultivos para la producción de biomasa microalgal está en el intervalo de 0.882 a 1.76 mmol L ⁻¹	5
3. Composición de los medios de cultivo utilizados para el cultivo de <i>Isochrysis galbana</i> (valores expresados en μM). Los medios T20 y BF fueron normalizados tomando como referencia la concentración de nitrógeno del medio “f/2” y se adicionaron vitaminas.	9
4. Fuente de macronutrientes (nitrógeno, fósforo y potasio) de los medios utilizados en el cultivo de <i>Isochrysis galbana</i> . T20 (Triple 20), BF (Bayfolan Forte™).	9
5. Costo en dólares de los medios de cultivo grado laboratorio y medios alternativos con base en fertilizantes agrícolas.	21
6. Productividad del cultivo semi masivo (15 L) de <i>Isochrysis galbana</i> cultivada con los medios alternativos BF y T20 y con el medio “f/2” como control.	22

Capítulo 1. Introducción

Las microalgas integran un grupo de organismos fotosintéticos, que habitan en el medio acuático. Conforman un grupo polifilético muy numeroso que es muy variado en forma y tamaño, además, se encuentran ampliamente distribuidas en aguas continentales y marinas, incluso pueden colonizar rocas, suelo, arena y hielo (Singh y Saxena, 2015). Son un componente muy importante de la comunidad planctónica y bentónica, ya que son productores primarios, ubicados en el primer eslabón de la cadena alimenticia (Andersen, 2013; Bordignon y Cabrini, 2015).

Este grupo de organismos es muy abundante y diverso en su composición bioquímica. Sintetizan compuestos de alto valor económico como pigmentos carotenoides, ficobiliproteínas y ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) (Barkia *et al.*, 2019; Lafarga y Acién, 2022), principalmente los ácidos grasos de cadena larga como el EPA (ácido eicosapentaenóico, 20:5n3), ARA (ácido araquidónico, 20:4n6) y DHA (ácido docosahexaenóico, 22:6n3) que son abundantes en las microalgas (Khozin-Goldberg, 2016). Estos ácidos grasos son esenciales para la salud humana y por eso han alcanzado un valor de mercado de hasta 260 dólares L⁻¹ (Paniagua-Michel, 2015).

Debido a la gran cantidad de nutrientes que aportan, las microalgas se han utilizado en México desde hace cientos de años. Alrededor del siglo XV, los aztecas cosechaban la cianobacteria *Arthrospira* del lago de Texcoco y la utilizaban para elaborar un pan llamado tecuitlatl (Portilla 1989). El primer cultivo a gran escala se realizó en Alemania durante la segunda guerra mundial (Becker, 1994). En la actualidad, las microalgas y sus extractos son utilizados en diversas industrias como la acuicultura, farmacéutica, cosmeceútica, alimenticia y la energética (Barsanti y Gualtieri, 2014; Kholssi *et al.*, 2021).

La acuicultura es uno de los mercados más importantes para las microalgas, ya que se utilizan directamente como alimento en el cultivo de todos los estadios de moluscos bivalvos como las ostras, almejas y mejillones; postlarvas y juveniles de abulón, crustáceos como los camarones y en el estadio larval de algunos peces (Brown, 2002). Para su uso en este sector se seleccionan especies que tengan una composición bioquímica adecuada y que, además, proporcionen nutrientes esenciales como los ácidos grasos altamente insaturados (AGAI) como el DHA, EPA y ARA, ya que no pueden ser sintetizados *de novo* por los organismos cultivados, por lo tanto, deben ser incorporados en la dieta (Tacon, 1989). Estas biomoléculas impactan directamente en el crecimiento, desarrollo y en la reproducción de los organismos que los consumen (Hinzpeter *et al.*, 2006).

Entre las microalgas marinas más utilizadas como alimento vivo se encuentran las pertenecientes a los géneros *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Pavlova*, *Phaeodactylum*, *Chaetoceros*, *Nannochloropsis*, *Skeletonema* y *Thalassiosira*, (Guedes *et al.*, 2015). Así mismo, *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis* y la cianobacteria *Spirulina* (*Arthrospira spp.*) son agregadas como fuente de pigmentos naturales en el cultivo de salmón y peces ornamentales (Priyadarshani y Rath, 2012). Adicionalmente, se han desarrollado dietas experimentales para el cultivo de peces en las que se sustituye la harina y el aceite de pescado por harina de *I. galbana* y de otras microalgas, y se han obtenido buenos resultados (Tibaldi *et al.*, 2015; Sarker *et al.*, 2020).

Arthrospira spp., *Chlorella spp.* y *Dunaliella salina* son aprovechadas por la industria alimenticia como suplementos alimenticios para el consumo humano y comúnmente se comercializan como tabletas, en polvo o de forma líquida (Gouveia *et al.*, 2008). Recientemente, estas y otras microalgas ricas en AGPI y carotenoides se han agregado a los alimentos como fuente de DHA, EPA y de pigmentos naturales. Se ha reportado que el consumo moderado de alimentos ricos en DHA y EPA pueden posponer el declive de la cognición en adultos mayores (Van Gelder *et al.*, 2007), reducen el riesgo de padecer enfermedades cardíacas (Daviglius *et al.*, 1997) y diabetes (Liu *et al.*, 2013). Especies como *I. galbana* se han agregado en galletas (Gouveia *et al.*, 2008), en pastas (Fradique *et al.*, 2013) y en yogurt (Matos *et al.*, 2021), además, los pigmentos de *C. vulgaris* y *H. pluvialis* se han agregado exitosamente como antioxidantes (β - caroteno) en emulsiones como la mayonesa (Gouveia *et al.*, 2006), convirtiéndolos en alimentos más saludables.

En la cosmeceútica, los extractos de microalgas, como los AGPI, carotenoides, polisacáridos y ficobiliproteínas son utilizados como agentes espesantes, antioxidantes, aglutinantes y como pigmento (Ryu *et al.*, 2015; Rahman, 2020), son comúnmente añadidos en cremas anti-edad, cremas regenerativas, protectores solares y productos destinados al cuidado del cabello (Priyadarshani y Rath, 2012). *A. máxima*, *A. platensis*, *C. vulgaris*, *H. pluvialis*, *Nannochloropsis sp.*, y *N. gaditana* son microalgas actualmente presentes en este mercado (Lucakova *et al.*, 2022).

Por otra parte, los extractos de microalgas con actividad antiviral, antimicrobiana, antifúngica, antiinflamatoria y neuro protectora son aprovechados por la industria farmacéutica. Por ejemplo, estudios *in silico* reportaron actividad antiviral contra SARS-CoV-2 utilizando oligosacáridos de *Porphyridium sp.* (Hlima *et al.*, 2022) y glicolípidos extraídos de *I. galbana* mostraron actividad antiinflamatoria (Rodríguez-Luna *et al.*, 2018).

Las microalgas pueden ser aprovechadas como una fuente viable de carbohidratos, proteínas, pigmentos y lípidos, entre ellos el DHA y el EPA para satisfacer la creciente demanda en industrias como la alimenticia, cosmeceútica, farmacéutica y de energía (Steinrücken *et al.*, 2017; Cheirsilp y Maneechote, 2022).

Sin embargo, para poder explotar al máximo el potencial de las microalgas, se deben superar algunos retos, por ejemplo, se deben desarrollar sistemas de cultivo a gran escala que sean económicamente viables (Barclay y Apt, 2013; Udayan *et al.*, 2021). La cosecha de las microalgas es otro gran reto por resolver, ya que este proceso requiere un gasto energético importante (Singh y Patidar, 2018), además, uno de los cuellos de botella en el cultivo de microalgas a nivel industrial es el elevado costo de los nutrientes (Wang *et al.*, 2018), por lo que constantemente se está en la búsqueda de medios de cultivo económicos. Los medios de cultivo a base de fertilizantes agrícolas se plantean como una opción viable, ya que brindan resultados similares o mejores que los medios convencionales para la producción de biomasa y en la composición bioquímica de las microalgas (Tabla 1).

Los medios convencionales han servido de referencia para el desarrollo de los medios alternativos basados en sales inorgánicas, como los fertilizantes agrícolas (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 1999). En general, los fertilizantes agrícolas contienen macronutrientes como el nitrógeno, fósforo y potasio, y algunos incluyen micronutrientes como el hierro, zinc, cobre, magnesio y cobalto. La composición y concentración de estos nutrientes varía dependiendo del fertilizante utilizado (Grobbelaar, 2013). Entre las formas de nitrógeno más comúnmente encontradas en las formulaciones de fertilizantes agrícolas se encuentran los nitratos (NO_3^-), nitritos (NO_2^-), amonio (NH_4^+) y urea $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$.

Las condiciones de cultivo definen el crecimiento celular y la composición bioquímica de las microalgas, en general se necesita luz, CO_2 , agua, macronutrientes y micronutrientes para cultivar microalgas estrictamente autotróficas, además, se debe considerar que las condiciones óptimas de cultivo varían entre especies, ya que son muy sensibles a factores ambientales como la temperatura, la salinidad, el pH, la intensidad de luz y la disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo (Barsanti y Gualtieri, 2014). En general, se puede decir que la intensidad de luz es inversamente proporcional al contenido de clorofila α y otros pigmentos involucrados en la fotosíntesis, además, el contenido de lípidos tiende a aumentar a altas intensidades de luz.

Los macronutrientes como el nitrógeno, fósforo, vitaminas y micronutrientes como el hierro, zinc, manganeso, selenio, cobalto y níquel también son un factor importante en el desarrollo de las microalgas,

por lo que, para optimizar su cultivo es fundamental seleccionar un medio que contenga todos los nutrientes necesarios y en proporciones adecuadas (Singh *et al.*, 2015)

El nitrógeno es el nutriente inorgánico más importante después del carbono y es un componente de las proteínas, aminoácidos, nucleótidos, vitaminas, clorofilas, entre otros componentes celulares (Raven y Giordano, 2016), comúnmente se agrega en los medios de cultivo en forma de nitratos (NO_3^-), nitritos (NO_2^-) y iones de amonio (NH_4^+), siendo este último el primero en ser asimilado por las microalgas, ya que al ser el más reducido, su asimilación requiere menos energía metabólica (Syrett, 1962; Becker 1994). Cuando el nitrógeno es agregado como nitrato, se transporta al interior de la microalga por los transportadores de membrana NRT1 y NRT2.1. El transportador NRT1 es de naturaleza peptídica y es afín a los nitratos, NRT2.1 es una proteína afín a los nitratos y nitritos. En el interior de la célula, el nitrato es reducido a nitrito por la enzima nitrato reductasa (NR), el nitrito es reducido a amonio en el estroma del cloroplasto por la enzima nitrito reductasa (NiR) y finalmente el amonio es transformado en glutamato por la enzima GS/GOGAT (Syrett, 1962, Guerrero *et al.*, 1981; Sanz-Luque *et al.*, 2015), el glutamato es transportado desde el cloroplasto hacia el citosol, donde a través de la reacción de transaminación se pueden sintetizar otros aminoácidos (Barsanti y Gualtieri, 2014).

Tabla 1. Desempeño de medios de cultivo comúnmente utilizados en el cultivo de microalgas para la producción de biomasa, comparados con medios de cultivo con base en fertilizantes agrícolas (FA).

Especie	Medio de cultivo	Biomasa producida	Autores
<i>Chaetoceros muelleri</i>	"f/2", FA	FA > "f/2"	Martínez-Córdova <i>et al.</i> (2012)
<i>Scenedesmus sp.</i>	BG11, FA	FA > BG11	Soares <i>et al.</i> (2018)
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	MBB, FA	FA > MBB	Abdulsamad <i>et al.</i> (2019)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	BG11, FA	Diferencias no significativas	Covell <i>et al.</i> (2020)
<i>Isochrysis galbana</i>	ALGAL, FA	Diferencias no significativas	Camacho-Rodríguez <i>et al.</i> (2020)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	MBB, FA	Diferencias no significativas	Sanghamitra <i>et al.</i> (2020)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	BG11, FA	Diferencias no significativas	Ribeiro <i>et al.</i> (2020)

La limitación del nitrógeno es uno de los métodos más efectivos para inducir la acumulación de compuestos en las microalgas (Song *et al.*, 2022), sin embargo, el estrés generado por esta condición lleva a la reducción del crecimiento poblacional e induce cambios en la composición bioquímica de las microalgas (Nayak *et al.*, 2019). Utilizando este método, el carbono fijado en la fotosíntesis se incorpora en los lípidos y carbohidratos (Li *et al.*, 2011). En experimentos con *H. pluvialis*, *Nannochloropsis* sp., *I. galbana* y otras microalgas se ha demostrado que la limitación de nitrógeno afecta de manera positiva la síntesis de ácidos grasos (Breuer *et al.*, 2012; Recht *et al.*, 2012). Estudios recientes en este tema se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Efectos de la limitación de nitrógeno en el cultivo de distintas especies de microalgas. La concentración de nitrógeno comúnmente utilizada en cultivos para la producción de biomasa microalgal está en el intervalo de 0.882 a 1.76 mmol L⁻¹.

