

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 CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías).

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 de Autor.

CICESE© 2023. Todos los derechos reservados

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



---

**Maestría en Ciencias  
en Acuicultura**

---

**Composición bioquímica de las diatomeas *Phaeodactylum  
tricornutum* y *Thalassiosira weissflogii* en cultivo estático y  
semicontinuo**

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

Presenta:

**Yaneth Alejandra Arenas Encinas**

Ensenada, Baja California, México  
2023

Tesis defendida por  
**Yaneth Alejandra Arenas Encinas**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dra. Beatriz Cordero Esquivel**  
Directora de tesis

**Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez**

**Dra. Bertha Eugenia Lavaniegos Espejo**



---

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

---

**Dra. Ana Denise Re Araujo**  
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Yaneth Alejandra Arenas Encinas** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura

**Composición bioquímica de las diatomeas *Phaeodactylum tricornutum* y *Thalassiosira weissflogii* en cultivo estático y semicontinuo**

Resumen aprobado por:

---

Dra. Beatriz Cordero Esquivel  
**Directora de tesis**

Las microalgas se caracterizan por tener una alta tasa de división, además de una adecuada composición bioquímica (proteínas, lípidos y carbohidratos) por lo que son utilizadas como alimento vivo para moluscos bivalvos, en la etapa larval de crustáceos y algunos peces y para enriquecer zooplancton. En este trabajo se realizó un cultivo semicontinuo (15L) de las microalgas *Phaeodactylum tricornutum* y *Thalassiosira weissflogii*, con el objetivo de evaluar el efecto de las tasas de dilución del 20, 30 y 40% sobre la producción de biomasa (densidad celular) y la composición bioquímica (proteínas, lípidos, carbohidratos y clorofila *a*) de estas microalgas. En *P. tricornutum* y *T. weissflogii*, las mayores densidades celulares se obtuvieron en los tratamientos del 20 y 30%. No se encontraron diferencias en la concentración de proteínas y clorofila *a*, en las tres tasas de dilución del sistema semicontinuo de *P. tricornutum*. Mientras que, para *T. weissflogii*, el mayor contenido de lípidos y carbohidratos se obtuvo en la tasa de dilución del 20%. En conclusión, la tasa de dilución del 20% es la más viable económicamente ya que mostró resultados similares a la tasa de dilución del 30 y superiores a la del 40% para la producción de biomasa en ambas especies de microalgas.

**Palabras clave:** Microalgas, *Phaeodactylum tricornutum*, *Thalassiosira weissflogii*, composición bioquímica, sistema semicontinuo.

Abstract of the thesis presented by **Yaneth Alejandra Arenas Encinas** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture

**Biochemical composition of diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Thalassiosira weissflogii* in batch and semi-continuous culture**

Abstract approved by:

---

Dra. Beatriz Cordero Esquivel  
**Thesis Director**

The microalgae are characterized by a high division rate, further a good biochemical composition (protein, lipids, and carbohydrates). Therefore, they are used as feed for the larval stage of bivalve mollusks, crustaceans, and some fish. Also, microalgae are used to enrich zooplankton. In this investigation, a semicontinuous culture (15L) of the microalgae *P. tricornutum* and *T. weissflogii* was carried out to evaluate the effect of 20, 30 and 40% dilution rates on biomass production (cell density) and biochemical composition (proteins, lipids, carbohydrates, and chlorophyll *a*). For *P. tricornutum* and *T. weissflogii*, the highest cell densities were obtained in the 20 and 30% ( $p > 0.05$ ). There were no significant differences in proteins, and chlorophyll *a* ( $p > 0.01$ ) in the three dilution rates of the semicontinuous system of *P. tricornutum*. While, for *T. weissflogii*, the highest lipid and carbohydrate content was obtained in the 20 % ( $p < 0.05$ ) dilution rate. In conclusion, the 20% dilution rates is the most economically since it showed results similar to the dilution rate of 30% and higher than that of 40% for biomass production in both microalga species.

**Keywords:** Microalgae, *Phaeodactylum tricornutum*, *Thalassiosira weissflogii*, proximal composition, semi-continuous culture.

**Dedicatoria**

A mi familia, amigos y  
a Ruben Luna

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por brindarme una beca con la cual sustenté mis estudios de maestría.

Quiero agradecer al Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) por proporcionar las instalaciones y financiamiento necesario que permitieron el desarrollo de mi tesis y por permitirme utilizar libremente los laboratorios y la biblioteca.

Además, quiero agradecer especialmente a la Dra. Beatriz Cordero Esquivel por aceptarme como su estudiante, por aconsejarme, guiarme, y cuidarme. Por ser amable y paciente, por su carisma y buen humor, por enseñarme el cultivo de las maravillosas microalgas, pero, sobre todo, quisiera agradecerle por ser una gran amiga.

A la Dra. Carmen Paniagua Chávez por ser parte de mi comité, por sus enseñanzas y buenos consejos, los cuales me permitieron realizar mi trabajo de tesis.

A la Dra. Bertha Eugenia Lavaniegos Espejo por aceptar ser miembro de mi comité, por sus consejos y correcciones, guía y asesoramiento.

Gracias al técnico de laboratorio Abelardo Campos Espinoza por ayudarme cuando lo necesité.

Al nuevo Maestro en Ciencias Ruben Luna por ayudarme y acompañarme en todo el proceso de la tesis y por ser mi mejor amigo.

También a la nueva Maestra en Ciencias Narda Pérez, por ser una gran compañera de laboratorio y muy buena amiga.

A mi familia, la cual me apoyó en todo momento y me animó a seguir estudiando.

Y por último, a usted lector.

## Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria .....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas .....	x
<b>Capítulo 1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Hipótesis.....	7
1.2 Objetivos .....	7
1.2.1 Objetivo general .....	7
1.2.2 Objetivos específicos.....	7
<b>Capítulo 2. Metodología.....</b>	<b>8</b>
2.1 Cultivo de microalgas .....	8
2.1.1 Mantenimiento de las cepas .....	8
2.1.2 Tratamiento del agua de mar.....	8
2.1.3 Cultivo estático y semicontinuo .....	8
2.2 Evaluación de la biomasa .....	9
2.2.1 Toma de muestras.....	9
2.2.2 Concentración celular .....	9
2.2.3 Peso seco total (PST) y orgánico (PO) .....	10
2.3 Composición proximal de las microalgas .....	11
2.4 Análisis estadísticos.....	12



<b>Capítulo 3. Resultados .....</b>	<b>13</b>
3.1 Crecimiento celular .....	13
3.1.1 Concentración celular de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> y <i>Thalassiosira weissflogii</i> en sistema estático y semicontinuo.....	13
3.1.2 Peso seco total y orgánico unitario .....	15
3.2 Composición bioquímica .....	17
3.2.1 Cuantificación de proteínas.....	17
3.2.2 Cuantificación de lípidos totales .....	19
3.2.3 Cuantificación de carbohidratos .....	20
3.2.4 Cuantificación de pigmentos (Clorofila <i>a</i> ).....	22
<b>Capítulo 4. Discusión.....</b>	<b>24</b>
<b>Capítulo 5. Conclusiones .....</b>	<b>29</b>
<b>Literatura citada .....</b>	<b>30</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>36</b>

## Lista de figuras

Figura	Página
1. Curva de crecimiento típica de una población de microalgas en un cultivo estático: (1) fase lag o de acondicionamiento, (2) fase de crecimiento exponencial, (3) fase de crecimiento lento, (4) fase estacionaria y (5) fase de muerte. ....	6
2. Cinética de crecimiento de un cultivo semicontinuo de microalgas. ....	6
3. Densidad celular de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> en sistema estático y semicontinuo a tasas de dilución de 20% (PT20), 30% (PT30) y 40% (PT40). Los números indican las tasas de división ( $\mu = \text{div día}^{-1}$ ) durante la fase de crecimiento exponencial. ....	14
4. Densidad celular de <i>Thalassiosira weissflogii</i> en sistema estático y semicontinuo a tasas de dilución de 20% (TW20), 30% (TW30) y 40% (TW40). Los números indican las tasas de división ( $\mu = \text{div día}^{-1}$ ) durante la fase de crecimiento exponencial. ....	14
5. Peso seco total unitario (PSTU) de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> en los sistema estático y semicontinuo (20, 30 y 40% de dilución).....	15
6. Peso orgánico unitario (POU) de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> en sistema estático y semicontinuo (20, 30 y 40% de dilución).....	16
7. Peso seco total unitario (PSTU) de <i>Thalassiosira weissflogii</i> en sistema estático y semicontinuo (20, 30 y 40% de dilución).....	16
8. Peso orgánico unitario (POU) de <i>Thalassiosira weissflogii</i> en sistema estático y semicontinuo (20, 30 y 40% de dilución).....	17
9. Contenido de proteínas de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> en sistema estático y semicontinuo (20, 30 y 40% de dilución).....	18
10. Contenido de proteínas de <i>Thalassiosira weissflogii</i> en sistema estático y semicontinuo (20, 30 y 40% de dilución).....	18
11. Contenido de lípidos de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> en sistema estático y semicontinuo (20, 30 y 40% de dilución).....	19
12. Contenido de lípidos de <i>Thalassiosira weissflogii</i> en sistema estático y semicontinuo (20, 30 y 40% de dilución).....	20
13. Contenido de carbohidratos de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> en sistema estático y semicontinuo 20, 30 y 40% de dilución).....	21
14. Contenido de carbohidratos de <i>Thalassiosira weissflogii</i> en sistema estático y semicontinuo (20, 30 y 40% de dilución).....	21

15. Contenido de clorofila <i>a</i> de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> en sistema estático y semicontinuo (20, 30 y 40% de dilución).....	22
16. Contenido de clorofila <i>a</i> de <i>Thalassiosira weissflogii</i> en sistema estático y semicontinuo (20, 30 y 40% de dilución).....	23
17. Resultados del ANOVA de la densidad celular de <i>P. tricornutum</i> .....	36
18. Resultados de la prueba Tukey de la densidad celular de <i>P. tricornutum</i> .....	36
19. Resultados de ANOVA de dos vías del PSTU de <i>P. tricornutum</i> .....	36
20. Resultados de ANOVA de dos vías del POU de <i>P. tricornutum</i> .....	36
21. Resultados de ANOVA de dos vías de la concentración de proteínas de <i>P. tricornutum</i> .....	37
22. Resultados de ANOVA de dos vías de la concentración de lípidos de <i>P. tricornutum</i> .....	37
23. Resultados de ANOVA de dos vías de la concentración de carbohidratos de <i>P. tricornutum</i> ..	37
24. Resultados de ANOVA de dos vías de la concentración de clorofila <i>a</i> de <i>P. tricornutum</i> .....	37
25. Resultados de la prueba Kruskal-Wallis de la densidad celular de <i>T. weissflogii</i> .....	38
26. Resultados de la prueba Dunn de la densidad celular de <i>T. weissflogii</i> .....	38
27. Resultados de ANOVA de dos vías del PSTU de <i>T. weissflogii</i> .....	38
28. Resultados de ANOVA de dos vías del POU de <i>T. weissflogii</i> .....	38
29. Resultados de ANOVA de dos vías de la concentración de proteínas de <i>T. weissflogii</i> .....	38
30. Resultados de ANOVA de dos vías de la concentración de lípidos de <i>T. weissflogii</i> .....	39
31. Resultados de ANOVA de dos vías de la concentración de carbohidratos de <i>T. weissflogii</i> ....	39
32. Resultados de ANOVA de dos vías de la concentración de clorofila <i>a</i> de <i>T. weissflogii</i> .....	39

## Lista de tablas

Tabla

Página

1. Composición bioquímica de *Thalassiosira weissflogii* (TW), *T. pseudonana* (TP) y *Phaeodactylum tricornutum* (PT) reportado por varios autores. ....**¡Error! Marcador no definido.**

## Capítulo 1. Introducción

---

Las microalgas son organismos autótrofos que se encuentran comúnmente en ambientes acuáticos, pero, también podemos encontrar algunas especies habitando en regiones desérticas y ambientes polares (en la nieve) (Graham y Wilcox, 2000); son muy diversas en su composición bioquímica y, debido a esta característica y a su rápida tasa de crecimiento, fácil digestión y alto valor nutricional, son utilizadas en la acuicultura como fuente de alimento vivo en todos los estadios del ciclo de vida de los moluscos bivalvos, en la etapa postlarval y juvenil de abulones y crustáceos, en etapas tempranas de algunas especies de peces y para enriquecer zooplancton como *Artemia*, copépodos y rotíferos (los cuales son una fuente de alimento para larvas de peces y crustáceos marinos) (Brown *et al.*, 1989; Borowitzka, 1997; Graham y Wilcox, 2000; Barsanti y Gualtieri, 2014).

Según la FAO, en el 2020 se cultivaron alrededor de 35 millones de toneladas de algas (incluyendo a las microalgas), siendo China el principal productor. Sin embargo, es difícil conocer el estado mundial actual de la producción de microalgas por falta de datos publicados de los principales países productores como Australia, Estados Unidos, Francia, India, Israel, Italia, Japón, entre otros (FAO, 2020). Por otro lado, en las últimas décadas las microalgas han adquirido gran importancia por las biomoléculas que producen, algunas de las cuales son utilizadas en la industria farmacéutica y cosmética, y actualmente se han intensificado las investigaciones para la producción de biocombustibles como biodiesel, biohidrógeno y bioetanol (Borowitzka, 1999; Muller-Feuga, 2013; Ahmad *et al.*, 2022).

La composición bioquímica es un factor importante que influye en la calidad nutricional de las microalgas y esta varía dependiendo de la especie y de las condiciones de cultivo, como el tamaño de inóculo, la fase de crecimiento, la cantidad y calidad de los nutrientes, la temperatura, la intensidad de luz, el fotoperiodo, el pH y el sistema de cultivo (Becker, 1994). Dentro de los principales compuestos de interés están las proteínas, carbohidratos, lípidos y, pigmentos (especialmente carotenoides y clorofilas) (Abalde *et al.*, 1995; Reboloso-Fuentes *et al.*, 2001; Markou y Nerantzis, 2013). En general, en términos de peso seco y en condiciones estándar de cultivo, las microalgas contienen alrededor del 20 al 57% de proteínas, 7 al 40% de lípidos y 4.1 al 32% de carbohidratos (Brown *et al.*, 1989; Renaud *et al.*, 1999; Becker, 2013; Brown y Blackburn, 2013).

Una de las principales razones por la cual se utilizan a las microalgas como fuente de alimento en la acuicultura es debido a su alto contenido proteico, el cual tiene una distribución equilibrada de

aminoácidos esenciales (Abalde *et al.*, 1995). Los aminoácidos esenciales deben de ser proporcionados en las dietas diarias ya que los organismos no los sintetizan o lo hacen de manera lenta si se compara con la velocidad en la que el cuerpo lo necesita (García-Blandón, 1983). Por otro lado, los lípidos tienen importancia fisiológica, ya que son componentes de la membrana celular y fuente de energía (Khozin-Goldberg *et al.*, 2014), además, son ricos en fosfolípidos (entre el 70% al 90% de los lípidos totales) producidos durante la fase logarítmica de crecimiento (Brown y Blackburn, 2013). Los lípidos son utilizados en el sector de la industria alimenticia y en la salud, por lo que el cultivo de microalgas es una alternativa viable para la obtención de los ácidos grasos esenciales como el docosahexaenoico (DHA; 22:6n-3), el eicosapentaenoico (EPA; 20:5n-3) y el araquidónico (ARA; 20:4n-6).

