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

Programa de Posgrado en Ciencias de la Vida con Orientación en Microbiología

Aislamiento y caracterización bioquímica de microalgas de Baja California como alternativas para la producción de lípidos

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

Presenta
Socorro Jiménez Valera

Ensenada, Baja California, México
2016

Tesis defendida por

Socorro Jiménez Valera

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Director del Comité

Dra. Elizabeth Ponce Rivas

Dra. Ernestina Castro Longoria

Dra. Ana Elena Escalante Hernández

Dr. Eugenio de Jesús Carpizo Ituarte

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Socorro Jiménez Valera © 2016
Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor

Resumen de la tesis, que presenta **Socorro Jiménez Valera** como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología

Aislamiento y caracterización bioquímica de microalgas de Baja California como alternativas para la producción de lípidos

Resumen aprobado por:

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Directora de Tesis

En México existe una gran diversidad de microalgas con enorme potencial de uso en áreas como la acuicultura, siendo importante realizar aislamiento de microalgas para obtener cultivos monoespecíficos y caracterizar su crecimiento y fisiología para su posterior aprovechamiento. El objetivo de esta investigación fue aislar especies de microalgas de la Península de Baja California para la producción de lípidos al ser mantenidas en distintas condiciones de cultivo. A partir de muestras de agua obtenidas en diversas localidades de la Península de Baja California, se aislaron 21 especies de microalgas. La localidad de Ensenada presentó el mayor número de especies de microalgas aisladas. El tamaño de las especies aisladas varió entre 0.75 µm a 193.13 µm. La mayor densidad celular de las especies evaluadas la obtuvo la cianofita *Aphanocapsa marina* (11.92 x 10^6 células ml^{-1}), y la mayor tasa de crecimiento fue obtenida por la cianofita *Komvophoron* sp. (2.98 divisiones $día^{-1}$).
La composición proximal fue diferente entre las distintas especies aisladas y entre las fases de crecimiento. El mayor contenido de lípidos fue obtenido por *Amphora* sp. (cepa 3) (57.7%), en la fase exponencial de crecimiento. Durante la fase estacionaria *Cymbella* sp. (cepa 2) mostró el mayor contenido de carbohidratos (47.5%) y de proteínas (39.5%). La composición de ácidos grasos de las 21 especies aisladas varió entre las diferentes clases taxonómicas, el grupo de las diatomeas obtuvo altos porcentajes de ácidos grasos polinsaturados (n-3 y n-6), los cuales variaron entre 23.4% a 60.7%.
Se realizó un ensayo de toxicidad con nauplios de *Artemia franciscana* utilizando el medio residual de las microalgas aisladas, y ninguna de las especies fue tóxica. Con base en los resultados de crecimiento y de composición bioquímica de las 21 especies aisladas, se eligieron a las especies *Aphanocapsa marina*, *Tetraselmis suecica*, *Heterococcus* sp. y *Navicula* sp. (cepa 3), para cultivarlas a diferentes condiciones de temperatura (20 y 25ºC), irradiancia (100 y 200 µE m^{-2} s^{-1}) y aporte de nitrógeno ($NaNO_3$ y NH_4NO_3) para evaluar la producción de lípidos. Fue *Aphanocapsa marina* cultivada con nitrato de sodio, a una temperatura de 20 ºC y a una irradiancia de 200 µE m^{-2} s^{-1} quien obtuvo el mayor crecimiento (0.57 divisiones $día^{-1}$) y *Tetraselmis suecica* obtuvo el mayor contenido de lípidos (17.6%). La mayor producción de ácidos grasos en las especies cultivadas fue a una temperatura de 25 ºC y una irradiancia de 100 µE m^{-2} s^{-1} y con aporte de nitrato de amonio. Los ácidos grasos 16:0, 16:1n-7cis y 20:5n-3 presentaron un alto contenido en las cuatro especies estudiadas y en todas las condiciones experimentales. Se realizó un bioensayo usando *Tetraselmis suecica* y *Navicula* sp. (cepa 3) para evaluarlas como alimento para cultivos de rotíferos (*Brachionus plicatilis*) y la mayor tasa de crecimiento, densidad de rotíferos y composición proximal fue obtenida al suministrar como alimento a la microalga

Abstract of the thesis presented by **Socorro Jiménez Valera** as a partial requirement to obtain the Doctor of Science degree in Life of Sciences with orientation in Microbiology

Isolation and biochemical characterization of microalgae of Baja California as alternatives for the production of lipids

Abstract approved by: Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Thesis director

In Mexico there is a great diversity of microalgae with great potential use in areas such as aquaculture, whereby it is very important to isolate microalgae species, to obtain monospecific cultures and characterize their growth and physiology for subsequent use. The objective of this research was to isolate microalgae species from the Peninsula of Baja California for the production of lipids on being maintained in different growing conditions. From water samples obtained at different sites in the Peninsula of Baja California, 21 species of microalgae were isolated. The locality of Ensenada showed the highest number of isolated microalgae species. The size of the isolated microalgae species varied between 0.75 µm to 193.13 µm. The highest cell density of all species evaluated was obtained from the cyanophyte *Aphanocapsa marina* (11.92 x 10^6 cells ml^{-1}), and the highest growth rate was obtained from the cyanophyte *Komvophoron* sp. (2.98 divisions day $^{-1}$).
The proximal composition was different among different species of isolated microalgae and between growth phases. The highest lipid content was obtained from *Amphora* sp. (strain 3) (57.7%), in the exponential phase of growth. During the growth stationary phase *Cymbella* sp. (strain 2) sp. obtained the highest carbohydrate content (47.5%) and protein (39.5%). The fatty acid composition of the 21 species isolated varied among the different taxonomic classes and the group of diatoms obtained high percentages of polyunsaturated fatty acids (n-3 and n-6) ranging from 23.4% to 60.7%. A toxicity test was performed using the residual medium of isolated microalgae and with *Artemia franciscana* nauplii, and none of the species was toxic.
Based on the results of growth and biochemical composition of the 21 species isolated, the species *Aphanocapsa marina*, *Tetraselmis suecica*, *Heterococcus* sp and *Navicula* sp. (strain 3), were chosen to be cultivated at different temperature conditions (20 y 25 ºC), irradiance (100 y 200 µE m^{-2} s^{-1}) and nitrogen input conditions ($NaNO_3$ and NH_4NO_3) to evaluate the lipid production. *Aphanocapsa marina* was cultivated with sodium nitrate, to a temperature of 20 ºC and an irradiance of 200 µE m^{-2} s^{-1}, which obtained the highest growth (0.57 divisions day $^{-1}$) and *Tetraselmis suecica* obtained the highest lipid content (17.6%). The highest fatty acids production in the four species cultivated was to a temperature of 25 ºC and irradiance of 100 µE m^{-2} s^{-1} and with an input of ammonium nitrate. Fatty acids 16:0, 16:1n-7cis and 20:5n-3 showed a high content in the four species and in all experimental conditions. A bioassay was performed using the species *Tetraselmis suecica* and *Navicula* sp. (strain 3) to be evaluated as food for cultures of rotifers (*Brachionus plicatilis*). The highest growth rate, rotifer density and proximal composition were obtained when given as food to the microalga *Tetraselmis suecica*.

Based in the results of growth and biochemical composition was concluded that all the isolated microalgae species have the potential to be used as food in aquaculture whether it be as a component of a mixed diet or as sole ingredient, being the specie *Tetraselmis suecica* the one with the highest lipid production of all the isolated species.

Keywords: Isolated, Growth, Proximal composition, Lipids, Fatty acids.

Dedicatoria

Con especial cariño y amor esta tesis se la dedico a mi madre María del Carmen Valera Soto por todo el apoyo que siempre me has brindado para cumplir mis metas.

A mis hermanos Sabina y Martín, y a sobrina Karla por no dejarme caer en los momentos más difíciles y por su apoyo incondicional.

A mi esposo Luis Erasmo Miranda por brindarme tu amor, así como por el apoyo, la paciencia y comprensión para que terminara mi tesis.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme una beca para realizar mis estudios de doctorado.

Al apoyo económico para la adquisición de materiales y reactivos para realizar la tesis fue de parte del proyecto de CICESE 623108, así como del proyecto de investigación financiado por SEP-CONACyT con clave de referencia 130074.

Se agradece el apoyo de una beca doctoral recibida de parte del proyecto de investigación SEP-CONACyT con clave de referencia 130074.

A mi directora de tesis Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra por su dirección académica durante mi trabajo de tesis, por apoyarme durante momentos difíciles y alentarme a seguir adelante, muchas gracias.

A los integrantes del comité de tesis Dra. Ernestina Castro Longoria, Dra. Elizabeth Ponce Rivas, Dra. Ana Elena Escalante Hernández, Dr. Eugenio de Jesús Carpizo Ituarte, por sus valiosas observaciones y comentarios académicos para la elaboración de esta tesis.

A la Dra. Rufina Hernández por su apoyo durante su período en la Coordinación del Posgrado en Ciencias de la Vida.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada por otorgarme una beca para finalizar la tesis y al Dr. Jesús Favela Vara por el apoyo económico recibido a través de la Dirección de Estudios de Posgrado durante su gestión.

Al Departamento de Microbiología del CICESE por aceptarme como alumna y por el apoyo brindado en el transcurso de mi doctorado.

Al Departamento Biotecnología del CICESE por permitime usar el equipo del laboratorio y en especial a la Dra. Edna Sánchez Castrejon por su tiempo y asesoramiento para el uso del equipo.

Al Departamento de Acuicultura del CICESE por permitirme usar las instalaciones y en especial al Dr. Juan Pablo Lazo por permitir que usara su laboratorio y el cromatógrafo de gases.

Al Dr. Rafael Vázquez Duhalt y a la Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno por sus asesorías en el uso del cromatógrafo de gases.

Al Dr. Conal David True por donarme los rotíferos usados en el ensayo de alimentación y al M. en C. Gerardo Sandoval por proporcionarme los organismos.

A la Dra. Ana Bertha Castro Ceseña por sus observaciones al primer manuscrito del artículo derivado de la tesis doctoral.

Al Dr. David Alfaro Siqueiros Beltrones por su ayuda en la identificación de una cepa de diatomea.

Al M. en C. Luis Erasmo Miranda Bojórquez por la elaboración del mapa de los sitios de muestreo.

Al Biol. Norberto Flores Acevedo por su ayuda en el trabajo de laboratorio y por sus consejos.

A mis compañeros de laboratorio Estrella, Ceres, Diana, Anely, Flor, Angyell, Carolina, Laura, Luis, Diego, Ruperto, Carlos, Duahmet por su ayuda tanto dentro y fuera del laboratorio y por brindarme su amistad.

A mis amigos Gisel, Diana, Getsemany, Marisol, Ana, Hayde, Gretel, Brenda, Karina, Noemi, Melba, Angy, Miriam, Claudia, Chayo, Ricardo, Eddy, por su apoyo moral y por brindarme su invaluable amistad.

A mi padre José Jiménez Murrieta por tus valiosos consejos.

Y a todas las personas que me apoyaron de forma directa o indirecta durante el doctorado y en la tesis, muchas gracias.

Tabla de Contenido

Resumen en español ii
Resumen en inglés iv
Dedicatoria vi
Agradecimientos vii
Lista de figuras xii
Lista de tablas xiv

1. Introducción 1
   1.1. Justificación 13

2. Hipótesis 15

3. Objetivos 16
   3.1. Objetivo general 16
   3.2. Objetivos específicos 16

4. Materiales y métodos 17
   4.1. Descripción de la zona de estudio 17
   4.2. Colecta de muestras 17
   4.3. Técnicas de aislamiento 20
      4.3.1. Diluciones seriadas 20
      4.3.2. Aislamiento con micropipeta 20
      4.3.3. Aislamiento en agar 21
   4.4. Caracterización taxonómica 21
   4.5. Mantenimiento de las cepas 22
   4.6. Ensayo preliminar del crecimiento de las especies aisladas 22
   4.7. Evaluación del crecimiento de cultivos monoespecíficos 23
      4.7.1. Condiciones de cultivo 23
   4.8. Evaluación de la composición bioquímica de los cultivos monoespecíficos 24
      4.8.1. Peso seco total, peso de las cenizas y peso seco orgánico 24
      4.8.2. Composición proximal 24
         4.8.2.1. Proteínas 25
         4.8.2.2. Carbohidratos 25
         4.8.2.3. Lípidos 25
      4.8.3. Perfiles de ácidos grasos 25
   4.9. Ensayo de toxicidad 26

4.9.1. Obtención de extractos acuosos 27
4.10. Efecto de distintas condiciones experimentales sobre la producción de lípidos: selección de cepas 28
4.10.1. Crecimiento 29
4.10.2. Composición proximal 29
4.10.3. Perfiles de ácidos grasos 29
4.10.4. Pigmentos 30
4.11. Ensayo de alimentación 30
4.11.1. Obtención del alimento 30
4.11.2. Cultivo de rotíferos 31
4.11.3. Composición proximal 33
4.11.4. Ensayo de sedimentación de *Navicula* sp. (cepa 3) 33
4.12. Tratamiento estadístico 34
4.12.1. Ensayo de crecimiento y composición bioquímica 34
4.12.2. Evaluación del crecimiento y composición bioquímica en distintas condiciones experimentales 35
4.12.3. Ensayo de alimentación 36
4.12.4. Ensayo de sedimentación de *Navicula* sp. (cepa 3) 36

5. Resultados 38
5.1. Aislamiento 38
5.2. Identificación de las especies aisladas 38
5.3. Ensayo preliminar de crecimiento de las especies aisladas 39
5.4. Crecimiento de cultivos monoespecíficos 49
5.5. Peso seco total, peso de las cenizas y peso seco orgánico 53
5.6. Composición proximal 56
5.7. Perfiles de ácidos grasos 58
5.8. Ensayo de toxicidad 63
5.9. Efecto de distintas condiciones experimentales 65
5.9.1. Crecimiento de las cuatro especies seleccionadas 65
5.9.1.1. *Tetraselmis suecica* 65
5.9.1.2. *Aphanocapsa marina* 66
5.9.1.3. *Heterococcus* sp. 66
5.9.1.4. *Navicula* sp. (cepa 3) 68
5.9.1.5. Comparación del crecimiento de las cuatro especies 69
5.9.2 Peso seco total, peso de las cenizas y peso seco orgánico 73
5.9.2.1. *Tetraselmis suecica* 73

5.9.2.2. *Aphanocapsa marina* 74
5.9.2.3. *Heterococcus* sp. 74
5.9.2.4. *Navicula* sp. (cepa 3) 75
5.9.2.5. Peso de las 4 especies 76
5.9.3. Composición proximal 79
5.9.3.1. *Tetraselmis suecica* 79
5.9.3.2. *Aphanocapsa marina* 79
V.9.3.3. *Heterococcus* sp. 80
5.9.3.4. *Navicula* sp. (cepa 3) 81
5.9.3.5. Comparación de la composición proximal de las cuatro especies 82
5.9.4. Perfiles de ácidos grasos 85
5.9.4.1. *Tetraselmis suecica* 85
5.9.4.2. *Aphanocapsa marina* 85
V.9.4.3. *Heterococcus* sp. 86
5.9.4.4. *Navicula* sp. (cepa 3) 87
5.9.4.5. Comparación de los ácidos grasos de las cuatro especies 88
5.9.5. Pigmentos 92
5.9.5.1. *Tetraselmis suecica* 92
5.9.5.2. *Aphanocapsa marina* 92
5.9.5.3. *Heterococcus* sp. 93
5.9.5.4. *Navicula* sp. (cepa 3) 94
5.9.5.5. Pigmentos entre de las 4 especies 95
5.10. Ensayo de alimentación 97
5.10.1. Crecimiento poblacional de los cultivos de rotíferos 98
5.10.2. Peso seco total, peso de cenizas y peso seco orgánico de los rotíferos 100
5.10.3. Composición proximal 101
5.10.4. Ensayo de sedimentación de *Navicula* sp. (cepa 3) 102

6. Discusión 104

7. Conclusiones 138

8. Recomendaciones 140

9. Literatura citada 141

10. Anexo 161

Lista de figuras

Figura		Página
1	Sitios de muestreo en Baja California (BC) y Baja California Sur (BCS)	19
2	Curvas de crecimiento de las especies *Aphanocapsa marina*, *Komvophoron* sp., *Phormidium* sp., *Tetraselmis suecica*, *Heterococcus* sp., *Amphora* sp. (cepa 1)	41
3	Curvas de crecimiento de las especies *Amphora* sp. (cepa 2), *Amphora* sp. (cepa 3), *Amphora* sp. (cepa 4), *Amphora* sp. (cepa 5), *Amphora* sp. (cepa 6), *Amphora* sp. (cepa 7)	42
4	Curvas de crecimiento de las especies *Cymbella* sp. (cepa 1), *Cymbella* sp. (cepa 2), *Diploneis* sp., *Navicula* sp. (cepa 4), *Navicula* sp. (cepa 1), *Navicula* sp. (cepa 2).....	43
5	Curvas de crecimiento de las especies *Navicula* sp. (cepa 3) y *Grammathophora angulosa*	44
6	Imágenes de las especies aisladas de los sitios de Ensenada y Mulegé	46
7	Imágenes de las especies aisladas de los sitios de Ensenada, Mulegé y San Quintín.....	47
8	Imágenes de las especies aisladas de los sitios de Ensenada, Mulegé y San Quintín.....	48
9	Curvas de crecimiento de *Aphanocapsa marina*, *Komvophoron* sp. y *Phormidium* sp	49
10	Curva de crecimiento de *Tetraselmis suecica*.....	50
11	Curva de crecimiento de *Heterococcus* sp.....	50
12	Curva de crecimiento de *Grammatophora angulosa*, *Navicula* sp. (cepa 4), *Diploneis* sp., *Amphora* sp. (cepa 5), *Navicula* sp. (cepa 1), *Amphora* sp. (cepa 7) aisladas en Ensenada....	51
13	Curvas de crecimiento de *Amphora* sp. (cepa 1), *Amphora* sp. (cepa 2), *Cymbella* sp. (cepa 1), *Amphora* sp. (cepa 3), *Cymbella* sp. (cepa 2), *Amphora* sp. (cepa 4), *Amphora* sp. (cepa 6), *Navicula* sp. (cepa 2) aisladas en Mulegé.....	51
14	Curvas de crecimiento de *Navicula* sp. (cepa 3) y *Synedra* sp. aisladas en la Bahía de San Quintín	52

15 Curvas de crecimiento de *Tetraselmis suecica*, *Aphanocapsa marina*, *Heterococcus* sp. y *Navicula* sp. (cepa 3) mantenidas con dos temperaturas, dos irradiancias y con dos aportes químicos de nitrógeno 70

16 Valores promedio y desviación estándar de peso seco total, peso de cenizas y peso seco orgánico de cultivos estáticos de *Tetraselmis suecica*, *Aphanocapsa marina*, *Heterococcus* sp. y *Navicula* sp. (cepa 3) mantenidos con dos temperaturas, dos irradiancias y dos aportes químicos de nitrógeno 78

17 Valores promedio y desviación estándar de proteínas, carbohidratos y lípidos de cultivos estáticos de *Tetraselmis suecica*, *Aphanocapsa marina*, *Heterococcus* sp. y *Navicula* sp. (cepa 3) mantenidos con dos temperaturas, dos irradiancias y dos aportes químicos de nitrógeno 84

18 Valores promedio y desviación estándar de clorofila a, clorofila b, clorofila c y carotenoides de cultivos estáticos de *Tetraselmis suecica*, *Aphanocapsa marina*, *Heterococcus* sp. y *Navicula* sp. (cepa 3) mantenidos con dos temperaturas, dos irradiancias y con dos aportes químicos de nitrógeno 96

19 Variables ambientales de mantenimiento de los cultivos de rotíferos (*Brachionus plicatilis*) alimentados con *Tetraselmis suecica*, *Navicula* sp. (cepa 3) e *Isochrysis galbana* como alimento control 97

20 Valores promedio de la densidad de los cultivos de rotíferos (*Brachionus plicatilis*) alimentados con *Tetraselmis suecica*, *Navicula* sp. (cepa 3) e *Isochrysis galbana* (control) 98

21 Valores promedio del largo y ancho en la fase inicial y final de los cultivos de rotíferos (*Brachionus plicatilis*) alimentados con *Tetraselmis suecica*, *Navicula* sp. (cepa 3) e *Isochrysis galbana* (control) 99