Especie	Limitación de nitrógeno (mmol L ⁻¹)	Efecto	Autores
<i>I. galbana</i>	Moderada (0.44) y total (0)	Inhibición de la fotosíntesis y el crecimiento	Song <i>et al.</i> (2018)
<i>Tetraselmis subcordiformis</i> , <i>Nannochloropsis oculata</i> ,	Moderada (0.22, 0.44) y total (0)	Aumento en el contenido de lípidos	Huang <i>et al.</i> (2013)
<i>Phaeodactylum tricorutum</i> , <i>I. aff. galbana</i> , <i>Rhodomonas baltica</i> , <i>N. oceanica</i>	Alta (0.08)	Alto contenido de lípidos y ácidos grasos	Wang <i>et al.</i> (2019)
<i>Chaetoceros</i> sp., <i>P. viridis</i> , <i>N. oculata</i> y <i>P. tricorutum</i>	Alta (0.08)	Incremento de ácidos grasos y EPA	Gong <i>et al.</i> (2013)
<i>C. muelleri</i>	Moderada (0.44) y alta (0.18)	Aumento en el contenido de lípidos	de Jesus-Campos <i>et al.</i> (2020)
<i>Scenedesmus acuminatus</i>	Total (0)	Aumento en el contenido de lípidos y carbohidratos	Zhang <i>et al.</i> (2019)

Isochrysis galbana es una microalga marina que ha despertado el interés de los investigadores por su alto contenido de lípidos y por tener la capacidad de producir y almacenar ácidos grasos poliinsaturados, principalmente el DHA (ácido docosahexaenóico, 22:6n3), el EPA (ácido eicosapentaenóico, 20:5n3), y el ARA (Ácido araquidónico, 20:4n6), todos de gran valor nutricional (Liu y Lin, 2001). Además, la biomasa de esta microalga contiene hasta un 41% de proteína, 5% carbohidratos y 21% lípidos (Brown *et al.*, 1989). Se debe agregar que esta microalga es una especie con potencial para la producción de compuestos de interés industrial como el DHA, EPA, fucoxantina, β - glucano, además de contener los 10 aminoácidos esenciales para los humanos (Kim *et al.*, 2012; Gorgonio *et al.*, 2013; Mishra y Mishra, 2018).

Aunque existe un gran avance en el estudio de *I. galbana*, es necesario optimizar su cultivo para que el aprovechamiento de su biomasa y de las moléculas que sintetiza sea económicamente viable. El uso de fertilizantes para la preparación de su medio de cultivo es una alternativa económica, que requiere poco esfuerzo y que está disponible en la mayoría de los mercados. El objetivo de este estudio es evaluar la asimilación de nitrógeno y optimizar el cultivo de *I. galbana* utilizando fertilizantes agrícolas como fuente de nutrientes.

1.1 Justificación

La creciente demanda de alimentos y productos de origen natural como los pigmentos carotenoides, el DHA y el EPA derivados del crecimiento de la población y del rápido crecimiento de la acuicultura, ha impulsado la búsqueda de fuentes alternativas para satisfacer la demanda del mercado. Las microalgas son una fuente adecuada de biomoléculas con beneficio para diferentes industrias, sin embargo, su cultivo a gran escala presenta limitaciones tecno-económicas que, actualmente, no permiten su consolidación a nivel industrial. En la fase de cultivo, se enfrentan ciertos retos como el alto costo de la energía eléctrica, la complejidad del proceso de cosecha de la microalga y el elevado costo de los medios de cultivo. La introducción de fertilizantes agrícolas en el cultivo de microalgas ha resultado una alternativa económica y que contribuye al desarrollo de esta actividad a gran escala. Las microalgas se perfilan como biorrefinerías de moléculas altamente demandadas por la acuicultura. Sin embargo, se requieren más estudios para optimizar su cultivo y para estandarizar las condiciones que propicien el desarrollo de una biomasa con características adecuadas para su producción a nivel industrial.

1.2 Hipótesis

Los medios con base en fertilizantes agrícolas (BF y T20) tendrán un desempeño igual o superior al medio convencional “f/2” en el cultivo semimasivo (15 L) de *Isochrysis galbana* aun cuando existen diferencias en la composición de estos medios de cultivo, en especial la fuente de nitrógeno.

La concentración y calidad de *Isochrysis galbana* cultivada con fertilizantes agrícolas será similar o superior a la producida con el medio convencional “f/2”.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Evaluar la asimilación de diferentes fuentes de nitrógeno y determinar su efecto sobre el crecimiento y la composición proximal de *Isochrysis galbana* cultivada en un sistema estático a nivel semimasivo (15 L).

1.3.2 Objetivos específicos

Evaluar la concentración residual de nitratos (NO_3^-), nitritos (NO_2^-), amonio (NH_4^+) y fosfatos (PO_4^-) en el cultivo de *I. galbana* a nivel semimasivo (15 L).

Evaluar la biomasa de *I. galbana* (número de células, peso seco, proteínas, lípidos y carbohidratos) producida con el medio “f/2” y con diferentes fertilizantes agrícolas, en un sistema estático a nivel semimasivo (15 L).

Capítulo 2. Metodología

2.1 Origen de la cepa

La cepa de *Isochrysis galbana* utilizada en este estudio fue proporcionada por el Cepario de Microalgas del Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). La cepa se mantuvo en un matraz Erlenmeyer de 150 mL con medio “f/2” Guillard (1983) y en condiciones controladas de temperatura de 21 ± 1 °C, salinidad de 35 ups e irradiancia de $30 \mu\text{m m}^{-2}\text{s}^{-1}$ proporcionada por lámparas fluorescentes de 40W.

2.2 Cultivo de *I. galbana*

El cultivo de *I. galbana* se realizó mediante escalamientos sucesivos de 125 mL, 2 L y 15 L. Los cultivos de 125 mL y 2 L se hicieron con agua de mar, previamente esterilizada en autoclave durante 15 min a 121 °C y 15 libras de presión. Los cultivos a nivel semimasivo (15 L) se realizaron con agua de mar previamente filtrada (filtros de 10 μm , 5 μm y 1 μm), posteriormente se irradió con luz ultravioleta y por último se esterilizó siguiendo el método descrito por Hemerick (1974), agregando cloro comercial (3 mL L^{-1}) por 24 h, después se agregó 150 mg L^{-1} de tiosulfato de sodio y aireación profusa por 24 h, para la total eliminación del cloro.

Los cultivos se iniciaron con tres medios de cultivo: 1) fertilizante granulado Triple 20 (T20) de la marca Valagro™; 2) fertilizante foliar Bayfolan Forte™ (BF) de la marca Bayer y; 3) medio “f/2” como control (Tabla 3). Los cultivos se mantuvieron en condiciones controladas de laboratorio: 21 ± 1 °C, intensidad de luz de $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, durante los dos primeros días de cultivo, y de $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante los días siguientes, el pH se mantuvo entre 8 y 8.5 con inyección de CO₂. Se adicionaron vitaminas a los tres medios en la misma concentración.

Tabla 3. Composición de los medios de cultivo utilizados para el cultivo de *Isochrysis galbana* (valores expresados en $\mu\text{M L}^{-1}$). Los medios T20 y BF fueron normalizados tomando como referencia la concentración de nitrógeno del medio "f/2" y se adicionaron vitaminas.

Nutriente	Medio de cultivo		
	"f/2"	T20	BF
N	882	882	882
P	36	87	61
K	-	131	69
B	-	1	4
Cu	0.04	0.5	1
Fe	12	1.1	1
Mo	0.02	-	0.1
Zn	0.08	0.5	1
S	-	-	8
Ca	-	-	1
Co	0.04	-	0.04
Mn	0.91	0.6	1
Mg	-	-	1
Tiamina	3	3	3
Biotina	0.0020	0.0020	0.0020
B ₁₂	0.0004	0.0004	0.0004

2.3 Evaluación del crecimiento de *I. galbana* con los medios de cultivo con base en fertilizantes agrícolas

Para evaluar el crecimiento de *I. galbana* con los medios con base en fertilizantes agrícolas T20, BF, y con el medio "f/2" como control, se realizaron cultivos por lotes en botellones de vidrio de 20 L, con un volumen útil de 15 L. La composición de los macronutrientes que los componen se muestra en la tabla 4. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado, iniciando con una concentración celular de 200×10^3 cél·mL⁻¹.

Tabla 4. Fuente de macronutrientes (nitrógeno, fósforo y potasio) de los medios utilizados en el cultivo de *Isochrysis galbana*. T20 (Triple 20), BF (Bayfolan Forte™).

Medio	Fuente de N	Fuente de P	Fuente de K
"f/2"	Nitrato de sodio	NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	No contiene
T20	Amonio, urea y nitrato de sodio	P ₂ O ₅	K ₂ O
BF	No especificado por el fabricante	P ₂ O ₅	K ₂ O

El agua de mar utilizada para los cultivos se trató como se mencionó anteriormente para cultivos semimasivos. Los cultivos se mantuvieron durante 14 días bajo las mismas condiciones de laboratorio mencionadas en el apartado 2.2 de este capítulo.

2.4 Análisis de la concentración residual y del consumo de nutrientes

Para cuantificar la concentración de nutrientes en el medio de cultivo, se analizaron los contenidos residuales de amonio (NH_4^+), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) y fosfatos (PO_4^-). Se realizaron previamente curvas de calibración con cloruro de amonio (NH_4Cl), nitrito de sodio (NaNO_2), nitrato de potasio (KNO_3) y fosfato trisódico (Na_3PO_4) como estándares para amonio, nitritos, nitratos y fosfatos, respectivamente. Para medir la concentración de nutrientes, diariamente se recolectaron 10 mL de cultivo de cada unidad experimental ($n=3$ por tratamiento), se centrifugaron a 3000 rpm, a 10°C durante 15 min y se recuperó el sobrenadante, se siguieron los métodos descritos por Adams (1990), Tsikas (2005), Collos *et al.* (1999) y Strickland y Parsons (1972).

El consumo de nutrientes (CN) en los cultivos de *I. galbana* se calculó diariamente con la siguiente ecuación:

$$\text{CN} = \text{Ci} - \text{Cf} \quad (1)$$

Donde:

Ci: concentración inicial

Cf: concentración final

2.5 Cuantificación de la concentración celular

Diariamente se recolectaron 10 mL de los cultivos y se realizaron recuentos celulares bajo un microscopio compuesto (Carl Zeiss Primo Star), utilizando un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad. Se utilizaron las ecuaciones propuestas por Guillard (1973) para calcular la concentración celular (C) y la tasa de crecimiento específica (μ , divisiones día^{-1}).

La concentración celular (C , $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$) se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$C = N * 10^4 * Dil \quad (2)$$

Donde:

N : promedio de células en ocho cuadrantes

10^4 : factor de conversión de $0.1 \mu\text{L}$ a 1 mL

Dil : factor de dilución

La tasa de crecimiento (μ) se calculó con base en los conteos celulares utilizando la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{\ln(X_2) - \ln(X_1)}{(T_2 - T_1)} \quad (3)$$

Donde:

μ : tasa de crecimiento

X : concentración celular (cél ml^{-1})

T : tiempo en días

2.6 Peso seco total (PST) y orgánico (PO)

Para cuantificar el PST y el PO en los cultivos a nivel semimasivo (15 L), se hicieron cuatro muestreos a lo largo del experimento. De cada unidad experimental se concentró 20 mL de cultivo en filtros Whatman GF/C de fibra de vidrio, de 47 mm de diámetro y $1.2 \mu\text{m}$ de retención de partículas. Antes de filtrar la muestra, los filtros se lavaron con agua destilada, se incineraron en una mufla a $500 \text{ }^\circ\text{C}$ y se pesaron. Los filtros con microalgas se colocaron en una estufa a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 h y se pesaron para determinar el PST,

posteriormente fueron incinerados a 500 °C durante 12 h y pesados para determinar el peso de las cenizas (PC). Por diferencia de peso entre el peso seco total y el peso de las cenizas se calculó el PO (Sorokin, 1973).

2.7 Análisis de la composición proximal de *I. galbana*

Para analizar el contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos en los diferentes tratamientos, se hicieron cuatro muestreos abarcando distintas fases de crecimiento de *I. galbana*. De cada unidad experimental se tomó una alícuota de 15 mL y se centrifugó a 3500 rpm, a 10 °C durante 15 min, se descartó el sobrenadante y el paquete celular se almacenó en un congelador a -20°C para su posterior análisis. Para la cuantificación de proteínas se realizó una curva de calibración con seroalbúmina bovina (BSA) como estándar. La extracción se realizó con NaOH 0.1 N siguiendo el método de Rausch (1981) y para la cuantificación se utilizó el método de Lowry *et al.* (1951).

La curva de calibración de lípidos totales se hizo con el estándar tripalmitina, la extracción de lípidos se hizo con diclorometano metanol (1:2 v/v) (Bligh y Dyer, 1959) y la cuantificación se realizó con el método de Pande *et al.* (1963). La extracción de carbohidratos se hizo con H₂SO₄ 1 M, (Whyte, 1987) y la determinación según el método de Dubois *et al.* (1956). La curva de calibración se hizo con glucosa anhidra como estándar. Las lecturas de absorbancia de todas las muestras se realizaron en un detector de absorbancia Beckman Coulter AD200.

2.8 Análisis estadístico

Para evaluar los supuestos de normalidad y homocedasticidad de varianza de los datos recabados en este estudio se aplicaron las pruebas Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente.

Para evaluar el efecto de los distintos medios de cultivo en el crecimiento de *I. galbana* se hizo un análisis de covarianza, para la tasa de crecimiento se utilizó un análisis no paramétrico de Kruskal – Wallis. Para identificar el efecto de los distintos tratamientos y las fases de crecimiento en la composición proximal de *I. galbana* se hizo un análisis de varianza de dos vías. Por último, para comparar la concentración y consumo de nutrientes se utilizó un análisis de varianza. Para las variables en las que se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) se hizo un análisis *a posteriori* de Tukey. Todos los análisis estadísticos se hicieron utilizando el software Rstudio.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Crecimiento de *I. galbana* a nivel semi masivo (15 L)

3.1.1 Concentración celular (cél mL⁻¹) de *I. galbana* a nivel semi masivo

En la figura 1 se muestra el crecimiento de *I. galbana* cultivada con los tres medios de cultivo: BF, T20 y el medio “f/2” como control. La concentración celular máxima alcanzada por cada tratamiento fue de 4094 x10³ (“f/2”), 3400 x10³ (BF) y 4539 x10³ (T20) cél mL⁻¹. La producción de biomasa fue similar en los tres medios hasta el día 9 de cultivo ($p > 0.05$), sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos al día 11 ($p < 0.05$), los mejores resultados se obtuvieron con el medio T20 y “f/2” con 4539 x10³ y 4094 x10³ cél mL⁻¹ respectivamente, el medio BF tuvo un rendimiento menor, con 3322 x10³ cél mL⁻¹.