Otros compuestos como los carbohidratos pueden afectar la digestibilidad de las dietas; en las microalgas, se encuentran en forma de glucosa, fructosa, sacarosa, ramnosa, xylosa, manosa, almidón, glicógeno y celulosa, son componentes de la pared celular y son de gran importancia como material de reserva (Tacon, 1989; Abalde *et al.*, 1995; Markou *et al.*, 2012). Así como las proteínas y los lípidos, la concentración de carbohidratos en las microalgas puede variar dependiendo de las condiciones de cultivo (Abalde *et al.*, 1995).

Aunque existen muchos estudios sobre la composición bioquímica de una gran cantidad de microalgas, hasta la fecha, menos de 20 especies de microalgas se han aprovechado en la acuicultura como alimento vivo (Barsanti y Gualtieri, 2014). Entre las especies más utilizadas se encuentran *I. galbana*, *P. lutheri*, *C. calcitrans*, *C. muelleri*, *T. pseudonana*, *Skeletonema costatum*, *Rhodomonas* spp., *Pyramimonas* spp., *Navicula* spp., *Nitzschia* spp., *Cocconeis* spp., *Amphora* spp., *Nannochloropsis oculata*, *Dunaliella tertiolecta* y *Tetraselmis suecica*. Otras especies que se han utilizado, pero en menor medida son *Phaeodactylum tricornutum* y *Thalassiosira weissflogii* (Borowitzka, 1999; Brown, 2002; Guedes *et al.*, 2015).

En la presente investigación se seleccionaron dos especies para cultivo por lo que se mencionarán algunas cuestiones generales de estas especies. La microalga *Thalassiosira weissflogii* es una diatomea céntrica que se distribuye en varias regiones del mundo. Esta especie se puede encontrar en aguas marinas, salobres y dulces (Kocielek *et al.*, 2015). Tiene un diámetro de 6-15 µm y 20 µm de alto, aunque otros autores mencionan que puede alcanzar hasta 32 µm de diámetro (Johansen y Theriot, 1987; Ortega-Salas y Flores-Nava, 2017). Esta especie ha sido utilizada como fuente de alimento para reproductores de moluscos bivalvos, en combinación de otras especies como *T. pseudonana*, *P. lutheri* y *C. muelleri* (Helem *et al.*, 2006). Además, es empleada como alimento vivo en el cultivo del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), el camarón tigre (*Penaeus monodon*) y el camarón de la India (*Penaeus indicus*), también es

utilizada para enriquecer rotíferos (Emmerson, 1980; Kiatmetha *et al.*, 2011; Ortega-Salas y Flores-Nava, 2017).

Por otro lado, la microalga *Phaeodactylum tricornutum* es una diatomea unicelular (Branco-Vieira *et al.*, 2018), con una alta tasa de crecimiento bajo condiciones óptimas de cultivo. Cultivada con altas intensidades de luz y limitación de nitrógeno, produce altas concentraciones de lípidos, principalmente EPA, por lo que tiene importancia económica en la industria farmacéutica y alimenticia (Kaixian y Borowitzka, 1992; Bitaubé *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2017). Esta especie ha sido utilizada como fuente de alimento para el cultivo de varias especies en estadios larvales de peces (*Sparus aurata*) y moluscos (*Crassostrea virginica*) y para *Artemia* sp. (Epifanio *et al.*, 1981; Fábregas *et al.*, 1998; Martin-Jézéquel y Tesson, 2012; Ribeiro *et al.*, 2017).

Las diatomeas *Thalassiosira weissflogii* y *Phaeodactylum tricornutum* tienen una composición bioquímica balanceada (Tabla 1), ambas especies aportan una buena cantidad de proteínas, lípidos y carbohidratos.

**Tabla 1.** Composición proximal de *Thalassiosira weissflogii* (TW) y *Phaeodactylum tricornutum* (PT) reportado por varios autores. Las concentraciones son indicadas en  $\mu\text{g c\acute{e}l}^{-1}$ .

Especie	Proteínas	Lípidos	Carbohidratos	Autores
TW	50.41	73.23	45	García <i>et al.</i> (2012)
	38.82	12.79	70	Li (1984)
PT	5.72	3.45	6.26	Fábregas <i>et al.</i> (1998)
	4.57	2.42	3.91	
	4.46	2.57	4.1	

El cultivo de las microalgas se realiza con una variedad de métodos, desde condiciones controladas en laboratorio hasta cultivos al exterior con condiciones menos predecibles. En los primeros se tiene control de la temperatura, el pH, la iluminación, los nutrientes, la contaminación por depredadores (como zooplancton) o la competencia con otras especies de microalgas, así mismo, se pueden lograr biomásas con una buena composición bioquímica. Por otro lado, los cultivos al exterior son de bajo costo, sin embargo, es difícil mantenerlos por largos periodos de tiempo debido a la dificultad de controlar los parámetros de cultivo, además, lo anterior causa variaciones en la calidad de la biomasa (Borowitzka, 1999; Barsanti y Gualtieri, 2014).

El sistema de cultivo de microalgas más común es el estático (“batch” o “en lote”) (Figura 1) debido a su simplicidad y bajo costo por lo que es frecuentemente utilizado para el cultivo comercial de microalgas (Becker, 2013; Chen y Gao, 2021). Este se basa en agregar, por una sola ocasión, nutrientes y una cantidad de inóculo conocido de microalgas con un volumen de agua limitado, donde no hay entrada ni salida de materiales, por lo que los recursos son finitos y las condiciones físicas y químicas durante el cultivo varían drásticamente, ya que los nutrientes se agotan a medida que la densidad celular aumenta y la cantidad de luz que absorbe cada célula disminuye debido al autosombreado provocado por el incremento de la densidad celular, lo que a su vez incrementa el nivel de pH y el oxígeno disuelto mientras que disminuye el CO<sub>2</sub>. Además, una vez que los recursos son utilizados por las células, las microalgas mueren a no ser que se agreguen nuevos nutrientes (Barsanti y Gualtieri, 2014; Chen y Gao, 2021).

El crecimiento celular de una microalga cultivada en un sistema estático consiste en varias fases (Figura 1), las cuales están caracterizadas por variaciones en la tasa de crecimiento ( $\mu$ : divisiones por día<sup>-1</sup>). En la fase de acondicionamiento o fase “Lag” no hay crecimiento celular. En este tipo de cultivo, el inóculo de microalgas se adapta fisiológicamente a las condiciones del nuevo sistema de cultivo, se incrementan las enzimas y los metabolitos involucrados en la división celular y en la fijación de carbono. Una vez que la población de microalgas se adapta al nuevo entorno, inicia la fase de crecimiento exponencial, donde las células se dividen rápida y constantemente; no obstante, esta fase dura poco tiempo (generalmente de dos a tres días) porque la luz se vuelve limitante debido al autosombreado causado por la alta densidad celular y por la disminución de los nutrientes. Debido a esto, el cultivo entra en fase de crecimiento lento y posteriormente inicia la fase estacionaria donde el crecimiento celular permanece estancado, por lo que la tasa de crecimiento es cero; durante esta fase la calidad del agua se deteriora, la concentración celular disminuye y, por ende, la tasa de crecimiento es negativa, lo que conlleva a la fase de muerte celular (Barsanti y Gualtieri, 2014; Lee *et al.* 2015; Arredondo-Vega *et al.*, 2017).

Otro sistema de cultivo es el semicontinuo (Figura 2), este se basa en cosechar un volumen del cultivo diario y reemplazarlo con un volumen equivalente de agua con nutrientes, previamente se determina la tasa de dilución adecuada, la cual dependerá de la tasa de división de la especie en cultivo; esta técnica de cultivo presenta varias ventajas: las microalgas se mantienen fisiológicamente estables, se puede manipular y optimizar el cultivo, así como la composición bioquímica, de tal manera que se logre mantener la calidad de la biomasa por largos periodos en las condiciones deseadas, además, es fácil de operar y es útil en estudios de limitación de nutrientes (Borowitzka, 1999, Barsanti y Gualtieri, 2014; Chen y Gao, 2021).



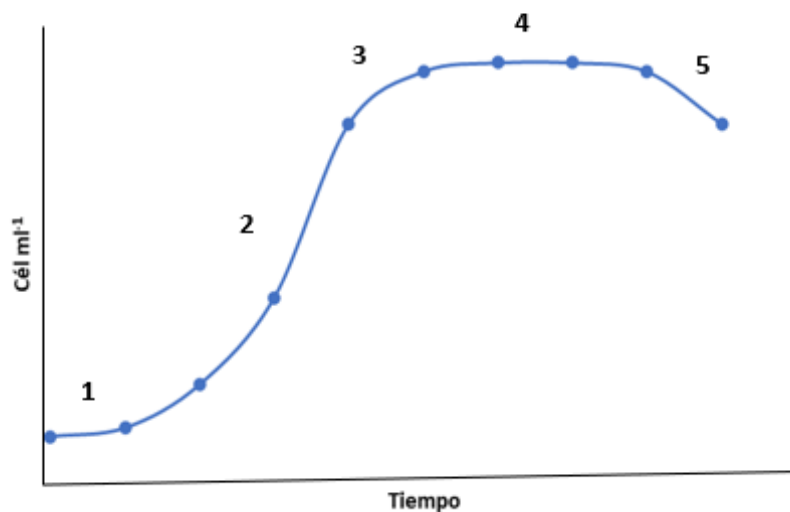
Como ya se mencionó anteriormente, uno de los factores que influyen en el crecimiento y la composición bioquímica de las microalgas son los distintos sistemas de cultivo, siendo el estático o “batch” de los más empleados; sin embargo, la estabilidad y calidad de la biomasa se puede ver afectada por los factores antes mencionados, por lo anterior, los sistemas semicontinuos son una alternativa viable para el cultivo de microalgas, ya sea para ser utilizadas directamente como alimento vivo o para la producción de compuestos de alto valor económico, debido a que pueden ser mantenidos por largos periodos de tiempo con una calidad estable, principalmente en la fase de crecimiento exponencial (Graham y Wilcox, 2000). No obstante, es de gran importancia utilizar la tasa de dilución adecuada que permita obtener las mayores densidades celulares y una buena composición bioquímica.

Actualmente, la utilización del sistema de cultivo semicontinuo es baja, en especial en aplicaciones comerciales, a pesar de que se han reportado buenos resultados por ejemplo, Fábregas *et al.* (2004) reportan para *Nannochloropsis* sp. que la tasa de dilución del 40% y altas irradiancias promueve el aumento en el contenido de proteínas; Brown *et al.* (1993), cuando evaluaron el cultivo estático de *Isochrysis* sp., *Pavlova lutheri* y *Nannochloropsis oculata* encontraron que la composición bioquímica varió a lo largo del tiempo, el contenido de proteínas fue mayor durante la fase de crecimiento exponencial, mientras que los lípidos y carbohidratos aumentaron durante la fase estacionaria; sin embargo, cuando compararon con el sistema semicontinuo, aunque el contenido de proteínas fue menor, este fue constante durante todo el cultivo, además, el contenido de carbohidratos de las microalgas aumentó y *P. lutheri* obtuvo un mayor porcentaje de lípidos.

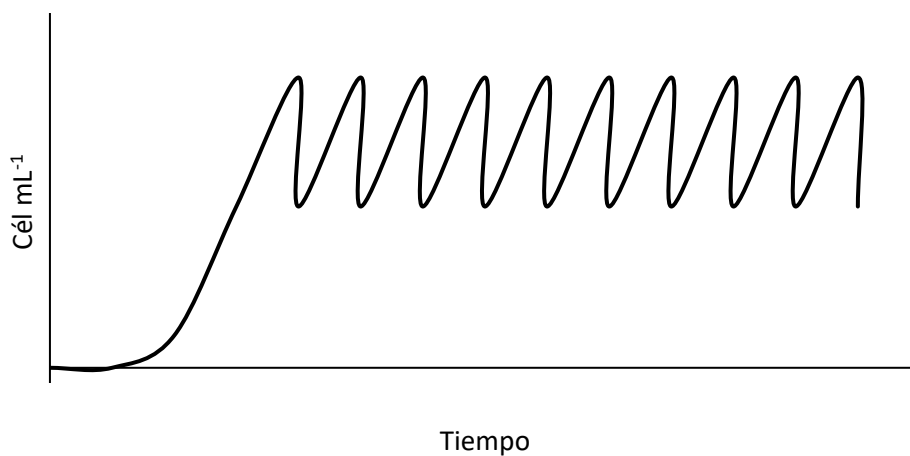
Así mismo, López-Elías y Voltolina (1993) reportaron una buena calidad de la biomasa en el cultivo semicontinuo de *Chaetoceros* sp., *P. tricornutum*, *Tetraselmis* sp. y *P. lutheri* utilizando tasas de dilución del 15 al 75%. Otero *et al.* (1997), determinaron el contenido del ácido eicosapentaenoico (EPA) en cultivos semicontinuos con limitación y saturación de nitrógeno de las microalgas *P. tricornutum*, *I. galbana* y *Porphyridium cruentum* y los resultados mostraron que el contenido de EPA aumenta cuando las tasas de dilución son mayores en condiciones de limitación de nitrógeno. Cerón (2000), encontró que las microalgas *Isochrysis* sp., *P. lutheri* y *C. calcitrans* cultivadas en un sistema semicontinuo (con una tasa de dilución del 20%) presentaron un contenido de proteínas similar entre las especies, pero una mayor concentración de lípidos en *Isochrysis* y *Chaetoceros*, además, en *Isochrysis* se obtuvo un mayor porcentaje del ac. graso DHA, mientras que, en *C. calcitrans* y *P. lutheri* se registró un mayor porcentaje del ac. graso EPA.

Por último, Fábregas *et al.* (1996), evaluaron la composición bioquímica de *P. tricornutum* cultivada en un sistema semicontinuo con distintas tasas de dilución y concentraciones de nutrientes y no encontraron

diferencias en la densidad celular en los cultivos con mayor concentración de nutrientes, excepto en los cultivos que usaron altas tasas de dilución, con un mayor contenido de proteína a mayor concentración de nutrientes, no obstante, el contenido de lípidos y carbohidratos fue menor en estas condiciones de cultivo. En este trabajo se realizó un cultivo semicontinuo con tres porcentajes de dilución (20, 30 y 40%), con el objetivo de determinar la tasa de dilución que proporcione la mayor cantidad de biomasa y la mejor composición bioquímica en el cultivo de las microalgas *T. weissflogii* y *P. tricornutum*.



**Figura 1.** Curva de crecimiento típica de una población de microalgas en un cultivo estático: (1) fase lag o de acondicionamiento, (2) fase de crecimiento exponencial, (3) fase de crecimiento lento, (4) fase estacionaria y (5) fase de muerte.