22 Valores promedio de peso seco total, peso de cenizas y peso seco orgánico de los rotíferos (*Brachionus plicatilis*) alimentados con *Tetraselmis suecica*, *Navicula* sp. (cepa 3) e *Isochrysis galbana* (control) 100

23 Porcentajes promedio de proteínas, carbohidratos y lípidos de los rotíferos (*Brachionus plicatilis*) alimentados con *Tetraselmis suecica*, *Navicula* sp. (cepa 3) e *Isochrysis galbana* (control) 101

24 Valores promedio de las células sedimentadas de *Navicula* sp. (cepa 3) mantenidos en recipientes de plástico transparente (1 L)..... 103

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Sitios de muestreo y sus coordenadas de ubicación en la Península de Baja California, México	18
2	Calidad de agua de los sitios de colecta en Baja California y Baja California Sur	38
3	Clasificación taxonómica de las diversas especies de microalgas aisladas en la Península de Baja California	39
4	Valores promedio y desviación estándar del tamaño celular, la tasa de crecimiento en fase exponencial (μ) y los días en fase de retardo de crecimiento, así como los días de duración en fase exponencial de crecimiento de las microalgas aisladas	45
5	Valores promedio y desviación estándar de la tasa de crecimiento en fase exponencial (μ), el tiempo de generación (Tg) y la densidad celular inicial y final de los cultivos de las especies de microalgas aisladas	53
6	Valores promedio y desviación estándar del peso seco total, contenido de ceniza y peso seco orgánico de 21 especies de microalgas	55
7	Valores promedio y desviación estándar del porcentaje de lípidos, proteínas y carbohidratos de 21 especies de microalgas	57
8	Valores promedio y desviación estándar del porcentaje de ácidos grasos de 21 especies de microalgas	59
9	Porcentaje de supervivencia de *Artemia franciscana* y las densidades celulares de 21 especies de microalgas utilizadas para realizar el ensayo de toxicidad	64
10	Valores promedio y desviación estándar de la tasa de crecimiento (μ), el tiempo de generación (Tg) y densidad celular de cultivos estáticos de *Tetraselmis suecica*, *Aphanocapsa marina*, *Heterococcus* sp. y *Navicula* sp. (cepa 3) mantenidas en dos temperaturas, con dos irradiancias y con dos aportes químicos de nitrógeno	71
11	Porcentaje de ácidos grasos de *Tetraselmis suecica*, *Aphanocapsa marina*, *Heterococcus* sp. y *Navicula* sp. (cepa 3) mantenidos con dos temperaturas (20 y 25 °C), dos irradiancias (100 y 200 μE m^{-2} s^{-1}) y dos aportes químicos de nitrógeno provistos por nitrato de sodio y por nitrato de amonio	90
12	Valores promedio y desviación estándar de la densidad de rotíferos, la tasa de crecimiento, y el tiempo de duplicación de los cultivos de rotíferos (*Brachionus plicatilis*) alimentados con *Tetraselmis suecica*, *Navicula* sp. (cepa 3) e *Isochrysis galbana* (usado como alimento control)	99

13 Valores promedio y desviación estándar de los porcentajes de proteínas, carbohidratos y lípidos de las microalgas usadas como alimento y de los cultivos de rotíferos (*Brachionus plicatilis*) así como el valor de correlación (R) entre ambas variables 102

1. Introducción

Las microalgas son un grupo de microorganismos fotosintéticos que agrupa tanto a las cianobacterias (procariotas) como a las eucariotas, estos organismos tienen un papel ecológico importante ya que son capaces de fijar CO_2, producir oxígeno y son la base de la cadena alimenticia acuática (Lee y Lee 2001, 2002; Wehr, 2003; Gómez-Luna, 2007).

Se ha evaluado que existen alrededor de doscientas mil especies de microalgas, cuya distribución y amplio rango de metabolismos les permite ser un grupo heterogéneo (Kyle, 1989; Pulz y Gross, 2004). Debido a que las microalgas son uno de los grupos de organismos vegetales más diversos en formas, tamaños, estrategias fisiológicas y de crecimiento son un recurso con gran potencial de aplicaciones acuícolas, biotecnológicas y farmacéuticas (Pulz y Gross, 2004; Andersen, 2005).

Esta gran diversidad de especies de microalgas se debe a la variabilidad de hábitats en donde se les encuentra y a su tolerancia a los factores ambientales, como son: la concentración y forma química de los nutrientes, la temperatura, la luz, la salinidad, y el pH. La diversidad de especies de microalgas también es influenciada por las variaciones geográficas, estacionales, diurnas, y verticales en la columna de agua (Metting, 1996; Sánchez-Molina *et al*., 2007). En los trópicos, debido a que las variaciones estacionales son cortas, hay mayor diversidad de especies, ya que las diferentes especies de microalgas pueden coexistir durante mucho tiempo, mientras que en las latitudes altas hay menos diversidad de especies debido a que los cambios estacionales son menores (Reynolds, 2006).

Como consecuencia de las variaciones en el ambiente y a la estacionalidad, las microalgas han desarrollado diversas estrategias para aprovechar las ventajas de cada uno de los ambientes que habitan, para así poder crecer rápidamente y adaptarse a las condiciones ambientales. Esta adaptabilidad ha permitido que las microalgas puedan vivir tanto en ambientes acuáticos como terrestres, en sistemas marinos y dulceacuícolas y en ambientes extremos desde muy cálidos como zonas hidrotermales hasta en glaciares (Metting, 1996).

Es importante hacer una bioprospección en diferentes tipos de ambientes para poder conocer la diversidad de especies y realizar aislamiento de microalgas para tener cultivos monoespecíficos de las especies dominantes y tolerantes para conocer su respuesta fisiológica en ambientes controlados. Al aislar una especie de microalga, se debe cultivar sin la interferencia de otros organismos, ya que el establecimiento y crecimiento exitoso de un cultivo de una sola especie bajo condiciones de laboratorio, dependerá si las condiciones ambientales sean las propicias para su mantenimiento (Metting, 1996; Rosales *et al.,* 2005; Ratha *et al*., 2012).

Hasta donde se conoce, existen entre 200,000 y 800,000 especies de microalgas, de las cuales alrededor de cinco mil especies han sido aisladas, pero solo un número reducido de especies de microalgas han sido caracterizadas bioquímica o fisiológicamente, se estima que menos del 1% han sido aisladas para uso farmacéutico (Kyle, 1989; Pulz y Gross, 2004, Natrah *et al.,* 2007; Hernández-Carlos y Gamboa-Angulo, 2011).

Uno de los grupos taxonómicos más abundantes en los océanos son las diatomeas, se calcula que proporcionan hasta un 45% del total de la producción primaria oceánica y pueden vivir en cualquier tipo de ambiente lo que permite ser un recurso importante para su aislamiento (Round *et al*., 1990; Mann, 1999).

Otro grupo importante por su abundancia son las cianobacterias las cuales poseen características fisiológicas y morfológicas que les permiten adaptarse y sobrevivir bajo condiciones ambientales extremas como desiertos, aguas termales y hasta en lagos alcalinos (Pulz y Gross, 2004; Rosales *et al*., 2005). Por la capacidad de las cianobacterias de colonizar diversos ambientes acuáticos, ha sido de gran interés el aislamiento y la evaluación de las características bioquímicas y fisiológicas de estos organismos (Mora *et al*., 2002). Las cianobacterias son fuentes útiles de pigmentos, exopolisacáridos, proteínas y otros metabolitos que pueden ser obtenidos por distintas técnicas.

En México existen pocos grupos de investigación dedicados al estudio y conservación de las especies de microalgas. En los últimos 10 años se han incrementado los grupos dedicados a este tipo de estudios y se considera que solo alrededor del 10% de las

especies de microalgas existentes en los sistemas acuáticos, han sido estudiadas con la finalidad de conocer su fisiología y su potencial para el cultivo de producción de biomasa con fines comerciales (Mora *et al*., 2002).

Factores ambientales y su influencia en la calidad de los cultivos de microalgas

La calidad de un cultivo de microalgas y su productividad dependen de las características fisiológicas de cada especie, así como de un conjunto de factores ambientales importantes para su crecimiento. Entre los factores ambientales que afectan el crecimiento y la composición química de las microalgas se encuentran los requerimientos físicos y químicos tales como: la irradiancia, la composición espectral de la luz, la temperatura, el carbono, la salinidad, el pH, y entre los requerimientos nutritivos se encuentra el tipo y la concentración de nutrientes (Björn *et al*., 1996; Mora *et al*., 2002; Rosales *et al*., 2006).

Algunas especies de microalgas han desarrollado diferentes estrategias adaptativas en respuesta al estrés provocado por los factores fisicoquímicos, algunos de estos cambios se producen en la morfología y en la fisiología. Estos cambios adaptativos incluyen la tasa de crecimiento (Thompson y Guo, 1992 a, b; Carvalho y Malcata, 2003), el volumen celular, la composición bioquímica (Renaud *et al*., 1991), la composición de pigmentos (Eriksen e Iversen, 1995; Sciandra *et al*., 2000), la actividad fotosintética y el metabolismo del carbono (Turpin, 1991).

La luz provee la energía para el crecimiento de las microalgas y es indispensable para el desarrollo de células fotoautotróficas, por lo que es un factor importante en el crecimiento. La eficiencia de la utilización de la luz, depende de las características fisiológicas de las células para poder utilizarla con distintas irradiancias y composición espectral (Rivkin, 1989; Rodríguez *et al*., 2000). Por efecto de la cantidad de luz se producen importantes modificaciones en la tasa de crecimiento, en la síntesis de pigmentos y en la composición proximal de las células microalgales (Andersen, 2005).

La composición de ácidos grasos se ve modificada por efecto de la irradiancia a la cual están expuestas las células microalgales. En los cultivos de diatomeas bentónicas

(*Amphora* sp.), al ser cultivadas al exterior sintetizaron una mayor producción de ácidos grasos saturados, mientras que la clorofita *Parietochloris incisa* al ser cultivada a una baja irradiancia 35 µE m^{-2} s^{-1} tuvo una mayor producción de ácido araquidónico (de la Peña, 2007; Solovchenko *et al*., 2008). La composición de ácidos grasos en diversas especies de microalgas también se ve modificada por la exposición a los rayos ultravioleta (UV) y producen un efecto sobre los PUFAs (Ácidos Grasos Poliinsaturados, por sus siglas en inglés), ya sea acumulando el número de dobles enlaces de carbono (aumento del grado de insaturación de los lípidos), por la oxidación de ácidos grasos, o afectando diversas enzimas (rubisco, anhidrasa carbónica) y rutas metabólicas que intervienen en la síntesis de ácidos grasos (Rech *et al.,* 2005; Leu *et al*., 2006; Guihéneuf *et al*., 2010). La respuesta de las microalgas a la exposición de rayos ultravioleta es especie específica, causando que aumenten o disminuyan los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) dependiente de las características fisiológicas de la especie (Jun-hui y Chi-Keung, 2011, Guihéneuf *et al*., 2010).

La salinidad es un factor que influye en el crecimiento, la distribución y la composición de las microalgas, muchas especies (diatomeas, clorofítas y cianobacterias) son tolerantes a altas concentraciones y a amplias fluctuaciones de salinidad, como *Dunaliella salina* y *Asteromonas gracilis* que son microalgas halotolerantes, capaces de almacenar grandes cantidades de glicerol intracelular para mantener su balance osmótico. Ante un estrés salino, las microalgas presentan una serie de cambios en la fotosíntesis, en la fotorespiración, en la síntesis de aminoácidos y acumulan metabolitos orgánicos que contribuyen a regular su presión osmótica interna. Sin embargo, se conoce poco sobre las estrategias fisiológicas y ecológicas de muchas especies que viven en estos ambientes hipersalinos (Ben-Amotz y Avron, 1983; Mishra *et al*., 2008; Garza-Sánchez *et al*., 2009).

La temperatura es otro parámetro clave en la distribución y abundancia de las especies de microalgas, ya que controla el metabolismo y las tasas de todas las reacciones bioquímicas, pero específicamente tiene un efecto directo en los componentes estructurales de las células, particularmente en los lípidos (Oliveira *et al*., 1999; Coles y Jones, 2000; Simental-Trinidad *et al*., 2001; Carvalho y Malcata, 2003). La temperatura influye en el tipo de ácidos grasos que son sintetizados por parte de las microalgas, y

tiene un efecto sobre la fluidez de la membrana plasmática como en la microalga heterotrófica *Aurantiochytrium* sp. que al ser cultivada a 10 ºC sintetizó un mayor contenido de ácido docosahexaenoico (DHA, por sus siglas en inglés) (Renaud *et al*., 1995; Taoka *et al*., 2009).

Dentro de los requerimientos nutritivos, los macronutrientes son utilizados para sintetizar compuestos orgánicos, y los micronutrientes se requieren principalmente como catalizadores (Prieto *et al*., 2005). La cantidad y la forma química de los nutrientes disponibles en el medio afectan diversos procesos fisiológicos de las microalgas, ya que las tasas fotosintéticas y de respiración disminuyen a medida que aumenta la deficiencia del nutrimento (Darley, 1987). La deficiencia de nitrógeno en el medio provoca el cese del crecimiento e influye en la composición bioquímica de las microalgas, porque al haber menos nitrógeno hay una menor producción de proteínas y en consecuencia aumentan los lípidos (Lourenço *et al*., 2002; Su *et al*., 2011). Tal como ocurrió en un estudio realizado por Huang *et al*. (2013) con las especies *Tetraselmis subcordiformis*, *Nannochloropsis oculata* y *Pavlova viridis* al ser cultivadas sin adición de nitrógeno en el medio de cultivo, obteniendo un cese de crecimiento y un aumento en la producción de lípidos.

Las microalgas usualmente tienen preferencia por utilizar NH^+_4 respecto a otros aportes nitrogenados, debido al menor gasto metabólico que se requiere para su incorporación y utilización, ya que usualmente las distintas formas químicas del nitrógeno son reducidas para realizar la biosíntesis de aminoácidos (South y Whittick, 1987).

Hay diversos trabajos sobre los efectos individuales de la luz, la salinidad, los nutrientes y la temperatura sobre la composición bioquímica de las microalgas. Sin embargo, hay poca información sobre la interacción de tres o más variables y su efecto sobre su fisiología. Además que las respuestas de las microalgas al efecto de estas variables es especie-específica (Redalje y Laws, 1983, Bouterfas *et al*., 2002, Sandnes *et al*., 2005; Natrah *et al*., 2007).

El conocimiento de la fisiología de las microalgas permitirá manipular su capacidad de respuesta a distintas variables ambientales, en relación a la producción de distintos componentes celulares *e.g.* proteínas, carbohidratos, lípidos y por ende se podrá

evaluar que vías metabólicas contribuyen a la síntesis de los constituyentes celulares y como pueden ser adaptadas o modificadas para incrementar la producción de un determinado componente celular (Oliveira *et al*., 1999).

Importancia de las microalgas en la industria alimentaria

La teoría nutricional moderna ha centrado su atención sobre los numerosos beneficios a la salud humana por efecto de la alimentación y por mantener los niveles adecuados de n3-PUFA. La principal fuente de ácidos grasos poliinsaturados como el ácido eicosapentaenoico (EPA por sus siglas en inglés, C20:5n3) y el ácido docosahexaenóico (DHA, C22:6n3) son los aceites de pescado de origen marino, pero debido a la gran demanda por parte de la industria alimenticia y a la sobre extracción de peces, el aceite de pescado es un recurso que está declinando en su producción, por lo que se hace necesario buscar fuentes alternativas de ácidos grasos como las microalgas (Hinzpeter *et al*., 2006; Patil *et al*., 2007).

Las microalgas tienen un alto valor nutricional debido a su composición proximal, pueden contener entre el 30% al 65% de su peso seco total como proteína, hasta 53% de lípidos ricos en ácidos grasos insaturados y hasta 58% de carbohidratos (Mora *et al*., 2002). El contenido proximal de las distintas especies de microalgas puede variar según las condiciones de cultivo, la especie y la etapa de cultivo, además de las características de cada especie de microalga (Brown, 2002).

La composición lipídica de las microalgas tiene constituyentes similares a los de aceites vegetales y el contenido de lípidos tiende a ser inversamente proporcional a la tasa de crecimiento microalgal, con grandes acumulaciones durante la fase estacionaria y senescente (Hinzpeter *et al*., 2006; Zepka *et al*., 2007). Los lípidos de las microalgas son principalmente ésteres de glicerol y ácidos grasos de cadena larga C14 a C22, y éstos pueden ser saturados e insaturados (Metting, 1996).

En general los lípidos obtenidos de las microalgas no poseen el olor y sabor característicos del aceite de pescado, por lo que se reduce el riesgo de una contaminación química y mejora el potencial de purificación contrario a lo que ocurre en

el proceso de purificación del aceite de pescado en el cual la refinación del aceite involucra un tratamiento químico que afecta la calidad del aceite (Pulz y Gross, 2004; Guedes *et al*., 2011). Los lípidos de las microalgas son más estables a la degradación oxidativa que los lípidos obtenidos de otras fuentes naturales, ya que las microalgas tienen agentes antioxidantes que evitan la degradación (Hinzpeter *et al*., 2006; Natrah *et al*., 2007). Además, los lípidos tienen una mayor estabilidad en comparación con los PUFA tradicionales, provenientes de peces marinos porque naturalmente son ricos en carotenoides, antioxidantes y vitaminas (Patil *et al*., 2007).

El porcentaje total de lípidos como lípidos neutrales, glicolípidos y fosfolípidos varía entre y dentro de los grupos taxonómicos, ya que pueden existir diferencias entre microalgas de la misma clase, además de que el contenido de lípidos varía de acuerdo a las condiciones de cultivo y a la fase de crecimiento en la que se encuentre (Metting, 1996; Brown, 2002; Chia-Hung *et al*., 2011). Por ejemplo, el contenido lipídico de las cianobacterias lo constituyen ésteres de glicerol y ácidos grasos de cadena larga C14 a C24 presentando entre el 25% y 60% de enlaces insaturados (Zepka *et al*., 2007). El dinoflagelado marino *Crypthecodinium cohnii* puede contener hasta más del 40% de lípidos de su peso seco total, con alto contenido de DHA (40% del total de ácidos grasos) (Mendoza *et al*., 2008).

Las microalgas oleaginosas (*Nannochloris*, *Chlorella*, *Isochrysis* y *Nannochloropsis*) han recibido mayor atención en la investigación, debido a su alto contenido de lípidos y mayor tasa de producción principalmente de triglicéridos (Chia-Hung *et al*., 2011). La mayoría de las especies de microalgas tienen de moderado a alto porcentaje de ácido eicosapentaenóico (EPA, C20:5n3), las Prymnesiofitas tienen de 7-34% (*Pavlova* spp. e *Isochrysis* sp. (T.ISO)), las Cryptomonadas son relativamente ricas en ácido docosahexaenóico (DHA, C22:6n3) (0.2% a 11%), las Eustigmatofitas (*Nannochloropsis* spp.) y las diatomeas tienen altos porcentajes de ácido araquidónico (ARA por sus siglas en inglés, C20:n6) (0% a 4%) (Brown, 2002).

Debido a su alto valor nutricional y a su habilidad de sintetizar y acumular grandes cantidades de n3-PUFA, actualmente las microalgas son cultivadas a nivel industrial para su uso en la alimentación de organismos acuáticos cultivados, siendo las diatomeas las microalgas más utilizadas ya que acumulan más lípidos comparado con

el grupo de las clorofitas y las cianobacterias que tienden acumular carbohidratos (Pratoomyot *et al.,* 2005; Patil *et al*., 2007).

Aunque las microalgas tienen una alta biodiversidad, existe un número limitado de especies de microalgas que han sido estudiadas y analizadas para la producción de lípidos en la alimentación animal y humana. Por lo anterior, el primer paso para la elección de especies ricas en lípidos, es el aislamiento, posteriormente realizar cultivos monoespecíficos, y así elegir las microalgas con altas tasas de crecimiento y con un alto contenido de lípidos, que sean fácil de cosechar y principalmente aislar especies locales a la zona en donde sean utilizadas. Además con el aislamiento de especies de microalgas locales, se evita la transfloración de especies, ya que los organismos estarán mejor adaptados a las condiciones del medio ambientales del sitio en donde fueron aisladas (Yen *et al*., 2011; Chaichalerm *et al*., 2012).