En general, con los tres medios, *I. galbana* estuvo en la fase de acondicionamiento durante los primeros dos días de cultivo, donde se obtuvieron tasas de crecimiento (μ) de 0.0 a 0.3 div día⁻¹ sin diferencias significativas entre las tasas de crecimiento ($p > 0.05$). Así mismo, la fase de crecimiento exponencial con los tres medios inició a partir del día 3 y se mantuvo en esta fase hasta el día 6 de cultivo, al día 4 se alcanzó la mayor tasa de crecimiento en los tres tratamientos, con 1.0 a 1.3 div día⁻¹ y con una concentración celular de 1217x10³ a 1277 x10³ cél mL⁻¹ sin diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$). Con el medio “f/2” control, la fase de crecimiento lento tuvo una duración de tres días (7, 8 y 10) con tasas de crecimiento de 0.3, 0.1 y 0.2 div día⁻¹ respectivamente y la fase estacionaria se presentó en el día 9 de cultivo con una tasa de crecimiento de 0.0 div día⁻¹, con el medio BF el cultivo estuvo en crecimiento lento durante los días 7 y 10 con tasas de crecimiento de 0.3 y 0.1 div día⁻¹ y entró en la fase estacionaria el día 8 de cultivo ($\mu = 0.0$ div día⁻¹), por otra parte, con el medio T20 la fase de crecimiento lento tuvo una duración de cinco días ($\mu = 0.1$ a 0.2 div día⁻¹) abarcando los días 7 al día 11 de cultivo, no se observó la fase estacionaria en los cultivos con el medio T20. Por último, con los tratamientos “f/2” y BF los cultivos entraron en la fase de muerte a partir del día 11 y en el tratamiento T20 al día 12.

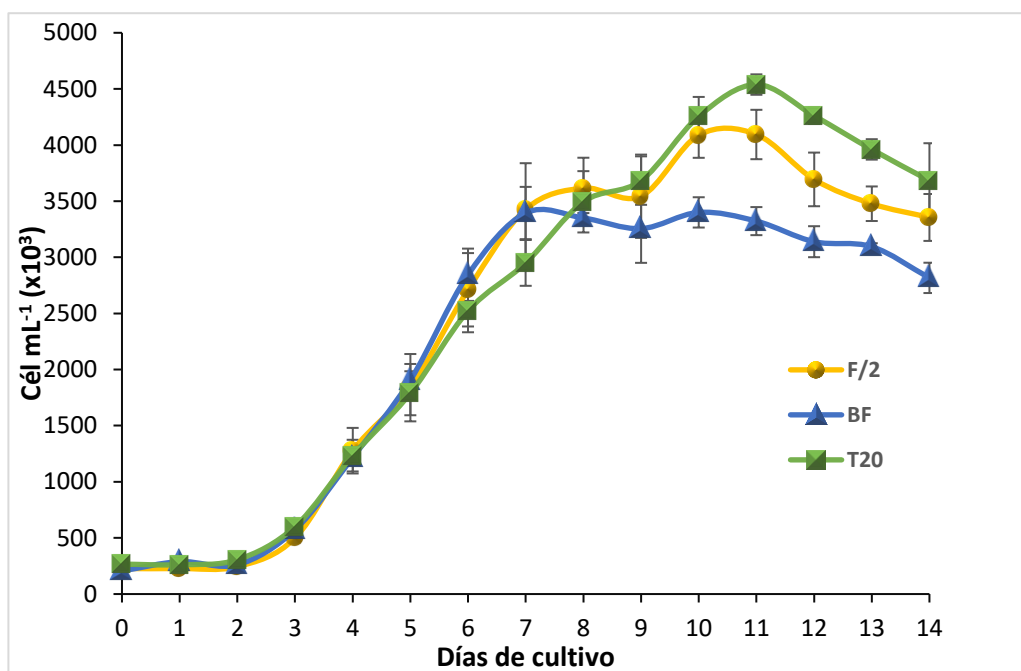


Figura 1. Crecimiento de *Isochrysis galbana* cultivada a nivel semi masivo con los medios alternativos BF, T20 y el medio control "f/2". Las barras verticales indican la desviación estándar (n=3).

3.1.2 Peso seco total (PST) y orgánico (PSO) de *I. galbana* a nivel semi masivo

La biomasa producida con base en el peso seco total unitario (PSTU) y peso seco orgánico unitario (POU) expresada en $\mu\text{g célula}^{-1}$ se muestra en las figuras 2 y 3 respectivamente. Con los tres medios de cultivo, los valores máximos de PSTU se registraron al día 3, con un peso promedio entre 441 y 363 $\mu\text{g célula}^{-1}$, sin diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$). En general, el PSTU tiende a disminuir desde el día 3 hasta el día 7 de cultivo ($p < 0.05$), donde se registraron pesos de 132, 121 y 147 $\mu\text{g célula}^{-1}$ con los medios "f/2", BF y T20, respectivamente, después de este día de cultivo no se observaron diferencias en los PSTU ($p > 0.05$).

Tomando como referencia solamente la fracción orgánica (POU) de *I. galbana* (Figura 3), con los tres medios se alcanzaron los valores máximos de POU en el día 3 de cultivo, con valores entre 154 y 122 $\mu\text{g célula}^{-1}$, no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos por día ($p > 0.05$). Al igual que con el PSTU, el POU tiende a disminuir desde el día 3 hasta el día 7 de cultivo ($p < 0.05$), sin cambios significativos en los días posteriores ($p > 0.05$).

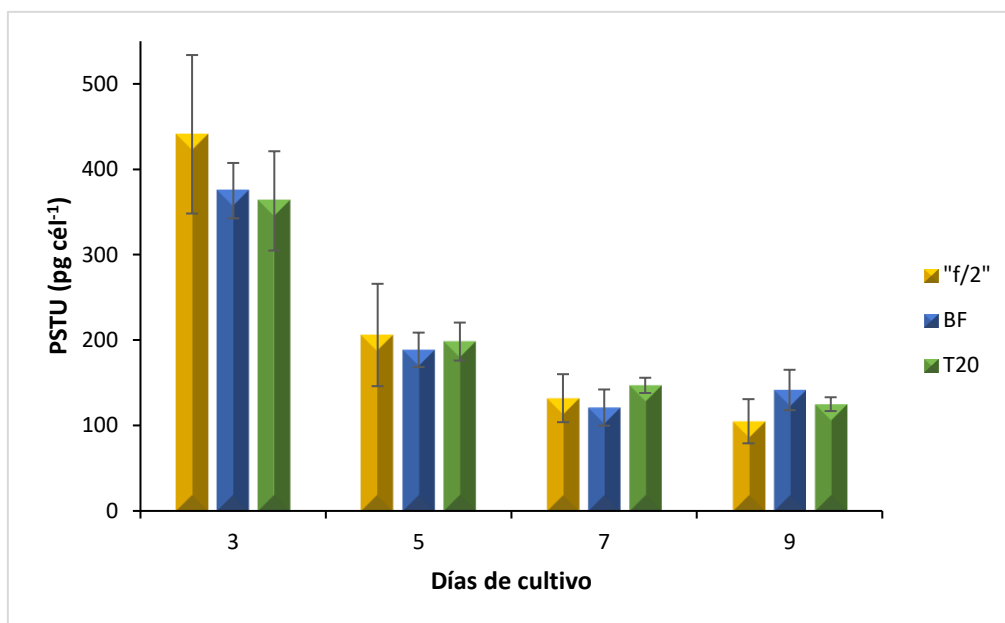


Figura 2. Peso seco total unitario (PSTU) de *Isochrysis galbana* cultivada a nivel semi masivo con dos medios elaborados con fertilizantes agrícolas (BF y T20) y con el medio control "f/2". Las barras verticales indican la desviación estándar (n=3).

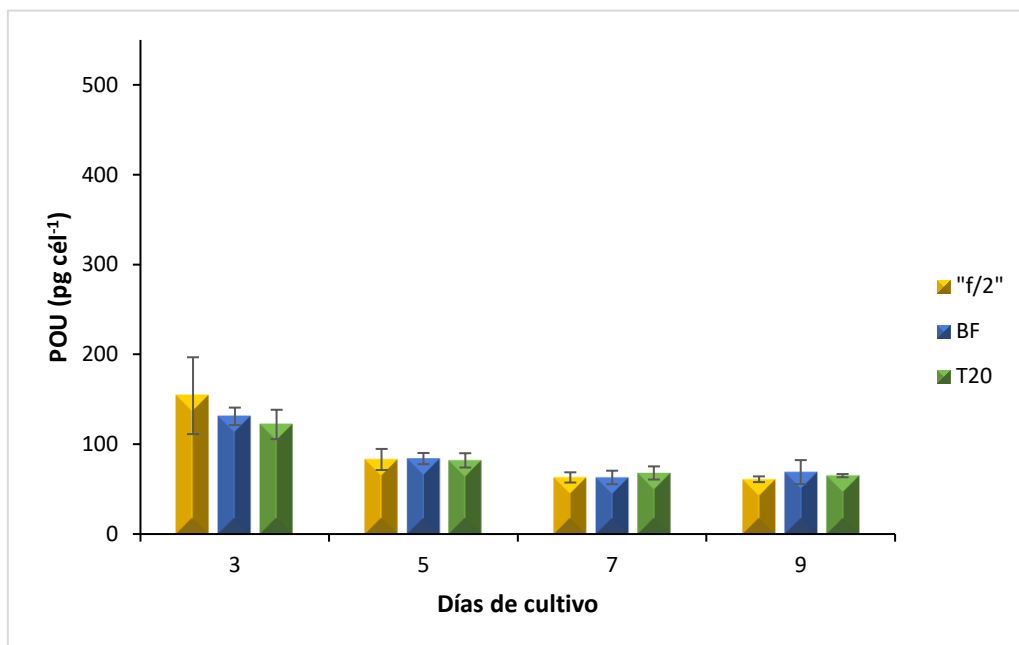


Figura 3. Peso seco orgánico unitario (PSOU) de *Isochrysis galbana* cultivada a nivel semi masivo con dos medios elaborados con fertilizantes agrícolas (BF y T20) y con el medio control "f/2". Las barras verticales indican la desviación estándar (n=3).

3.2 Composición proximal de *I. galbana*

Los resultados de la composición proximal (proteínas, lípidos y carbohidratos) de *I. galbana* se expresan en $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$, con base en el peso orgánico unitario. El contenido de proteínas de *I. galbana* se muestra en la figura 4, con el tratamiento control “f/2” el contenido máximo de proteínas se alcanzó en el día 3 de cultivo con $19.7 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$ y disminuyó a $12.1 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$ al día 7 ($p < 0.05$), después de este día no se observaron cambios significativos. En los tratamientos BF y T20 el contenido de proteínas fue constante a lo largo del cultivo con valores entre 10.9 y $15 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$ ($p > 0.05$). Solamente se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos al día 3 de cultivo, el contenido de proteínas fue mayor en los medios “f/2” ($19.7 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$) y BF ($15 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$) en comparación con el medio T20 ($12.1 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$) ($p < 0.05$). A partir del día 5 el contenido de proteínas entre tratamientos fue similar.

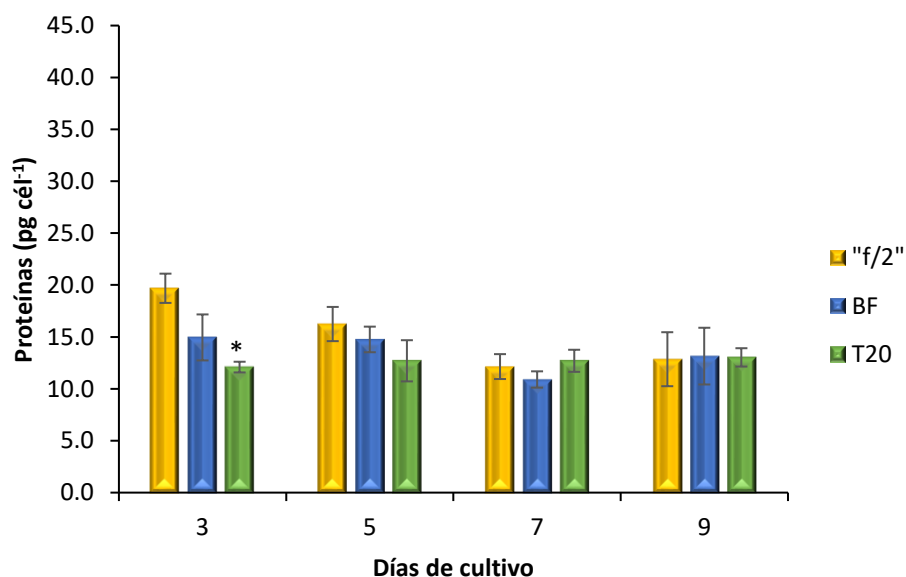


Figura 4. Contenido de proteínas de *Isochrysis galbana* ($\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$ con base en el PSOU) cultivada a nivel semi masivo (15 L) con los medios alternativos BF, T20, y con el medio control “f/2”. Las barras verticales indican la desviación estándar ($n=3$), el asterisco (*) indica diferencias significativas.

El contenido de lípidos de *I. galbana* a lo largo del cultivo se puede apreciar en la figura 5, en general se pueden observar tres tendencias distintas, con el medio “f/2” el contenido de lípidos tiende a disminuir significativamente entre los días 3 ($36.1 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$) y 7 ($18.1 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$) ($p < 0.05$), en el día 9 el contenido de lípidos aumenta significativamente en comparación del día 7, pasando de $18 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$ a $27.6 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$ ($p < 0.05$); En el medio BF el contenido de lípidos disminuye en el día 7 con $19.4 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$, éste fue el contenido mínimo observado a lo largo del cultivo ($p < 0.05$); Por otra parte, con el medio T20 el contenido de lípidos

se mantuvo constante a lo largo del cultivo, con valores entre 20.8 y 25 $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$ ($p > 0.05$). Al comparar el contenido de lípidos entre tratamientos, solamente se encontraron diferencias significativas en el día 3 de cultivo, donde el medio "f/2" (36.1 $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$) y el medio BF (29.9 $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$) presentaron un mayor contenido de lípidos que el medio T20 (20.8 $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$).