**Figura 2.** Cinética de crecimiento de un cultivo semicontinuo de microalgas.

## 1.1 Hipótesis

La biomasa producida (densidad celular) y la composición bioquímica de las microalgas *P. tricornutum* (PT) y *T. weissflogii* (TW) se mantendrán estables en un sistema de cultivo semicontinuo con un porcentaje de dilución del 20%.

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Objetivo general

Evaluar la biomasa producida por las microalgas *P. tricornutum* (PT) y *T. weissflogii* (TW) en cultivo estático y semicontinuo con tasas de dilución del 20, 30 y 40%.

### 1.2.2 Objetivos específicos

Evaluar la densidad celular (número de células y peso seco total y orgánico), de las microalgas *P. tricornutum* (PT) y *T. weissflogii* (TW) en cultivo estático y semicontinuo (con diferentes porcentajes de dilución: 20, 30 y 40%).

Evaluar la composición bioquímica (proteínas, carbohidratos, lípidos y pigmentos) de las microalgas *P. tricornutum* (PT) y *T. weissflogii* (TW) en cultivo estático y semicontinuo.

## Capítulo 2. Metodología

---

### 2.1 Cultivo de microalgas

#### 2.1.1 Mantenimiento de las cepas

Las cepas de las microalgas *Phaeodactylum tricornutum* y *Thalassiosira weissflogii* se obtuvieron de la Colección de Microalgas del Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Se realizaron escalamientos sucesivos de los cultivos a partir de un matraz Erlenmeyer de 100 mL, matraz Fernbach de 2 L hasta botellón de 10 L. Los cultivos se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura ( $21\pm 1$  °C para *P. tricornutum* y  $25\pm 1$  °C para *T. weissflogii*), pH (8-8.5 controlado por medio de inyección de CO<sub>2</sub>), salinidad (35 ups) e intensidad de luz ( $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , proporcionada por lámparas fluorescentes de luz blanca fría). El medio de cultivo que se utilizó fue el "f/2" de Guillard (1983).

#### 2.1.2 Tratamiento del agua de mar

El agua de mar que se utilizó para los cultivos pasó por una serie de filtros de cartucho de 10, 5 y 1  $\mu\text{m}$  de poro, después se trató con luz UV. El agua fue posteriormente esterilizada de dos formas. Para los cultivos de 100 mL y 2 L se usó una autoclave durante 20 min a 15 lb de presión y 121°C y para los botellones de 15 L, se esterilizó por medio del método de Hemerick (1974), el cual consiste en agregar 3 mL de cloro comercial por cada litro de agua de mar y después de 24 h se agregaron 150 mg de tiosulfato de sodio por litro y por último se agregó aireación profusa por 24 h para neutralizar el cloro previamente añadido.

#### 2.1.3 Cultivo estático y semicontinuo

Para el cultivo de las microalgas se evaluaron dos sistemas, estático y semicontinuo, en el primer caso se inició con inóculos de  $200 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$  de *P. tricornutum* y  $75 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$  de *T. weissflogii*, en botellones de 20 L, con un volumen útil de 10 L. El cultivo estático de las microalgas se mantuvo hasta el día 6 para *P.*

*tricornutum* y 3 para *T. weissflogii*. Posteriormente se inició un sistema semicontinuo, donde se evaluaron tasas de dilución del 20%, 30% y 40% con tres repeticiones para cada una.

## 2.2 Evaluación de la biomasa

### 2.2.1 Toma de muestras

Para evaluar la biomasa producida con base en el peso seco total y orgánico y en la composición bioquímica (proteínas, lípidos, carbohidratos y pigmentos), se realizaron tres muestreos en el cultivo estático de *P. tricornutum*, dos en la fase de crecimiento exponencial (día 3 y 5) y otro en la fase estacionaria (día 6), además de tres en el sistema semicontinuo (día 14, 16 y 18). Por otro lado, en el cultivo estático de *T. weissflogii* se tomaron dos muestras en la fase de crecimiento exponencial (día 2 y 3) y cuatro en el semicontinuo (día 7, 11, 14 y 18).

### 2.2.2 Concentración celular

Los recuentos celulares se realizaron en una cámara de Neubauer de 0.1 mm de profundidad y bajo un microscopio compuesto (ZEISS, Primo Star) utilizando el objetivo de 10x, además, se midió la absorbancia con el fin de obtener curvas de calibración, comparando el número de células con las unidades de absorbancia; para cumplir dicho propósito, se realizó previamente un experimento de las dos especies de microalgas cultivadas en botellones de 10 L, y en sistema estático y se tomaron muestras cada 24 h y una vez que inició el sistema semicontinuo, los muestreos se llevaron a cabo antes y después de cada dilución. Para la medición de la absorbancia se utilizó un espectrofotómetro Hach DR 6000 y las muestras se leyeron a una longitud de onda de 680 nm, establecida previamente por un barrido a diferentes longitudes de onda.

La concentración celular (Cél mL<sup>-1</sup>) se obtuvo con la fórmula de Guillard (1973):

$$N = C * 10^4 F.D \quad (1)$$

Donde:

$N = \text{Cél mL}^{-1}$

$C =$  promedio de células en los ocho cuadrantes externos de la cámara Neubauer

$10^4 =$  factor de conversión dado por la profundidad de la cámara

F.D. = factor de dilución (cuando fue necesario)

La tasa de crecimiento ( $\mu$ : divisiones día<sup>-1</sup>) se calculó según la fórmula descrita por Guillard (1973):

$$\mu = \frac{\log_2(X_2) - \log_2(X_1)}{(T_2 - T_1)} \quad (2)$$

Donde:

$X_2$  y  $X_1 =$  concentración celular determinada en los tiempos  $t_2$  y  $t_1$  (días)

### 2.2.3 Peso seco total (PST) y orgánico (PO)

El peso seco total y orgánico se obtuvo según el método de Sorokin (1973). Se filtró un volumen de 20 mL de microalgas en filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/C, de 47 mm de diámetro, con retención de partículas de 1.2  $\mu\text{m}$ ). Para obtener el peso de los filtros (PF), éstos fueron previamente lavados con agua destilada, calcinados a 500°C en una mufla (Thermoline) por 12 h y pesados en una balanza analítica (marca GR-202, A&D). Posteriormente, muestras de microalgas, de un volumen conocido, se filtraron y se lavaron con una solución de formiato de amonio al 3% para eliminar las sales del cultivo (Wikfors *et al.*, 1992), después se secaron en una estufa (Thermoline, series 9000) a 70 °C por 24 h; transcurrido este tiempo se pesaron (PFM) en una balanza analítica y enseguida se calcinaron en una mufla a 500 °C por 12 h y se pesaron para obtener el peso de cenizas (PFC).

Para los cálculos de los pesos, se utilizarán las ecuaciones descritas por Sorokin (1973):

$$PST(\mu\text{g mL}^{-1}) = [(PFM) - PF]/VF \quad (3)$$

$$PC(\mu g mL^{-1}) = (PFCM - PF)/VF \quad (4)$$

$$PO (\mu g mL^{-1}) = PST - PC \quad (5)$$

En donde:

PST, PC y PO = peso seco total, peso de cenizas y peso orgánico.

PFM, PF, y PFCM= peso del filtro con microalgas, peso del filtro, y peso del filtro con las cenizas de microalgas.

VF = Volumen de muestra filtrado.

### 2.3 Composición proximal de las microalgas

La cuantificación de proteínas totales se realizó por el método de Lowry *et al.* (1951), previa extracción con NaOH 0.1 N (Rausch, 1981), mientras que la extracción de los lípidos totales se llevó a cabo según el método de Bligh y Dyer (1959), modificado por Cequier-Sánchez *et al.* (2008), utilizando diclorometano: metanol (1:2), y posteriormente fueron analizados por el método de Pande *et al.* (1963). La extracción de los carbohidratos se realizó con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M (Whyte, 1987) y la cuantificación según el método de Dubois *et al.* (1956). Para estos análisis se realizaron curvas de calibración con albúmina de suero de bovino para proteínas (se leyeron las absorbancias a 750 nm), tripalmitina para lípidos (590nm) y para carbohidratos con glucosa anhidra (485 nm). Por último, los análisis de pigmentos (clorofila *a*), se realizaron por el método de Lichtenthaler y Buschmann (2001) previa extracción con metanol al 100%. La cuantificación de los pigmentos se obtuvo mediante las siguientes fórmulas:

$$Ca = 16.72A_{665.2} - 9.16A_{652.4} \quad (6)$$

Donde:

Ca= clorofila *a*

A= absorbancia

## 2.4 Análisis estadísticos

Los resultados obtenidos durante el cultivo de las microalgas *P. tricornutum* y *T. weissflogii* (densidad celular, peso seco total y orgánico y composición proximal), en las diferentes tasas de dilución (20%, 30% y 40%), se analizaron con el software R. Se verificaron los supuestos de la normalidad de los datos mediante la prueba Shapiro-Wilk y la homocedasticidad de varianzas con la prueba de Levene. Para *P. tricornutum* se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar el efecto de las tasas de dilución (20, 30 y 40%) sobre el crecimiento celular; mientras que, para *T. weissflogii*, se utilizó la prueba Kruskal-Wallis sobre la densidad celular teniendo como variable independiente las tasas de dilución. Para ambas especies se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para determinar el efecto de las tasas de dilución y el tiempo sobre el peso seco total (PST) y unitario (POU), contenido de proteínas, lípidos, carbohidratos y clorofila  $\alpha$ . Cuando se encontraron diferencias significativas entre tratamientos se utilizó la prueba *a posteriori* de Tukey. Todos los análisis estadísticos se realizaron con un nivel de significancia del 0.05, a excepción de proteínas y clorofila  $\alpha$ , que se utilizó 0.01, para poder aplicar los análisis paramétricos.



## Capítulo 3. Resultados

---

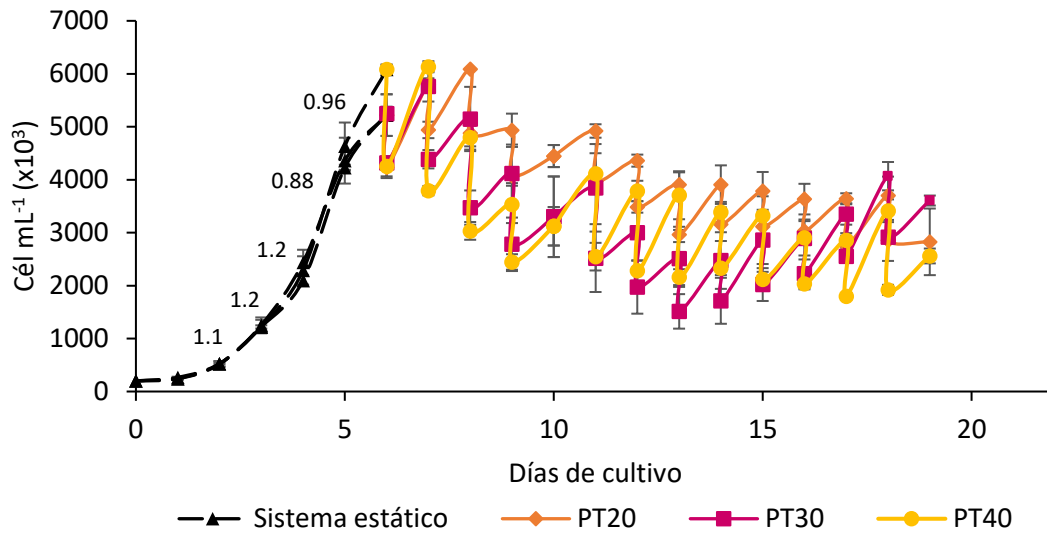
### 3.1 Crecimiento celular

#### 3.1.1 Concentración celular de *Phaeodactylum tricornutum* y *Thalassiosira weissflogii* en sistema estático y semicontinuo

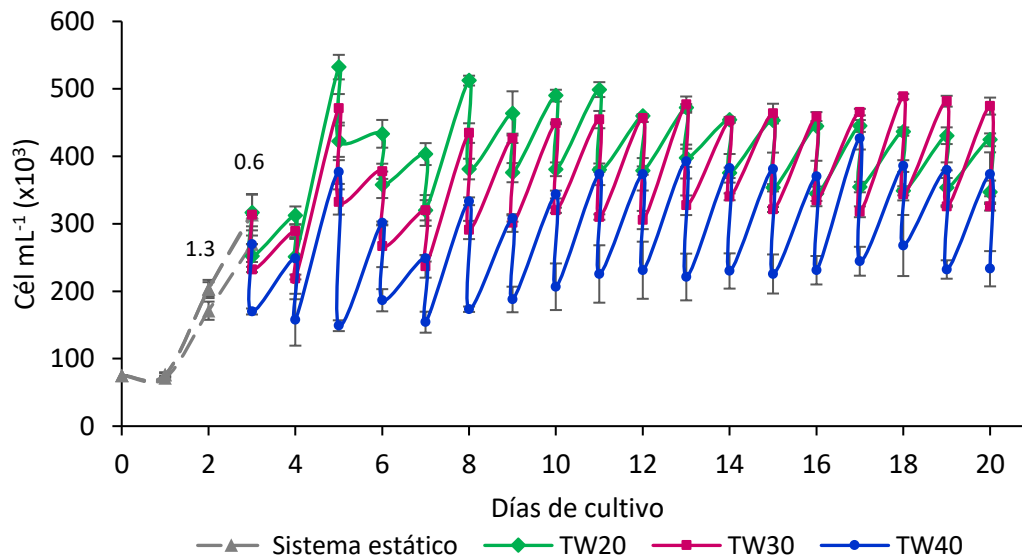
El cultivo estático de la diatomea *P. tricornutum* tuvo una duración de seis días (Figura 3), la fase de crecimiento exponencial inició a partir del día dos con  $1.1 \pm 0.22$  div día<sup>-1</sup> y se mantuvo hasta el día cinco donde se registró una tasa de crecimiento de  $0.96 \pm 0.20$  div día<sup>-1</sup>. Al día seis se inició el sistema semicontinuo, con una densidad celular inicial de  $5,515 \times 10^3 \pm 1506$  cél mL<sup>-1</sup> en los tres tratamientos, y una tasa de crecimiento de  $0.30 \pm 0.18$  div día<sup>-1</sup>. Las densidades celulares durante los días seis, siete y ocho de cultivo tuvieron un promedio de  $5,585 \times 10^3 \pm 283$  cél mL<sup>-1</sup> y  $0.08 \pm 0.23$  div día<sup>-1</sup>. El noveno día, el número de células disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) hasta  $4,195 \times 10^3 \pm 844$  cél mL<sup>-1</sup> y  $-0.32 \pm 0.15$  div día<sup>-1</sup>, por lo que se decidió no realizar la dilución el día 10, para recuperación de los cultivos. A partir de este día la densidad celular se estabilizó y en general se mantuvo hasta el día 19 ( $p > 0.05$ ), con una densidad media de  $3,473 \times 10^3 \pm 375.33$  cél mL<sup>-1</sup> y  $-0.05 \pm 0.23$  div día<sup>-1</sup>. La prueba estadística ANOVA mostró diferencias significativas de la densidad celular entre los tres tratamientos, con base en los resultados del análisis Tukey, la dilución del 20% fue la de mayor densidad celular ( $p > 0.05$ ) (Anexo A).