Valor nutricional de la microalgas en la Acuicultura

En la acuicultura, las microalgas son muy importantes debido a que son utilizadas como alimento vivo en las etapas tempranas (larval y juvenil) de la mayoría de las especies acuáticas en cultivo, como son abulón, crustáceos, algunas especies de peces. En el caso de los moluscos bivalvos (ostras, almejas, mejillones), las microalgas son consumidas en todas las etapas de vida (Zhu *et al*., 1997; Brown, 2002; Mendoza *et al*., 2008). Las microalgas también son usadas como alimento en la producción de zooplancton (artemia, rotíferos, copépodos) ya sea como dieta unialgal o en dietas mixtas para evitar deficiencias nutricionales principalmente de ácidos grasos poliinsaturados (n3 y n6) (Conceição *et al*., 2010; Hernández-Pérez y Labbé, 2014). Los rotíferos son los organismos más utilizados como alimento vivo para larvas de peces y crustáceos en cultivo, debido a que se reproducen rápidamente, son resistentes y se pueden cultivar a gran escala en condiciones controladas de crecimiento (James *et al*., 1983).

El valor nutricional de las microalgas varía significativamente entre especies y según las condiciones del cultivo. Algunos de los factores que se tienen que considerar para utilizar a las microalgas como alimento son el tamaño, la forma, la digestibilidad

(relacionado con la estructura y composición de la pared celular), la composición bioquímica (presencia de nutrientes, enzimas y toxinas) y los requerimientos alimenticios del organismo que las consumirá. Entre las microalgas con buenas propiedades nutricionales se encuentran *Chaetoceros calcitrans*, *Chaetoceros muelleri*, *Pavlova lutheri*, *Isochrysis* sp. (T-ISO), *Nannochloropsis* spp. y *Thalassiosira pseudonana* (Brown, 2002; Richmond, 2005).

Existen aproximadamente 500 especies de algas incluidas las macroalgas que son usadas para la alimentación humana o como complemento alimenticio. Alrededor de 160 especies de microalgas son de valor comercial y principalmente son organismos que crecen en ambientes extremos como *Spirulina* y *Dunaliella*, o que tienen rápidas tasas de crecimiento como *Chlorella* y *Scenedesmus* (Day *et al*., 1999; Richmond, 2005). Actualmente el mercado de la biomasa microalgal para uso en la alimentación produce alrededor de diez mil toneladas de peso seco total al año y una ganancia de USD $10000/tonelada, además el 30% de la producción mundial de microalgas está destinada al consumo animal (Benemann, 2013).

En el noreste de México, la producción de microalgas es una industria en plena expansión para la producción de alimento de larvas de camarón en los laboratorios comerciales acuícolas. Sin embargo, la producción comercial de microalgas está reducida a menos de diez especies entre las más importantes destaca la especie *Chaetoceros muelleri* cuya concentración media de biomasa está cercana a 1×10^6 células ml^{-1} en cultivos masivos al exterior y tiene una producción de biomasa muy variable en cada laboratorio (López-Elías *et al*., 2004).

Colecciones de cepas de microalgas

La mayoría de las microalgas para uso comercial y experimental se obtienen por lo general de colecciones establecidas de bancos de cepas vivas siendo la mayoría de países Europeos y de Estados Unidos de Norteamérica. Hasta donde se conoce, en México existen cuatro bancos de cepas de microalgas para venta comercial, a saber: 1) CICESE, 2) Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), y 3) la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) y la colección microbiana del Centro de

Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN). Se conoce que existen tres colecciones particulares de microalgas y cianobacterias (dos en el CICESE y una en la Universidad del Mar, Oaxaca). Las dos colecciones particulares de CICESE, no realizan venta de cultivos de microalgas y cianobacterias, pero mantienen para investigación cepas vivas de microalgas, en el Departamento de Acuicultura (136 cepas de microalgas y cianobacterias) y en el de Biotecnología Marina (20 cepas de cianobacterias). Es relevante contar con este tipo de ceparios para el estudio y el aprovechamiento de las microalgas en diversas áreas. Por lo anterior, es importante continuar aislando especies de microalgas de poblaciones naturales locales, ya que se encontrarían mejor adaptadas a las condiciones ambientales de la zona (Kyle, 1989; Arredondo y Voltolina, 2007).

El realizar cultivos de microalgas, ha permitido tener un mayor conocimiento sobre los ciclos de vida de diversas especies, han aportado información acerca de sus características genéticas y sobre su biología en lo referente a su morfología, fisiología, toxicidad, requerimientos nutricionales y características bioquímicas, también se han obtenido datos para establecer los límites taxonómicos de muchos taxa (Werner, 1977; Alveal *et al*., 1995; Andersen, 2005).

Algunos antecedentes del uso de nuevas especies de microalgas

Algunos de los resultados relevantes obtenidos con nuevas especies de microalgas aisladas en México y otros países, al ser mantenidas en condiciones de cultivo se resumen a continuación.

En la zona costera de Playitas en Ensenada Baja California, México durante 1989 fue aislada una especie de *Chaetoceros* sp., la cual ha sido utilizada en diversos estudios: para la alimentación de distintas especies de moluscos *e.g*. el ostión japonés (*Crassostrea gigas*), obteniendo resultados de crecimiento similares a los obtenidas con las especies tradicionalmente utilizadas en su cultivo (*Isochrysis* spp.) (Trujillo-Valle, 1993). Sánchez-Saavedra y Voltolina, (1994 y 1996) también utilizaron a esta especie de *Chaetoceros* sp. para evaluar la composición bioquímica al cultivarla en dos

irradiancias (199 y 498 µE m^{-2} s^{-1}) y con dos calidades de luz (blanca y azul) concluyendo que la composición proximal cambió significativamente.

En otro estudio realizado por Sánchez-Saavedra y Voltolina (1995) al utilizar a *Chaetoceros* sp. como alimento para *Artemia franciscana*, observaron un incremento significativo en la longitud de los organismos y alcanzaron la madurez sexual en menor tiempo, cuando las células provenían de los cultivos mantenidos en luz azul con respecto al sistema tradicional de cultivo con luz blanca.

En distintas zonas de Baja California, México, fueron aisladas 12 especies de diatomeas bentónicas que ya están siendo utilizadas en la nutrición de postlarvas y juveniles de distintas especies de abulón (*Haliotis* spp.) en condiciones de laboratorio y en granjas comerciales de producción. Además han realizado diversos estudios, en donde obtuvieron diferencias importantes en la composición proximal de las distintas especies de diatomeas, así como en la calidad nutricional para juveniles de abulón al ser suministradas en forma monoespecífica, mixta o bien al enriquecer el valor nutrimental de macroalgas (Correa-Reyes *et al*., 2001; Simental y Sánchez-Saavedra, 2003; Simental *et al.,* 2004; Gorrostieta-Hurtado y Searcy-Bernal, 2004; Carbajal-Miranda *et al.,* 2005; Chávez-Medrano, 2008; Correa *et al*., 2009).

Con el propósito de utilizar microalgas para uso en la acuicultura y biotecnología, así como para la remoción de nutrientes y de metales pesados, en el grupo de Biología y Cultivo de Microalgas del CICESE, han realizado colectas y aislamiento de especies en distintas zonas de México en ambientes marinos y dulceacuícolas asociados a efluentes de granjas de producción acuícola y efluentes urbanos. Por lo anterior, y por la búsqueda de especies con alto valor nutricional han investigado especies aisladas en la localidad de Nayarit y Baja California, México (Aguilar-May, 2002; Correa-Reyes *et al*., 2001; Sánchez-Alejandro y Sánchez-Saavedra, 2014). Han evaluado que el cultivo de *Synechococcus elongatus* puede ser utilizado como alimento de rotíferos (*Brachionus plicatilis*) (Campa-Ávila, 2002), así como para etapas larvales de camarón (*Litopenaus vannamei*) (Moreno-Pérez, 2008) y de *Artemia franciscana* (Sánchez-Saavedra *et al.,* 2011). Diversas especies de diatomeas aisladas de Baja California han sido utilizadas como alimento para postlarvas de abulón en cultivo (Corre-Reyes *et al*., 2001, 2009), además se ha estudiado la preservación de estas diatomeas bentónicas

hasta por dos años y su uso como alimento para postlarvas y juveniles de abulón (Núñez-Zarco y Sánchez-Saavedra, 2011; Sánchez-Saavedra y Núñez-Zarco, 2012, 2015). También han encontrado especies de microalgas (*Scenedesmus* spp.) y cianobacterias (*Synechococcus elongatus*) que tienen alta eficiencia de remoción de nitratos, fosfatos y amonio al ser mantenidas en forma libres e inmovilizadas en quitosano y otros polímeros (Fierro-Reséndiz *et al*., 2008; Jiménez-Valera, 2008; Aguilar-May y Sánchez-Saavedra, 2009; Castro-Ceseña y Sánchez-Saavedra, 2014, 2015; Castro-Ceseña *et al*., 2015; Ruíz-Güereca y Sánchez-Saavedra, 2015). Otras especies (*Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* y *Synechococcus* sp.) han mostrado alta tolerancia y capacidad de remoción de metales pesados como el cadmio y el zinc (Valle-Ramírez de Arellano, 2008). Varias especies aisladas de la región de Baja California han mostrado actividad antibacteriana para organismos patógenos en sistemas de cultivo acuícolas (Molina-Cárdenas, 2011) y para humanos (Sánchez-Saavedra *et al*., 2010; Barrón-Monterrubio, 2014). Otras especies de microalgas aisladas de la localidad de Baja California han mostrado potencial uso para la producción de biocombustibles (Márquez-Reyes *et al*., 2015).

Otro estudio con microlagas aisladas es el realizado por González-Davis (2010) en el cual evaluó la capacidad antimicrobiana de 29 cepas de microalgas y cianobacterias contra *Vibrio campbellii* así como su biotoxicidad contra nauplios de *Artemia franciscana*, y obtuvo actividad antimicrobiana en 6 extractos acuosos de microalgas y 3 de cianobacterias pero ninguno de los extractos mostró un efecto tóxico.

En aguas costeras de Cuba, Almaguer *et al*. (2004), aislaron dos especies de diatomeas bentónicas pertenecientes al género *Amphora*. Las diatomeas fueron cultivadas en dos tipos de medios (Guillard f/2 y A-M) para evaluar su calidad como alimento para postlarvas de camarón (*Litopenaeus schmitii*). Concluyeron que estas diatomeas mantenidas en las dos condiciones experimentales promovieron altas tasas de crecimiento en las postlarvas respecto a las especies utilizadas como control.

Con el fin de reducir los costos de producción de alimento vivo, de la Peña (2007), aisló una especie de diatomea (*Amphora* sp.) proveniente de una granja de cultivo de abulón (*Southeast Asian Fisheries Development Center Aquaculture Department*), y la cultivó en diferentes condiciones de luz, nutrientes y en cultivos a la intemperie y al interior,

para evaluar el crecimiento y la composición bioquímica. Concluyó que en cultivos al interior, tuvo una mayor tasa de crecimiento a baja irradiancia (11.4 µE m^{-2} s^{-1}), mientras que en cultivos a la intemperie obtuvo un mayor contenido de ácidos grasos.

En la búsqueda de nuevas especies de microalgas para uso en la maricultura Tzovenis *et al*. (2009) aislaron seis especies de prasinofitas y una *Pyramimonas* de lagunas costeras de Grecia para evaluar su potencial de cultivo y la composición bioquímica. En este estudio obtuvieron una composición proximal de 10-20% en cenizas, 35-65% de proteínas, 6-10% en lípidos y 25-45% en otros compuestos orgánicos incluidos los carbohidratos y un alto contenido de (EPA) y DHA, concluyeron que estas especies de microalgas tienen potencial para ser usadas en la acuicultura mediterránea.

Park *et al*. (2012) evaluaron la producción de biomasa y de lípidos de 14 especies de clorofítas aisladas en Saskatchewan, Canadá, al ser cultivadas en condiciones mixotróficas y autótrofas para su potencial uso en la remoción de desechos y posterior producción de biodiesel. Concluyeron que las clorofitas tuvieron una mayor producción de biomasa y de lípidos al ser mantenidas en condiciones mixotróficas y que pueden ser alternativas para la producción de biodiesel mediante el uso de desechos.

1.1. Justificación

Debido a que en el medio ambiente existen variaciones temporales, estacionales y espaciales, las microalgas han desarrollado diversas estrategias para aprovechar las ventajas de cada uno de los ambientes que habitan. Por lo anterior, se plantea hacer una bioprospección de los diferentes tipos de ambientes en la Península de Baja California y de sitios con actividad acuícola para poder obtener aislados de microalgas y realizar estudios que permitan conocer sus características fisiológicas y bioquímicas en respuesta a diversos parámetros ambientales para determinar su potencial uso en la acuicultura.

Dada la importancia de las microalgas en la alimentación de diversos organismos, y a la creciente demanda de alimento vivo en la industria acuícola, a la reducida lista de especies utilizadas para la producción de microalgas para usos biotecnológicos y

acuícolas, así como los pocos estudios acerca de las especies nativas de microalgas en México y en particular en Baja California en condiciones de cultivo, resulta importante aislar y caracterizar especies nativas de México, para contribuir al conocimiento de la biodiversidad, conocer su fisiología, las mejores condiciones para su cultivo y su posible utilización. Por lo anterior, el presente estudio pretende aislar especies de microalgas nativas de Baja California, para obtener organismos adaptados a las condiciones ambientales de esta zona y evitar la introducción de especies alóctonas ya que es importante aprovechar el acervo genético de microalgas que existe en la localidad.

Además, es necesario tener un mayor conocimiento de la biodiversidad de microalgas marinas de Baja California, para aportar el mayor número de datos para la elaboración de claves taxonómicas en el caso de encontrar alguna especie no listada en las actuales claves taxonómicas para la Península de Baja California. Lo anterior es debido a que en nuestro país son pocas las claves taxonómicas de referencia y las existentes están enfocadas a la descripción de especies de diatomeas y de dinoflagelados (Ortega, 1984; Licea, 1995; Moreno *et al*., 1996; Siqueiros-Beltrones, 2002).

En México los estudios sobre microalgas están centrados en aspectos ecológicos (abundancia) y de monitoreo y son pocos los destinados a aspectos fisiológicos. La realización de este trabajo contribuirá al acervo de referencias taxonómicas y bioquímicas de especies de microalgas nativas de Baja California.

2. Hipótesis

La producción de lípidos de las microalgas aisladas se incrementará por el efecto del estrés de los factores abióticos (temperatura, irradiancia y nutrientes).

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Aislar especies de microalgas de Baja California para la producción de lípidos al ser mantenidas en distintas condiciones de cultivo.

3.2. Objetivos específicos

1) Aislar especies de microalgas obtenidas de Baja California.
2) Identificación taxonómica de las especies de microalgas obtenidas de Baja California.
3) Caracterizar el crecimiento y la composición proximal de las especies de microalgas aisladas para una selección con base en el contenido de lípidos.
4) Realizar ensayos de toxicidad con las especies de microalgas aisladas.
5) Evaluar el crecimiento, la producción de lípidos de las microalgas seleccionadas y cultivadas en diferentes condiciones de luz, temperatura y de nutrientes disponibles en el medio.
6) Evaluar la calidad nutricional de las especies de microalgas seleccionadas al ser suministradas como alimento para rotíferos *Brachionus plicatilis*.

4. Materiales y métodos

4.1. Descripción de la zona de estudio

El estado de Baja California se caracteriza por ser una zona con una gran diversidad de ambientes marinos y dulceacuícolas, su clima es muy variado y existen nichos con características muy diversas. En los distintos ambientes de la península de Baja California se presentan fluctuaciones de la temperaturas máximas de hasta 50 ºC y temperaturas mínimas de hasta -5 ºC. Las costas de Baja California están bordeadas por el Océano Pacífico y el Golfo de California. En la zona marina del Pacífico de Baja California se producen procesos de surgencias durante primavera y verano (Gómez, 1983). En los ambientes terrestres de la península de Baja California existen aportes de agua en lagunas, oasis, zonas hidrotermales y geotérmicas. Baja California comprende dos regiones fitogeográficas: la Región Californiana o también llamada Mediterránea, y la Región del Desierto Central o Desierto Sonorense (INEGI, 2012).

4.2. Colecta de muestras

Las colectas de especies de microalgas se realizaron en Baja California y Baja California Sur (Tabla 1) (Figura 1).

Se realizó una visita por cada sitio de colecta para obtener 3 muestras de agua y del bentos, durante distintas épocas del 2010 a 2012. Las muestras de agua fueron tomadas en la zona costera (superficie) y otras fueron tomadas a 100 m de la costa, se tomaron muestras de agua para análisis cualitativo y para el aislamiento de microalgas. Las muestras para el análisis cualitativo en la zona costera fueron tomadas directamente con una botella color ambar (150 ml) y las muestras alejadas de la costa fueron tomadas por botellas hidrográficas (Van Dorn) y otras fueron tomadas por filtrar 20 l de agua de superficie a través de redes de fitoplactón de 20 µ y 100 µ posteriormente fueron fijadas con solución Lugol (Sournia, 1978; Venrick, 1978; Arangúren *et al.*, 2002; Andersen, 2005).

Para las muestras de agua que se utilizaron para los aislamientos se tomaron directamente de botella y posteriormente fueron transportadas en hieleras con hielo para mantener las muestras en frío (4 ºC) hasta llegar al laboratorio del CICESE.

Para cada sitio de muestreo se midió la temperatura, el pH, y la salinidad, mientras el contenido de nutrientes (amonia, nitratos y fosfatos) se midió siguiendo las técnicas espectrofotométricas descritas para un Hach DR/4000 UV-VIS (Hach, 1997).

Tabla 1. Sitios de muestreo y sus coordenadas de ubicación en la Península de Baja California, México.

Baja California	**Latitud**	**Longitud**
Bahía de Ensenada	31° 51' 55.33"	116° 40' 15.22"
San Quintín	30° 26' 0"	115° 58' 0"
San Felipe	31° 01' 39"	114° 50' 07"
Baja California Sur		
Mulegé	26° 38' 22.13"	111° 50' 13.92"
La Paz (Malecón)	24° 08' 32"	110° 18' 39"
El Sauzoso (Golfo de Baja California)	24°18' 26"	110° 38' 17"
Ensenada (Golfo de Baja California)	24° 08' 20.4"	110° 21' 0"
Punta Lobos (Océano Pacífico)	23º 25'	110º 14'
Bahía de los Ángeles	28° 56' 33.00"	113° 33' 39.99"
Playa Tecolote	24° 20' 11.00"	110° 18' 55.00"
Playa Balandra	24° 18' 49.99"	110° 18' 47.99"
Playa Los Barriles	23° 40' 52.99"	109° 42' 19.00"
Santa Rosalía	27° 20' 20.00"	112° 16' 0.99"

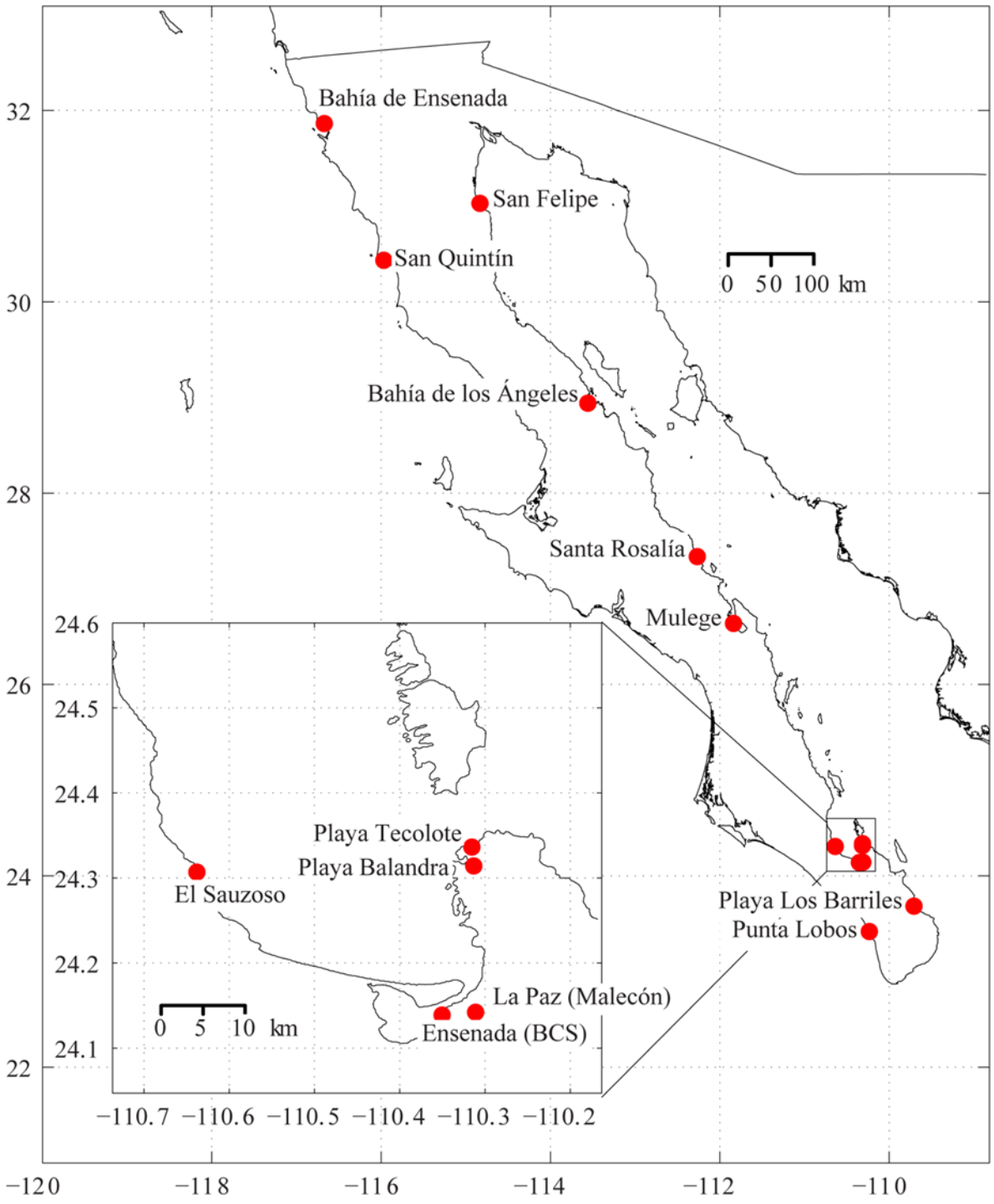

Figura 1. Sitios de muestreo en Baja California (BC) y Baja California Sur (BCS).