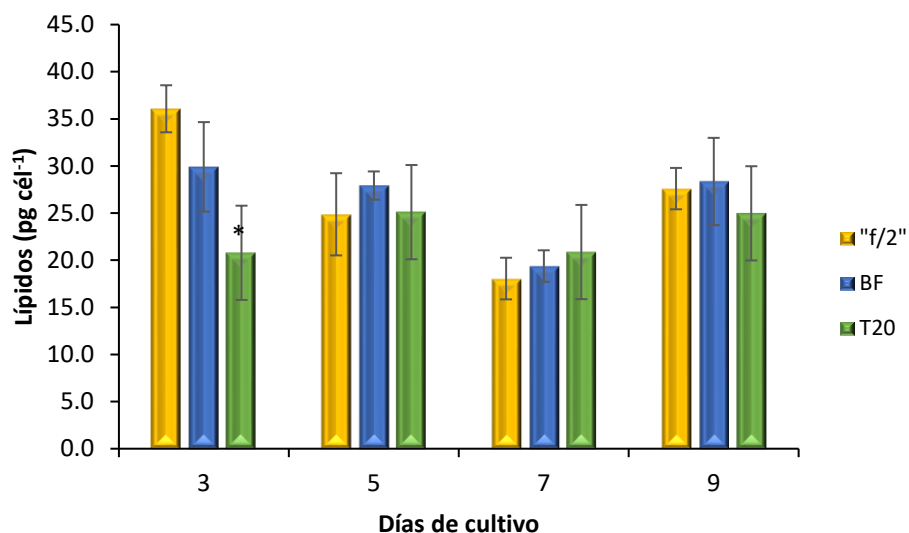


Figura 5. Contenido de lípidos de *Isochrysis galbana* ($\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$ con base en PSOU) cultivada a nivel semi masivo (15 L) con los medios alternativos BF, T20 y con el medio control "f/2". Las barras verticales indican la desviación estándar ($n=3$), el asterisco (*) indica diferencias significativas entre tratamientos por día.

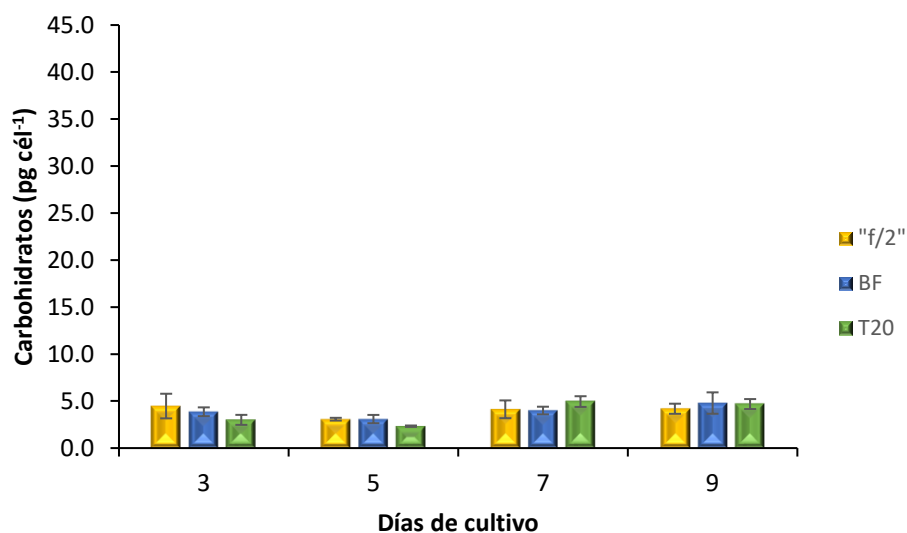


Figura 6. Contenido de carbohidratos de *Isochrysis galbana* ($\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$ con base en PSOU) cultivada a nivel semi masivo (15 L) con los medios alternativos BF, T20 y con en el medio control "f/2". Las barras verticales indican la desviación estándar ($n=3$).

Los carbohidratos son el componente menos abundante de la composición proximal de *I. galbana* (Figura 6). En general, en los tres medios el contenido de carbohidratos fue menor al día 5, con valores entre 2.3 y 3.1 pg cél⁻¹, al día 7 el contenido de esta fracción se incrementó significativamente, alcanzando entre 4 y 4.9 pg cél⁻¹ ($p < 0.05$). Después al día 7 de cultivo, el contenido de carbohidratos se mantuvo constante. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos a lo largo del cultivo ($p > 0.05$).

3.3 Consumo de nutrientes durante el cultivo de *I. galbana*

La concentración residual de nitratos durante el cultivo se muestra en la figura 7. La concentración inicial promedio de nitratos fue distinta en los tres tratamientos ($p < 0.05$), con el medio control "f/2" la concentración inicial fue más alta (1032 μM), mientras que con el medio BF fue la más baja (315 μM) ($p < 0.05$). El nitrato residual alcanzó concentraciones mínimas desde el día 7 con los tres medios de cultivo, con valores de 106, 69 y 120 μM para los medios "f/2", BF y T20 respectivamente, en los días de cultivo posteriores no se observaron cambios significativos ($p > 0.05$). El consumo diario de nitratos fue mayor con el medio "f/2" a partir del día 3 de cultivo ($p < 0.05$).

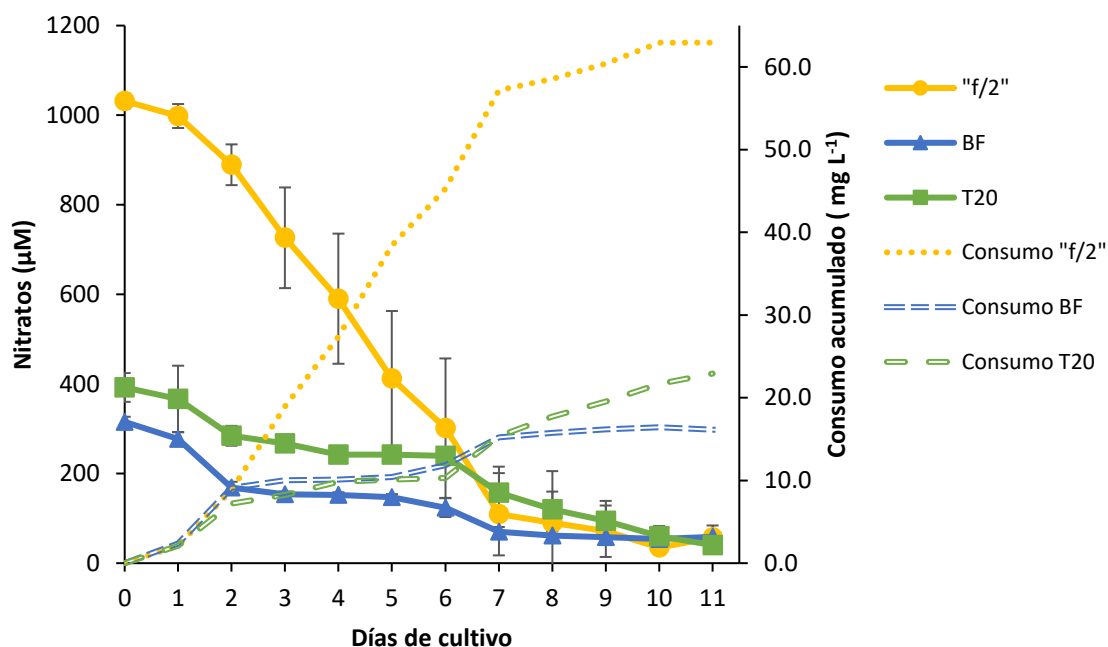


Figura 7. Concentración residual y consumo acumulado de nitratos durante el cultivo de *Isochrysis galbana* cultivada con los medios alternativos BF y T20 y con el medio control "f/2". barras verticales indican la desviación estándar ($n = 3$).

El amonio es una fuente de nitrógeno en los medios BF y T20. El medio control "f/2" (Figura 8), no contiene esta forma de nitrógeno por lo que no se detectó a lo largo del cultivo. La concentración de amonio inicial y a lo largo del cultivo fue mayor con el medio BF en comparación con el medio T20 ($p < 0.05$). En los tratamientos con los medios BF y T20, la concentración inicial de amonio fue de $113 \mu\text{M}$ y $53.8 \mu\text{M}$ respectivamente, y se consumió en su totalidad al día 3 de cultivo. Sin embargo, el consumo aparente al día 3 de cultivo, fue mayor con el medio BF (0.71 mg L^{-1}) que con el medio T20 (0.12 mg L^{-1}) ($p < 0.05$).

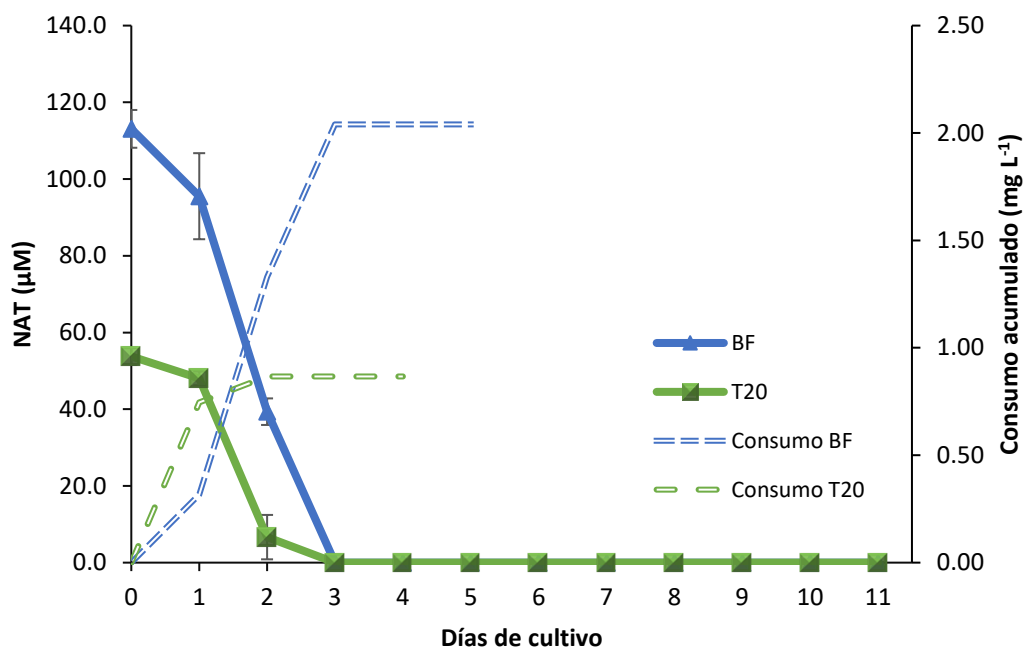


Figura 8. Concentración residual y consumo acumulado de amonio (NAT) durante el cultivo semi masivo de *Isochrysis galbana* utilizando los medios alternativos BF y T20. Las barras verticales indican la desviación estándar ($n=3$).

A lo largo del cultivo de *I. galbana* se observó la acumulación de nitritos en todos los medios (Figura 9), la concentración aumentó desde el inicio del cultivo. El consumo aparente de esta fuente de nitrógeno inició una vez que se agotó el amonio y los nitratos. El medio control "f/2" tuvo la mayor concentración de nitritos, con $49 \mu\text{M}$ al día 6 de cultivo, esta concentración fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que la alcanzada en el medio BF ($15.2 \mu\text{M}$) y T20 ($12.7 \mu\text{M}$). En general, el consumo de nitritos fue mayor en los medios "f/2" y T20 que en el medio BF ($p < 0.05$). En los tres medios de cultivo, el nitrógeno fue limitante a partir del día 7 y los nitritos fueron la última fuente de nitrógeno en ser asimilada.

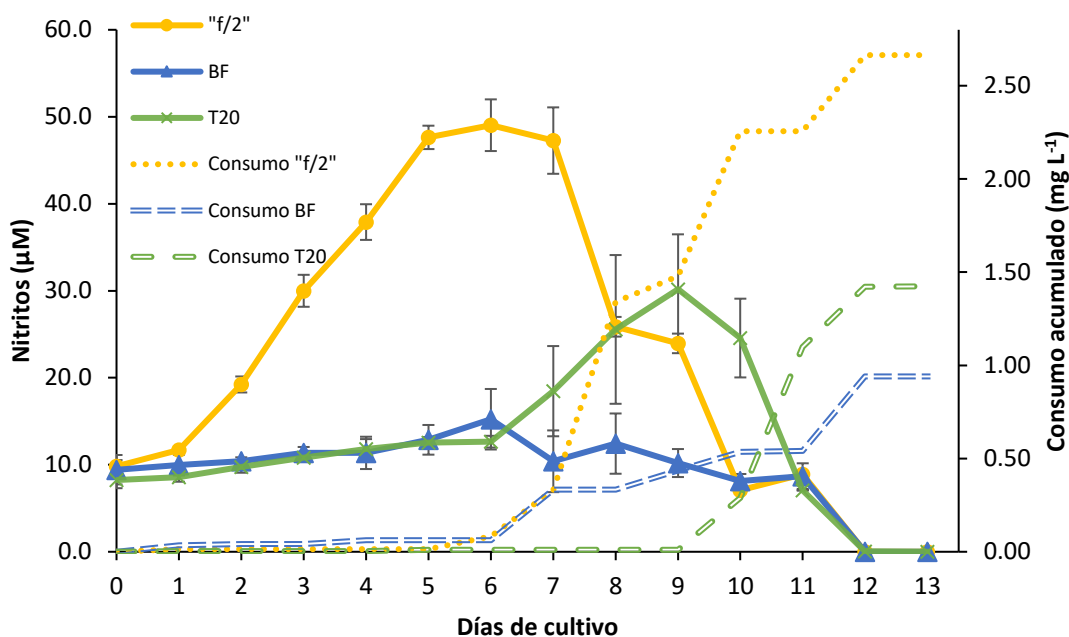


Figura 9. Concentración residual y consumo acumulado de nitritos durante el cultivo de *Isochrysis galbana* con los medios alternativos BF y T20 y con el medio "f/2" como control. Las barras verticales indican la desviación estándar (n=3).