Por otro lado, el cultivo estático de *T. weissflogii* (Figura 4) tuvo una duración de tres días y la fase de crecimiento exponencial inició al día dos con  $1.3 \pm 0.21$  div día<sup>-1</sup>. El sistema semicontinuo comenzó al día tres, cuando el cultivo tenía una densidad celular de  $270.33 \times 10^3 \pm 52.82$  cél mL<sup>-1</sup> y una tasa de crecimiento ( $\mu$ ) de  $0.65 \pm 0.08$  div día<sup>-1</sup> para los tres tratamientos. Estas densidades celulares se mantuvieron hasta el día cuatro. En el día cinco se registró un incremento de la biomasa en los diferentes tratamientos, donde se alcanzaron densidades de  $532 \times 10^3 \pm 34.08$  cél mL<sup>-1</sup> (dilución 20%)  $471 \times 10^3 \pm 53.57$  cél mL<sup>-1</sup> (30%) y  $376 \times 10^3 \pm 28.49$  cél mL<sup>-1</sup> (40%). Posteriormente, en los días seis y siete la densidad celular de los tres tratamientos disminuyó entre un 25% y 34%. No obstante, los cultivos en los tres tratamientos se recuperaron a partir del octavo día y se mantuvieron estables hasta el final del ensayo (día 20). Durante este periodo no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en el número de células en los cultivos semicontinuos con las tasas de dilución del 20 y 30%, en los cuales se observaron las mayores densidades

celulares ( $460 \times 10^3 \pm 33.62 \text{ cél mL}^{-1}$ ), estos tratamientos fueron diferentes al tratamiento del 40%, donde se obtuvieron  $370 \times 10^3 \pm 66.91 \text{ cél mL}^{-1}$  ( $p < 0.05$ ) (Anexo B).



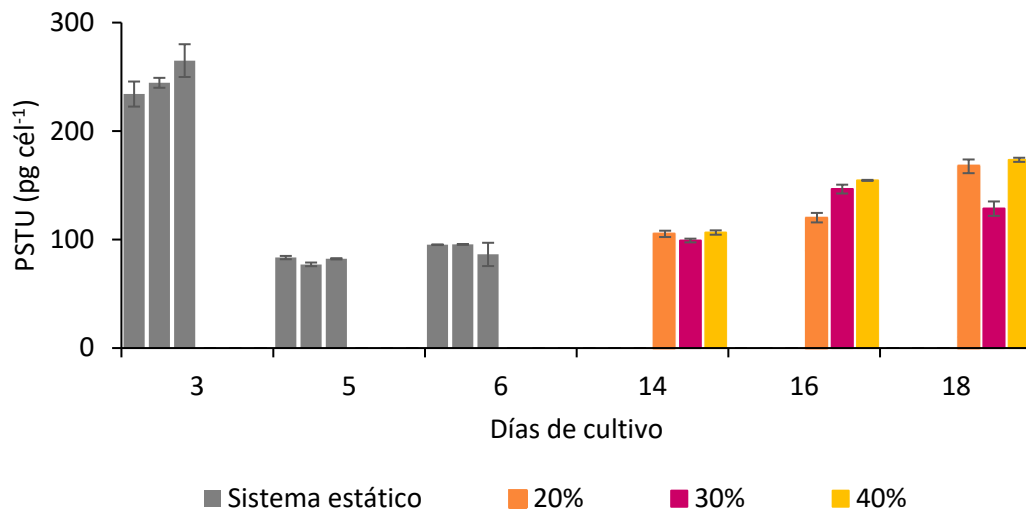
**Figura 3.** Densidad celular de *Phaeodactylum tricornutum* en sistema estático y semicontinuo a tasas de dilución de 20% (PT20), 30% (PT30) y 40% (PT40). Los números indican las tasas de división ( $\mu = \text{div día}^{-1}$ ) durante la fase de crecimiento exponencial.



**Figura 4.** Densidad celular de *Thalassiosira weissflogii* en sistema estático y semicontinuo a tasas de dilución de 20% (TW20), 30% (TW30) y 40% (TW40). Los números indican las tasas de división ( $\mu = \text{div día}^{-1}$ ) durante la fase de crecimiento exponencial.

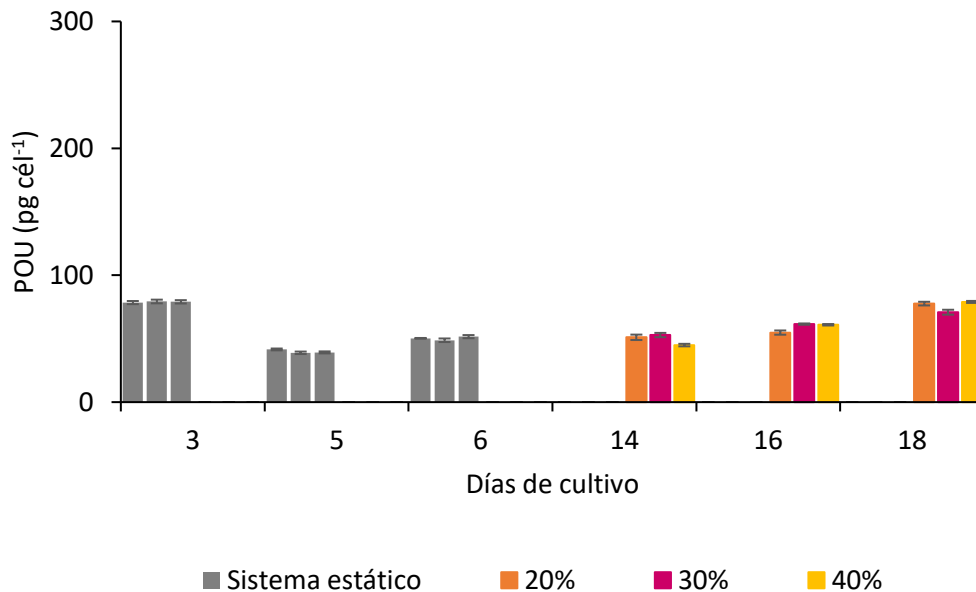
### 3.1.2 Peso seco total y orgánico unitario

Para *P. tricornutum*, durante el cultivo estático se observaron los mayores PSTU ( $247.87 \pm 21.71 \text{ pg cél}^{-1}$ ) y POU ( $78.93 \pm 2.14 \text{ pg cél}^{-1}$ ) al día tres de cultivo que corresponden a la fase de crecimiento exponencial. En los siguientes días se registró una disminución de los pesos, sin diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en el PSTU entre los días cinco y seis (promedio de los dos días:  $86.73 \pm 9.48 \text{ pg cél}^{-1}$ ), pero sí en el POU ( $p < 0.05$ ), donde se obtuvieron promedios de  $39.85 \pm 1.70$  y  $50.21 \pm 2.26 \text{ pg cél}^{-1}$  respectivamente (Figuras 5 y 6).



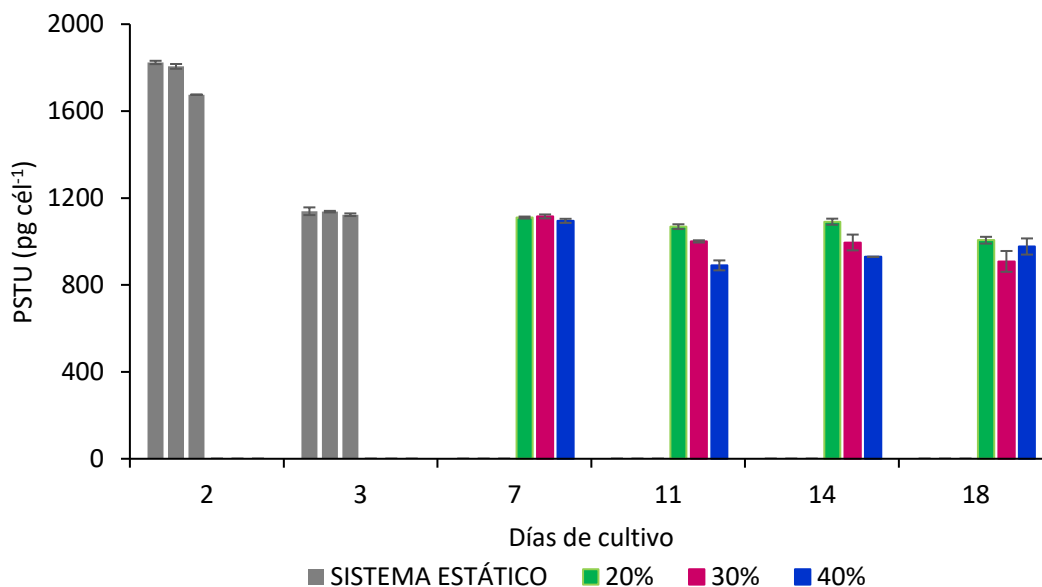
**Figura 5.** Peso seco total unitario (PSTU) de *Phaeodactylum tricornutum* en los sistema estático y semicontinuo (20, 30 y 40% de dilución).

El sistema semicontinuo inició con promedios de  $92.35 \pm 5.32 \text{ pg cél}^{-1}$  de PSTU y  $50.21 \pm 4.38 \text{ pg cél}^{-1}$  de POU. No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en ambos pesos (PSTU y POU) entre los valores del día seis (sistema estático) y las diferentes diluciones del día 14 de cultivo. Posteriormente se registró un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en el PSTU y POU durante los días 16 y 18, los cultivos con los tratamientos de 20% y 40% de dilución fueron los que alcanzaron una mayor biomasa (en PSTU) durante el día 18, por otra parte, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en el peso orgánico unitario (POU) durante el día 18 de cultivo (Anexo A).



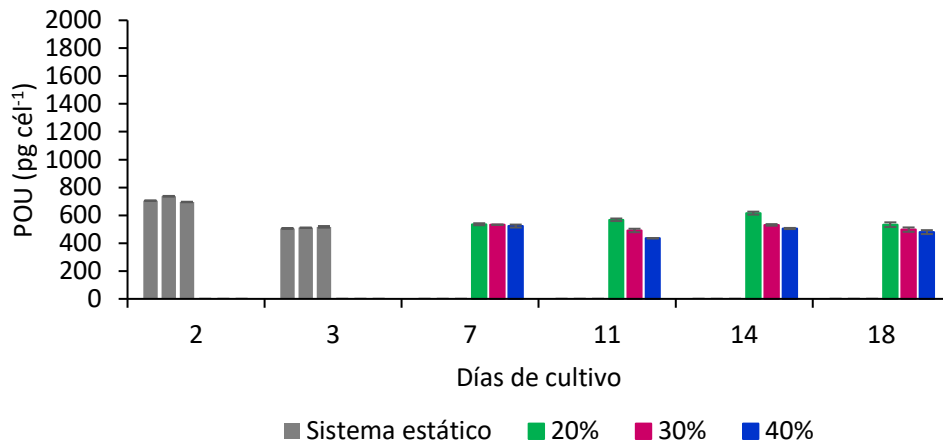
**Figura 6.** Peso orgánico unitario (POU) de *Phaeodactylum tricornutum* en sistema estático y semicontinuo (20, 30 y 40% de dilución).

En relación con la microalga *T. weissflogii*, al igual que *P. tricornutum*, los mayores pesos se obtuvieron en el sistema estático al día dos de cultivo, con  $1,709 \pm 71$  pg cél<sup>-1</sup> (PSTU) y  $683 \pm 18$  pg cél<sup>-1</sup> (POU) (Figura 7 y 8, respectivamente), los cuales disminuyeron al día tres en un 34% (de PSTU) y 25.27% (de POU).



**Figura 7.** Peso seco total unitario (PSTU) de *Thalassiosira weissflogii* en sistema estático y semicontinuo (20, 30 y 40% de dilución).

El sistema semicontinuo inició con  $1,132 \pm 12$  pg cél<sup>-1</sup> de PSTU y  $529 \pm 12$  pg cél<sup>-1</sup> de POU y estos se mantuvieron constantes hasta el día siete de cultivo ( $p > 0.05$ ). El PSTU en los días 11 y 14 fue mayor en el tratamiento del 20% ( $1,079 \pm 23$  pg cél<sup>-1</sup>) ( $p < 0.05$ ), se estabilizó al día 18, donde se obtuvo un promedio de  $963 \pm 27$  pg cél<sup>-1</sup>, sin diferencias significativas entre diluciones ( $p > 0.05$ ). Por último, el POU en el tratamiento del 40%, se observó una disminución del día 7 al día 11 ( $p < 0.05$ ) (Anexo B), después se recuperó y se mantuvo estable hasta el final del cultivo.

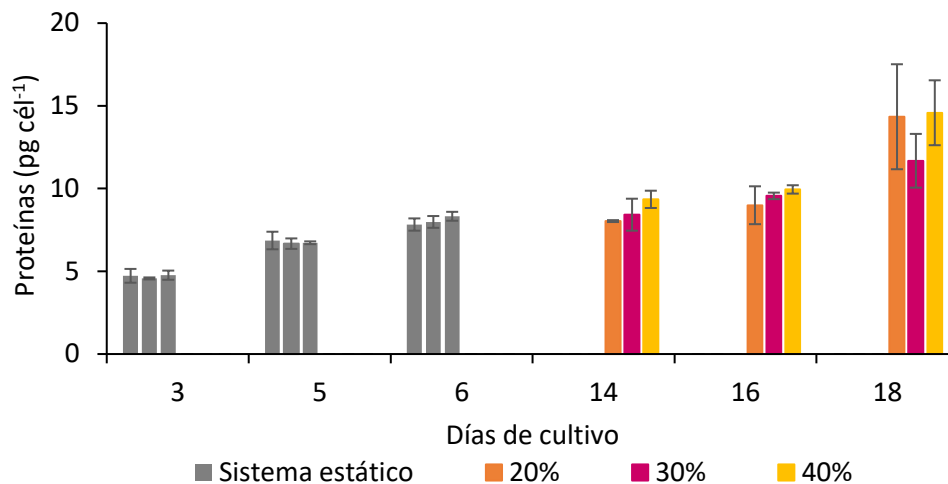


**Figura 8.** Peso orgánico unitario (POU) de *Thalassiosira weissflogii* en sistema estático y semicontinuo (20, 30 y 40% de dilución).