4.3. Técnicas de aislamiento

A partir de las muestras de agua colectadas se tomó una submuestra y se realizaron observaciones al microscopio con el propósito de reconocer las especies de microalgas más abundantes para su aislamiento. Las técnicas utilizadas para el aislamiento fueron por medio de diluciones seriadas, de micropipeta y de rayado en agar siguiendo las recomendaciones descritas por Andersen (2005). Se utilizó el medio ”f” descrito por Guillard y Ryther (1962), como medio de cultivo para realizar el aislamiento debido a que se ha demostrado que es un medio que cubre amplios requerimientos para diversos grupos de microalgas.

4.3.1. Diluciones seriadas

La técnica de diluciones seriadas se usó cuando las células de las microalgas que se aislaron tuvieron un tamaño inferior a 10 µm de diámetro, y para aislar especies abundantes en la muestra. Para conocer la concentración celular de la especie de interés y poder calcular el número de diluciones necesarias para reducir la concentración celular hasta obtener la especie de interés se realizó un recuento del número de células. Se tomó 1 ml de muestra y se agregó a un tubo de ensayo que contenía 9 ml de medio de cultivo estéril, la muestra se homogenizó y posteriormente se agregó un 1 ml a un segundo tubo y así sucesivamente hasta una dilución de 10^6.

4.3.2. Aislamiento con micropipeta

Se utilizó para separar células mayores a 10 µm de diámetro en forma de quistes, dinoflagelados, formas coloniales o filamentosas. El método consistió en aislar una microalga con la ayuda de una pipeta Pasteur con punta reducida. Se tomó una gota de la muestra y se colocó en un portaobjetos para después succionar por capilaridad las células de interés, dicha gota se colocó en otro portaobjetos limpio con una gota de

agua de mar previamente esterilizada, este procedimiento se realizó hasta que se obtuvo un solo organismo libre de contaminantes.

4.3.3. Aislamiento en agar

Esta técnica consiste en un rayado en estrías en una caja de Petri con agar y se utilizó para especies bentónicas, clorofitas y cianofitas. Se preparó el medio de cultivo enriquecido con medio “f” descrito por Guillard y Ryther (1962) y 1% de agar, después se colocaron dos gotas de la muestra cerca de la periferia posteriormente con un asa de platino previamente esterilizada se realizó el rayado, se invirtió la caja y se dejó incubar de 4 a 8 días y después se observó en el microscopio para seleccionar las colonias que estuvieron libres de otros organismos. Cuando así fue requerido, se utilizó una combinación de las técnicas de aislamiento antes mencionadas para lograr obtener cultivos monoespecíficos según recomendaciones de Andersen (2005).

Los medios de cultivo, tanto líquidos como sólidos, se esterilizaron en una autoclave vertical a 121 ºC y 1.05 kg cm^{-2} de presión durante 15 minutos. La elección de los medios de cultivo se realizó de acuerdo al tipo de organismo que se aisló (Stein, 1973) y las características del ambiente marino. Para la preparación de todos los cultivos y para evitar la posible introducción de otras especies de organismos, el agua utilizada para todos los ensayos fue pasada a través de filtros de cartucho de diferentes medidas, irradiada con luz ultravioleta (u.v.) y desinfectada por vía química con cloro y tiosulfato de sodio siguiendo las proporciones recomendadas por Hemerick (1973).

El proceso de aislamiento de microalgas se siguió hasta obtener al menos un total de 21 especies para mantener en cultivos monoespecíficos.

4.4. Caracterización taxonómica

Con el propósito de identificar taxonómicamente a las especies aisladas, se realizaron observaciones con un microscopio compuesto (Olympus CX31). La identificación taxonómica se realizó con base en caracteres morfológicos y de organización de los

organismos. Se utilizaron claves taxonómicas clásicas y adecuadas al tipo de organismo (Round *et al.,* 1990; Moreno *et al*., 1996; Tomas, 1997; Siqueiros-Beltrones, 2002; Komárek y Anagnostidis, 2005).

4.5. Mantenimiento de las cepas

Se realizaron cultivos monoespecíficos de las especies aisladas y se siguió la secuencia clásica de cultivo en sistemas estáticos (sin renovación de medio) (Stein, 1973), transfiriendo los cultivos a un volumen sucesivamente mayor desde tubo de ensayo (10 ml) hasta matraz Erlenmeyer (125 ml). El medio de cultivo que se utilizó fue el medio "f" descrito por Guillard y Ryther (1962). Los medios de cultivo fueron esterilizados en una autoclave a 121 ºC y 1.05 kg m^{-2} de presión durante 15 min.

El inóculo de células para los cultivos monoespecíficos provino de las especies obtenidas de los aislamientos. Los cultivos se mantuvieron en una cámara climática con temperatura de 20 ± 1 °C y a luz continua a una irradiancia de 60 µE m^{-2} s^{-1} proporcionada por lámparas fluorescentes de luz blanca fría (Silvana F40CW).

4.6. Ensayo preliminar del crecimiento de las especies aisladas

Para conocer el crecimiento poblacional de las especies aisladas, se prepararon matraces Erlenmeyer de 250 ml con 200 ml de medio "f" (Guillard y Ryther, 1962). Los cultivos se mantuvieron por duplicado a las mismas condiciones que para el mantenimiento pero a una irradiancia de 100 µE m^{-2} s^{-1}. Para cada especie aislada se evaluó su cultivo diariamente y durante 14 días la cantidad de biomasa producida, por recuentos utilizando un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad y un microscopio compuesto (Olympus CX31). Previo al recuento de células, en el caso de las diatomeas bentónicas para evitar que se formen agregados de células, las muestras fueron sonicadas (3-6 min a 50 Hz). Para el recuento de las cianobacterias filamentosas se tomó como criterio contar el filamento completo y para el recuento celular de la xantofíta

se decidió contar por racimos usando una cámara de conteo Fuchs Rosenthal (0.2 mm de profundidad) (Moheimani *et al*., 2013; Huarachi *et al*., 2013).

Con los datos de densidad óptica se realizaron las curvas de crecimiento y se calcularon la tasa de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación utilizando la ecuaciones (1) y (2) propuestas por Fogg y Thake (1987):

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

En donde N_1 y N_2 son el número de células en el día inicial (t_1) y en el día final de la fase exponencial de crecimiento (t_2), respectivamente

$$TG = \frac{\log_2 2}{\mu} = \frac{1}{\mu} \quad (2)$$

En donde TG es el tiempo necesario para que se duplique la población, y se usó logaritmo de base 2 considerando que la mayoría de las células se reproducen mediante fisión binaria y (μ) es la tasa de crecimiento.

4.7. Evaluación del crecimiento de cultivos monoespecíficos

4.7.1. Condiciones de cultivo

Para cada una de las especies aisladas se mantuvieron cultivos en las mismas condiciones que en la sección 4.6.

Para evaluar el crecimiento poblacional para cada especie se evaluó diariamente y durante 10 días la cantidad de biomasa producida, por recuentos utilizando un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad y un microscopio compuesto (Olympus CX31) además de los criterios previamente mencionados en la sección 4.6. Con los datos obtenidos de los conteos de células se realizaron curvas de crecimiento y se calculó la tasa de crecimiento (μ) durante la fase exponencial utilizando la ecuación propuesta por Fogg y Thake (1987) previamente descrita en la sección 4.6.

4.8. Evaluación de la composición bioquímica de los cultivos monoespecíficos

4.8.1. Peso seco total, peso de las cenizas y peso seco orgánico

El peso seco total, el peso de las cenizas y peso seco orgánico se evaluaron según la técnica propuesta por Sorokin (1973). Durante la fase de crecimiento exponencial (día 4) y en la fase de crecimiento estacionaria (día 10), se tomó una alícuota (10 ml) de cada cultivo en y se filtró a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/C) de 47 mm de diámetro y 1 µm de abertura de poro, la biomasa retenida en los filtros se enjuago con 5 ml de formiato de amonio (3%) para remover las sales del medio de cultivo. Para obtener el peso seco total, los filtros con la biomasa se mantuvieron en una estufa a 60 °C y posteriormente se pesaron en una balanza analítica (Mettler Toledo XS105) hasta obtener valores de peso constante, y por diferencia entre el peso del filtro y del filtro con biomasa se calcularon los valores de peso seco total. Para conocer el contenido de cenizas, los filtros con biomasa fueron incineradas en una mufla a 470 °C por 4 horas y por diferencias entre el peso seco total constante y el peso de después de incinerar, se obtuvo el contenido de cenizas. El peso seco orgánico se obtuvo por la diferencia entre los valores de peso seco total y de las cenizas.

4.8.2. Composición proximal

Para los análisis de composición proximal de cada una de las especies aisladas se tomaron submuestras de los cultivos en la fase de crecimiento exponencial (día 4) y en la fase de crecimiento estacionaria (día 10). Se filtraron 5 ml de cada cultivo a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/C de 25 mm y abertura de poro de 1 µm). Los filtros previamente se lavaron con agua destilada y preincineraron en una mufla 470 °C por un periodo de 4 horas.

Todas las muestras se mantuvieron congeladas a –20 °C hasta obtener el total de las muestras para realizar posteriormente los análisis químicos respectivos. La composición proximal para cada especie, se calculó en porcentajes con base en los valores del peso seco orgánico obtenido para cada cepa de microalga aislada.

4.8.2.1. Proteínas

La extracción de la proteínas se realizó con hidróxido de sodio, siguiendo el método descrito por Malara y Charra (1972a), para la reacción de proteínas se realizó con el reactivo de Folin-Ciocalteau y para la evaluación según el método de Lowry *et al.* (1951). Para la elaboración de la curva de calibración de las proteínas se utilizó como estándar el suero de albúmina de bovino (98%) Sigma®.

4.8.2.2. Carbohidratos

La extracción de carbohidratos se efectuó con ácido sulfúrico siguiendo la técnica descrita por Whyte (1987) y para la medición de carbohidratos se realizó la cuantificación con fenol siguiendo el método de Dubois *et al*. (1956) y Malara y Charra (1972b). Para la curva de calibración se utilizó como estándar una solución de glucosa (99%) Sigma®.

4.8.2.3. Lípidos

Para la extracción de los lípidos se utilizó una mezcla de cloroformo-metanol-agua siguiendo el método de Blight y Dyer (1959) y modificada por Chiaverini (1972). La cuantificación de lípidos se efectuó por el método de Pande *et al.* (1963) y para elaborar la curva de calibración se preparó con una solución de tripalmitina (99%) Sigma®.

4.8.3. Perfiles de ácidos grasos

Para el análisis de los ácidos grasos de cada una de las especies aisladas se prepararon para cada especie aislada matraces Erlenmeyer de 1 l con 700 ml de medio “f” (Guillard y Ryther, 1962). Los cultivos se mantuvieron por duplicado a las mismas condiciones de cultivo que el ensayo de crecimiento (sección 4.6).

Para la obtención de la biomasa de cada especie aislada, los cultivos fueron cosechados en la fase de crecimiento estacionaria temprana (día 5), y fueron

centrifugados a 4500 rpm por 5 min (Centrifuge 5810R, Eppendorf), posteriormente las muestras fueron congeladas a –80 °C y después liofilizadas (Labconco, Freezone 2.5).

Para la extracción de los ácidos grasos se utilizaron 50 mg de muestra liofilizada de cada cultivo y se realizó siguiendo la metodología descrita por Folch *et al*. (1957) utilizando una solución extractora de diclorometano-metanol (2:1) más BHT al 0.01%.

La saponificación de los lípidos extraídos se realizó utilizando una solución de KOH (0.3N) metanólica al 90% y en baño maría a 60 ºC por 30 minutos, después se agregó agua y hexano para la extracción de los lípidos insaponificables. Posteriormente fueron adicionados agua, hexano y se acidificó (HCl 6N) para extraer los lípidos saponificables.

La metilación fue hecha utilizando un reactivo de esterificación (trifloruro de boro en metanol al 14%) siguiendo el método de Metcalfe *et al.* (1966).

Los metil ésteres de los ácidos grasos fueron analizados en un cromatógrafo de gases (GC Agilent Technologies 7890A), equipado con una columna capilar (Agilent J&W, 123-3232 DB-FFAP) (30 m de longitud, 0.32 mm de diámetro, 0.25 µm grosor de la película), y con un detector de ionización de flama (250 ºC) e hidrógeno como gas de acarreo.

El volumen de inyección fue de 1µl y la temperatura inicial del horno fue de 120 ºC, con incrementos de 9 ºC por minuto hasta los 190 ºC, posteriormente se aumentó a 3 ºC por minuto hasta alcanzar los 230 ºC manteniéndose por 4 minutos.

La identificación de los ácidos grasos se realizó por la comparación de los tiempos de retención relativos de un estándar comercial (37 Component, Supelco FAME Mix Sigma). Los porcentajes de los ácidos grasos se calcularon tomando como base el total de ácidos grasos identificados.

4.9. Ensayo de toxicidad

Para evaluar la posible toxicidad de las especies de microalgas y cianobacterias aisladas se realizó un bioensayo, utilizando nauplios recién eclosionados de *Artemia*

franciscana (Argentemia Golden, Grado 1). Para la obtención de los nauplios se pesó 0.05 mg de quistes de *A. franciscana* los cuales fueron hidratados en agua de mar filtrada durante una hora. Se debilitó el corion de los quistes usando hipoclorito de sodio al 6%, hasta que tomaron una coloración anaranjada (5 min) y se enjuagaron con agua de uso doméstico hasta eliminar el hipoclorito. Los quistes fueron colocados en un cono de eclosión y para aumentar la eficiencia de eclosión los quistes fueron mantenidos a 28 ºC en agua de mar filtrada, a una salinidad de 22‰ con aireación constante hasta su eclosión (22 horas) (Van Stappen, 1996). Cuando los nauplios de *A. franciscana* eclosionaron fueron colectados por fototropismo y se subdividieron en los sistemas experimentales.

4.9.1. Obtención de extractos acuosos

Se realizaron cultivos monoespecíficos de las microalgas mantenidas en tubos de ensayo de 15 ml con 10 ml de medio “f” según lo descrito por Guillard y Ryther (1962). Los cultivos se realizaron por duplicado en las mismas condiciones ambientales que las descritas en el ensayo descrito en la sección 4.7.1. Los cultivos fueron cosechados en la fase estacionaria de crecimiento (día 12). Para la colecta del medio residual de los cultivos, se separó la biomasa de las células por medio de filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/C) de 47 mm de diámetro y 1 µm de abertura de poro.

El ensayo de toxicidad fue realizado por cuadruplicado utilizando una placa de 96 pozos con fondo plano con tapa. En cada pozo se colocaron entre 7 y 10 nauplios en un volumen final de 200 µl del medio residual de cada especie de microalga. Se utilizó como control de los ensayos, agua de mar filtrada estéril y agua de mar estéril con medio “f” (Guillard y Ryther, 1962). Estos ensayos se realizaron a una temperatura de 20 °C y una irradiancia de 100 µE m^{-2} s^{-1} con luz continua.

Para cada sistema experimental se evaluó la densidad de nauplios de *A. franciscana* al inicio y al final del ensayo, para calcular el porcentaje de supervivencia. El término del ensayo fue considerado después de mantener a los nauplios con los tratamientos por un periodo de 24 horas y antes de que los nauplios consumieran sus reservas vitelinas.

4.10. Efecto de distintas condiciones experimentales sobre la producción de lípidos: selección de cepas

Se seleccionaron cuatro especies de microalgas (*Tetraselmis suecica*, *Aphanocapsa marina*, *Heterococcus* sp. y *Navicula* sp. (cepa 3) entre el total de las especies aisladas, para evaluar su crecimiento y la composición bioquímica al ser mantenidas en distintas condiciones experimentales. La selección de las especies a utilizar, fue con base en sus características de crecimiento y de composición bioquímica evaluada en los ensayos descritos en las secciones 5.4 y 5.6. El inóculo de células para los cultivos de las especies seleccionadas provino de un cultivo de cada especie en fase exponencial de crecimiento.

Los cultivos se mantuvieron por triplicado para cada condición experimental en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 100 ml de medio “f” considerando lo descrito por Guillard y Ryther (1962). Todos los cultivos se mantuvieron en una cámara climática situada en el Laboratorio Húmedo del Departamento de Acuicultura del CICESE.

Las distintas condiciones experimentales para el mantenimiento de los cultivos consistieron en dos temperaturas (20 °C y 25 °C), dos irradiancias (100 y 200 µE m^{-2} s^{-1}) y dos aportes químicos de nitrógeno.

La temperatura experimental de 20 ± 1 °C se obtuvo por medio del uso de aire acondicionado y para mantener la temperatura de 25 °C se utilizó un calefactor de ventilación (1500 W).

Con el propósito de conocer el efecto de la forma química de nitrógeno disponible en el medio de cultivo, se utilizaron dos aportes de nitrógeno: nitrato de sodio ($NaNO_3$) y nitrato de amonio (NH_4NO_3). Se utilizó el medio “f” descrito por Guillard y Ryther (1962) como medio de cultivo control, el cual considera el nitrato de sodio como aporte de nitrógeno. Se consideró la relación atómica del nitrógeno para sustituir el nitrato de sodio descrito en el medio “f” por el nitrato de amonio (como tratamiento experimental), manteniendo la misma concentración molar final de nitrógeno ($1.7x10^{-3}$ M). Se mantuvo la composición del resto de los componentes del medio “f” en iguales proporciones para ambos tratamientos.

La iluminación para mantener los cultivos fue continua suministrada por medio de lámparas fluorescente de luz fría (Silvana F40CW). La irradiancia fue medida con un irradiómetro (modelo QSL-100, sensor 4π, Biospherical Instruments), construyendo líneas de igual irradiancia y ajustando los valores experimentales a 100 y 200 µE m^{-2} s^{-1}.

4.10.1. Crecimiento

Para cada condición experimental se evaluó cada día y durante 10 días, la cantidad de la biomasa producida y evaluada mediante densidad óptica utilizando un espectrofotómetro (Hach modelo DR/400 UV-VIS) a una longitud de onda de 680 nm. Con los datos obtenidos, se realizaron curvas de crecimiento y se calculó la tasa de crecimiento (µ) durante la fase exponencial y el tiempo de duplicación utilizando las ecuaciones propuestas por Fogg y Thake (1987) descritas en la sección 4.6.