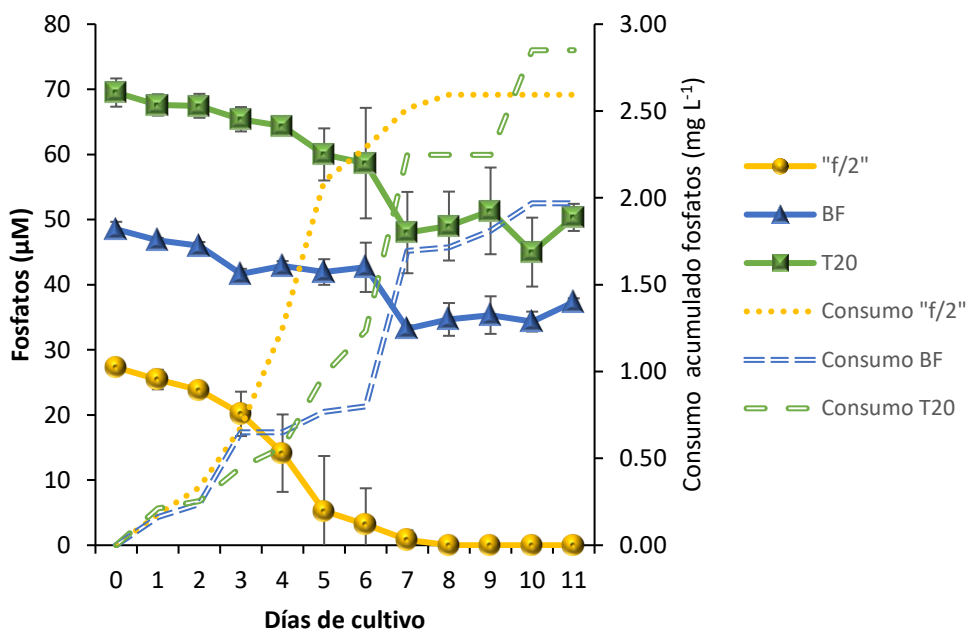


Figura 10. Concentración residual y consumo acumulado de fosfatos durante el cultivo de *Isochrysis galbana* a nivel semi masivo (15 L) con los medios alternativos BF y T20 y con el medio control "f/2". Las barras verticales indican la desviación estándar (n = 3).

En cuanto a los fosfatos, el consumo total de este nutriente a lo largo del cultivo fue de 2.59, 1.97 y 2.85 mg L⁻¹ en el medio control “f/2”, BF y T20 respectivamente. La concentración inicial de fosfatos (Figura 10) fue diferente para los tres medios, de 70, 49 y 28 μM para T20, BF y para el medio control “f/2” respectivamente (p < 0.05). En el medio “f/2” los fosfatos se agotaron al día 7 y en este mismo día en los medios BF y T20 los fosfatos alcanzaron su concentración mínima, sin cambios significativos en los días posteriores (p > 0.05). El consumo de fosfatos entre los tratamientos fue similar desde el inicio del cultivo y hasta el día 3 (p > 0.05) y se encontraron diferencias significativas a partir del día 4 cultivo (p < 0.05), en general el consumo de este nutriente fue mayor en los medios “f/2” y T20, en el medio BF se registró un menor consumo de este nutriente.

3.4 Costos de los medios de cultivo y rendimiento en la producción de *I. galbana*

Los medios de cultivo elaborados con fertilizantes agrícolas son más económicos que los de grado laboratorio (Tabla 5), un litro de medio “f/2” de la marca UTEX™, listo para usarse, tiene un costo de 55 dólares (\$55 USD L⁻¹), comparativamente, un litro de medio “f/2” concentrado grado reactivo tiene un costo de 95 dólares y rinde para 1000 L de cultivo (\$0.095 USD L⁻¹). Por otra parte, los medios alternativos con base en fertilizantes agrícolas como el medio BF y T20 brindan un mayor rendimiento a menor costo, con 1 kg de fertilizante T20 se pueden preparar 16,000 L de medio de cultivo teniendo un costo por litro de \$0.00035 USD y 1 L del fertilizante BF rinde 11,300 L resultando en un costo por litro de \$0.00053 USD.

Tabla 5. Costo en dólares de los medios de cultivo grado laboratorio y medios alternativos con base en fertilizantes agrícolas.

	Medio “f/2” UTEX™	Medio “f/2” Bigelow™	Medio T20	Medio BF
Precio (dólares)	55	95	5.7	6
Cantidad	1 L	1 L	1 kg	1 L
Rendimiento	1 L	1000 L	16 000 L	11 300 L

En la tabla 6 se resumen los resultados de la productividad del cultivo de *I. galbana* en gramos por unidad de volumen (g L⁻¹) con los tres medios de cultivo utilizados. La comparación entre los tres tratamientos

indica que la productividad fue similar ($p > 0.05$). Tomando en cuenta el PST de *I. galbana*, se alcanzó una producción máxima entre 0.40 y 0.46 g L⁻¹ al día 9 de cultivo. La fracción orgánica (PO) producida al día 9 de cultivo estuvo entre 0.2 y 0.23 g L⁻¹ de la cual entre 90 y 96 mg L⁻¹ corresponden a los lípidos.

Tabla 6. Productividad del cultivo semi masivo (15 L) de *Isochrysis galbana* cultivada con los medios alternativos BF y T20 y con el medio “f/2” como control.

Medio	Día de cultivo	Concentración celular (Cél mL ⁻¹)	PST (g L ⁻¹)	PSO (g L ⁻¹)	Lípidos (mg L ⁻¹)	Proteínas (mg L ⁻¹)	Carbohidratos (mg L ⁻¹)
“f/2”	3	499 000	0.20	0.10	20	10	2
	5	1 838 000	0.36	0.16	46	26	6.5
	7	3 427 000	0.40	0.20	60	43	14
	9	3 544 000	0.40	0.20	96	43	14
BF	3	572 000	0.20	0.10	20	10	2
	5	1 906 000	0.36	0.16	56	26	6
	7	3 394 000	0.40	0.20	63	36	14
	9	3 256 000	0.43	0.20	90	40	15
T20	3	600 000	0.20	0.10	10	10	1.6
	5	1 789 000	0.36	0.13	46	23	4
	7	2 950 000	0.43	0.20	60	36	14
	9	3 683 000	0.46	0.23	93	43	17

Capítulo 4. Discusión

Los medios de cultivo alternativos surgen de la necesidad de reducir los costos asociados a la producción de microalgas, entre las alternativas utilizadas se encuentran los residuos agroindustriales, las aguas residuales, efluentes provenientes de la industria acuícola y los fertilizantes agrícolas, entre otros. Como lo mencionan Voltolina *et al.* (1998), los primeros trabajos sobre el uso de fertilizantes agrícolas como medio de cultivo iniciaron alrededor de 1985 y desde entonces se han probado distintas formulaciones comerciales como medios alternativos para diversas especies, como en el caso de *Isochrysis galbana*, microalga marina de gran importancia económica, muy utilizada en la acuicultura como alimento vivo para los cultivos de organismos filtradores y para enriquecer el zooplancton que se utiliza en el cultivo de diferentes especies de organismos acuáticos, como las larvas de camarón y de peces marinos (Muller-Feuga, 2000; Guedes y Malcata, 2012), además, recientemente esta y otras microalgas se han utilizado en aplicaciones biotecnológicas (Kholssi *et al.*, 2021).

En el cultivo de microalgas estrictamente autotróficas, el crecimiento celular está regulado por la cantidad y calidad de los nutrientes, así mismo, la irradiancia, la temperatura, la salinidad y el pH juegan un papel importante (Barsanti y Gualtieri, 2014). En los cultivos semimasivos y masivos, el utilizar medios grado reactivo es bastante costoso (Nayak *et al.*, 2016), por lo que se han utilizado fertilizantes agrícolas como alternativa.

Al comparar el crecimiento de *I. galbana* con los medios alternativos BF y T20, respecto al medio control “f/2”, se observaron concentraciones celulares similares entre los tratamientos hasta el día 9 de cultivo ($p > 0.05$). Así mismo, en los tres medios, la fase de aclimatación y la fase de crecimiento exponencial tuvieron la misma duración, con tasas de crecimiento (μ) de 0.0 a 0.3 div día⁻¹ y de 0.5 a 1.3 div día⁻¹ respectivamente. Lo anterior indica que las condiciones de cultivo fueron adecuadas y que los nutrientes aportados por los fertilizantes agrícolas promueven el crecimiento de *I. galbana*. Las diferencias en las fases de crecimiento registradas entre los tres medios pueden estar relacionadas con la baja concentración de nitrógeno disponible durante la fase estacionaria.

Delgado *et al.* (2021), mencionan que el crecimiento celular depende de un adecuado suministro de nutrientes, en especial del nitrógeno y fósforo. En el medio “f/2” y BF, el agotamiento del nitrógeno ocasionó que los cultivos entraran en la fase de crecimiento lento y posteriormente en la fase estacionaria entre los días 7 al 9, sin embargo, la acumulación de nitritos registrada en los tres medios posiblemente

favoreció la disposición de este nutriente para *I. galbana* y probablemente ocasionó que la fase de crecimiento lento se presentara por segunda ocasión en los cultivos con los medios BF y “f/2” durante el día 10 de cultivo y que en el medio T20 esta fase tuviera una mayor duración.

En este estudio, la producción de biomasa de *I. galbana*, utilizando fertilizantes agrícolas como medios de cultivo alternativos, igualó las biomásas obtenidas con el medio control “f/2” durante la fase de crecimiento exponencial, con densidades de 2.69×10^6 cél ml⁻¹. En otros estudios también se han encontrado resultados similares al utilizar fertilizantes agrícolas como medio de cultivo, por ejemplo, Valenzuela-Espinoza *et al.* (1999) reportaron un desempeño similar en el cultivo de *Isochrysis aff galbana* (Clone T-ISO), cuando se utilizaron fertilizantes agrícolas y el medio control “f/2”, obteniendo hasta $\sim 4.8 \times 10^6$ cél mL⁻¹, así mismo, Piña *et al.* (2007) reportaron biomásas de 4.85×10^6 cél mL⁻¹ en el cultivo de *Isochrysis sp.* al utilizar el fertilizante agrícola Nutrilake y el medio “f” como control, por último, Tan *et al.* (2021) obtuvieron resultados favorables en el cultivo de *Isochrysis sp.* utilizando el fertilizante China-contributed culture medium (CCM) logrando biomásas de 6×10^6 cél mL⁻¹. Sin embargo, estos autores reportan concentraciones celulares más altas que las obtenidas en este estudio, esto puede estar relacionado con las diferencias en el tamaño de inóculo utilizado, el cual fue mayor en los estudios de Valenzuela-Espinoza *et al.* (1999) y Tan *et al.* (2021), así como con la concentración de nitrógeno en el trabajo de Piña *et al.* (2007), quienes formularon sus medios con base en fertilizantes agrícolas tomando como referencia el medio “f”.

En investigaciones con otras especies, tanto marinas como de agua dulce (*Porphyridium cruentum*, *Chaetoceros sp.*, *Pavlova lutheri*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Tetraselmis sp.*, *Haematococcus sp.* y *Scenedesmus sp.*) también se han obtenido biomásas iguales o mayores con los fertilizantes agrícolas como medio de cultivo (López-Elías y Voltolina, 1993; González-Muñoz, 2006; Escuredo-Vielba, 2014; Nava Gómez, 2017; Soares *et al.*, 2018) lo que confirma su utilidad para el cultivo y producción de diferentes especies de microalgas. Es importante señalar que, tanto en esta investigación como en los trabajos mencionados anteriormente, se han utilizado fertilizantes agrícolas que aportan una o varias formas de nitrógeno, entre ellas nitratos, nitritos, urea y amonio, además, se ha estandarizado el contenido de nitrógeno tomando como referencia un medio convencional.

El nitrógeno es un componente esencial de todas las proteínas estructurales y funcionales de las microalgas, así mismo, es utilizado en el crecimiento y la reproducción (Hu, 2013). Este nutriente es comúnmente agregado en forma de nitratos, amonio, urea y en menor medida en forma de nitritos (Hu, 2013). Cuantificar el consumo de nitrógeno y de otros nutrientes celulares permite comprender los

cambios fisiológicos que experimentan las microalgas a lo largo del cultivo, ya que permite relacionar el consumo de nutrientes con el crecimiento y la composición proximal.

En el medio control “f/2”, los nitratos son la única forma de nitrógeno, el medio T20 contiene amonio, urea y nitratos y el medio BF está compuesto de amonio, nitratos y posiblemente urea. En el presente estudio, las distintas formas de nitrógeno fueron asimiladas por la microalga *I. galbana*; en los tres tratamientos, el nitrógeno fue consumido desde el inicio del cultivo, por lo tanto, la concentración de este nutriente disminuyó a medida que la concentración celular aumentó. El amonio fue asimilado rápidamente en los medios BF y T20, agotándose el día 3 de cultivo, esta fuente de nitrógeno fue la primera en ser asimilada en estos medios, estos resultados coinciden con los reportados por Sanz-Luque *et al.* (2015) y Kumar y Bera (2020), quienes observaron que las microalgas consumen en forma preferente el amonio, ya que su asimilación involucra un menor costo energético, ya que a diferencia de los nitratos y los nitritos, el amonio no requiere ser reducido, por medio de enzimas, para su asimilación.