## 3.2 Composición bioquímica

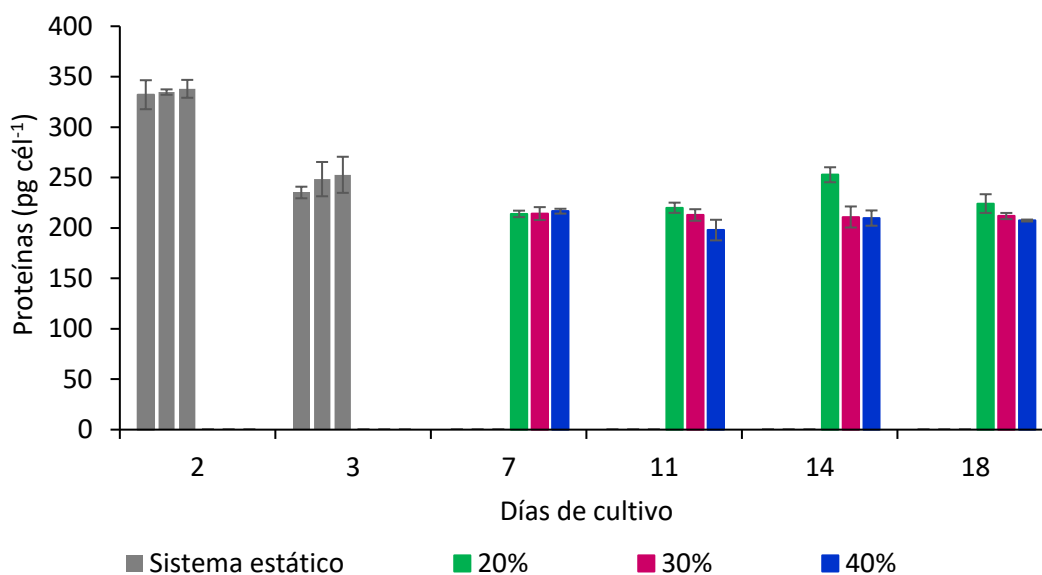
### 3.2.1 Cuantificación de proteínas

Como se puede observar en la Figura 9, en el cultivo estático de *P. tricornutum*, el contenido de proteínas aumenta a lo largo del cultivo en las tres tasas de dilución utilizadas, el menor contenido se registró en el día tres con  $4.7 \pm 0.4$  pg cél<sup>-1</sup>, estos valores aumentaron hasta el día seis, donde se encontró una mayor concentración de proteínas ( $8.0 \pm 0.5$  pg cél<sup>-1</sup>), durante este día de cultivo las microalgas se encontraban en la fase de crecimiento lento. El sistema semicontinuo inició con una concentración de proteínas de  $8.0 \pm 1.1$  pg cél<sup>-1</sup> y se mantuvo estable hasta el día 16 en las tres tasas de dilución, con un aumento significativo en el día 18 ( $p < 0.01$ ) alcanzando valores de  $13.5 \pm 3.7$  pg cél<sup>-1</sup>. No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.01$ ) en el contenido de proteínas entre tratamientos (20, 30 y 40% de dilución) por día de cultivo (Anexo A).



**Figura 9.** Contenido de proteínas de *Phaeodactylum tricornutum* en sistema estático y semicontinuo (20, 30 y 40% de dilución).

Con relación a la microalga *T. weissflogii* (Figura 10), el mayor contenido de proteínas se registró durante el cultivo estático (día dos), con  $334.9 \pm 15.0$  pg cél<sup>-1</sup> (fase de máximo crecimiento exponencial), en el día tres se observó una disminución significativa en el contenido de proteínas con valores de  $245.4 \pm 23.3$  pg cél<sup>-1</sup> ( $p < 0.05$ ).

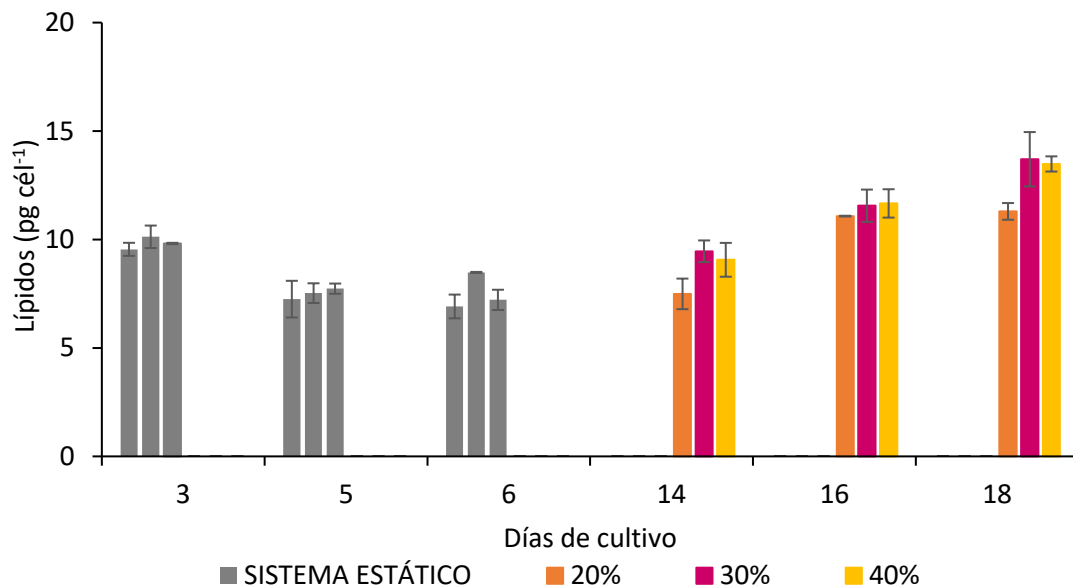


**Figura 10.** Contenido de proteínas de *Thalassiosira weissflogii* en sistema estático y semicontinuo (20, 30 y 40% de dilución).

En general, durante el sistema semicontinuo, el contenido de proteínas se mantuvo estable entre las tasas de dilución (20%, 30% y 40%), solamente se encontraron diferencias significativas durante el día 14, donde el contenido fue mayor en la tasa de dilución del 20% ( $p < 0.05$ ). Las concentraciones registradas durante el sistema semicontinuo fueron menores a las obtenidas durante el día dos en el sistema estático ( $p < 0.05$ ) (Anexo B).

### 3.2.2 Cuantificación de lípidos totales

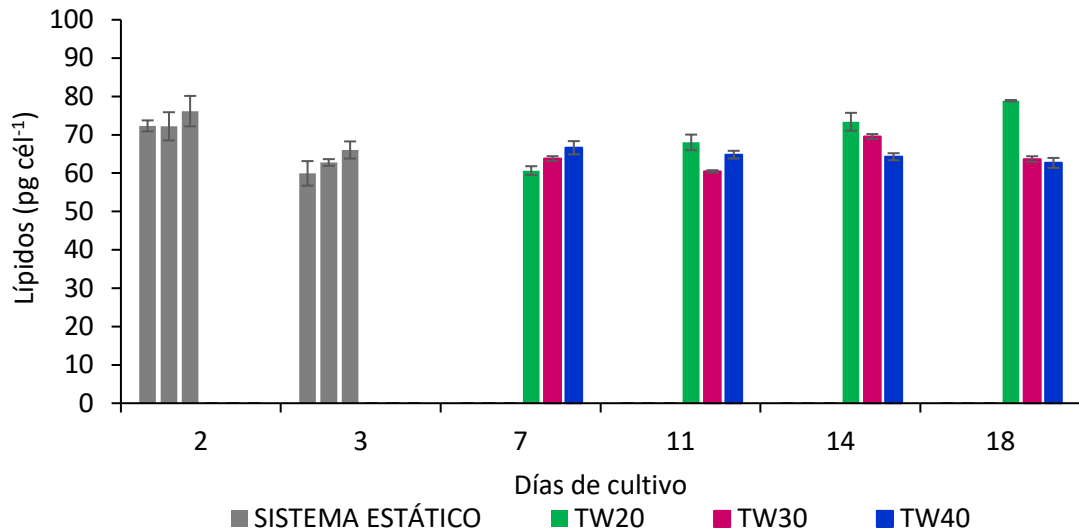
El mayor contenido de lípidos de *P. tricornutum*, en el sistema estático, se obtuvo al tercer día de cultivo en las tres tasas de dilución, con un promedio de  $9.8 \pm 0.5 \text{ pg cel}^{-1}$  (Figura 11), esta concentración disminuyó en el día cinco y se mantuvo estable hasta el día seis con un valor promedio de  $7.5 \pm 0.8 \text{ pg cel}^{-1}$ . El contenido de lípidos aumentó durante el sistema semicontinuo en las tres diluciones, inició con una concentración de  $7.5 \pm 0.9 \text{ pg cel}^{-1}$  y en el día 18 aumentó hasta los  $13.5 \pm 1.4 \text{ pg cel}^{-1}$  en las diluciones del 30 y 40% ( $p > 0.05$ ) (Anexo A).



**Figura 11.** Contenido de lípidos de *Phaeodactylum tricornutum* en sistema estático y semicontinuo (20, 30 y 40% de dilución).

Por otro lado, en *T. weissflogii* (Figura 12), en las tres tasas de dilución el mayor contenido de lípidos en el cultivo estático se registró al día dos (fase de crecimiento exponencial), con una concentración promedio de  $73.5 \pm 5.2 \text{ pg cel}^{-1}$ , esta concentración disminuyó en el día tres un 14.5%. El sistema semicontinuo inició

con un  $62.9 \pm 4.3$  pg cél<sup>-1</sup> y esta concentración se mantuvo, en general, hasta el final de cultivo en los tratamientos del 30% y 40% ( $p > 0.05$ ). A partir del día 14, la concentración de lípidos del tratamiento del 20% fue significativamente mayor ( $p > 0.05$ ) a los tratamientos del 30 y 40%, siendo el día 18 cuando se registró la mayor concentración ( $78.8 \pm 7.9$  pg cél<sup>-1</sup>) (Anexo B).



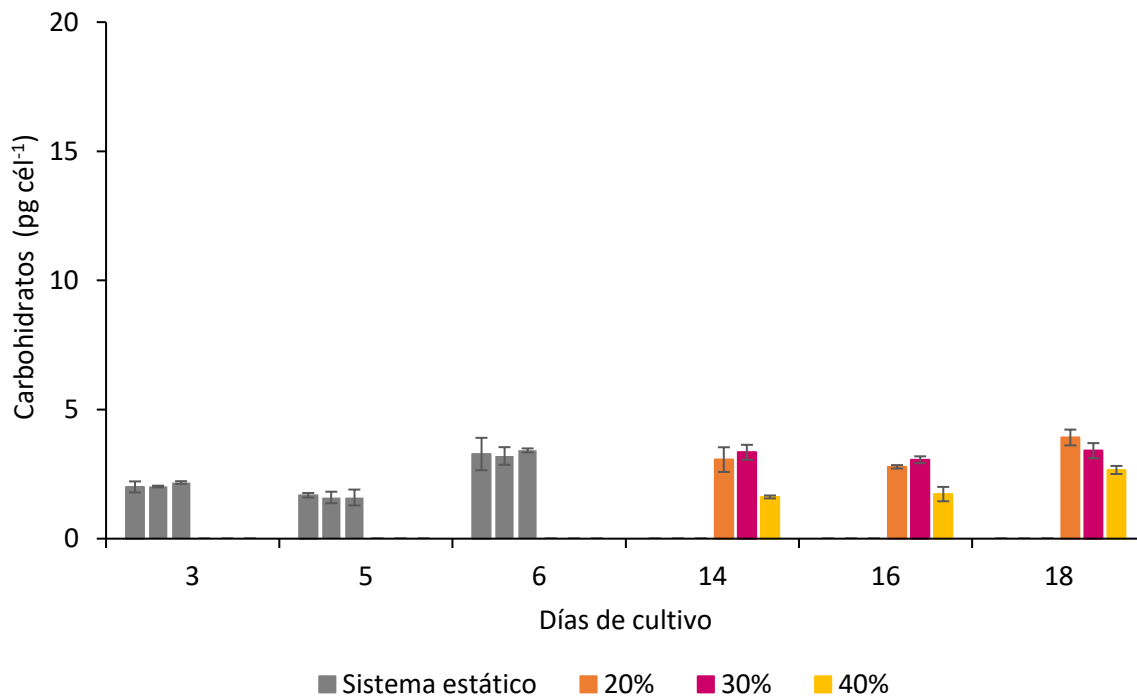
**Figura 12.** Contenido de lípidos de *Thalassiosira weissflogii* en sistema estático y semicontinuo (20, 30 y 40% de dilución).

### 3.2.3 Cuantificación de carbohidratos

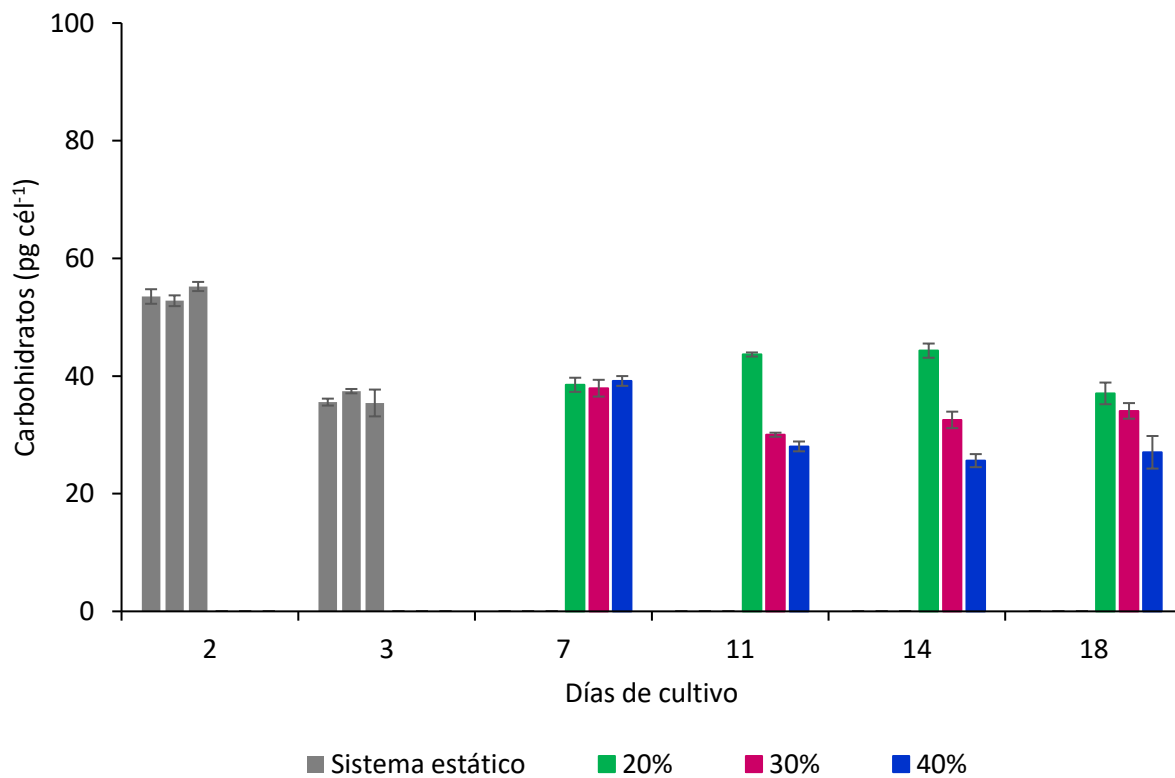
El mayor contenido de carbohidratos de *P. tricornutum* (Figura 13) en el sistema estático se registró al día seis de cultivo, con una concentración de  $3.3 \pm 0.6$  pg cél<sup>-1</sup>. Durante el sistema semicontinuo, el contenido de carbohidratos no mostró una tendencia clara. A lo largo del cultivo semicontinuo el contenido de carbohidratos fue distinto entre tratamientos, siendo menor en el del 40% ( $p < 0.05$ ), además, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), entre los días 16 ( $2.5 \pm 0.6$  pg cél<sup>-1</sup>) y 18 de cultivo ( $3.3 \pm 0.6$  pg cél<sup>-1</sup>), siendo este último el que registró mayores concentraciones de carbohidratos. (Anexo A).