4.10.2. Composición proximal

Durante la fase exponencial de crecimiento (día 5) de cada especie mantenida en las distintas condiciones experimentales se tomaron alícuotas para analizar la composición proximal. La composición proximal para cada especie, se calculó en porcentajes con base en los valores del peso seco orgánico obtenido para cada cepa de microalga.

Para evaluar el peso seco total, peso de las cenizas y el peso seco orgánico, así como los lípidos, proteínas y carbohidratos se siguieron las metodologías descritas en las secciones 4.8.1 y 4.8.2.

4.10.3. Perfiles de ácidos grasos

Para el análisis de los ácidos grasos de cada especie mantenida en las distintas condiciones experimentales fueron preparados matraces Erlenmeyer de 1 l con 700 ml de medio “f” (Guillard y Ryther, 1962) para cada especie de microalga seleccionada.

Durante la fase estacionaria de crecimiento (día 10) se cosecharon los matraces para la obtención de la biomasa celular y posterior análisis de ácidos grasos siguiendo las metodologías descritas en la sección 4.8.3.

4.10.4. Pigmentos

La colecta de muestras fue realizada por triplicado durante la fase estacionaria (día 10) para cada especie y condición experimental. Cada muestra se filtró a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/C) de 25 mm de diámetro y abertura de poro de 1 µm. La cuantificación de pigmentos se realizó siguiendo la técnica descrita por Parsons *et al*. (1984).

4.11. Ensayo de alimentación

Para evaluar la calidad nutricional de al menos dos especies de microalgas aisladas (*Tetraselmis suecica* y *Navicula* sp. (cepa 3)) y con base en los resultados obtenidos del ensayo del efecto de distintas condiciones experimentales (sección 5.9) se realizó un ensayo de alimentación utilizando rotíferos de la especie *Brachionus plicatilis* tipo S.

4.11.1. Obtención del alimento

El inóculo de células para los cultivos de las especies seleccionadas provino de un cultivo de cada especie en fase exponencial de crecimiento.

Se realizaron cultivos monoespecíficos de las especies *Tetraselmis suecica*, *Navicula* sp. (cepa 3) y como alimento control se utilizó a *Isochrysis galbana* (Parke, 1949) cepa CCMP1323 obtenida de Bigelow, "*National Center for Marine Algae and Microbiota*", en Estados Unidos de Noteamérica.

Los cultivos se realizaron en matraces Fernbach con 2 L de medio "f" según lo descrito por Guillard y Ryther (1962) y fueron mantenidos a una temperatura de 20 °C, con una

irradiancia de 100 µE m^{-2} s^{-1}, para alimentar a los rotíferos, los cultivos fueron cosechados en la fase exponencial de crecimiento.

Para cada uno de los cultivos de microalgas se evaluó diariamente (10 días) la cantidad de biomasa producida por recuentos utilizando un hematocitómetro de 0.1 mm y un microscopio compuesto (Olympus CX31), con el propósito de ajustar la ración de alimento que suministró a los rotíferos (0.001 mg peso seco total microalga/rotífero) (Øie *et al*., 1994).

La ración de alimento se suministró dos veces al día (mañana-noche) y debido a la diferencia de tamaño entre las especies de microalgas, la ración fue normalizada de acuerdo al peso seco total de cada especie de microalga. La ración de alimento compuesta por *Navicula* sp. (cepa 3) fue previamente disgregada por el uso de un baño de agua y ultrasonido (3 a 6 min a 50 Hz) para evitar agregados de células debido a que esta especie tiene a formar agregados de células y biopelículas.

4.11.2. Cultivo de rotíferos

Los rotíferos de la especie *Brachionus plicatilis* fueron obtenidos mediante una donación de la Unidad de Biotecnología en Piscicultura de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), en Ensenada, México.

Los rotíferos fueron colocados en un recipiente de 7.5 l y mantenidos a una temperatura de 20 °C, con una irradiancia de 100 µE m^{-2} s^{-1}, a una salinidad de 34‰**,** con aireación continua y con pH de 7.5 a 8, con el fin de aclimatar a los rotíferos a las condiciones experimentales del ensayo (24 horas). Posteriormente, los organismos fueron colectados e introducidos en los sistemas experimentales y durante dos días fueron acondicionados al tipo de alimento que recibirían durante el ensayo y la cantidad de células adicionadas como alimento fue *al libitum*.

El ensayo de alimentación duro 8 días, cada tratamiento experimental fue mantenido por triplicado en recipientes cilíndricos de plástico transparentes (PET o politereftalato de etileno por sus siglas en inglés) de 1 l (9 cm de diámetro y 14 cm de altura).

La densidad inicial de rotíferos para cada tratamiento experimental fue de 50 rotíferos ml^{-1} en un volumen de 500 ml de agua de mar filtrada a 1 µm y tratada con luz ultravioleta. En cada sistema experimental se adicionó aireación de forma continua y suministrada por medio de una pipeta Pasteur de vidrio (0.1 mm) introducida en la tapa del recipiente.

En cada sistema experimental se midieron las variables ambientales (temperatura, pH, salinidad y amonio), y fueron realizados recambios de agua al 50% cada día para la eliminación de los desechos (heces y alimento) usando un tamiz con una luz de malla de 35 µm.

Para cada sistema experimental se evaluó diariamente la densidad de rotíferos, la tasa de crecimiento poblacional y el tiempo de duplicación, mediante recuentos del número de individuos por mililitro utilizando un microscopio estereoscópico (Olympus S2X7) y una cámara de conteo de zooplancton.

La tasa de crecimiento poblacional (r) fue calculada utilizando la ecuación (3) propuesta por Øie *et al*. (1994):

$$r = \frac{(\ln N_f - \ln N_0)}{t} \tag{3}$$

En dónde N_0: es la densidad inicial de rotíferos, N_f es la densidad final de rotíferos al tiempo t (día 8).

El tiempo de duplicación (Td) de la población se determinó mediante la ecuación (4) descrita por Román-Reyes *et al*. (2014), en donde r es la tasa de crecimiento.

$$Td = \frac{\ln 2}{r} \tag{4}$$

Para evaluar el crecimiento de los rotíferos en cada sistema experimental se realizó mediante evaluación del tamaño obtenidas por fotografías de los rotíferos al inicio y al final del ensayo, para la observación de los organismos se utilizó un microscopio estereoscópico (Olympus S2X7) equipado con una cámara digital SLR (Olympus Evolt Є330). Para realizar las mediciones de los organismos se utilizó el programa Image-Pro Discovery versión 4.5 para Windows.

4.11.3. Composición proximal

Para el análisis de peso seco total, peso de cenizas y peso seco orgánico de la biomasa de los rotíferos por tratamiento, se tomaron alícuotas de 50 a 100 ml (según la densidad de rotíferos) al final del ensayo (día 8), y las muestras fueron filtradas a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/C de 45 mm y abertura de poro de 1 µm) y enjuagados con 10 ml de formiato de amonio (3%) para remover las sales del medio de cultivo.

Para evaluar el peso seco total, peso de las cenizas y el peso seco orgánico, se siguieron las metodologías descritas en la sección 4.8.2.

Para los análisis de la composición proximal de los rotíferos mantenidos en cada sistema experimental fueron tomadas submuestras de los cultivos de rotíferos al final del ensayo (día 8), y se les realizó un enjuague con agua de mar para quitar el exceso de alimento.

Posteriormente fueron filtradas las submuestras de 30 a 100 ml según la densidad de rotíferos por tratamiento a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/C de 45 mm y abertura de poro de 1 µm) para obtener la biomasa de los rotíferos por tratamiento.

Todas las muestras de biomasa de los rotíferos se mantuvieron congeladas a –20 °C para realizar posteriormente los análisis químicos respectivos.

Para evaluar el contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos, se siguieron las metodologías descritas en la sección 4.8.2.

4.11.4. Ensayo de sedimentación de *Navicula* sp. (cepa 3)

Se realizó un ensayo de evaluación del grado de sedimentación de *Navicula* sp. (cepa 3) para evaluar la disponibilidad de alimento para los rotíferos, ya que esta especie es una diatomea que tiende a formar agregados y mayoritariamente se le encuentra de forma bentónica.

Para la obtención de la biomasa de *Navicula* sp. (cepa 3) se preparó un cultivo monoespecífico, el cual fue colocado en un matraz Erlenmeyer de 1 l con 700 ml de medio “f” (Guillard y Ryther, 1962). El cultivo fue mantenido en las mismas condiciones experimentales que las descritas en la sección 4.11.1, la biomasa de células fue cosechada en la fase exponencial de crecimiento para utilizarse posteriormente en el ensayo de sedimentación.

El ensayo de sedimentación fue realizado por triplicado en recipientes de plástico transparente de 1 l (9 cm de diámetro y 14 cm de altura y de plástico PET), fueron mantenidos en las mismas condiciones experimentales que las descritas en la sección 4.11.2.

Para evaluar la sedimentación de las células de *Navicula* sp. (cepa 3) se utilizó la misma cantidad de biomasa que se suministró a los rotíferos en el ensayo de alimentación descrito en la sección 4.11.2. La evaluación de la sedimentación de células, se realizó mediante una cuantificación de células disponibles en el medio en diferentes tiempos tomando alícuotas de 1 ml de cada repetición, las muestras se tomaron cada 15 minutos hasta completar una hora, ya que este fue el tiempo en el cual se encontró sedimentada la mayor parte de las células. El conteo de las células se realizó utilizando un hematocitómetro de 0.1 mm y un microscopio compuesto (Olympus CX31). Para cada tiempo de evaluación se calculó el porcentaje de sedimentación de las células, considerando el valor de la densidad inicial respecto a la densidad de células evaluada para cada uno de los distintos intervalos de tiempo de medición en este ensayo.

4.12. Tratamiento estadístico

4.12.1. Ensayo de crecimiento y composición bioquímica

Para evaluar si existieron diferencias en el crecimiento de los cultivos monoespecíficos de las especies aisladas, se aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA). El mismo análisis estadístico se utilizó para comparar las diferencias en el peso seco total,

cenizas, peso seco orgánico y para cada componente de la composición proximal (proteínas, carbohidratos y lípidos) entre las especies aisladas por fase de crecimiento.

Se utilizó un análisis de varianza de una vía para evaluar las posibles diferencias en la composición de ácidos grasos de las especies aisladas. Sin embargo, debido a que los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad y de homogeneidad de varianzas para realizar estadística paramétrica, se utilizó un análisis de varianza por rangos (Kruskal-Wallis).

Para evaluar las diferencias en peso seco total, cenizas y peso seco orgánico así como en cada componente de la composición proximal entre las fases de crecimiento, se aplicó un análisis de varianza de dos vías.

4.12.2. Evaluación del crecimiento y composición bioquímica en distintas condiciones experimentales

Se utilizó un ANOVA factorial para evaluar las diferencias en el crecimiento, peso seco total, cenizas, peso seco orgánico, las clorofilas a, b, c y carotenoides para cada especie (*Tetraselmis suecica*, *Aphanocapsa marina*, *Heterococcus* sp. y *Navicula* sp. (cepa 3)) y mantenidas con dos aportes de nitrógeno, a dos temperaturas y en dos irradiancias.

Se usó un análisis de varianza factorial, para evaluar las posibles diferencias en cada uno de los componentes de la composición proximal (proteínas carbohidratos y lípidos) y entre las distintas condiciones experimentales de irradiancia, temperatura y tipo de aporte del nitrógeno, así como para cada especie mantenida en cultivo (*Tetraselmis suecica*, *Aphanocapsa marina*, *Heterococcus* sp. y *Navicula* sp. (cepa 3)).

Se aplicó un ANOVA factorial para evaluar si existieron diferencias entre los datos de crecimiento, peso seco total, cenizas, peso seco orgánico, las clorofilas a, b, c y carotenoides entre las especies *Tetraselmis suecica*, *Aphanocapsa marina*, *Heterococcus* sp. y *Navicula* sp. (cepa 3) mantenidas con dos aportes de nitrógeno, a dos temperaturas y en dos irradiancias.

Se utilizó un análisis de varianza factorial para evaluar las diferencias en el contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos entre las cuatro especies (*Tetraselmis suecica*, *Aphanocapsa marina*, *Heterococcus* sp. y *Navicula* sp. (cepa 3)), mantenidas con dos aportes de nitrógeno, en dos temperaturas y en dos irradiancias.

No se realizó un análisis estadístico con los datos de los perfiles de ácidos grasos evaluados para las cuatro especies de microalgas estudiadas (*Tetraselmis suecica*, *Aphanocapsa marina*, *Heterococcus* sp. y *Navicula* sp. (cepa 3)) y mantenidas con dos aportes de nitrógeno, en dos temperaturas y en dos irradiancias, la falta de análisis estadístico fue debido a que solo se tuvo una muestra para cada caso.

4.12.3. Ensayo de alimentación

Para evaluar las diferencias en el crecimiento (tasa de crecimiento, tiempo de duplicación, densidad de organismos y peso) de los rotíferos, se aplicó un análisis de varianza de una vía. El mismo análisis se utilizó para comparar las diferencias en cada componente de la composición proximal (proteínas, carbohidratos y lípidos) entre los diferentes tratamientos experimentales de alimentación.

4.12.4. Ensayo de sedimentación de *Navicula* sp. (cepa 3)

Se utilizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para evaluar las diferencias en los porcentajes de sedimentación de las células de *Navicula* sp. (cepa 3) entre los diferentes intervalos de tiempo evaluados.

Consideraciones generales

Cuando se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, se aplicó un análisis *a posteriori* de Tuckey (Zar, 1984).

Para todos los análisis estadísticos se tomaron en consideración las hipótesis que fundamentan estas pruebas y que son la normalidad, la homogeneidad de varianzas y la independencia (Sokal y Rohlf, 1979; Zar, 1984).

Para los análisis estadístico se utilizó el programa estadístico STATISTICA® versión 10.0 (Stat Soft Inc., 2002) y se consideró un valor de significancia de 0.05.

5. Resultados

5.1. Aislamiento

Se colectaron un total de 115 muestras entre todos sitios de muestreo y la mayor temperatura entre los sitios de muestreo se registró en Mulegé (25 ºC), mientras que los menores valores fueron en San Quintín (17.2 ºC). Los valores de pH variaron entre 8.2 y 9.2 entre los distintos sitios de colecta. La mayor concentración de nitratos (1.03 mg l^{-1}) ocurrió en Mulegé, y la mayor concentración de nitritos (0.37 mg l^{-1}) y fosfatos (0.68 mg l^{-1}) fue en San Quintín. La salinidad entre los sitios de colecta varió de 34‰ a 35‰, no hubo presencia de amonio en ninguno de los sitios de colecta de muestras (Tabla 2).

Tabla 2. Calidad de agua de los sitios de colecta en Baja California y Baja California Sur.

Sitios de colecta	Temperatura (°C)	Nitratos (mg l^{-1})	Nitritos (mg l^{-1})	Fosfatos (mg l^{-1})	Amonio (mg l^{-1})	Salinidad (‰)	pH
Ensenada	20.0	0.15	0	0.10	0	35.0	9.2
Mulegé	25.0	1.03	0.0017	0.05	0	34.0	8.6
San Quintín	17.0	0.37	0.04	0.68	0	33.9	9.0

5.2. Identificación de las especies aisladas

Se aislaron e identificaron 21 especies de microalgas de las localidades de Ensenada, Mulegé, y San Quintín en la Península de Baja California, se encontró que el mayor número de especies aisladas perteneció a la localidad de Ensenada.

Las especies identificadas pertenecieron a las siguientes clases: Cyanophyceae, Chlorodendrophyceae, Xanthophyceae y Bacillariophyceae. La clase Bacillariophyceae presentó el mayor número de especies aisladas (16 especies), de las cuales los

géneros *Navicula* y *Amphora* fueron los más representativos dentro de las especies aisladas (Tabla 3).

Tabla 3. Clasificación taxonómica de las diversas especies de microalgas aisladas en la Península de Baja California

Clase	Especies	Sitio de aislamiento
Cyanophyceae	*Aphanocapsa marina* Hansgirg 1890	Ensenada
Cyanophyceae	*Komvophoron* sp. Anagnostidis and Komárek, 1988	Ensenada
Cyanophyceae	*Phormidium* sp. Kützing ex Gomont, 1892	Ensenada
Chlorodendrophyceae	*Tetraselmis suecica* (Kylin) Butcher 1959	Ensenada
Xanthophyceae	*Heterococcus* sp. Chodat 1908	Ensenada
Bacillariophyceae	*Amphora* sp. (cepa 1) Ehrenberg ex Kützing, 1844	Mulegé
Bacillariophyceae	*Amphora* sp. (cepa 2) Ehrenberg ex Kützing, 1844	Mulegé
Bacillariophyceae	*Amphora* sp. (cepa 3) Ehrenberg ex Kützing, 1844	Mulegé
Bacillariophyceae	*Amphora* sp. (cepa 4) Ehrenberg ex Kützing, 1844	Mulegé
Bacillariophyceae	*Amphora* sp. (cepa 5) Ehrenberg ex Kützing, 1844	Ensenada
Bacillariophyceae	*Amphora* sp. (cepa 6) Ehrenberg ex Kützing, 1844	Mulegé
Bacillariophyceae	*Amphora* sp. (cepa 7) Ehrenberg ex Kützing, 1844	Ensenada
Bacillariophyceae	*Cymbella* sp. (cepa 1) C. Agardh 1830	Mulegé
Bacillariophyceae	*Cymbella* sp. (cepa 2) C. Agardh 1830	Mulegé
Bacillariophyceae	*Diploneis* sp. Ehrenberg ex Cleve, 1894	Ensenada
Bacillariophyceae	*Navicula* sp. (cepa 1) Bory de Saint-Vicent, 1822	Ensenada
Bacillariophyceae	*Navicula* sp. (cepa 2) Bory de Saint-Vicent, 1822	Mulegé
Bacillariophyceae	*Navicula* sp. (cepa 3) Bory de Saint-Vicent, 1822	San Quintín
Bacillariophyceae	*Navicula* sp. (cepa 4) Bory de Saint-Vicent, 1822	Ensenada
Bacillariophyceae	*Grammatophora angulosa* Ehrenberg, 1840	Ensenada
Bacillariophyceae	*Synedra* sp. Ehrenberg, 1830	San Quintín

5.3. Ensayo preliminar de crecimiento de las especies aisladas

Las curvas de crecimiento de *Heterococcus* sp., *Amphora* sp. (cepa 3), *Amphora* sp. (cepa 5) y *Cymbella* sp. (cepa 2), presentaron una fase de acondicionamiento de 3 días, mientras que *Amphora* sp. (cepa 1) mostró 2 días de fase de acondicionamiento (Figuras 2 a 5). Las especies aisladas tuvieron una fase exponencial de crecimiento que varió de 3 a 10 días (Tabla 4).

El tamaño de las microalgas aisladas fue diverso dependiendo de las características morfológicas de la especie aislada. El mayor tamaño celular se obtuvo en *Heterococcus* sp. (193.13 µm) (Tabla 4 y Figura 2), que pertenece a la clase Xantophyceae. Las células de menor tamaño fueron para *Aphanocapsa marina* (0.75 µm) que pueden formar agregados celulares y pertenece a la clase Cyanophyceae, en esta clase taxonómica también se encontraron especies que forman filamentos (*Komvophoron* sp. y *Phormidium* sp.) (Figura 2 y Tabla 4).

Entre las especies pertenecientes a la clase Bacillariophycea, *Grammatophora angulosa* fue la que tuvo el mayor tamaño celular (14.92 x 13.64 µm) (Tabla 4 y Figura 5).

Las tasas de crecimiento obtenidas entre las distintas especies aisladas tuvieron diferencias significativas ($P<0.05$), se encontró que *Amphora* sp. (cepa 6) obtuvo la mayor tasa de crecimiento (0.58 divisiones día^{-1}) (Tabla 4) de entre todas las especies aisladas.