Con el medio “f/2”, las microalgas asimilaron los nitratos en forma continua a medida que transcurrió el cultivo, mientras que con los medios BF y T20 el consumo fue intermitente, en estos cultivos se detectó la asimilación de nitratos en presencia de amonio, desde el inicio del cultivo y hasta el día 2, estos resultados no coinciden con los reportado para *Chlamydomonas* por Fernández *et al.* (1998), Fernández y Galván (2008) y Sanz-Luque *et al.* (2015) quienes indican que la asimilación de nitratos y nitritos se ve inhibida en presencia de amonio. Por otra parte, Charrier *et al.* (2015) reportaron que en *Tisochrysis lutea* la expresión del gen TINrt2.4 es independiente de la presencia de amonio en el medio de cultivo, este gen codifica para transportadores de membrana afines a nitratos y nitritos. La activación de este gen tal vez podría explicar el consumo de nitratos registrado durante el inicio del cultivo en los medios BF y T20. Así mismo, la asimilación de nitratos durante el cultivo puede indicar que los medios BF y T20 aportaron hierro en cantidades adecuadas, mismo que es necesarios para el funcionamiento de la enzima nitrato reductasa, enzima encargada de reducir los nitratos a nitritos (Guerrero *et al.*, 1981; Su, 2021). En adición, en este estudio, la microalga *I. galbana* tuvo un crecimiento similar entre los medios de cultivo, aun cuando los medios BF y T20 aportan alrededor de 11 veces menos hierro que el medio convencional “f/2”, lo que indica que esta microalga puede crecer correctamente en medios que contengan 1 μM de hierro.

Desde el inicio del cultivo se detectó la acumulación de nitritos, a pesar de que esta forma de nitrógeno no proviene de los medios utilizados. En distintas investigaciones se ha abordado la interacción microalga-bacteria, tanto en el medio marino como en cultivos de microalgas, Waksman y Carey (1934) mencionan que las bacterias son las encargadas de descomponer la materia orgánica presente en el océano, liberando

nutrientes como dióxido de carbonó, amonio y fosfatos, esto da lugar al reciclamiento de nutrientes, entre ellos el nitrógeno, mismo que es transformado por bacterias nitrificantes hasta nitratos, así mismo, Kamatani (1969) habla del proceso de descomposición de las diatomeas y la subsecuente mineralización del nitrógeno por la acción de las bacterias nitrificantes, que oxidan el amonio y liberan nitritos y posteriormente oxidan los nitritos y liberan nitratos. Un proceso similar pudo haber causado la acumulación de nitritos en los cultivos del presente estudio, puesto que, los cultivos de este estudio son no axénicos, además, el inóculo utilizado para iniciar los cultivos, posiblemente contenían una carga bacteriana que permitió el desarrollo de esta comunidad en los cultivos de microalgas.

La acumulación de nitritos en los cultivos de *I. galbana* en los medios BF, T20 y "f/2" tuvo un impacto positivo en el crecimiento de esta microalga, ya que los nitritos fueron asimilados por *I. galbana* en los tres medios de cultivo, la asimilación de esta fuente de nitrógeno se observó durante la fase de crecimiento lento con el medio T20 y durante la fase estacionaria con los medios BF y "f/2", en esta etapa del cultivo, los nitritos eran la única fuente de nitrógeno, por lo que probablemente ayudaron a retardar la fase de muerte. Otros efectos benéficos han sido reportados por Le Chevanton *et al.* (2013) quienes encontraron que las bacterias *Alteromonas* sp. y *Muricauda* sp. mediante el reciclamiento de la materia orgánica y la liberación de nitrógeno promovieron la producción de biomasa de *Dunaliella* sp. En el mismo sentido, Sandhya y Vijayan (2019) reportaron mayores biomásas en cultivos no axénicos de *I. galbana* que en aquellos libres de bacterias (axénicos) y reportaron por primera vez la existencia de una relación simbiótica entre *I. galbana* y las bacterias *Alteromonas* sp. y *Labrenzia* sp., en su estudio, se demostró que estas bacterias liberan antioxidantes y sideróforos (compuestos que facilitan el transporte de hierro al interior de la célula), además de que reciclan nutrientes como el nitrógeno y el fósforo, los cuales estimulan el crecimiento de la microalga, así mismo, las microalgas liberan carbono orgánico, mismo que es aprovechado por las bacterias.

Es posible que esta capacidad para incorporar los nitratos, nitritos y amonio involucre transportadores de membrana como los SI-SIV y AMT1.1-AMT1.6, descritos para *Chlamydomonas* (Fernandez y Galvan, 2007), además, es posible que cuente con las enzimas nitrato reductasa y nitrito reductasa que le brindan la capacidad de reducir los nitratos hasta amonio (Guerrero *et al.*, 1981; Fernandez y Galvan, 2007; Sanz-Luque *et al.*, 2015). El amonio es asimilado por las microalgas en el cloroplasto, esta reacción involucra a las enzimas glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT). La asimilación del nitrógeno, en cualquiera de sus formas, es de gran importancia para el crecimiento y desarrollo de las microalgas, la ausencia de este nutriente en el medio de cultivo causa un estrés fisiológico en las microalgas, inhibiendo el crecimiento celular (Song *et al.*, 2018), además, imposibilita la síntesis de aminoácidos, proteínas,

enzimas, DNA y RNA, e impacta negativamente en el transporte de energía, además de causar una disminución en el contenido de clorofilas y de la enzima RuBisCo, esta última es el sustrato inicial del ciclo de Calvin, resultando en una menor eficiencia fotosintética (Hellebust y Ahmad, 1989; Fan et al., 2014; Kumar y Bera, 2020).

La limitación de nitrógeno observada en este estudio pudo haber causado la disminución del peso orgánico unitario de *I. galbana*. Resultados similares fueron reportados por Peter y Sommer (2015), quienes encontraron que la limitación de nitrógeno tiene un importante efecto sobre el tamaño celular, causando una disminución en el tamaño de *Scrippsiella trochoidea*, *Chaetoceros curvisetus*, *Thalassionema nitzschioides*, *Thassiosira* sp., *Teleaulax amphioxieia*, *Chaetoceros similis* y *Skeletonema costatum*, así mismo, reportaron que el efecto de la limitación de nitrógeno sobre el tamaño celular es mayor que el efecto causado por la temperatura, estos autores mencionan que esta reducción del tamaño celular inducida por la limitación del nitrógeno, podría estar relacionada con una menor absorción de luz. Fan et al. (2014) reportan que la limitación de nitrógeno y fosforo llevan a una rápida disminución en el contenido de clorofila en *Chlorella pyrenoidosa*, que ocasiona una disminución en la eficiencia fotosintética, Markou et al. (2017) reportan resultados similares para *Chlorella vulgaris*, por último, Song et al. (2018) encontraron que, bajo condiciones de estrés por limitación de nitrógeno, *I. galbana* contiene hasta 3 veces menos concentración de clorofilas, pasando de 2.1 a 0.6 mg L⁻¹. Otros estudios realizados con protistas indican que la reducción del tamaño celular como respuesta a cambios de temperatura podría estar relacionada con la plasticidad fenotípica de los organismos (Atkinson et al. 2003).

Los metabolitos producidos por las microalgas, como las proteínas, lípidos, carbohidratos, ácidos grasos poliinsaturados y pigmentos, entre otros, han impulsado la acuicultura de estos organismos, puesto que, son muy apreciados para su desarrollo y para el éxito de su cultivo, además, actualmente existe una tendencia por el consumo de alimentos de origen natural y las microalgas son una fuente viable para la producción de estos compuestos. Muchos autores, como Cordero-Esquivel y Voltolina (1996), Fábregas et al. (1996), Lora-Vilchis et al. (2004), Guedes y Malcata (2012) han investigado sobre el valor nutricional de las microalgas y su aplicación en la acuicultura.

En este estudio, la composición proximal entre el medio convencional "f/2" y los medios alternativos BF y T20 es similar a lo largo del cultivo. Las diferencias reportadas durante el día 3 de cultivo en el contenido de estos compuestos se puede deber a que los inóculos utilizados para iniciar los cultivos se encontraban en distinta fase de crecimiento, posiblemente el inóculo utilizado para iniciar los cultivos del tratamiento "f/2" se encontraba limitado de nutrientes. A lo largo del cultivo, los lípidos fueron el componente más

abundante de la composición proximal de los tres medios de cultivo, durante la fase de crecimiento exponencial se alcanzaron valores de 27.9, 25.1 y 24.9 pg cél⁻¹ para BF, T20 y “f/2” respectivamente; en segundo lugar de abundancia se encuentran las proteínas, con valores de 14.8, 12.7 y 16.2 pg cél⁻¹ para BF, T20 y “f/2” respectivamente; por último, los carbohidratos fueron la fracción orgánica menos abundante con 3.1, 2.3 y 3.1 pg cél⁻¹ para BF, T20 y “f/2” respectivamente.

Otros autores han reportado resultados positivos al utilizar fertilizantes agrícolas como medio de cultivo, Renaud *et al.* (1991) estudió el cultivo de *Isochrysis* sp. utilizando fertilizantes agrícolas y obtuvo 11 pg cél⁻¹ de proteínas, 10.3 pg cél⁻¹ de lípidos y 4.2 pg cél⁻¹ de carbohidratos. Posteriormente, Valenzuela-Espinoza *et al.* (2002) realizaron un cultivo de *I. aff. galbana* (clone T-Iso) y también obtuvieron una menor concentración de componentes bioquímicos, con valores máximos de ~8 pg cél⁻¹ de proteínas, 11 de pg cél⁻¹ lípidos y 12 pg cél⁻¹ de carbohidratos. En el mismo sentido, Nalder *et al.* (2015) cultivaron *Isochrysis* sp. (T-Iso) utilizando el medio Conway y obtuvieron un contenido de lípidos de 7.5 pg cél⁻¹. Los autores mencionados anteriormente utilizaron medios de cultivo con concentraciones de nitrógeno igual o mayor que en este estudio, así mismo, los demás nutrientes se aportaron en cantidades suficientes, sin embargo, ellos reportan menor contenido de nutrientes en su microalgas, esto podría estar influenciado por la irradiancia, ya que en los tres estudios se refieren irradiancias menores a 110 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, lo que podría causar una menor eficiencia fotosintética, resultando en la disminución del metabolismo celular.

En otros estudios también se han reportado biomásas de igual o mejor calidad en el cultivo de *Chaetoceros muelleri* (Martínez-Córdova *et al.*, 2012), *Haematococcus* sp (Cruz-Jiménez, 2017), *Scenedesmus* sp. (Soares *et al.*, 2018), *Desmodesmus subspicatus* (Abdulsamad *et al.*, 2019), *Chlorella sorokiniana* (Ribeiro *et al.*, 2020) y *Scenedesmus obliquus* (Covell *et al.*, 2020) cuando utilizaron fertilizantes agrícolas como medio de cultivo. Con base en los estudios aquí mencionados se puede decir que los fertilizantes agrícolas podrían ser utilizados en el cultivo de una gran variedad de microalgas. Los medios BF y T20 aportaron los macro y micronutrientes que permitieron un crecimiento similar al medio “f/2” en el cultivo de *I. galbana*, es de gran importancia mencionar que los medios BF y T20 deben ser adicionados con vitaminas, puesto que no las incluyen en su formulación original. En adición, se puede decir que, la mayoría de los fertilizantes agrícolas deben ser complementados con vitaminas, ya que no aportan estos nutrientes.

Como se mencionó anteriormente, por su gran contenido de lípidos *I. galbana* es una especie potencial para la producción de suplementos alimenticios, nutracéuticos, para la extracción de DHA y EPA y en la producción de biodiesel, en adición, esta microalga acumuló dichas cantidades de lípidos al ser cultivada con los medios alternativos T20 y BF, lo cual ayuda a reducir los costos de producción. sin embargo, existen

otros retos por superar para aprovechar las biomoléculas producidas por las microalgas a nivel industrial como el poco conocimiento del efecto del consumo de microalgas en la salud humana y el desarrollo de leyes que regulen su cultivo y consumo.

Al analizar el costo que supone un medio de cultivo, este fue significativamente menor con los medios BF (0.0005 dólares L⁻¹) y T20 (0.003 dólares L⁻¹) en comparación del medio "f/2" el cual se vende listo para agregarse en los cultivos (55 dólares L⁻¹) o concentrado (0.095 dólares L⁻¹). Con la comparación anterior se destaca la viabilidad económica de estos medios y con el presente estudio se reafirma que la sustitución total de los medios convencionales por medios con base en fertilizantes agrícolas son una alternativa económica que brinda buenos rendimientos en el cultivo de *I. galbana* y la producción de biomoléculas como proteínas, lípidos y carbohidratos en cultivos semimasivos.

Capítulo 5. Conclusiones

En condiciones óptimas de cultivo, el crecimiento y la composición proximal de *I. galbana* están directamente relacionados con la disponibilidad de nitrógeno en el medio y no con la fuente del nutriente. Los nitritos, nitratos y el amonio son formas de nitrógeno inorgánicas que pueden ser asimiladas por *I. galbana*, sin embargo, su preferencia por las sales de amonio es mayor que por los nitratos, y la fuente de nitrógeno menos utilizada son los nitritos. El uso de fertilizantes agrícolas con distintas formas de nitrógeno en su composición son una opción viable y más económica que los medios formulados con compuestos puros (grado reactivo), como el medio "f/2". Los dos medios de cultivo alternativos probados en este estudio (BF y T20) produjeron resultados similares en la producción de biomasa y tuvieron la misma calidad que las microalgas cultivadas en el medio "f/2", por lo tanto, se recomienda su uso, ya que pueden ayudar a reducir los costos de producción a nivel industrial, haciendo de las microalgas una opción viable para satisfacer la demanda actual y futura de industrias como la acuicultura, alimenticia, farmacéutica, cosmecéutica y de energía.