Respecto *T. weissflogii*, el contenido de carbohidratos disminuyó en el sistema estático (Figura 14), pasando de  $53.8 \pm 1.8$  pg cél<sup>-1</sup> durante el segundo día de cultivo a  $36.1$  pg cél<sup>-1</sup> durante el día tres ( $p < 0.05$ ). El sistema semicontinuo inició con un promedio de  $36.1 \pm 2.2$  pg cél<sup>-1</sup>, el mayor contenido de carbohidratos se obtuvo con la tasa de dilución del 20% en los días del 11 al 18 ( $p < 0.05$ ) (Anexo B).





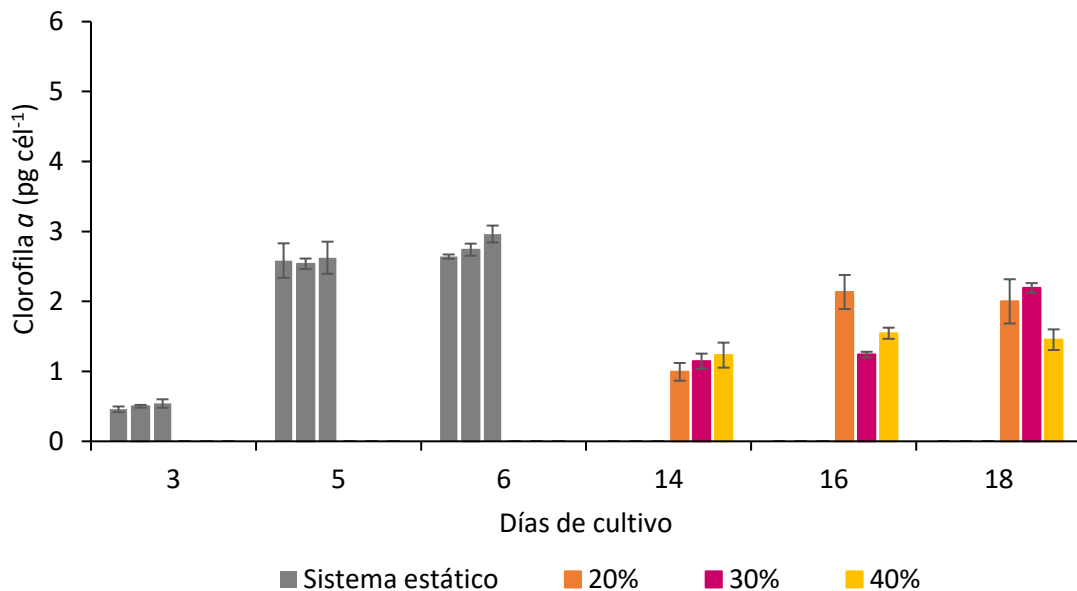
**Figura 13.** Contenido de carbohidratos de *Phaeodactylum tricornutum* en sistema estático y semicontinuo 20, 30 y 40% de dilución).



**Figura 14.** Contenido de carbohidratos de *Thalassiosira weissflogii* en sistema estático y semicontinuo (20, 30 y 40% de dilución).

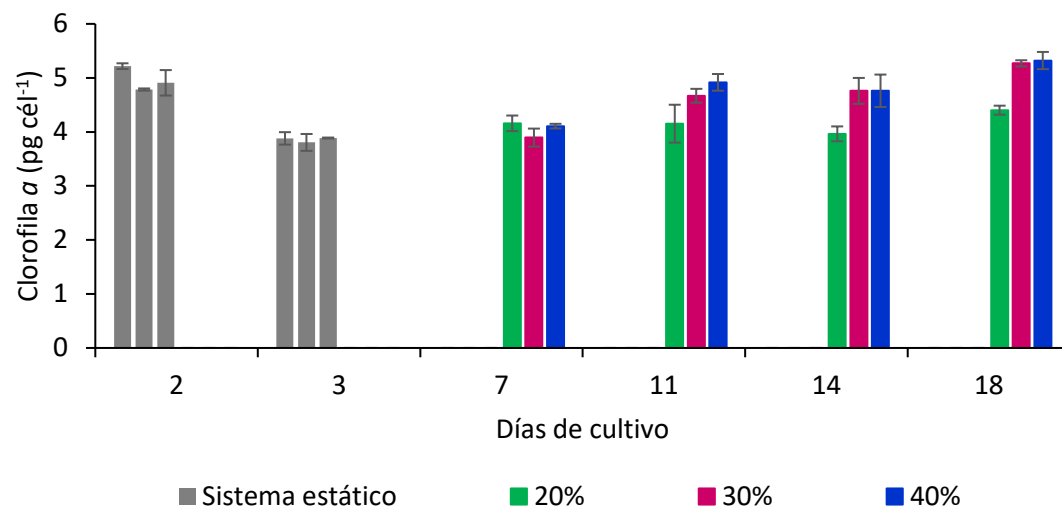
### 3.2.4 Cuantificación de pigmentos (Clorofila *a*)

La concentración de clorofila *a* aumentó durante el cultivo estático de *P. tricornutum* en las tres tasas de dilución (Figura 15), los valores mínimos ( $0.4 \pm 0.1 \text{ pg cél}^{-1}$ ) se registraron durante el día tres de cultivo y aumentaron durante los días cinco y seis ( $p < 0.01$ ), iniciando el sistema semicontinuo con concentraciones de  $2.7 \pm 0.2 \text{ pg cél}^{-1}$  (Anexo A). No se encontraron diferencias significativas en el contenido de clorofila *a* ( $p > 0.01$ ) entre las tres tasas de dilución durante el día 14. No obstante, en el día 16 se observó un aumento en el tratamiento del 20% con un valor similar al obtenido en el día 18 ( $p > 0.01$ ) con una concentración de  $2.0 \pm 0.4 \text{ pg cél}^{-1}$ . Por otro lado, en el tratamiento del 30%, el contenido de clorofila *a* se mantuvo constante durante los días 14 y 16 ( $1.1 \pm 0.5 \text{ pg cél}^{-1}$ ) y aumentó significativamente durante el día 18, alcanzando  $2.1 \pm 0.1 \text{ pg cél}^{-1}$  ( $p > 0.01$ ). Finalmente, el contenido de clorofila *a* del tratamiento del 40% se mantuvo constante hasta el final del cultivo ( $1.4 \pm 0.02 \text{ pg cél}^{-1}$ ).



**Figura 15.** Contenido de clorofila *a* de *Phaeodactylum tricornutum* en sistema estático y semicontinuo (20, 30 y 40% de dilución).

De forma contraria a *P. tricornutum*, en *T. weissflogii* el contenido de clorofila *a* disminuyó durante el cultivo estático (Figura 16), el mayor contenido de clorofila *a* se registró al día dos de cultivo, con una concentración de  $4.9 \pm 0.1 \text{ pg cél}^{-1}$ . El sistema semicontinuo inició en el día tres con una concentración de  $3.8 \pm 0.1 \text{ pg cél}^{-1}$ . A partir del día 11, el contenido de clorofila *a* aumentó en los tratamientos del 30 y 40% y en estos tratamientos se mantuvo constante hasta el final del cultivo ( $4.7 \pm 0.5 \text{ pg cél}^{-1}$ ) (Anexo B).



**Figura 16.** Contenido de clorofila *a* de *Thalassiosira weissflogii* en sistema estático y semicontinuo (20, 30 y 40% de dilución).

## Capítulo 4.      Discusión

---

En el crecimiento de las microalgas influyen tanto el método de cultivo, así la temperatura, la intensidad de luz, el tipo y cantidad de nutrientes, entre otros, las cuales pueden incidir en su composición bioquímica (Brown *et al.*, 1989; Chen y Gao, 2021). Abalde *et al.* (1995), menciona que además de estos factores, el rendimiento de los cultivos también depende de la concentración celular, por lo que es necesario un inóculo de un tamaño mínimo adecuado, para que los cultivos puedan desarrollar su máximo potencial de crecimiento. En el transcurso de este trabajo, las condiciones de cultivo como temperatura, intensidad de luz y pH de las microalgas *P. tricornutum* y *T. weissflogii* se mantuvieron en condiciones óptimas, dentro del intervalo recomendado para estas especies, por lo que se considera que estas no tuvieron una influencia directa en los resultados obtenidos.

Las microalgas se caracterizan por ser un grupo con una gran variedad de formas y tamaños; en este trabajo se observó una diferencia respecto al número de células obtenidos en *P. tricornutum* y *T. weissflogii*, lo que puede ser debido en gran parte al tamaño celular de cada especie de diatomea, como lo ha mencionado Agusti *et al.* (1987). Por ejemplo, Janta *et al.* (2012) encontraron que, a pesar de obtener altas densidades celulares en el cultivo de *Chlorella* sp. y *Nannochloropsis limnetica*, el peso seco de ambas microalgas era menor en comparación de otras especies de microalgas que cultivaron, mencionando que, el tamaño celular es un factor importante en la producción de la biomasa. Además, en condiciones óptimas, las microalgas con tamaños mayores tendrán una menor biomasa y densidad celular en comparación con las microalgas de tamaños pequeños, esta dependencia parece ser atribuida al autosombreado de las mismas microalgas, lo que limitaría la penetración de luz en el cultivo (Agusti *et al.*, 1987).

Como se ha reportado para otras especies, la densidad celular de los cultivos semicontinuos de *P. tricornutum* y *T. weissflogii* disminuyen al incrementar las tasas de dilución; la densidad celular de *T. weissflogii* también depende fuertemente del nivel de escalamiento y del sistema de cultivo (Fábregas *et al.*, 1996; Otero *et al.*, 1997 y Tam *et al.*, 2021).

Con respecto a *P. tricornutum*, la fase de crecimiento exponencial inició al segundo día de cultivo con  $1.1 \text{ div día}^{-1}$  y se mantuvo así hasta el día cinco; resultados similares fueron reportados por Kaixian y Borowitzka (1992) para esta especie en un cultivo estático y Marti (1982), menciona que es raro que *P. tricornutum* entre en una fase de latencia, por lo que la fase de crecimiento exponencial casi siempre inicia

al agregar el inóculo al cultivo. López-Elías y Voltolina (1993) mencionan que los cultivos semicontinuos de esta microalga en porcentajes altos de dilución (50, 60 y 75%), se mantienen estables por no más de siete días debido a la alta división celular, provocando el decaimiento del cultivo, con la consecuente precipitación de la biomasa. En este trabajo, la densidad celular de *P. tricornutum*, a pesar de que disminuyó al iniciar las diluciones en los tres tratamientos (20, 30 y 40%), se estabilizó a partir del día 10 y permaneció estable hasta el final del cultivo.

Por otro lado, se observaron variaciones en la densidad celular de *T. weissflogii* en los primeros días del cultivo semicontinuo, lo cual se puede atribuir a que las microalgas se estaban adaptando al nuevo sistema de cultivo. Botte *et al.* (2018), compararon la composición bioquímica de esta microalga en dos cultivos semicontinuos y demostraron que los nutrientes son un elemento importante en la productividad de la biomasa.

Los valores de densidad celular obtenidos en los primeros días de cultivo con las tres tasas de dilución de *T. weissflogii* fueron similares a los encontrados por Peraza-Yee *et al.* (2022), quienes la cultivaron en un sistema semicontinuo con una tasa de dilución del 30%; los autores reportaron alrededor de 200,000 cél mL<sup>-1</sup> y, al igual que en este trabajo, la densidad celular se mantuvo estable, para las tres tasas de dilución, en los primeros días del sistema semicontinuo. Por otro lado, Tam *et al.* (2021) reportan para esta microalga, en cultivos a diferentes niveles de escalamiento y en distintas condiciones de cultivo a las utilizadas en este trabajo, densidades celulares, de 500x10<sup>3</sup> cél mL<sup>-1</sup>, al día seis de cultivo mientras que en este trabajo estas biomásas se obtuvieron al día cinco para las tres tasas de dilución; los autores mencionan que, *T. weissflogii* puede alcanzar densidades celulares de hasta 800x10<sup>4</sup> cél mL<sup>-1</sup>; no obstante, como se mencionó anteriormente, la densidad celular puede variar dependiendo de las condiciones de cultivo.

El peso seco total y orgánico de las dos especies de microalgas (*P. tricornutum* y *T. weissflogii*) mostraron una tendencia a disminuir en el cultivo estático. Sin embargo, al iniciar las diluciones los pesos aumentaron en el caso de *P. tricornutum*, mientras que en *T. weissflogii* se mantuvieron estables a lo largo del cultivo semicontinuo. La disminución del peso se debió a la disminución del tamaño de las microalgas, lo cual puede atribuirse a la limitación de nutrientes (nitrógeno), debido probablemente a una menor absorción de luz (Stramski *et al.*, 2002; Peter y Sommer, 2015). Probablemente hubo una limitación de nutrientes en los cultivos estáticos de ambas especies de microalgas y estos se recuperaron al iniciar los sistemas semicontinuos, lo anterior se pudo observar claramente en la densidad celular de *T. weissflogii*, ya que esta aumentó al iniciar las diluciones.

Como se mencionó anteriormente, la temperatura influye en la producción de biomasa de las microalgas, Liu *et al.* (2011) y García *et al.* (2012) cultivaron *T. weissflogii* a 18 y 20°C, y obtuvieron menores pesos a los obtenidos en este trabajo, tanto en el cultivo estático como en el semicontinuo, los cuales fueron mantenidos a 25 °C, de cinco a siete grados de diferencia con los autores mencionados. Otros autores (Hernández-Sandoval *et al.*, 2022; Ortega-Salas y Flores-Nava, 2017), obtuvieron pesos comparables a los obtenidos en este trabajo bajo condiciones de temperatura similares a las de este estudio. Stramski *et al.* (2002) ya habían reportado diferencias respecto al tamaño celular en el caso de *T. pseudonana*, la cual alcanzó su talla mínima a 7°C, mientras que al ser cultivada a 25°C obtuvo un mayor tamaño celular.