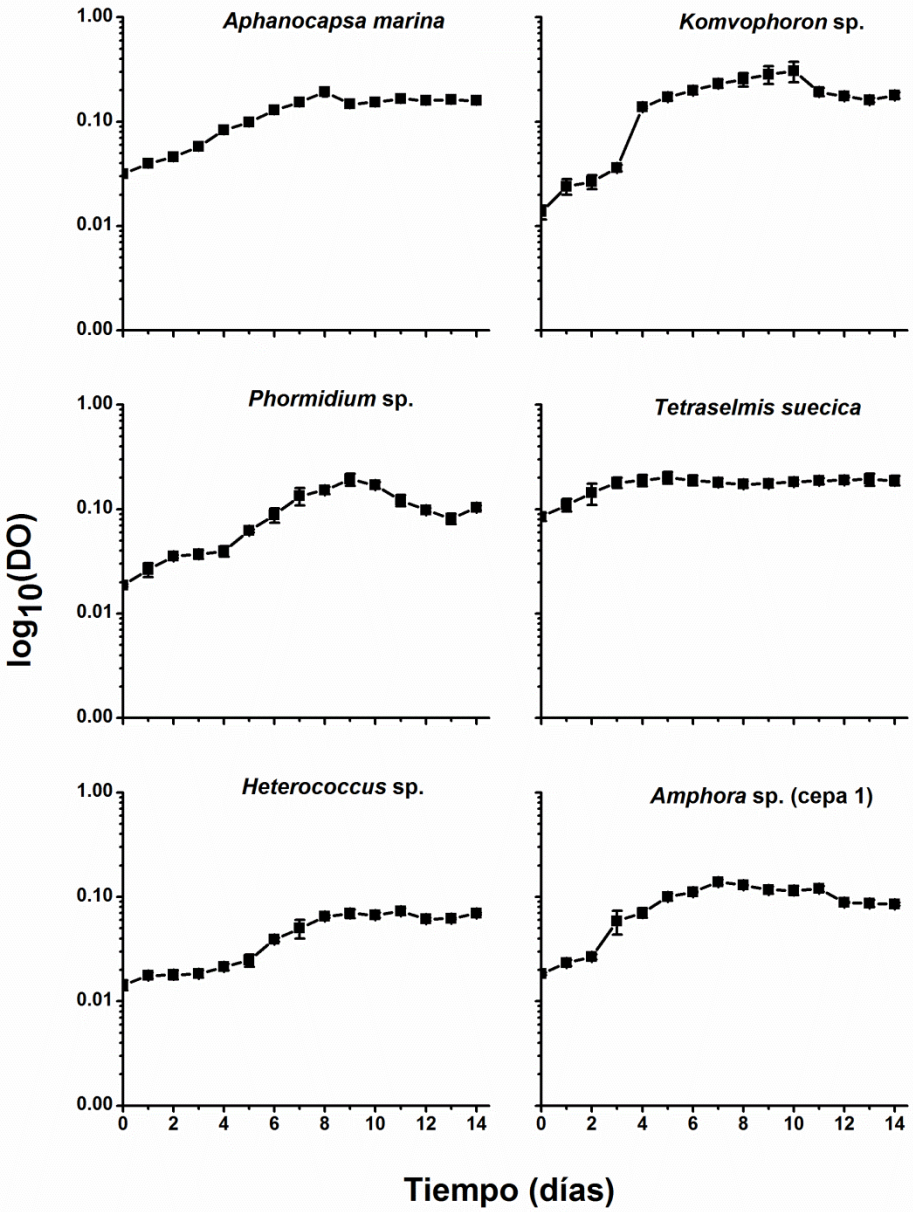

Figura 2. Curvas de crecimiento de las especies *Aphanocapsa marina*, *Komvophoron* sp., *Phormidium* sp., *Tetraselmis suecica*, *Heterococcus* sp., *Amphora* sp. (cepa 1) mantenidas en cultivo estático con medio "f" (Guillard y Ryther, 1962). Las barras verticales representan ± 1 desviación estándar (n=3).

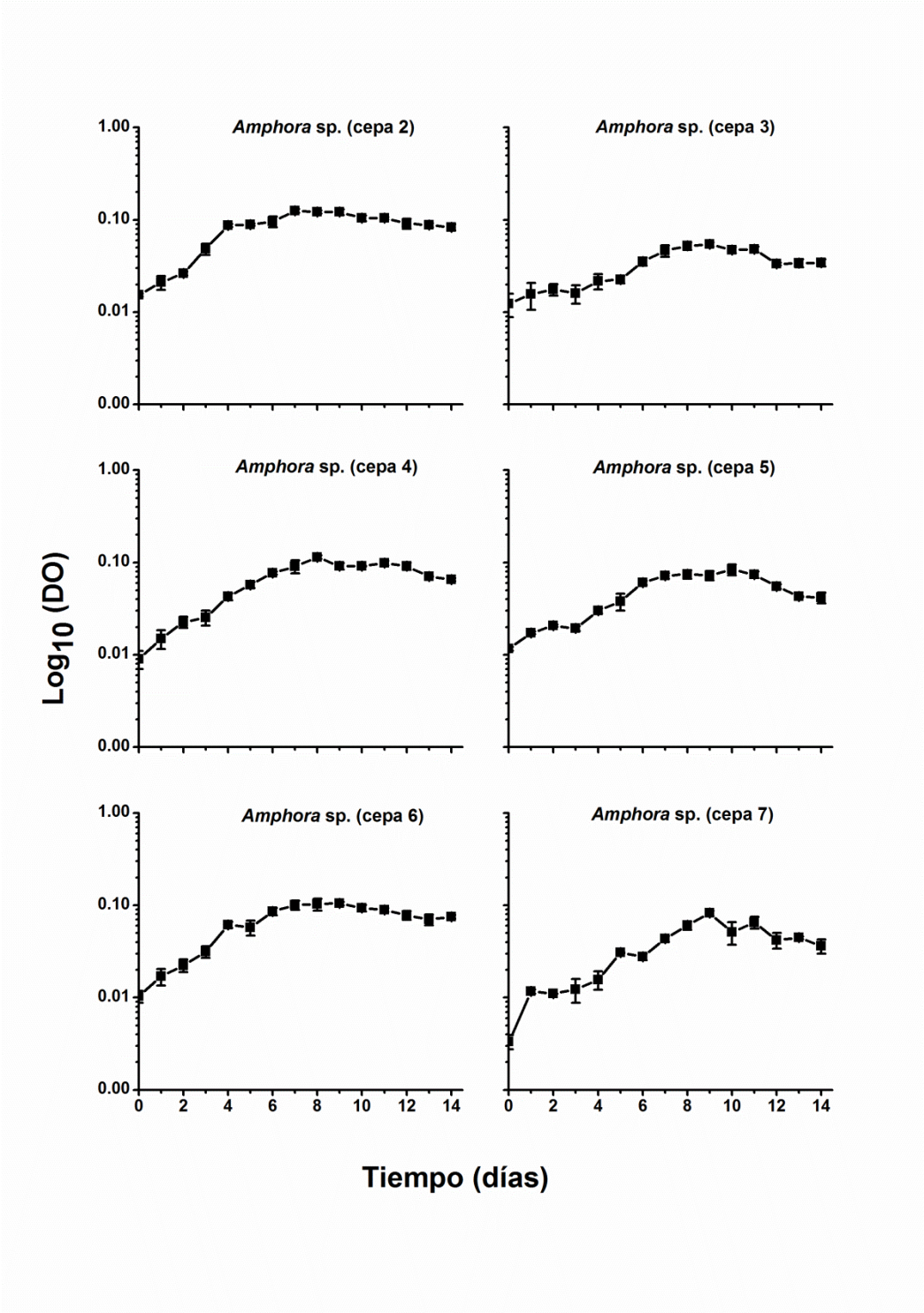

Figura 3. Curvas de crecimiento de las especies *Amphora* sp. (cepa 2), *Amphora* sp. (cepa 3), *Amphora* sp. (cepa 4), *Amphora* sp. (cepa 5), *Amphora* sp. (cepa 6), *Amphora* sp. (cepa 7) mantenidas en cultivo estático con medio "f" (Guillard y Ryther, 1962). Las barras verticales representan ± 1 desviación estándar (n=3).

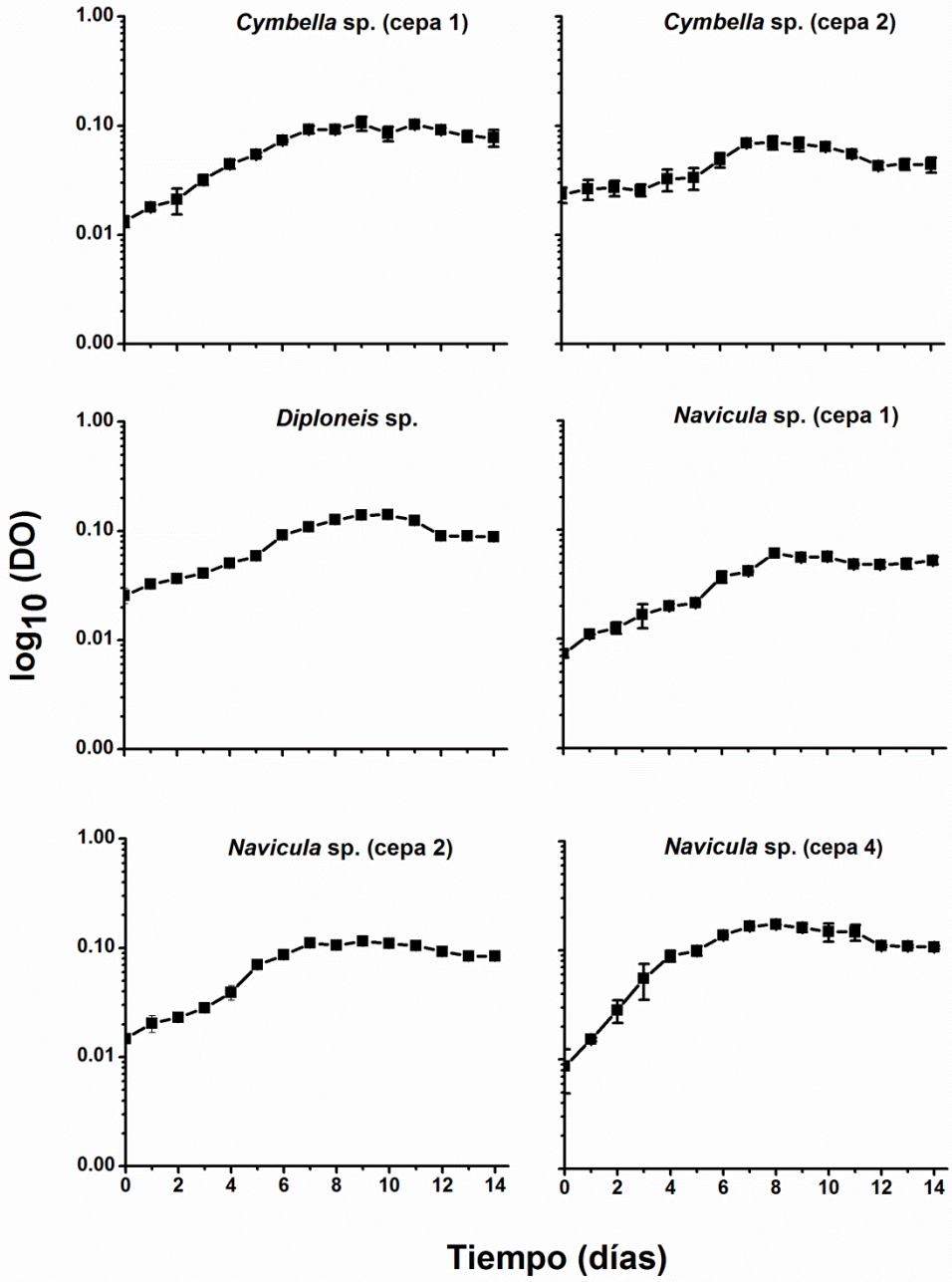

Figura 4. Curvas de crecimiento de las especies *Cymbella* sp. (cepa 1), *Cymbella* sp. (cepa 2), *Diploneis* sp., *Navicula* sp. (cepa 4), *Navicula* sp. (cepa 1), *Navicula* sp. (cepa 2) mantenidas en cultivo estático con medio "f" (Guillard y Ryther, 1962). Las barras verticales representan ± 1 desviación estándar (n=3).

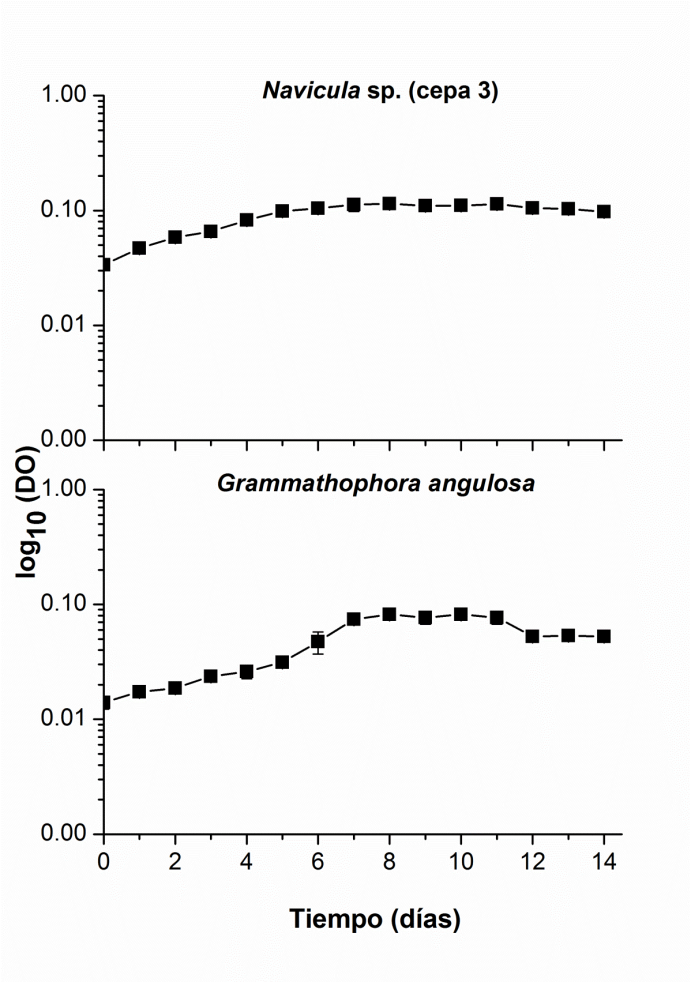

Figura 5. Curvas de crecimiento de las especies *Navicula* sp. (cepa 3) y *Grammathophora angulosa* mantenidas en cultivo estático con medio "f" (Guillard y Ryther, 1962). Las barras verticales representan ± 1 desviación estándar (n=3).

Tabla 4. Valores promedio y desviación estándar del tamaño celular, la tasa de crecimiento en fase exponencial (μ) y los días en fase de retardo de crecimiento, así como los días de duración en fase exponencial de crecimiento de las microalgas aisladas. Las letras distintas indican diferencias significativas entre las especies *P*< 0.05 a>b>c obtenidas por una prueba *a posteriori* de Tukey.

Clase y especie	Tamaño (μm)				μ (divisiones día $^{-1}$)	Fase Retardo (días)	Fase Exponencial (días)
	Largo	Ancho	Diámetro	Largo total			
Cyanophyceae							
Aphanocapsa marina			0.75 ± 0.11		0.31 ± 0.03 bc	0	8
Komvophoron sp.	1.60 ± 0.37	1.62 ± 0.33		58.0 ± 13.51	0.51 ± 0.09 ac	0	10
Phormidium sp.	1.27 ± 0.29	2.26 ± 0.39		42.5 ± 20.98	0.38 ± 0.10 ab	0	9
Chlorodendrophyceae							
Tetraselmis suecica	10.80 ± 0.88	6.90 ± 0.82			0.25 ± 0.02 b	0	3
Xanthophyceae							
Heterococcus sp.	193.13 ± 41.69	13.14 ± 1.40			0.35 ± 0.09 ab	3	5
Bacillariophyceae							
Amphora sp. (cepa 1)	14.37 ± 1.42	5.69 ± 1.17			0.41 ± 0.07 ab	2	5
Amphora sp. (cepa 2)	14.36 ± 0.68	5.56 ± 1.11			0.50 ± 0.13 ac	0	4
Amphora sp. (cepa 3)	3.65 ± 0.20	2.84 ± 0.27			0.32 ± 0.16 bc	3	5
Amphora sp. (cepa 4)	14.94 ± 1.22	5.58 ± 0.59			0.48 ± 0.01 ab	0	8
Amphora sp. (cepa 5)	15.55 ± 1.62	6.69 ± 1.60			0.41 ± 0.04 ab	3	4
Amphora sp. (cepa 6)	5.70 ± 1.03	3.68 ± 0.39			0.58 ± 0.09 a	0	6
Amphora sp. (cepa 7)	13.83 ± 0.67	3.99 ± 0.58			0.48 ± 0.07 ab	1	8
Cymbella sp. (cepa 1)	6.48 ± 0.45	3.00 ± 0.45			0.35 ± 0.05 ab	0	7
Cymbella sp. (cepa 2)	12.59 ± 1.37	2.95 ± 0.67			0.35 ± 0.10 ab	3	4
Diploneis sp.	10.21 ± 0.72	4.90 ± 0.37			0.26 ± 0.03 b	0	8
Navicula sp. (cepa 1)	6.77 ± 0.42	3.56 ± 0.54			0.38 ± 0.02 ab	0	8
Navicula sp. (cepa 2)	6.69 ± 0.74	2.80 ± 0.41			0.41 ± 0.08 ab	0	7
Navicula sp. (cepa 3)	6.61 ± 0.78	3.73 ± 0.40			0.30 ± 0.05 bc	0	5
Navicula sp. (cepa 4)	16.85 ± 1.64	4.93 ± 0.76			0.51 ± 0.12 ac	0	7
Grammatophora angulosa	14.92 ± 2.76	13.64 ± 2.21			0.30 ± 0.02 bc	0	8

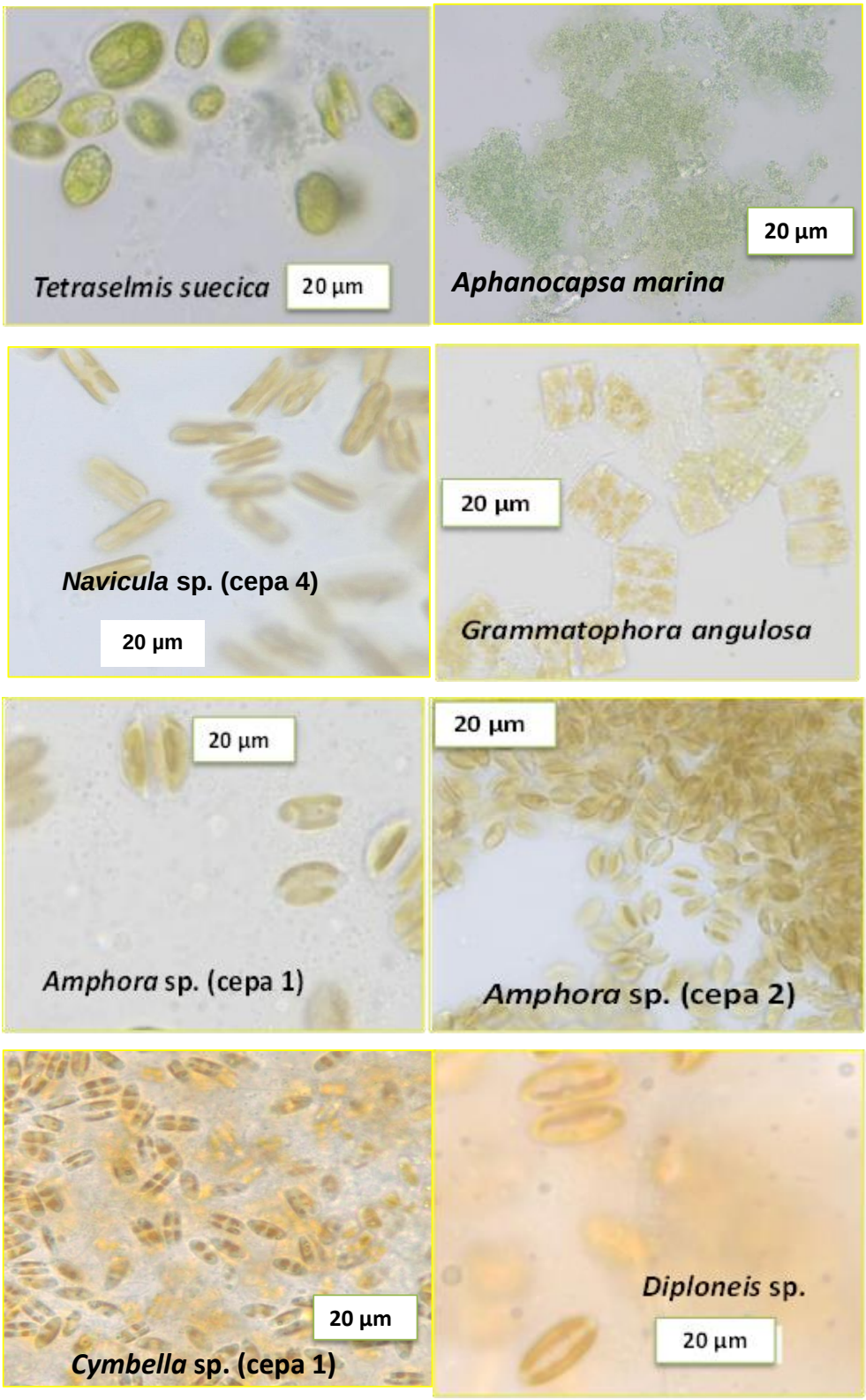

Figura 6. Imágenes de las especies aisladas de los sitios de Ensenada y Mulegé.