Literatura citada

- Abdulsamad, J. K., Varghese, S. A. y Thajudeen, J. (2019). Cost effective cultivation and biomass production of green microalga *Desmodesmus subspicatus* MB. 23 in npk fertilizer medium. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 9 (3), 599-604. doi: 10.15414/jmbfs.2019/20.9.3.599-604
- Adams, V. D. (1990). *Water & wastewater examination manual*. CRC Press. United States.
- Andersen, R. A. (2013). The microalgal cell. En: A. Richmond. y Q. Hu (Eds.), *Handbook of microalgal culture applied phycology and biotechnology*. Jhon Wiley & Sons, Oxford.
- Atkinson, D., Ciotti, B. J. y Montagnes, D. J. S. (2003). Protists decrease in size linearly with temperature: ca. 2.5% °C⁻¹. *Royal Society*, 270(1533), 2605 – 2611. doi: 10.1098/rspb.2003.2538
- Barclay, W. y Apt, K. (2013). Strategies for bioprospecting microalgae for potential commercial applications. En: A. Richmond. y Q. Hu (Eds.), *Handbook of microalgal culture applied phycology and biotechnology*. Jhon Wiley & Sons, Oxford.
- Barkia, I., Saari, N. y Manning, S. R. (2019). Microalgae for high-value products towards human health and nutrition. *Marine Drugs*, 17(5), 1 – 29. doi: 10.3390/md17050304
- Barsanti, L. y Gualtieri, P. (2014). *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. 2ª ed. CRC Press, Pisa.
- Becker, E.W. (1994). *Biotechnology and microbiology*. Cambridge University Press. New York.
- Bordignon, G. y Cabrini, M. (2015). Algae: an introduction. En: A. Perosa., G. Bordignon., G. Ravagnan. y S. Zinoviev (Eds.), *Algae as a potential source of food and energy in developing countries, sustainability, technology, and selected case studies*. Edizioni Ca'Foscari, Venecia.
- Bligh, E. G. y Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37 (8), 911-917.
- Breuer, G., Lamers, P. P., Martens, D. E., Draaisma, R. B. y Wijffels, R. H. (2012). The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. *Bioresource Technology*, 124, 217-226. doi: 10.1016/j.biortech.2012.08.003
- Brown, M. R., Jeffrey, S. W. y Garland, C. D. (1989). Nutritional aspects of microalgae used in mariculture: a literature review. Informe técnico N.º 205. CSIRO Marine Laboratories, 45 pp.
- Brown, M. R. (2002). Nutritional value and use of microalgae in aquaculture. En: L. E. Cruz-Suárez., D. Ricque-Marie., M. Tapia-Salazar., M. G. Gaxiola-Cortés., N. Simoes. *Avances en nutrición acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Cancún, Quintana Roo, México.
- Camacho-Rodríguez, J., Cerón-García, M. C., González-López, C. V., López-Rosales, L., Contreras-Gómez, A. y Molina-Grima, E. (2020). Use of continuous culture to develop an economical medium for the mass production of *Isochrysis galbana* for aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, 32 (2), 851 - 863. doi: 10.1007/s10811-019-02015-0

- Charrier, A., Bérard, J-B., Bougaran, G., Carrier, G., Lukomska, E., Schreiber, N., Fournier, F., Charrier, A. F., Rouxel, C., Garnier, M., Cadoret, J-P. y Saint-Jean, B. (2015). High-affinity nitrate/nitrite transporter genes (Nrt2) in *Tisochrysis lutea*: identification and expression analyses reveal some interesting specificities of Haptophyta microalgae. *Physiologia Plantarum*, 154 (4), 572 – 590. doi: 10.1111/ppl.12330
- Cheirsilp, B. y Maneechote, W. (2022). Insight zero waste approach for sustainable microalgae biorefinery; Sequential fractionation, conversion and applications for high-to-low value-added products. *Bioresource Technology Reports*, 18, 1 – 15. doi: 10.1016/j.biteb.2022.101003
- Collos, Y., Mornet, F., Sciandra, A., Waser, N., Larson, A. y Harrison, P. J. (1999). An optical method for the rapid measurement of micromolar concentrations of nitrate in marine phytoplankton cultures. *Journal of Applied Phycology*, 11, 179 – 184.
- Covell, L., Machado, M., Vaz, M. G. M. V., Soares, J., Batista, A. D., Araújo, W. L., Martins, M. A. y Nunes-Nesi, A. (2020). Alternative fertilizer-based growth media support high lipid contents without growth impairment in *Scenedesmus obliquus* BR003. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43, 1123 - 1131. doi: 10.1007/s00449-020-02301-z
- Cordero-Esquivel, B. y Voltolina, D. (1996). Nutritional value of preserved microalgae for subadult *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 27 (1), 113 – 118. doi: 10.1111/j.1749-7345.1996.tb00601.x
- Cruz-Jiménez, M. A. (2017). Cultivo masivo de la microalga *Haematococcus* sp. en fotobiorreactores planos para la producción de astaxantina bajo diferentes condiciones de estrés. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California., 58 pp.
- Daviglus, M. L., Stamler, J., Orenca, A. J., Dyer, A. R., Liu, K., Greenland, P., Walsh, M. K., Morris, D. y Shekelle, R. B. (1997). Fish consumption and the 30-year risk of fatal myocardial infarction. *The New England Journal of Medicine*, 336 (15), 1046 - 1053.
- De Jesus-Campos, D., López-Elías, J. A., Medina-Juárez, L. A., Carvallo-Ruiz, G., Fimbres-Olivarria, D. y Hayano-Kanashiro, C. (2020). Chemical composition, fatty acid profile and molecular changes derived from nitrogen stress in the diatom *Chaetoceros muelleri*. *Aquaculture Reports*, 16, 1- 7.
- Delgado, R. T., Guarieiro, M. S., Antunes, P. W., Cassini, S. T., Terreros, H. M. y Fernandes, V. O. (2021). Effect of nitrogen limitation on growth, biochemical composition, and cell ultrastructure of the microalga *Picocystis salinarum*. *Journal of Applied Phycology*, 33(4), 2083 – 2092. doi: 10.1007/s10811-021-02462-8
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. y Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350 – 356.
- Escuredo-Vielba, R. (2014). Evaluación de la biomasa producida por la microalga *Haematococcus* sp. y la inducción a la carotenogénesis bajo diferentes condiciones de cultivo. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California., 52 pp.
- Fábregas, J., Patiño, M., Morales, E. D., Cordero, B. y Otero, A. (1996). Optimal renewal rate and nutrient concentration for the production of the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* in semicontinuous cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (1), 266 – 268. doi: 10.1128/AEM.62.1.266-268.1996

- Fan, J., Cui, Y., Wan, M., Wang, W. y Li, Y. (2014). Lipid accumulation and biosynthesis genes response of the oleaginous *Chlorella pyrenoidosa* under three nutrition stressors. *Biotechnology for Biofuels*, 7(17), 1 – 14. doi: 10.1186/1754-6834-7-17
- Fradique, M., Batista, A.P., Nunes, M.C., Gouveia, L., Bandarra, N. M. y Raymundo, A. (2013). *Isochrysis galbana* and *Diatrypa vukobratovi* biomass incorporation in pasta products as PUFA's source. *LWT - Food Science and Technology*, 50, 312-319. doi: 10.1016/j.lwt.2012.05.006
- Fernandez, E., Galvan, A. y Quesada, A. (1998). Nitrogen assimilation and its regulation. En: J. D. Rochaix., M. Goldschmidt-Clermont., S. Merchant (Eds.), *Molecular biology of Chlamydomonas: chloroplast and mitochondria*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Fernandez, E. y Galvan, A. (2007). Inorganic nitrogen assimilation in *Chlamydomonas*. *Journal of Experimental Botany*, 58(9), 2279 – 2287. doi: 10.1093/jxb/erm106
- Fogg, G. E. (1975). *Algal cultures and phytoplankton ecology*. 2.^a ed. The university of Wisconsin Press, Madison.
- Gong, Y., Guo, X., Wan, X., Liang, Z. y Jiang, M. (2013). Triacylglycerol accumulation and change in fatty acid content of four marine oleaginous microalgae under nutrient limitation and at different culture ages. *Journal of Basic Microbiology*, 53, 29 - 36. doi: 10.1002/jobm.201100487
- González-Muñoz, J. A. (2006). Evaluación del crecimiento, consumo de nutrientes y composición proximal de *Porphyridium cruentum* (Rhodophyceae) cultivada con el medio F/2 y fertilizantes agrícolas. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California., 64 pp.
- Gouveia, L., Coutinho, C., Mendonca, E., Batista, A. P., Sousa, I., Bandarra, N. M. y Raymundo, A. (2008). Functional biscuits with PUFA- ω 3 from *Isochrysis galbana*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88 (5), 891- 896. doi: 10.1002/jsfa.3166
- Gouveia, L., Raymundo, A., Batista, A. P., Sousa, I. y Empis, J. (2006). *Chlorella vulgaris* and *Haematococcus pluvialis* biomass as colouring and antioxidant in food emulsions. *European Food Research and Technology*, 222, 362-367. doi: 10.1007/s00217-005-0105-z
- Grobbelaar, J. U. (2013). Inorganic algal nutrition. En: A. Richmond. y Q. Hu (Eds.), *Handbook of microalgal culture applied phycology and biotechnology*. Jhon Wiley & Sons, Oxford.
- Guedes, A. C. y Malcata, F. X. (2012). Nutritional value and uses of microalgae in aquaculture. En: Muchlisin, Z (Ed), *Aquaculture*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/1516>
- Guedes, A. C., Sousa-Pinto, I. y Malcata, F. X. (2015). Application of microalgae protein to aquafeed. En: S. K. Kim (Ed.), *Handbook of marine microalgae: biotechnology advances*. Academic Pres, Amsterdam.
- Guerrero, M. G., Vega, J. M. y Losada, M. (1981). The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Annual Review of Plant Physiology*, 32, 169 - 204. doi: 10.1146/annurev.pp.32.060181.001125
- Guillard, R. R. L. (1973). Division rates. En: J. R. Stein (Ed.), *Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements*. Cambridge University Press.

- Guillard, R. R. L. (1983). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. En: C. J. Berg (Ed.), Culture of marine invertebrates selected readings. Hutchinson Ross Publishing Co, Stroudsburg.
- Hellebust, J. A. y Ahmad, I. (1989). Regulation of nitrogen assimilation in green microalgae. *Biological Oceanography*, 6,(3-4), 241 – 255. doi: 10.1080/01965581.1988.10749529
- Hlima, H. B., Farhat, A., Akermi, S., Khemakhem, B., Halima, Y. B., Michaud, P., Fendri, I. y Abdelkafi, S. (2022). In silico evidence of antiviral activity against SARS-CoV-2 main protease of oligosaccharides from *Porphyridum* sp. *Science of the Total Environment*, 836, 1 – 10. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.155580
- Hinzpeter, I., Shene, C. y Masson, L. (2006). Alternativas biotecnológicas para la producción de ácidos grasos poliinsaturados omega-3. *Grasas y Aceites*, 57(3), 336 – 342.
- Hu, Q. (2013). Environmental effects on cell composition. En: A. Richmond. y Q. Hu (Eds.), Handbook of microalgal culture applied phycology and biotechnology. Jhon Wiley & Sons, Oxford.
- Huang, X., Huang, Z., Wen, W. y Yang, J. (2013). Effects of nitrogen supplementation of the culture medium on the growth, total lipid content and fatty acid profiles of three microalgae (*Tetraselmis subcordiformis*, *Nannochloropsis oculata* y *Pavlova viridis*). *Journal of Applied Phycology*, 25, 129 - 137. doi: 10.1007/s10811-012-9846-9
- Kamatani, A. (1969). Regeneration of inorganic nutrients from diatom decomposition. *Journal of the Oceanographical Society of Japan*, 25(2), 63 – 74. doi: 10.5928/KAIYOU1942.25.63
- Kim, S. M., Kang, S. W., Kwon, O. N., Chung, D. y Pan, C. H. (2012). Fucoxanthin as a major carotenoid in *Isochrysis* aff. *galbana*: characterization and extraction for commercial application. *The Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 55, 477 – 483. doi: 10.1007/s13765-012-2108-3
- Kholssi, R., Ramos, P. V., Marks, E. A. N., Montero, O. y Rad, C. (2021). Biotechnological uses of microalgae: a review on the state of the art and challenges for the circular economy. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 36, 1-7. doi: 10.1016/j.bcab.2021.102114
- Khozin-Goldberg, I. (2016). Lipid metabolism in microalgae. En: M. A. Borowitzka., J. Beardall. y J. A. Raven (Eds.), *The physiology of microalgae*. Springer, New York.
- Kumar, A. y Bera, S. (2020). Revisiting nitrogen utilization in algae: a review on the process of regulation and assimilation. *Bioresource Technology Reports*, 12, 100584. doi: 10.1016/j.biteb.2020.100584
- Lafarga, T. y Acién, G. (2022). Microalgae for the food industry: from biomass production to the development of functional foods. *Foods*, 11(5), 1 – 3. doi: 10.3390/foods11050765
- Le Chevanton, M., Garnier, M., Bougaran, G., Schreiber, N., Lukomska, E., Bérard, J. -B., Fouilland, E., Bernard, O. y Carodet, J. -P. (2013). Screening and selection of growth-promoting bacteria for *Dunaliella* cultures. *Algal Research*, 2(3), 212 – 222. doi: 10.1016/j.algal.2013.05.003
- Li, Y., Han, D., Sommerfeld, M. y Hu, Q. (2011). Photosynthetic carbon partitioning in the oleaginous microalga *Pseudochlorococcum* sp. (Chlorophyceae) under nitrogen limited conditions. *Bioresource Technology*, 102 (1), 123 - 129. doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.036
- Liu, C. P. y Lin, L. P. (2001). Ultrastructural study and lipid formation of *Isochrysis* sp. CCMP1324. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 42 (3), 207 - 214.