El valor para la acuicultura de una especie de microalga está relacionado con su composición bioquímica, por lo que un mejor conocimiento del perfil bioquímico permite una mejor manipulación y mayor productividad de la especie en cultivo (Fábregas *et al.*, 1995). En este trabajo el mayor contenido de macromoléculas de los cultivos semicontinuos de *P. tricornutum* y *T. weissflogii* fueron proteínas, seguido de lípidos y por último carbohidratos y una pequeña fracción de pigmentos. Fernández-Reiriz *et al.* (1989) analizaron la composición bioquímica de *P. tricornutum* en cultivos estático y semicontinuo y encontraron que el contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos disminuyeron drásticamente al iniciar las diluciones. La diferencia de resultados se puede deber a que el cultivo semicontinuo de este trabajo inició al día 6 (crecimiento lento) y el de los autores alrededor del día 12, por lo que puede ser que sus cultivos de microalgas se encontraban en distintas fases de crecimiento. Si bien estos autores no mencionan en qué fase se encontraban sus cultivos, es probable que la microalga estuviera en la fase estacionaria antes de que iniciara el sistema semicontinuo, por lo que tal vez estarían limitados de nutrientes. Fábregas *et al.* (1995 y 1996) reportaron diferencias en el perfil bioquímico de *P. tricornutum* en un sistema semicontinuo, con tasas de dilución del 10, 20, 30, 40 y 50% y con distintas concentraciones de nitrógeno y observaron un aumento en el contenido de proteínas conforme aumentaron las tasas de dilución y una disminución del contenido de lípidos. En este trabajo se observó que la concentración de proteínas y lípidos se mantuvieron relativamente estables en las diferentes tasas de dilución, pero con un aumento de proteínas en el último día de cultivo, es probable que las diferencias en la composición bioquímica de *P. tricornutum* reportadas por los autores se deba a que utilizaron una mayor concentración de nitrógeno (1 mmol L<sup>-1</sup>) en comparación de los 0.88 mmoles utilizados en este estudio. La concentración de proteínas y lípidos que se obtuvieron en este trabajo, en el sistema semicontinuo y con luz continua, (8.04 y 7.53 pg cél<sup>-1</sup> respectivamente) fueron mayores a las reportadas por Fábregas *et al.* (1996), quienes reportaron valores de 4.46 a 5.04 pg cél<sup>-1</sup> para proteínas y 3.45 a 2.57 pg cél<sup>-1</sup> para lípidos con diferentes tasas de dilución. Estas diferencias podrían estar relacionadas con el volumen del cultivo y la intensidad de luz ya que los autores realizaron los cultivos en tubos de 80 mL y con periodos de luz y oscuridad. Kaixian y Borowitzka

(1992) reportaron mejores resultados respecto al crecimiento y la composición bioquímica de *P. tricornutum* cultivada en luz continua. Además, Abalde *et al.* (1995), menciona que la cantidad de proteínas varía dependiendo el método utilizado para su cuantificación, por lo que algunos datos encontrados en la literatura podrían estar sobreestimados, al tomar en cuenta una fracción de nitrógeno no proteico como ácidos nucleicos, péptidos, aminoácidos y pigmentos.

El contenido de proteínas de *T. weissflogii* en un cultivo estático varía según las condiciones de cultivo y la fase en que es cosechada, por ejemplo, Hernández-Sandoval *et al.* (2022) cultivaron esta microalga en un cultivo estático y con distintas concentraciones de nitrógeno y observaron que, en la mayoría de los casos, la concentración de proteínas disminuyó y los lípidos aumentaron a través del tiempo; no obstante, en este trabajo, la concentración de proteínas y lípidos se mantuvieron estables durante el cultivo semicontinuo en las diferentes tasas de dilución (20, 30 y 40%).

El contenido de carbohidratos también varía dependiendo de las fases de crecimiento de las microalgas, asimismo, se ha reportado que el método analítico que se utilice para su análisis también influye en su cuantificación, por lo que las diferencias reportadas por los diferentes autores hacen difícil la comparación de las especies bajo las mismas condiciones de cultivo (Tibbetts *et al.*, 2015). En este trabajo se encontraron variaciones en el contenido de carbohidratos de *P. tricornutum* y *T. weissflogii* en las distintas tasas de dilución. No obstante, al igual que Fábregas *et al.* (1996), la tendencia observada en ambos trabajos es que el contenido de carbohidratos en un cultivo semicontinuo disminuya al aumentar las tasas de dilución. Fidalgo *et al.* (1995), mencionan que el contenido de lípidos y carbohidratos de *P. tricornutum* en un cultivo estático aumenta en la fase estacionaria de crecimiento, el autor menciona que, en esta especie, los carbohidratos son los productos primarios de reserva, no obstante, los lípidos pueden llegar a serlo cuando hay un largo periodo de limitación de nutrientes (Fidalgo *et al.*, 1995).

En el cultivo estático y en las diferentes tasas de dilución del sistema semicontinuo de *T. weissflogii* se observó que el contenido de proteínas fue superior a la concentración de lípidos, resultados similares fueron reportados por Vásquez-Suárez *et al.* (2013) para *T. pseudonana*, en un cultivo semicontinuo bajo distintos niveles de irradiancia y obtuvieron una mayor concentración de proteínas y una menor cantidad de lípidos, lo cual se puede deber al rápido crecimiento celular (Branco-Vieira *et al.*, 2018).

Las clorofilas son el principal grupo fotosintético de todas las algas, siendo la clorofila *a* el pigmento predominante en las diatomeas, el cual juega un papel importante en la conversión de la energía fotoquímica en la mayoría de los organismos fotosintéticos (Kuczynska *et al.* 2015). El contenido de

clorofila en las diatomeas sigue una tendencia similar a la producción de biomasa ya que este pigmento depende de la concentración de nutrientes (Hernández-Sandoval *et al.* 2022; Saxena *et al.* 2022). En este trabajo no se encontraron diferencias significativas en el contenido de clorofila *a*, en ambas especies de microalgas, entre las tres tasas de dilución. Fidalgo *et al.* 1995 reportaron para *P. tricornutum* una mayor concentración de clorofila *a* (0.52 a 0.61 pg cél<sup>-1</sup>) durante la fase de crecimiento exponencial y las menores en la fase de crecimiento estacionaria (0.21-0.22 pg cél<sup>-1</sup>), estas concentraciones fueron similares a las reportadas en esta investigación. Por otro lado, la concentración de clorofila *a* para *T. weissflogii* fue mayor a lo reportado por Vásquez-Suárez y colaboradores en el 2013 para *T. pseudonana*.



## Capítulo 5. Conclusiones

---

En general, las tres tasas de dilución (20, 30, 40%) evaluadas en el sistema semicontinuo de *P. tricornutum* mostraron resultados similares en la producción de biomasa (densidad celular) y en la calidad de ésta (contenido de proteínas, carbohidratos y clorofila *a*). Por lo cual se recomienda la tasa de dilución del 20% debido a que se utilizan menos nutrientes. La tasa de dilución del 30% mostró los mejores resultados en la producción de lípidos, por lo tanto, se sugiere su uso si el objetivo es la producción de este compuesto. Respecto a *T. weissflogii*, la tasa de dilución del 20% resultó la mejor para la producción de biomasa, además de que esta obtuvo un buen contenido de proteínas y una mayor concentración de lípidos y carbohidratos. Se recomienda utilizar el sistema de cultivo semicontinuo para la producción de microalgas ya que en este sistema se puede mantener la calidad y cantidad de la biomasa por un largo periodo de tiempo.

## Literatura citada

---

- Abalde, J., Cid, A., Fidalgo, J. P., Torres, E. & Herrero, C. (1995). Microalgas: cultivo y aplicaciones. Universidade Da Coruña.
- Agusti, S., Duarte, C. M., & Kalff, J. (1987). Algal cell size and the maximum density and biomass of phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 32(4), 983–986. <https://doi.org/10.4319/lo.1987.32.4.0983>
- Ahmad, R., Vijay, D., Policarpo, F. & Redhman, K. (2022). Plant and algae biomass: feasible sources for biofuel production. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-94074-4>
- Arredondo-Vega, B. O., Voltolina, D. & Cordero-Esquivel, B. (2017). Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. In B.O. Arredondo-Vega, D. Voltolina, T. Zenteno-Savín, M. Arce-Montoya y G. A. Gómez-Anduro (Eds.), *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal* (2<sup>nd</sup> ed.) (pp. 21-29). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Barsanti, L. & Gualtieri, P. (2014). *Algae: anatomy, biochemistry and biotechnology* (2<sup>nd</sup> ed.). CRC Press, Pisa.
- Branco-Vieira, M., San Martin, S., Agurto, C., Freitas, M. A. V., Mata, T. M., Martins, A. A. & Caetano, N. (2018). Biochemical characterization of *Phaeodactylum tricorutum* for microalgae-based biorefinery. *Energy Procedia*, 153(1), 466-470. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2018.10.079>
- Becker, E. W. (1994). *Biotechnology and microbiology*. Cambridge University Press. New York.
- Becker, E. W. (2013). Microalgae for human and animal nutrition. In A. Richmond & Q. Hu (Eds.), *Handbook of microalgal culture applied phycology and biotechnology* (pp. 461-503). Jhon Wiley & Sons.
- Bitaubé, E., Caro, I. & Pérez, L. (2008). Kinetic model for growth of *Phaeodactylum tricorutum* in intensive culture photobioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 40(3), 520-525. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.02.007>
- Bligh, E. G. & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37 (8), 911-917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Botte, P., D'Ippolito, G., Gallo, C., Sardo, A. & Fontana, A. (2018). Combined exploitation of CO<sub>2</sub> and nutrient replenishment for increasing biomass and lipid productivity of the marine diatoms *Thalassiosira weissflogii* and *Cyclotella cryptica*. *Journal of Applied Phycology*, 30(1), 243-251. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1221-4>
- Borowitzka, M. A. (1997). Microalgae for aquaculture: opportunities and constraints. *Journal of Applied Phycology*, 9(5), 393-401. <https://doi.org/10.1023/A:1007921728300>
- Borowitzka, M. A. (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, and fermenters. *Journal of Biotechnology*, 70 (1-3), 313-312. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00083-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00083-8)
- Brown, M. R., Jeffrey, S. W. & Garland, C. D. (1989). Nutritional aspects of microalgae used in mariculture: a literature review. [Informe técnico N.º 205]. CSIRO Marine Laboratories.

- Brown, M. R., Garland, C. D., Jeffrey, S. W., Jameson, I. D. & Leroi, J. M. (1993). The gross and amino acid compositions of batch and semi-continuous cultures of *Isochrysis* sp. (clone T.ISO), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. *Journal of Applied Phycology*, 5(3), 285-296. <https://doi.org/10.1007/BF02186231>
- Brown, M. R. (2002). Nutritional value of microalgae for aquaculture. *Memorias del VI Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*. Cancún, Quintana Roo, México. *Avances en Nutrición Acuícola VI*, 281-292.
- Brown, M. R. & Blackburn, S. I. (2013). Live microalgae as feeds in aquaculture hatcheries. In G. Allan y G. Burnell (Eds.), *Advances in aquaculture hatchery technology* (pp. 117-156). Woodhead Publishing Limited.
- Cequier-Sánchez, E., Rodríguez, C., Ravelo, A. G. & Zárate, R. (2008). Dichloromethane as a solvent for lipid extraction and assessment of lipid classes and fatty acids from samples of different natures. *Journal of agricultural and food chemistry*. 56, 4297-4303. <https://doi.org/10.1021/jf073471e>
- Cerón, A. N. (2000). Evaluación de tres mezclas bialgales sobre el crecimiento de la almeja mano de león *Lyropecten (Nodipecten) subnodosus* [Tesis de maestría]. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B. C.
- Chen, S. & Gao, K. (2021). Microalgae continuous and semi-continuous cultures. In K. Gao, D. A. Hutchins y J. Beardall (Eds.), *Research methods of environmental physiology in aquatic sciences* (pp. 39-46). Springer.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350 – 356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Emmerson, W. D. (1980). Ingestion, growth and development of *Penaeus indicus* larvae as a function of *Thalassiosira weissflogii* cell concentration. *Marine Biology*, 58(1), 65-73. <https://doi.org/10.1007/BF00386881>
- Epifanio, C. E., Valenti, C. C. & Turk, C. L. (1981). A comparison of *Phaeodactylum tricornutum* and *Thalassiosira pseudonana* as foods for the oyster, *Crassostrea virginica*. *Aquaculture*, 23(1-4), 347-353. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(81\)90027-2](https://doi.org/10.1016/0044-8486(81)90027-2)
- Fábregas, J., Patiño, M., Arredondo-Vega, B. O., Tobar, J. L. & Otero, A. (1995). Renewal rate and nutrient concentration as tools to modify productivity and biochemical composition of cyclostat cultures of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44(1), 287-292. <https://doi.org/10.1007/BF00169918>
- Fábregas, J., Patiño, M., Morales, E.D., Cordero, B. & 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. <https://doi.org/10.1128/aem.62.1.266-268.1996>
- Fábregas, J., Otero, A., Morales, E. D., Arredondo-Vega, B. O. & Patiño, M. (1998). Modification of the nutritive value of *Phaeodactylum tricornutum* for *Artemia* sp. in semicontinuous cultures. *Aquaculture*, 169(3-4), 167-176. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00376-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00376-7)

- FAO (Food and Agriculture Organization). (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura.
- Fernández-Reiriz, M. J., Perez-Camacho, A., Ferreiro, M. J., Blanco, J., Planas, M., Campos, M. J., & Labarta, U. (1989). Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture*, 83(1-2), 17–37. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(89\)90057-4](https://doi.org/10.1016/0044-8486(89)90057-4)
- Fidalgo, J. P., Cid, A., Abalde, J. & Herrero, C. (1995). Culture of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* with different nitrogen sources: growth, nutrient conversion and biochemical composition. *Cah Biología Marina*, 36(3), 165-173.
- García, N., López-Elías, J. A., Miranda, A., Martínez-Pórchas, M., Huerta, N. & García, A. (2012). Effect of salinity on growth and chemical composition of the diatom *Thalassiosira weissflogii* at three culture phases. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 40(2), 435-440. <https://doi.org/10.3856/vol40-issue2-fulltext-18>
- Guedes, A. C., Sousa-Pinto, I. & Malcata, F. X. (2015). Application of microalgae protein to aquafeed. In S. K. Kim (Ed.), *Handbook of marine microalgae: biotechnology advances* (pp. 93-126). Academic Press.
- Guillard, R. R. L. (1973). Division rates. In J. R. Stein (Ed.), *Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements* (pp. 289-311). Cambridge University Press.
- Guillard, R. R. L. (1983). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In C. J. Berg (Ed.), *Culture of marine invertebrate animals* (pp. 29- 60). Springer.
- Graham, L. E. & Wilcox, L. W. (2000). *Algae*. Prentice Hall, Upper Saddle River.
- Hemerick, G. (1974). Culture methods and growth measurements. In J. R. Stein (Ed.), *Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements* (pp. 259-260). Cambridge University Press.
- Helem, M. M., Bourne, N. & Lovatelli, A. (2006). Cultivo de bivalvos en criadero: un manual práctico. [Informe técnico N° 471]. FAO (Food and Agriculture Organization). <https://www.fao.org/publications/card/fr/c/25d8a072-a030-5893-9aec-d3735c30570a/>
- Hernández-Sandoval, F.E., Del Ángel-Rodríguez, J.A., Núñez-Vázquez, E.J., Band-Schmidt, C.J., Arredondo-Vega, B.O., Campa-Córdova, Á.I., Moreno-Legorreta, M., Fernández-Herrera, L. J. & López-Cortés, D.J. (2022). Effects on cell growth, lipid and biochemical composition of *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae) cultured under two nitrogen sources. *Applied Sciences*, 12(3), 961. <https://doi.org/10.3390/app12030961>
- Janta, K., Pekkoh, J., Tongsiri, S., Pumas, C. & Peerapornpisal, Y. (2012). Selection of some native microalgal strains for possibility of bio-oil production in thailand. *Chiang Mai Journal of Science*, 40(5), 593-602.
- Johansen, J. R., & Theriot, E. (1987). The relationship between valve diameter and number of central fultoportulae in *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 23(4), 663-665. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1987.tb04221.x>