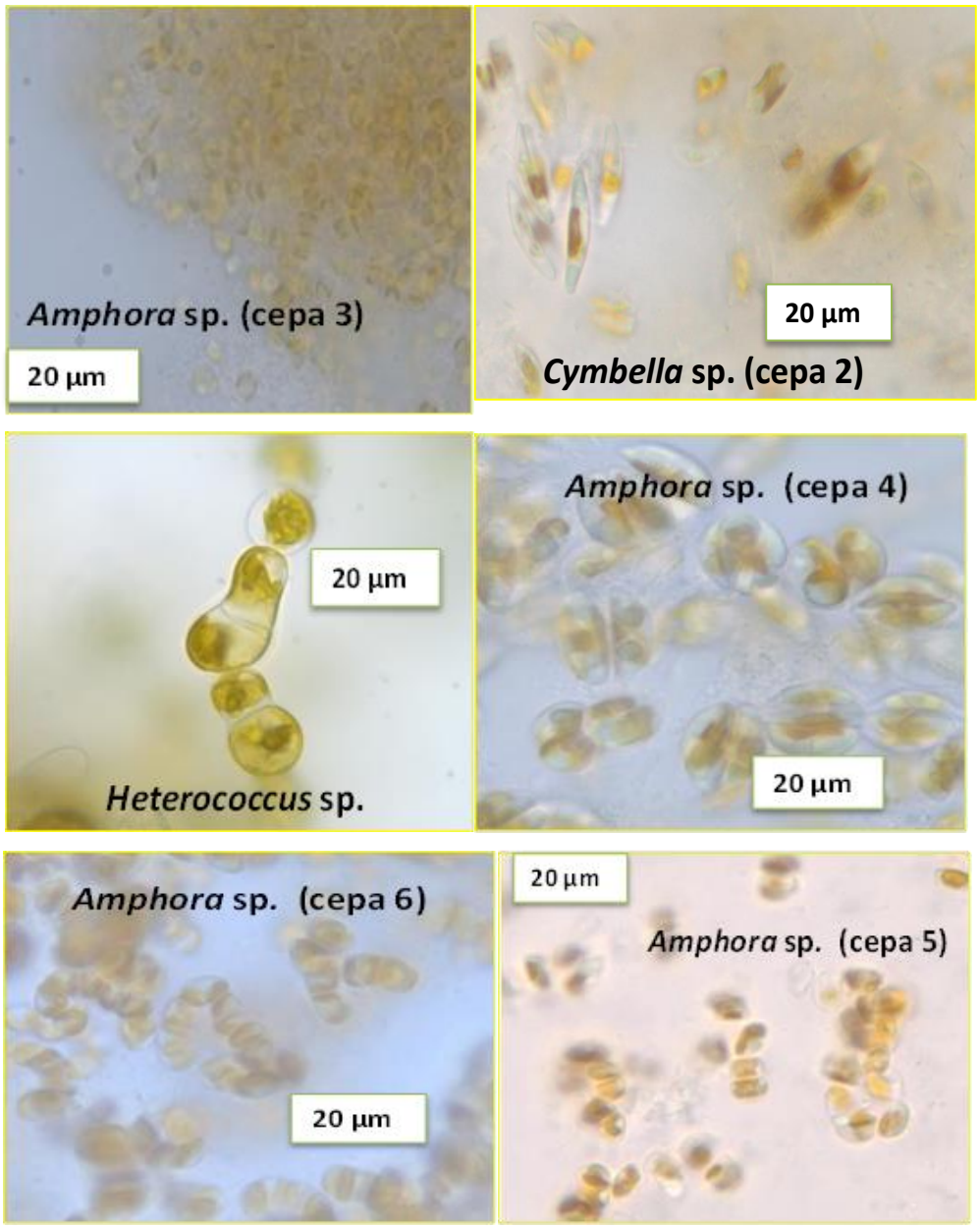

Figura 7. Imágenes de las especies aisladas de los sitios de Ensenada, Mulegé y San Quintín.

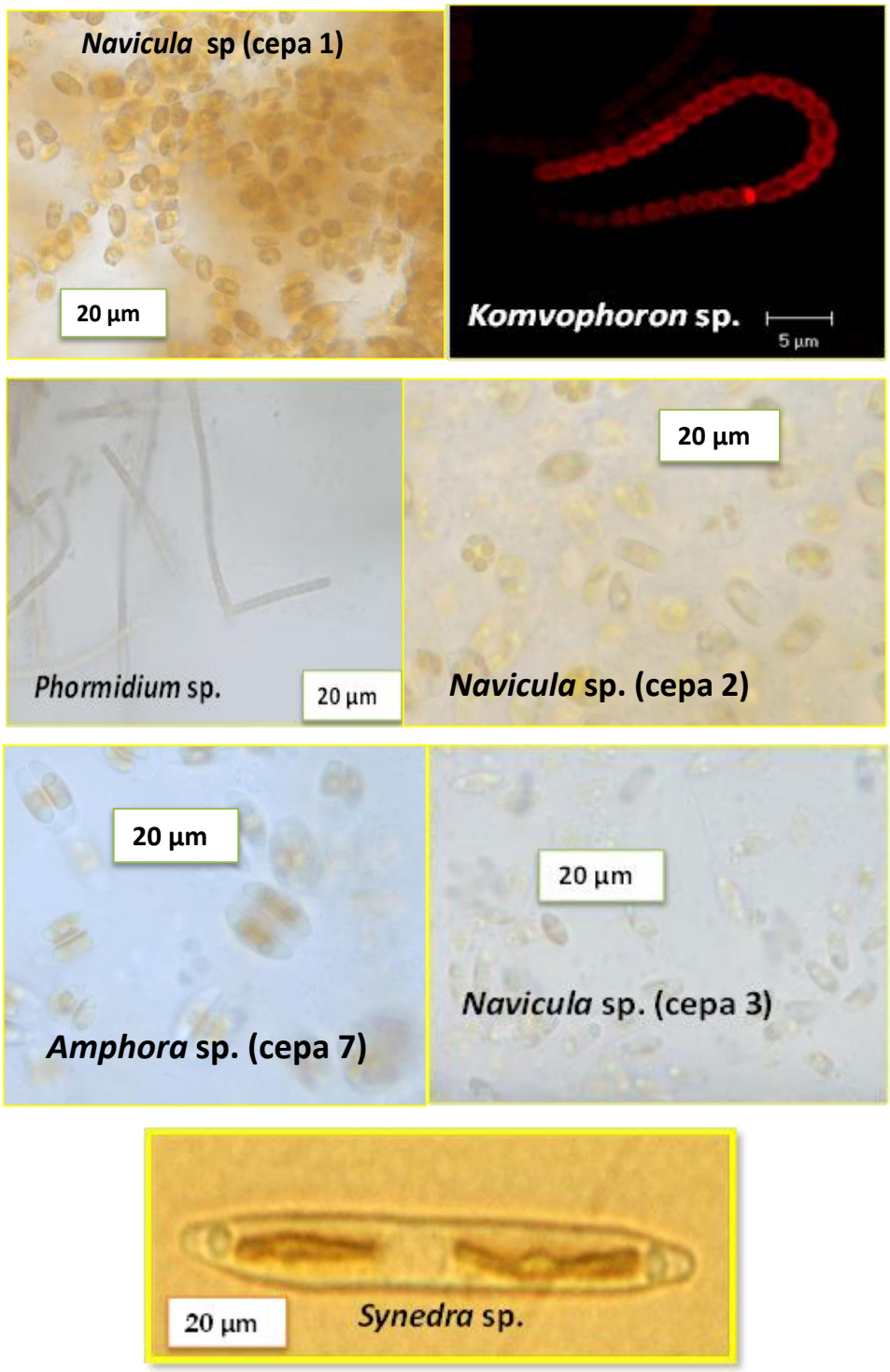

Figura 8. Imágenes de las especies aisladas de los sitios de Ensenada, Mulegé y San Quintín.

5.4. Crecimiento de cultivos monoespecíficos

La mayor densidad celular de entre todas las especies aisladas la obtuvo la cianofita *Aphanocapsa marina* (11.92x10^6 células ml^{-1}), y la menor densidad celular la presentó la especie *Phormidium* sp. (0.18x10^6 células ml^{-1}) (Tabla 5). El cultivo de la especie *Aphanocapsa marina* tuvo una fase de crecimiento exponencial de mayor duración (6 días) respecto a las otras especies (Figura 9).

La clorofíta *Tetraselmis suecica* tuvo un crecimiento exponencial desde el inicio de cultivo hasta el día 6 y obtuvo una densidad celular final de 11.92 x10^6 células ml^{-1} (Figura 10 y Tabla 5).

La xantofita *Heterococcus* sp. presentó una tendencia similar a la clorofita, de seis días en fase de crecimiento exponencial y obtuvo la menor densidad celular de entre todas las especies cultivadas (0.04x10^6 células ml^{-1}) (Figura 11 y Tabla 5).

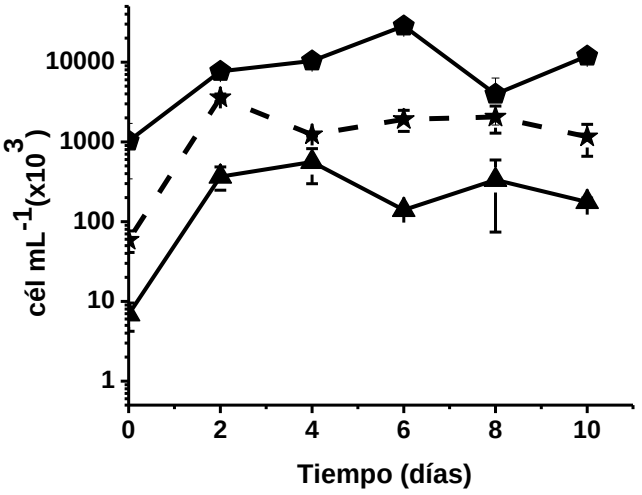

Figura 9. Curvas de crecimiento de *Aphanocapsa marina* (—●—), *Komvophoron* sp. (- ★ -) y *Phormidium* sp. (—▲—) mantenidas en cultivo estático con medio "f". Las barras verticales representan ± 1 desviación estándar (n=2).

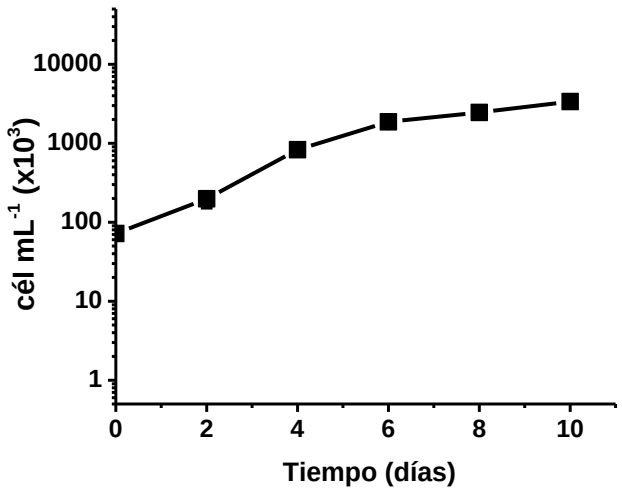

Figura 10. Curva de crecimiento de *Tetraselmis suecica* mantenida en cultivo estático con medio "f". Las barras verticales representan ± 1 desviación estándar (n=2).

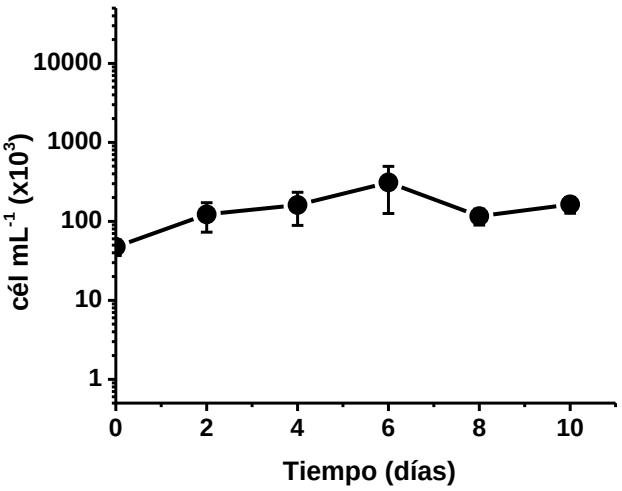

Figura 11. Curva de crecimiento de *Heterococcus* sp. mantenida en cultivo estático con medio "f". Las barras verticales representan ± 1 desviación estándar (n=2).

En el grupo de las diatomeas, las curvas de crecimiento fueron similares entre las especies, y fue la especie *Cymbella* sp. (cepa 2) (5.00 x10^6 células ml^{-1}) la que obtuvo la mayor densidad celular de entre todas las diatomeas aisladas (Figura 13 y Tabla 5), mientras que la menor densidad celular fue para la especie *Navicula* sp. (cepa 1) (0.13 x10^6 células ml^{-1}) (Figuras 12 y Tabla 5).

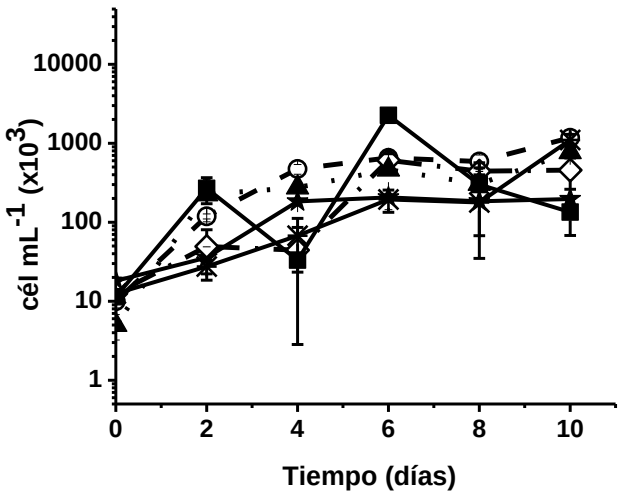

Figura 12. Curva de crecimiento de *Grammatophora angulosa* (), *Navicula* sp. (cepa 4) (), *Diploneis* sp. (), *Amphora* sp. (cepa 5) (), *Navicula* sp. (cepa 1) (), *Amphora* sp. (cepa 7) () aisladas en Ensenada y mantenidas en cultivo estático con medio "f". Las barras verticales representan ± 1 desviación estándar (n=2).

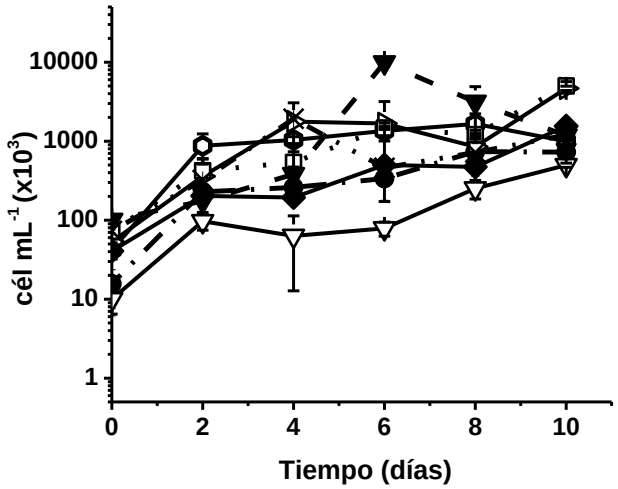

Figura 13. Curvas de crecimiento de *Amphora* sp. (cepa 1) (), *Amphora* sp. (cepa 2) (), *Cymbella* sp. (cepa 1) (), *Amphora* sp. (cepa 3), (), *Cymbella* sp. (cepa 2) (), Amphora sp. (cepa 4) (), *Amphora* sp. (cepa 6) (), *Navicula* sp. (cepa 2) () aisladas en Mulegé y mantenidas en cultivo estático con medio "f". Las barras verticales representan ± 1 desviación estándar (n=2).

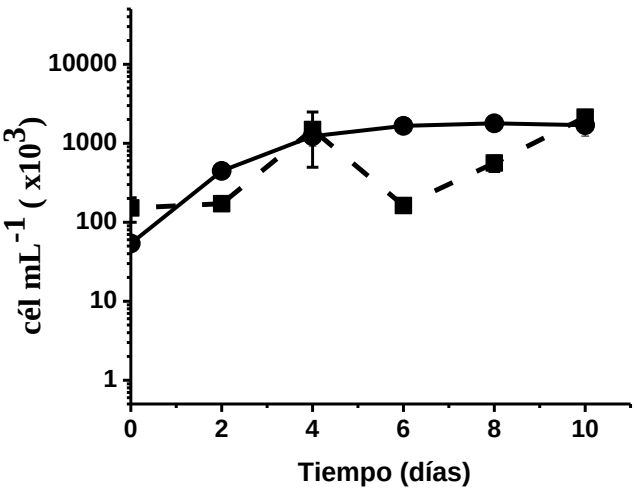

Figura 14. Curvas de crecimiento de *Navicula* sp. (cepa 3) (– ■ –) y *Synedra* sp. (—●—) aisladas en la Bahía de San Quintín y mantenidas en cultivo estático con medio "f". Las barras verticales representan ± 1 desviación estándar (n=2).

Existieron diferencias significativas entre las tasas de crecimiento de las especies aisladas ($P< 0.05$). La cianofita *Komvophoron* sp. presentó la mayor tasa de crecimiento (2.98 divisiones día^{-1}) (Tabla 5), mientras que la menor tasa de crecimiento fue para la especie *Heterococcus* sp. (0.48 divisiones día^{-1}) (Tabla 5). El tiempo de duplicación fue significativamente diferente entre las distintas especies ($P<0.05$). La especie *Heterococcus* sp. presentó el mayor tiempo de duplicación (2 días) y el menor tiempo de duplicación lo obtuvo la cianofita *Komvophoron* sp. (Tabla 5).

Tabla 5. Valores promedio y desviación estándar de la tasa de crecimiento en fase exponencial (μ), el tiempo de duplicación (Tg) y la densidad celular inicial y final de los cultivos de las especies de microalgas aisladas. Las letras distintas indican diferencias significativas entre las especies obtenidas por una prueba *a posteriori* de Tukey, *P*< 0.05: a>b>c>d>e>f.