- Liu, X., Xue, Y., Liu, C., Lou, Q., Wang, J., Yanagita, T., Xue, C. y Wang, Y. (2013). Eicosapentaenoic acid-enriched phospholipid ameliorates insulin resistance and lipid metabolism in diet-induced-obese mice. *Lipids in Health and Disease*, 12 (109), 1 – 10. doi: 10.1186/1476-511X-12-109
- López-Elías, J. A. y Voltolina, D. (1993). Cultivos semicontinuos de cuatro especies de microalgas con un medio no convencional. *Ciencias Marinas*, 19(2), 169 – 180. doi: 10.7773/cm.v19i2.930
- Lora-Vilchis, M. C., Cordero-Esquivel, B. y Voltolina, D. (2004). Growth of *Artemia franciscana* fed *Isochrysis* sp. And *Chaetoceros muelleri* during its early life stages. *Aquaculture Research*, 35, 1086 – 1091. doi: 10.1111/j.1365-2109.2004.01123.x
- Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biology Chemistry*, 193 (1), 265 – 275. doi: 10.1016/S0021-9258(19)52451-6
- Lucakova, S., Branyikova, I. y Hayes, M. (2022). Microalgal proteins and bioactives for food, feed and other applications. *Applied Sciences*, 12 (9), 1-25. doi: 10.3390/app12094402
- Martínez-Córdova, L. R., Campaña-Torres, A., Martínez-Porchas, M., López-Elías, J. A. y García-Sifuentes, C. O. (2012). Effect of alternative mediums on production and proximate composition of the microalgae *Chaetoceros muelleri* as food in culture of the copepod *Acartia* sp. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 40 (1), 169 - 176. doi: 10.3856/vol40-issue1-fulltext-16
- Markou, G., Dao, L. H. T., Muylaert, K. y Beardall, J. (2017). Influence of different degrees of N limitation on photosystem II performance and heterogeneity of *Chlorella vulgaris*. *Algal Research*, 26, 84 – 92. doi: 10.1016/j.algal.2017.07.005
- Matos, J., Afonso, C., Cardoso, C., Serralheiro, M. L. y Bandarra, N. M. (2021). Yogurt enriched with *Isochrysis galbana*: an innovative functional food. *Foods*, 10(7), 1- 16. doi: 10.3390/foods10071458
- Mishra, N. y Mishra, N. (2018). Exploring the biologically active metabolites of *Isochrysis galbana* in pharmaceutical interest: an overview. *International journal of Pharmaceuticals Sciences and Research*, 9 (6), 2162 – 2174. doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.9(6).2162-74
- Muller-Feuga, A. (2000). The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *Journal of Applied Phycology*, 12, 527 – 534. doi: <https://doi.org/10.1023/A:1008106304417>
- Nalder, T. D., Miller, M. R. y Packer, M. A. (2015). Changes in lipid class content and composition of *Isochrysis* sp. (T-Iso) grown in batch culture. *Aquaculture International*, 23(5), 1293 – 1312. doi: 10.1007/s10499-015-9884-9
- Nava-Gómez, B. (2017). Optimización del crecimiento y producción del carotenoide astaxantina por la microalga *Haematococcus* sp. en diferentes condiciones de cultivo. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California., 62 pp.
- Nayak, M., Thirunavoukkarasu, M. y Mohanty, R. C. (2016). Cultivation of freshwater microalgae *Scenedesmus* sp. using a low cost inorganic fertilizer for enhanced biomass and lipid yield. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 62(1), 7 – 13. doi: 10.2323/jgam.62.7
- Nayak, M., Suh, W. I., Chang, Y. K. y Lee, B. (2019). Exploration of two-stage cultivation strategies using nitrogen starvation to maximize the lipid productivity in *Chlorella* sp. HS2. *Bioresource Technology*, 276, 110 - 118. doi: 10.1016/j.biortech.2018.12.111

- Pande, S. V., Khan, R. P. y Venkitasubramanian, T. A. (1963). Microdetermination of lipids and serum total fatty acids. *Analytical Biochemistry*, 6 (5), 415 - 423. doi: 10.1016/0003-2697(63)90094-0
- Paniagua-Michell, J. (2015). Microalgal Nutraceuticals. En: S. K. Kim (Ed.), *Handbook of marine microalgae: biotechnology advances*. Academic Press, Amsterdam.
- Peter, K. H. y Sommer, U. (2015). Interactive effect of warming, nitrogen and phosphorus limitation on phytoplankton cell size. *Ecology and Evolution*, 5(5), 1011 – 1024. doi: 10.1002/ece3.1241
- Piña, P., Medina, M. A., Nieves, M., Leal, S., López-Elías, J. A. y Guerrero, M. A. (2007). *Revista de Investigaciones Marinas*, 28(3), 225 – 236. Consultado el día 12 de septiembre del 2022 de: www.rim.uh.cu./index.php
- Portilla, M. L. (1989). *Visión de los vencidos. Relaciones indígenas de la conquista. versión de textos Nahuas: Ángel, M. A. Garibay, décima segunda edición, UNAM, México (edición digital)*.
- Priyadarshani, I. y Rath, B. (2012). Commercial and industrial applications of micro algae – A review. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 3(4), 89 - 100.
- Rahman, K. M. (2020). Food and high value products from microalgae: market opportunities and challenges. En: Md. A. Alam., J. L. Xu. y Z. Wang (Eds.), *Microalgae biotechnology for food, health and high value products*. Springer, Singapore.
- Rausch, T. (1981). The estimation of micro-algal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomass I. Comparison of methods for extracting protein. *Hydrobiologia*, 78, 237-251.
- Raven, J. A. y Giordano, M. (2016). Nutrients and their acquisition. En: M. A. Borowitzka., J. Beardall. y J. A. Raven (Eds), *The physiology of microalgae*. Springer, London.
- Recht, L., Zarka, A. y Boussiba, S. (2012). Patterns of carbohydrate and fatty acid changes under nitrogen starvation in the microalgae *Haematococcus pluvialis* and *Nannochloropsis* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94, 1495 - 1503. doi: 10.1007/s00253-012-3940-4
- Renaud, S. M., Parry, D. L., Thinh, L., Kuo, C., Padovan, A. y Sammy, N. (1991). Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis* sp. and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, 3, 43 – 53. doi: 10.1007/BF00003918
- Ribeiro, D. M., Roncaratti, L. F., Possa, G. C., Garcia, L. C., Cançado, L. J., Williams, T. C. R. y Brasil, B. D. S. A. F. (2020). A low-cost approach for *Chlorella sorokiniana* production through combined use of urea, ammonia and nitrate based fertilizers. *Bioresource Technology Reports*, 9, 1 – 9. doi: 10.1016/j.biteb.2019.100354
- Rodríguez-Luna, A., Talero, E., Terencio, M. C., González-Rodríguez, M. L., Rabasco, A. M., de los Reyes, C., Motilva, V. y Ávila-Román, J. (2018). Topical application of glycolipids from *Isochrysis galbana* prevents epidermal hyperplasia in mice. *Marine Drugs*, 16(1), 1 - 19. doi: 10.3390/md16010002
- Ryu, B., Himaya, S. W. A. y Kim, S. K. (2015). Applications of microalgae-derived active ingredients as cosmeceuticals. En: S. K. Kim (Ed.), *Handbook of marine microalgae: biotechnology advances*. Academic Press, Amsterdam.

- Sanghamitra, S., Deshmukh, S. y Narayan, K. P. (2020). Effects of alternate nutrient medium on microalgae biomass and lipid production as a bioenergy source for fuel production. *Materials Today: Proceedings*, 28(2), 659 - 664. doi: 10.1016/j.matpr.2019.12.238
- Sandhya, S. V. y Vijayan, K. K. (2019). Symbiotic association among marine microalgae and bacterial flora: a study with special reference to commercially important *Isochrysis galbana* culture. *Journal of Applied Phycology*, 31, 2259 – 2266. doi: 10.1007/s10811-019-01772-2
- Sanz-Luque, E., Chamizo-Ampudia, A., Llamas, A., Galvan, A. y Fernandez, E. (2015). Understanding nitrate assimilation and its regulation in microalgae. *Frontiers in Plant Science*, 6(899), 1 - 17. doi: 10.3389/fpls.2015.00899
- Sarker, P. K., Kapuscinski, A. R., Vandenberg, G. W., Proulx, E. y Sitek, A. J. (2020). Towards sustainable and ocean-friendly aquafeeds: evaluating a fish-free feed for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using three marine microalgae species. *Elementa Science of the Anthropocene*, 8(5), 1 - 16. doi: 10.1525/elementa.404
- Singh, J. y Saxena, R. C. (2015). An Introduction to microalgae: diversity and significance. En: S. K. Kim (Ed.), *Handbook of marine microalgae: biotechnology advances*. Academic Pres, Amsterdam.
- Singh, P., Gupta, S. K., Guldhe, A., Rawat, I. y Bux, F. (2015). Microalgae isolation and basic culturing techniques. En: S. K. Kim (Ed.), *Handbook of marine microalgae: biotechnology advances*. Academic Pres, Amsterdam.
- Singh, G. y Patidar, S. K. (2018). Microalgae harvesting techniques: a review. *Journal of Environmental Management*. 217, 499 – 508. doi: 10.1016/S1389-0344(03)00076-5
- Soares, J., Loterio, R. K., Rosa, R. M., Santos, M. O., Nascimento, A. G., Santos, N. T., Williams, T. C. R., Nunes-Nesi, A. y Martins, M. A. (2018). *Scenedesmus* sp. cultivation using commercial-grade ammonium sources. *Annals of Microbiology*, 68, 35 - 45. doi: 10.1007/s13213-017-1315x
- Song, P., Zhang, L. y Li, Q. (2018). Response of photosynthetic apparatus of *Isochrysis galbana* to different nitrogen concentration. *Bioresource Technology Reports*, 4, 74 - 79. doi: 10.1016/j.biteb.2018.09.003
- Song, X., Liu, B. F., Kong, F., Ren, N. Q. y Ren, H. Y. (2022). Overview on stress-induced strategies for enhanced microalgae lipid production: application, mechanisms and challenges. *Resources, Conservation & Recycling*, 183, 1 – 14. doi: 10.1016/j.resconrec.2022.106355
- Sorokin, C. (1973). Dry weight, packed cell volume and optical density. En: J. R. Stein (Ed.), *Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurement*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Su, Y. (2021). Revisiting carbon, nitrogen and phosphorus metabolisms in microalgae for wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, 762, 1 – 14. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.144590
- Syrett, P. J. (1962). Nitrogen assimilation. En: R. A. Lewin (Ed.), *Physiology and biochemistry of algae*. Academic Press, London.

- Steinrücken, P., Erga, S. R., Mjøs, S. A., Kleivdal, H. y Prestegard S. K. (2017). Bioprospecting north Atlantic microalgae with fast growth and high polyunsaturated fatty acid (PUFA) content for microalgae-based technologies. *Algal Research*, 26, 392 - 401. doi: 10.1016/j.algal.2017.07.030
- Strickland, J. D. H. y Parsons, T. R. (1972). A practical handbook of seawater analysis. Fisheries Research Board of Canada, Ottawa.
- Tacon, A. G. (1989). Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados. Manual de Capacitación. Documento de Campo No. 4. FAO, 318 pp.
- Tan, N., Liew, K., Shi, C., Shaleh, S. R. M. y Lim, L. (2021). Growth performance of brown-golden marine microalga, *Isochrysis* sp., cultivated in alternative algal culture media. *Borneo Journal of Marine Science and Aquaculture*, 05(02), 57 – 62. doi: 10.51200/bjomsa.v5i2.3150
- Tibaldi, E., Zittelli, G. C., Parisi, G., Bruno, M., Giorgi, G., Tulli, F., Venturini, S., Tredici, M. R. y Poli, B. M. (2015). Growth performance and quality traits of European sea bass (*D. labrax*) fed diets including increasing levels of freeze-dried *Isochrysis* sp. (T-ISO) biomass as a source of protein and n-3 long chain PUFA in partial substitution of fish derivatives. *Aquaculture*, 440, 60 - 68. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.02.002
- Tsikis, D. (2005). Methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological fluids. *Free Radicals Research*, 39(8), 797 – 815.
- Udayan, A., Pandey, A. K., Sharma, P., Sreekumar, N. y Kumar, S. (2021). Emerging industrial applications of microalgae: challenges and future perspectives. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 1, 411 - 431. doi: 10.1007/s43393-021-00038-8
- Valenzuela-Espinoza, E., Millán-Núñez, R. y Núñez-Cebrero, F. (1999). Biomass production and nutrient uptake by *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. *Aquacultural Engineering*, 20(3), 135 – 147. doi: 10.1016/S0144-8609(99)00011-4
- Valenzuela-Espinoza, E., Millán-Núñez, R. y Núñez-Cebrero, F. (2002). Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll α content in *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) cultured with a low cost alternative to the “f/2” medium. *Aquacultural Engineering*, 25(4), 207 – 216. doi: 10.1016/S0144-8609(01)00084-X
- Van Gelder, B. M., Tjihuis, M., Kalmijn, S. y Kromhout, D. (2007). Fish consumption, n-3 fatty acids, and subsequent 5-y cognitive decline in elderly men: the Zutphen elderly study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(4), 1142 – 1147. doi: 10.1093/ajcn/85.4.1142
- Voltoлина, D., Nieves, M., Navarro, G., Oliva, T y Peraza, D. (1998). The importance of acclimation for the evaluation of alternative media for microalgae growth. *Acuaqultural Engineering*, 19(1), 7 – 15. doi: [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(98\)00038-7](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(98)00038-7)
- Waksman, S. A. y Care, C. L. (1934). Decomposition of organic matter in sea water by bacteria. *Journal of Bacteriology*, 29 (5), 531 – 543. doi: 10.1128/jb.29.5.531-543.1935
- Wang, X., Lin, L., Lu, H., Liu, Z., Duan, N., Dong, T., Xiao, h., Li, B. y Xu, P. (2018). Microalgae cultivation and culture medium recycling by a two-stage cultivation system. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 12(6), 1 – 10. doi: 10.1007/s11783-018-1078-z

- Wang, X., Fosse, H. K., Li, K., Chauton, M. S., Vadstein, O. y Reitan, K. I. (2019). Influence of nitrogen limitation on lipid accumulation and EPA and DHA content in four marine microalgae for possible use in aquafeed. *Frontiers in Marine Science*, 6(95), 1 – 10. doi: 10.3389/fmars.2019.00095
- Whyte, J. N. C. (1987). Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture*, 60, 231 – 241.
- Zhang, Y., Wu, H., Yuan, C., Li, T. y Li, A. (2019). Growth, biochemical composition, and photosynthetic performance of *Scenedesmus acuminatus* during nitrogen starvation and resupply. *Journal of Applied Phycology*, 31, 2797-2809. doi: 10.1007/s10811-019-01783-z