- Kaixian, Q. & Borowitzka, M., A. (1992). Light and nitrogen deficiency effects on the growth and composition of *Phaeodactylum tricornerum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 38(1-2), 93-103. <https://doi.org/10.1007/BF02916415>
- Kiatmetha, P., Siangdang, W., Bunnag, B., Senapin, S. & Withyachumnarnkul, B. (2011). Enhancement of survival and metamorphosis rates of *Penaeus monodon* larvae by feeding with the diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Aquaculture International*, 19(4), 599-609. <https://doi.org/10.1007/s10499-010-9375-y>
- Khozin-Goldber, I., Solovchenko, D. P., Cohen, Z. & Boussiba, S. (2014). Omega-3 LC-PUFA from photosynthetic microalgae: studies on *Parietochloris incisa* and *Nannochloropsis* sp. In A. Catalá (Ed.), *Polyunsaturated fatty acids sources, antioxidant properties and health benefits* (pp. 1-22). Nova Science Publishers, New York.
- Kociolek, J. P., Theriot, E. C., Williams, D. M., Julius, M., Stoermer, E. F. & Kingston, J. C. (2015). Centric and araphid diatoms. *Freshwater algae of North America*. In J. D. Wehr, J. P. Kociolek & R.G. Sheath (Eds.), *Freshwater algae of North America* (pp. 653-708). Academic Press.
- Kuczynska, P., Jemiola-Rzeminska, M. & Strzalka, K. (2015). Photosynthetic pigments in diatoms. *Marine Drugs*, 13(9), 5847-5881. <https://doi.org/10.3390/md13095847>
- Lee, E., Jalalizadeh, M. & Zhang, Q. (2015). Growth kinetic models for microalgae cultivation: a review. *Algal Research*, 12(1), 497-512. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.10.004>
- Li, W. K. W. (1984). A modified logistic growth equation: effects of cadmium chloride on the diatom, *Thalassiosira weissflogii* and the dinoflagellate, *Amphidinium carteri* in unialgal and bialgal batch cultures. *Aquatic Toxicology*, 5(4), 307-313. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(84\)90011-0](https://doi.org/10.1016/0166-445X(84)90011-0)
- Liu, S., Gou, Z., Li, T., Huang, H. & Lin, S. (2011). Photosynthetic efficiency, cell volume, and elemental stoichiometric ratios in *Thalassiosira weissflogii* under phosphorus limitation. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 29(5), 1048-1056. <https://doi.org/10.1007/s00343-011-0224-2>
- Lichtenthaler, H. K. & Buschmann, C. (2001). Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, F 4.3.1-F4.3.8. <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0403s01>
- López-Elías, J. A. & Voltolina, D. (1993). Cultivos semicontinuos de cuatro especies de microalgas con un medio no convencional. *Ciencias Marinas*, 19(2), 169-180. <http://dx.doi.org/10.7773/cm.v19i2.930>
- Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biology Chemistry*, 193 (1), 265 – 275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Marti, V. M. (1982). Estudio de los factores que afectan la asimilación y la excreción de *Phaeodactylum tricornerum* Bohlin en cultivos de volumen limitado. *Investigación Pesquera*, 46(1), 91-119.
- Martin-Jézéquel, V. & Tesson, B. (2012). *Phaeodactylum tricornerum* polymorphism: an overview. In K. Heimann y C. Katsaros (Eds.), *Advances in Algal Cell Biology* (pp. 43-80). De Gruyter.

- Markou, G., Angelidaki, I., & Georgakakis, D. (2012). Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. *Applied microbiology and biotechnology*, 96, 631-645. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4398-0>
- Markou, G. & Nerantzis E. (2013). Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions. *Applied microbiology and biotechnology*, 31(1), 1532-1423. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.07.011>
- Muller-Feuga, A. (2013). Microalgae for aquaculture: the current global situation and future trends. In A. Richmond & Q. Hu (Eds.), *Handbook of microalgal culture applied phycology and biotechnology* (pp.613-627). Jhon Wiley & Sons.
- Ortega-Salas, A. A. & Flores-Nava, P. (2017). Cultivation of the microalga *Thalassiosira weissflogii* to feed the rotifer *Brachionus rotundiformis*. *Journal of Aquaculture and Marine Biology*, 6(5), 11-12. <https://doi.org/10.15406/jamb.2017.06.00169>
- Otero, A., García, D. & Fábregas, J. (1997). Factors controlling eicosapentaenoic acid production in semicontinuous cultures of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 9(5), 465-469. <https://doi.org/10.1023/A:1007930804367>
- Pande, S. V., Khan, R. P. & Venkitasubramanian, T. A. (1963). Microdetermination of lipids and serum total fatty acids. *Analytical Biochemistry*, 6 (5), 415 - 423. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(63\)90094-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(63)90094-0)
- Peraza-Yee, M. M., Carranza-Díaz, O., Bermudes-Lizárraga, J. F., López-Peraza, D. J., Nieves-Soto, M. & Millán-Almaraz, M. I. (2022). The effect of major nutrients in five levels of a medium on growth and proximal composition of *Thalassiosira weissflogii*. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 50(1), 110-123. <https://doi.org/10.3856/vol50-issue1-fulltext-2749>
- Peter, K. H. & Sommer, U. (2015). Interactive effect of warming, nitrogen, and phosphorus limitation on phytoplankton cell size. *Ecology and Evolution*, 5(5), 1011-1024. <https://doi.org/10.1002/ece3.1241>
- 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(1), 237-251. <https://doi.org/10.1007/BF00008520>
- Renaud, S. M., Thinh, L. & Parry, D. L. (1999). The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical australian microalgae for possible use in mariculture. *Aquaculture*, 170(2), 147-159. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00399-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00399-8)
- Ribeiro, A. R., Goncalves, A., Barbeiro, M., Bandarra, N., Nunes, M. A., Carvalho, M. L., Silva, J., Navalho, J., Dinis, M. T., Silva, T. & Días, J. (2017). *Phaeodactylum tricorutum* in finishing diets for gilthead seabream: effects on skin pigmentation, sensory properties and nutritional value. *Journal of Applied Phycology*, 29(4), 1945-1956. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1125-3>
- Saxena, A., Mishra, B. & Tiwari, A. (2022). Mass cultivation of marine diatoms using local salts and its impact on growth and productivity. *Bioresource Technology*, 352(1), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127128>

- Sorokin, C. (1973). Dry weight, packed cell volume and optical density. En: J. R. Stein (Ed.), Handbook of phycolgical methods. Culture methods and growth measurement (pp. 322-343). Cambridge University Press, Cambridge.
- Stramski, D., Sciandra, A. & Claustre, H. (2002). Effects of temperature, nitrogen, and light limitation of the optical properties of the marine diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Limnology and Oceanography*, 47(2), 392-403. <https://doi.org/10.4319/lo.2002.47.2.0392>
- Tacon, A. G. J. (1989). Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados. [Manual de Capacitación. No. 4.] FAO (Food and Agriculture Organization).
- Tam, L. T., Van Cong, N., Thom, L. T., Ha, N. C., Hang, N. T. M., Van Minh, C., Vien, D. T & Hong, D. D. (2021). Cultivation and biomass production of the diatom *Thalassiosira weissflogii* as a live feed for white-leg shrimp in hatcheries and commercial farms in Vietnam. *Journal of Applied Phycology*, 33(3), 1559–1577. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02371-w>
- Tibbetts, S. M., Milley, J. E. & Lall, S. P. (2015). Chemical composition and nutritional properties of freshwater and marine microalgal biomass cultured in photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, 27(1), 1109-1119. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0428-x>
- Vásquez-Suárez, A., Guevara, M., González, M., Cortez, R. & Arredondo-Vega, B. (2013). Crecimiento y composición bioquímica de *Thalassiosira pseudonana* (Thalassiosirales: Thalassiosiraceae) bajo cultivo semi-continuo en diferentes medios y niveles de irradiancias. *Revista de Biología Tropical*, 61(3), 1003-1013. <https://doi.org/1003-1013>. <https://doi.org/10.15517/rbt.v61i3.11776>
- Wikfors, G. H., Ferris, G. E. & Smith, B. C. (1992). The relationship between gross biochemical composition of cultured algal food and growth of the clam, *Mercenaria mercenaria* (L.). *Aquaculture*, 108(1-2), 134-154. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(92\)90324-E](https://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90324-E)
- Whyte, J. N. C. (1987). Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture*, 60, 231 – 241. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(87\)90290-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90290-0)
- Yang, Y. H., Du, L., Hosokawa, Y., Arai, H. & Taroda, H. (2017). Fatty acid and lipid class composition of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Oleo Science*, 66(4), 363-368. <https://doi.org/10.5650/jos.ess16205>

## Anexos

---

### Anexo A. Resultados de los análisis estadísticos de los datos de *P. tricornutum*

```

Coefficients:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)  4369.4      175.2   24.942 <2e-16 ***
GrupoPT30   -641.8       247.8   -2.591  0.0107 *
GrupoPT40   -533.2       247.8   -2.152  0.0333 *
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

Figura 17. Resultados del ANOVA de la densidad celular de *P. tricornutum*.

	Numero_celulas	groups
PT20	4369.418	a
PT40	3836.168	ab
PT30	3727.597	b

Figura 18. Resultados de la prueba Tukey de la densidad celular de *P. tricornutum*.

```

Response: PSTU_pg_cel
          Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
Grupo      2   1736     868    8.1160 0.0012319 **
Dia        5 171191   34238  320.0550 < 2.2e-16 ***
Grupo:Dia 10   5450     545    5.0942 0.0001287 ***
Residuals 36   3851     107

```

Figura 19. Resultados de ANOVA de dos vías del PSTU de *P. tricornutum*

```

Response: PSOU_pg_cel
          Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
Grupo      2    15.0     7.49    1.5474    0.2266
Dia        5 10808.0  2161.60  446.3315 < 2.2e-16 ***
Grupo:Dia 10   378.2    37.82    7.8087 1.705e-06 ***
Residuals 36   174.3     4.84

```

Figura 20. Resultados de ANOVA de dos vías del POU de *P. tricornutum*



```

Response: Proteinas
      Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
Grupo  2   8.066   4.033   0.8269    0.4495
Dia    3 166.420  55.473 11.3738 7.788e-05 ***
Grupo:Dia 6  12.011   2.002   0.4104    0.8647
Residuals 24 117.055   4.877

```

**Figura 21.** Resultados de ANOVA de dos vías de la concentración de proteínas de *P. tricornutum*

```

Response: Lípidos
      Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
Grupo  2  16.470   8.235   7.0125  0.003997 **
Dia    3 160.376  53.459 45.5222 4.652e-10 ***
Grupo:Dia 6   5.360   0.893   0.7607  0.607657
Residuals 24  28.184   1.174

```

**Figura 22.** Resultados de ANOVA de dos vías de la concentración de lípidos de *P. tricornutum*

```

Response: CHOS
      Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
Grupo  2  6.4931   3.2466 11.4395 0.0003242 ***
Dia    3  4.7254   1.5751  5.5501 0.0048708 **
Grupo:Dia 6  4.0965   0.6827  2.4057 0.0580239 .
Residuals 24  6.8112   0.2838

```

**Figura 23.** Resultados de ANOVA de dos vías de la concentración de carbohidratos de *P. tricornutum*

```

Response: Ca
      Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
Grupo  2  0.1604   0.0802   1.1590  0.330758
Dia    3 12.9576   4.3192 62.4222 1.761e-11 ***
Grupo:Dia 6  2.2535   0.3756   5.4281  0.001148 **
Residuals 24  1.6606   0.0692

```

**Figura 24.** Resultados de ANOVA de dos vías de la concentración de clorofila *a* de *P. tricornutum*

## Anexo B. Resultados de los análisis estadísticos de los datos de *T. weissflogii*

```
.y.          n statistic    df      p method
<chr>      <int>    <dbl> <int>  <dbl> <chr>
Numero_celulas  162    52.3    2 4.46e-12 Kruskal-wallis
```

Figura 25. Resultados de la prueba Kruskal-Wallis de la densidad celular de *T. weissflogii*

```
* <chr>      <chr> <chr> <int> <int>    <dbl>    <dbl>    <dbl> <chr>
1 Numero_celulas Tw20 Tw30    54    54    -0.647 5.17e- 1 5.17e- 1 ns
2 Numero_celulas Tw20 Tw40    54    54    -6.56 5.39e-11 5.39e-11 ****
3 Numero_celulas Tw30 Tw40    54    54    -5.91 3.37e- 9 3.37e- 9 ****
```

Figura 26. Resultados de la prueba Dunn de la densidad celular de *T. weissflogii*

```
Response: PSTU_pg_cel
          Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
Grupo     2  48731  24366  18.2948 6.393e-06 ***
Dia       4 205921  51480  38.6538 1.973e-11 ***
Grupo:Dia 8  55108   6889   5.1722 0.0004117 ***
Residuals 30 39955   1332
```

Figura 27. Resultados de ANOVA de dos vías del PSTU de *T. weissflogii*

```
Response: PSOU_pg_cel
          Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
Grupo     2  27957 13978.4  53.029 1.416e-10 ***
Dia       4  17221  4305.2  16.332 3.317e-07 ***
Grupo:Dia 8  24757  3094.6  11.740 2.170e-07 ***
Residuals 30   7908   263.6
```

Figura 28. Resultados de ANOVA de dos vías del POU de *T. weissflogii*

```
Response: Proteínas
          Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
Grupo     2 1254.5   627.26  2.6550 0.0867681 .
Dia       4  7194.6  1798.64  7.6131 0.0002333 ***
Grupo:Dia 8  4080.2   510.03  2.1588 0.0607490 .
Residuals 30 7087.7   236.26
```

Figura 29. Resultados de ANOVA de dos vías de la concentración de proteínas de *T. weissflogii*

```

Response: Lipidos
      Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
Grupo  2  143.12   71.561  10.296 0.0003941 ***
Dia    4  288.98   72.245  10.394 2.102e-05 ***
Grupo:Dia 8 674.57   84.321  12.132 1.525e-07 ***
Residuals 30 208.52    6.951

```

**Figura 30.** Resultados de ANOVA de dos vías de la concentración de lípidos de *T. weissflogii*

```

Response: CHOS
      Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
Grupo  2  666.64   333.32  47.388 5.186e-10 ***
Dia    4  305.95    76.49  10.874 1.437e-05 ***
Grupo:Dia 8 721.25    90.16  12.818 8.373e-08 ***
Residuals 30 211.01     7.03

```

**Figura 31.** Resultados de ANOVA de dos vías de la concentración de carbohidratos de *T. weissflogii*

```

Response: Ca
      Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
Grupo  2  1.9858  0.99292  10.9376 0.0002707 ***
Dia    4  7.4228  1.85569  20.4415 3.239e-08 ***
Grupo:Dia 8 1.9945  0.24932   2.7464 0.0211059 *
Residuals 30 2.7234  0.09078

```

**Figura 32.** Resultados de ANOVA de dos vías de la concentración de clorofila *a* de *T. weissflogii*