Especies	μ (divisiones día^{-1})	Tg (días)	Densidad celular Inicial	Densidad celular Final
			Células ml^{-1} x10^{6}	
Cyanophyceae				
Aphanocapsa marina	0.83 ± 0.19 b	1.24 ± 0.28 ab	1.03 ± 0.34	11.92 ± 0.91 a
Komvophoron sp.	2.98 ± 0.30 a	0.34 ± 0.03 b	0.06 ± 0.02	1.16 ± 0.50 def
Phormidium sp.	2.32 ± 0.73 ab	0.45 ± 0.14 bd	0.01 ± 0.00	0.18 ± 0.02 f
Chlorodendrophyceae				
Tetraselmis suecica	0.59 ± 0.05 b	1.70 ± 0.16 ac	0.07 ± 0.01	3.37 ± 0.40 c
Xanthophyceae				
Heterococcus sp.	0.48 ± 0.02 b	2.07 ± 0.10 a	0.05 ± 0.01	0.16 ± 0.04 f
Bacillariophyceae				
Amphora sp. (cepa 1)	0.66 ± 0.02 b	1.52 ± 0.05 acd	0.04 ± 0.01	1.00 ± 0.09 def
Amphora sp. (cepa 2)	0.88 ± 0.10 b	1.14 ± 0.14 ab	0.02 ± 0.01	0.73 ± 0.15 ef
Amphora sp. (cepa 3)	1.65 ± 0.09 ab	0.61 ± 0.03 bd	0.01 ± 0.00	0.50 ± 0.03 ef
Amphora sp. (cepa 4)	1.18 ± 0.03 ab	0.85 ± 0.02 bc	0.07 ± 0.01	1.20 ± 0.24 def
Amphora sp. (cepa 5)	0.63 ± 0.04 b	1.59 ± 0.11 ac	0.01 ± 0.00	1.10 ± 0.19 def
Amphora sp. (cepa 6)	0.68 ± 0.24 b	1.57 ± 0.55 acd	0.04 ± 0.03	1.55 ± 0.04 de
Amphora sp. (cepa 7)	2.04 ± 1.11 ab	0.58 ± 0.31 bd	0.01 ± 0.00	0.77 ± 0.10 ef
Cymbella sp. (cepa 1)	0.98 ± 0.06 ab	1.02 ± 0.06 bc	0.05 ± 0.00	4.67 ± 0.29 bc
Cymbella sp. (cepa 2)	0.74 ± 0.13 b	1.37 ± 0.24 acd	0.07 ± 0.03	5.00 ± 0.68 b
Diploneis sp.	1.79 ± 1.38 ab	0.79 ± 0.61 bc	0.01 ± 0.01	0.46 ± 0.19 ef
Navicula sp. (cepa 1)	2.16 ± 1.24 ab	0.56 ± 0.32 bd	0.01 ± 0.00	0.13 ± 0.07 f
Navicula sp. (cepa 2)	1.10 ± 0.04 ab	0.91 ± 0.03 bc	0.10 ± 0.01	1.17 ± 0.13 def
Navicula sp. (cepa 3)	0.79 ± 0.13 b	1.29 ± 0.22 ab	0.15 ± 0.05	2.14 ± 0.17 cd
Navicula sp. (cepa 4)	0.85 ± 0.21 b	1.21 ± 0.30 ab	0.01 ± 0.00	1.17 ± 0.07 def
Grammatophora angulosa	0.58 ± 0.04 b	1.72 ± 0.13 ac	0.02 ± 0.00	0.20 ± 0.00 f
Synedra sp.	1.02 ± 0.21 ab	1.00 ± 0.21 bc	0.05 ± 0.00	1.69 ± 0.46 de

5.5. Peso seco total, peso de las cenizas y peso seco orgánico

El peso seco total no presentó diferencias significativas entre las fases de crecimiento (*P*>0.05), pero fue significativamente diferente entre las especies estudiadas (*P*<0.05).

Durante la fase exponencial de crecimiento el mayor peso seco total (395.6 pg cél^{-1}) fue obtenido para *Amphora* sp. (cepa 5) y fue significativamente diferente entre las especies aisladas (*P*<0.05) mientras que *Heterococcus* sp. presentó el mayor peso

seco (503.9 pg cél^{-1}) en la fase estacionaria de crecimiento y fue significativamente diferente al resto de las especies aisladas (Tabla 6).

El contenido de cenizas no presentó diferencias significativas (P>0.05) entre las fases de crecimiento, sin embargo existieron diferencias significativas en el contenido de cenizas entre las especies estudiadas (P<0.05). El mayor contenido de cenizas (239.3 pg cél^{-1}) en la fase exponencial de crecimiento fue obtenido para *Amphora* sp. (cepa 5) (P<0.05), mientras que *Komvophoron* sp. presentó el mayor contenido de cenizas (248.8 pg cél^{-1}) en la fase estacionaria de crecimiento (Tabla 6).

El peso seco orgánico presentó diferencias significativas entre las fases de crecimiento (P<0.05). y entre todas las especies estudiadas (P<0.05). El mayor contenido de peso seco orgánico durante la fase exponencial de crecimiento (P<0.05) fue obtenido para *Amphora* sp. (cepa 5) (156.3 pg cél^{-1}), mientras que *Heterococcus* sp. presentó el mayor peso seco orgánico (409.5 pg cél^{-1}) en la fase estacionaria de crecimiento (Tabla 6).

Tabla 6. Valores promedio y desviación estándar del peso seco total, contenido de ceniza y peso seco orgánico de 21 especies de microalgas mantenidas en cultivos estáticos. Letras distintas indican diferencias significativas entre las especies por fase de crecimiento obtenidas por una prueba *a posteriori* de Tukey, *P*<0.05: a>b>c>d>e. Números distintos indican diferencias significativas entre las especies obtenidas por una prueba *a posteriori* de Tukey, *P*<0.05: 1>2>3.

	Peso seco (pg célula^{-1})		Cenizas (pg célula^{-1})		Peso orgánico (pg célula^{-1})	
	Exponencial	Estacionaria	Exponencial	Estacionaria	Exponencial	Estacionaria
Clase y Especie						
Cyanophyceae						
Aphanocapsa marina	1.6 ± 0.1 d3	6.4 ± 1.0 c	0.4 ± 0.1 b2	1.8 ± 0.5 e	1.2 ± 0.1 e	4.6 ± 0.6 d2
Komvophoron sp.	39.8 ± 5.9 bcd1,2,3	329.5 ± 142.2 ab	21.9 ± 0.7 b1,2	248.8 ± 84.3 a	17.9 ± 6.6 e	80.7 ± 57.8 bd2
Phormidum sp.	64.6 ± 34.3 bcd1,2,3	341.6 ± 104.0 ab	33.6 ± 14.4 b1,2	170.8 ± 52.0 ac	31.0 ± 19.8 de	170.8 ± 52.0 b2
Chlorodendrophyceae						
Tetraselmis suecica	23.0 ± 0.7 cd3	28.2 ± 3.3 c	7.1 ± 0.0 b2	3.5 ± 4.0 e	15.9 ± 0.7 e	24.7 ± 0.7 d2
Xanthophyceae						
Heterococcus sp.	121.3 ± 26.5 bcd1,2	503.9 ± 114.2 a	30.4 ± 0.2 b2	94.4 ± 21.4 bce	90.2 ± 26.2 ae	409.5 ± 92.8 a1
Bacillariophyceae						
Amphora sp. (cepa 1)	13.8 ± 0.4 cd2,3	108.2 ± 67.4 c	5.2 ± 2.3 b2	47.4 ± 43.5 ce	8.7 ± 1.8 e	60.8 ± 23.9 bd2
Amphora sp. (cepa 2)	56.4 ± 13.1 bcd1,2,3	144.0 ± 22.7 bc	21.8 ± 6.6 b2	50.0 ± 16.4 ce	34.6 ± 6.5 de	94.0 ± 6.3 bd2
Amphora sp. (cepa 3)	185.6 ± 142.1 b1,2,3	20.0 ± 1.3 c	72.7 ± 48.0 b2	2.4 ± 2.0 e	112.8 ± 94.2 acd	17.6 ± 0.7 d2
Amphora sp. (cepa 4)	14.7 ± 0.4 cd3	48.5 ± 9.8 c	10.2 ± 0.5 b2	1.4 ± 0.3 e	4.5 ± 0.1 e	47.1 ± 9.6 cd2
Amphora sp. (cepa 5)	395.6 ± 19.6 a1,2,3	50.1 ± 8.9 c	239.3 ± 6.2 a1,2	6.6 ± 1.2 e	156.3 ± 13.4 a	43.5 ± 7.7 cd2
Amphora sp. (cepa 6)	163.4 ± 7.5 bc1,2,3	36.7 ± 15.9 c	31.5 ± 1.4 b2	16.1 ± 15.5 e	131.9 ± 6.0 ac	20.7 ± 0.5 d2
Amphora sp. (cepa 7)	48.9 ± 20.3 bcd2,3	86.9 ± 20.5 c	19.3 ± 7.7 b2	36.1 ± 21.9 de	29.6 ± 12.6 de	50.8 ± 1.4 cd2
Cymbella sp. (cepa 1)	18.1 ± 11.0 cd3	45.2 ± 29.5 c	11.1 ± 6.8 b2	10.3 ± 7.6 e	7.0 ± 4.2e	34.9 ± 21.8 cd2
Cymbella sp. (cepa 2)	21.1 ± 10.6 cd3	1.8 ± 0.2 c	9.0 ± 6.0 b2	0.3 ± 0.1 e	12.1 ± 4.6 e	1.5 ± 0.3 d2
Diploneis sp.	361.8 ± 57.2 a1	341.2 ± 91.9 ab	223.7 ± 59.4 a1	197.2 ± 77.8 ab	138.1 ± 2.2 ab	144.0 ± 14.1 bc1,2
Navicula sp. (cepa 1)	102.5 ± 37.1 bcd1,2,3	218.9 ± 9.8 bc	54.6 ± 19.8 b1,2	59.4 ± 4.9 acd	47.9 ± 17.3 bce	159.5 ± 4.8 bd2
Navicula sp. (cepa 2)	84.2 ± 45.4 bcd2,3	87.2 ± 17.0 c	50.4 ± 38.7 b2	27.7 ± 3.3 e	33.8 ± 6.7 de	59.6 ± 13.8 bd2
Navicula sp. (cepa 3)	27.0 ± 15.2 cd3	55.7 ± 7.6 c	16.2 ± 10.0 b2	31.6 ± 7.1 e	10.8 ± 5.2 e	24.1 ± 0.4 d2
Navicula sp. (cepa 4).	70.7 ± 20.6 bcd1,2,3	191.3 ± 48.9 bc	33.6 ± 18.2 b2	101.0 ± 34.4 bce	37.1 ± 2.4 de	90.4 ± 14.5 bd2
Grammathophora angulosa	79.9 ± 6.4 bcd2,3	88.8 ± 15.4 c	36.5 ± 3.7 b2	46.8 ± 15.6 ce	43.4 ± 2.7 ce	42.0 ± 0.2 cd2
Synedra sp.	101.6 ± 37.2 bcd2,3	83.6 ± 15.0 c	78.2 ± 28.4 b1,2	62.0 ± 10.7 ce	23.5 ± 8.8 de	21.6 ± 4.4 d2

5.6. Composición proximal

El contenido de lípidos fue significativamente diferente entre las fases de crecimiento y entre las especies ($P<0.05$). Los mayores porcentajes de lípidos se obtuvieron durante la fase exponencial de crecimiento y *Amphora* sp. (cepa 3) presentó el mayor contenido de lípidos (57.7%) y fue significativamente mayor al resto de las especies ($P<0.05$) (Tabla 7). Durante la fase estacionaria de crecimiento *Cymbella* sp. (cepa 2) presentó el mayor contenido de lípidos (52.4%) y fue significativamente diferente al resto de las especies aisladas ($P<0.05$)

El contenido de proteínas no presentó diferencias significativas ($P>0.05$) entre las fases de crecimiento. Sin embargo, el contenido de proteínas fue significativamente diferente entre las especies ($P<0.05$) y *Cymbella* sp. (cepa 2) presentó el mayor contenido de proteínas (39.5%) en la fase estacionaria de crecimiento, mientras que *Amphora* sp. (cepa 1) presentó el mayor contenido (23.7%) en fase exponencial de crecimiento y fue significativamente diferente al resto de las especies estudiadas ($P<0.05$) (Tabla 7).

El contenido de carbohidratos presentó diferencias significativas ($P<0.05$) entre las fases de crecimiento y entre las especies ($P<0.05$). En la diatomea *Cymbella* sp. (cepa 2) también se obtuvo el mayor porcentaje de carbohidratos (47.5%) en la fase estacionaria de crecimiento (Tabla 7). Durante la fase exponencial de crecimiento *Amphora* sp. (cepa 1) presentó el mayor contenido de carbohidratos (14.1%) y fue signficativamente diferente al resto de las especies aisladas.

Tabla 7. Valores promedio y desviación estándar del porcentaje de lípidos, proteínas y carbohidratos de 21 especies de microalgas mantenidas en cultivos estáticos. Letras distintas indican diferencias significativas entre las especies por fase de crecimiento obtenidas por una prueba *a posteriori* de Tukey, *P*<0.05: a>b>c>d>e. Números distintos indican diferencias significativas entre las especies por fase de crecimiento obtenidas por una prueba *a posteriori* de Tukey, *P*<0.05: 1>2>3>4

	Lípidos (%)		Proteínas (%)		Carbohidratos (%)	
	Exponencial	**Estacionaria**	**Exponencial**	**Estacionaria**	**Exponencial**	**Estacionaria**
Clase y Especie						
Cyanophyceae						
Aphanocapsa marina	22.2 ± 1.6 bcde1,3	8.7 ± 3.9 bc	7.8 ± 0.8 abcd2,3,4	9.8 ± 1.2 bcde	7.5 ± 0.6 abc	18.4 ± 1.0 bc1,2
Komvophoron sp.	12.1 ± 4.1 de3	4.9 ± 1.2 bc	3.8 ± 1.1 bcd2,3,4	9.5 ± 3.6 bcde	3.5 ± 2.1 abc	12.2 ± 12.2 bcd2,3
Phormidum sp.	18.6 ± 13.0 cde1,3	12.0 ± 5.5 bc	15.0 ± 12.7 abc1,2	23.8 ± 4.5 ab	9.8 ± 10.5 ab	21.0 ± 3.1 b1,2
Chlorodendrophyceae						
Tetraselmis suecica	34.3 ± 6.6 bcde1,3	5.8 ± 0.1 bc	16.2 ± 4.9 abc2,3	10.8 ± 1.0 bcde	5.6 ± 0.6 abc	10.8 ± 3.6 bcd2,3
Xanthophyceae						
Heterococcus sp.	15.9 ± 2.7 de1,3	23.2 ± 17.5 abc	5.8 ± 1.3 abcd2,3,4	9.0 ± 6.0 bcde	8.1 ± 0.8 ab	11.7 ± 5.3 bcd1,2,3
Bacillariophyceae						
Amphora sp. (cepa 1)	40.8 ± 9.8 abc1,3	15.6 ± 10.5 bc	23.7 ± 6.1 a1,2,3	10.7 ± 5.0 bcde	14.1 ± 0.7 a	12.7 ± 6.1 bcd1,2
Amphora sp. (cepa 2)	19.6 ± 1.9 cde2,3	8.2 ± 4.2 bc	5.2 ± 0.1 abcd2,3,4	8.7 ± 4.9 bcde	6.2 ± 2.6 abc	8.7 ± 2.3 bcd2,3
Amphora sp. (cepa 3)	57.7 ± 0.2 a1	22.0 ± 4.9 abc	12.3 ± 0.4 abc1,2,3	20.6 ± 8.0 abc	5.6 ± 2.2 abc	9.3 ± 1.1 bcd2,3
Amphora sp. (cepa 4)	28.6 ± 5.2 bcde1,3	14.9 ± 7.1 bc	13.8 ± 1.7 abc1,2,3	16.1 ± 6.9 bcd	8.3 ± 0.4 ab	13.2 ± 4.0 bcd1,2,3
Amphora sp. (cepa 5)	17.3 ± 3.1 cde1,3	10.7 ± 3.4 bc	11.9 ± 3.7 abcd2,3	11.1 ± 2.7 bcde	3.8 ± 2.4 abc	10.5 ± 5.0 bcd2,3
Amphora sp. (cepa 6)	10.5 ± 1.7 e1,3	18.7 ± 1.3 bc	2.2 ± 0.5 cd2,3,4	11.9 ± 2.0 bcde	1.8 ± 0.3 bc	21.9 ± 0.3 ab2,3
Amphora sp. (cepa 7)	46.5 ± 4.4 ab1,3	11.1 ± 5.3 bc	12.2 ± 8.6 abcd1,2,3	14.4 ± 0.3 bcde	9.0 ± 1.1 ab	8.8 ± 0.2 bcd2,3
Cymbella sp. (cepa 1)	27.5 ± 4.1 bcde1,3	4.1 ± 3.3 c	11.0 ± 2.2 abcd2,3,4	4.3 ± 3.9 de	5.1 ± 0.5 abc	2.8 ± 1.9 d2,3
Cymbella sp. (cepa 2)	24.7 ± 1.6 bcde1,2	52.4 ± 3.5 a	20.2 ± 6.4 ab1	39.5 ± 2.5 a	10.7 ± 4.1 ab	47.5 ± 13.3 a1
Diploneis sp.	20.5 ± 1.7 cde2,3	7.1 ± 0.8 bc	0.5 ± 0.2 d4	2.1 ± 0.8 e	0.5 ± 0.7 c	3.7 ± 0.6 cd3
Navicula sp. (cepa 1)	15.7 ± 1.5 de2,3	9.9 ± 2.0 bc	6.8 ± 5.7 abcd3,4	2.8 ± 1.8 de	2.5 ± 0.5 abc	3.8 ± 0.8 cd2,3
Navicula sp. (cepa 2)	29.4 ± 0.6 bcde1,3	7.5 ± 0.6 bc	10.0 ± 2.2 abcd2,3,4	3.7 ± 1.1 de	4.5 ± 3.0 abc	3.6 ± 1.4 cd2,3
Navicula sp. (cepa 3)	23.4 ± 11.4 bcde1,3	8.9 ± 3.7 bc	15.7 ± 4.8 abc1,2,3	12.6 ± 7.7 bcde	4.2 ± 0.9 abc	9.3 ± 2.5 bcd2,3
Navicula sp. (cepa 4)	15.4 ± 4.0 de3	7.1 ± 1.0 bc	4.6 ± 2.1 bcd3,4	4.5 ± 0.9 cde	6.2 ± 1.5 abc	4.6 ± 1.2 bcd2,3
Grammathophora angulosa	34.2 ± 10.2 abcd1,3	26.3 ± 10.3 ab	4.4 ± 2.0 bcd2,3,4	8.5 ± 1.7 bcde	4.9 ± 1.3 abc	7.6 ± 0.4 bcd2,3
Synedra sp.	14.6 ± 4.5 de3	7.8 ± 0.3 bc	5.0 ± 1.3 abcd2,3,4	7.8 ± 0.9 bcde	4.4 ± 0.6 abc	5.1 ± 0.7 bcd2,3

5.7. Perfiles de ácidos grasos

Fueron identificados 17 tipos de ácidos grasos de las 21 especies aisladas (Tabla 8). En el grupo de las cianofitas, *Phormidium* sp. tuvo un significativo mayor contenido ($P<0.05$) del ácido graso saturado 16:0 (47.8%), mientras que *Aphanocapsa marina* presentó el mayor contenido ($P<0.05$) del ácido graso 14:0 (29.5%) (Tabla 8).

El grupo de las cianofitas, *Aphanocapsa marina* presentó un alto contenido de ácidos grasos saturados (53.0%) y de ácidos grasos monoinsaturados (47.0%), mientras que *Komvophoron* sp. presentó un alto porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (43.9%) (Tabla 8).

Los principales ácidos grasos de la clorofita *Tetraselmis suecica* fueron 16:0 (30.3%), 18:3n-3 (ALA) (24.1%), y 20:5n-3 (EPA) (13.8%) (Tabla 8). Esta clorofita presentó un menor contenido de ácidos grasos saturados (34.8%) y de ácidos monoinsaturados (17.2%) y un alto contenido ácidos grasos poliinsaturados (48.0%) (Tabla 8).

La xantofita *Heterococcus* sp. presentó los siguientes ácidos grasos: 16:0 (23.3%), 18:3n-3 (ALA) (42.4%), 20:4n-6 (ARA) (3.2%) y 20:5n-3 (EPA) (1.5%) (Tabla 8). *Heterococcus* sp. mostró un contenido de ácidos grasos saturados de 34.1%, un bajo contenido de ácidos monoinsaturados (7.4%) y un mayor contenido de ácidos grasos poliinsaturados (58.5%) (Tabla 8).

En el grupo de las diatomeas, *Amphora* sp. (cepa 3) obtuvo el mayor contenido de ácidos grasos saturados (43.5%) y *Amphora* sp. (cepa 4) presentó un significativamente mayor porcentaje ($P<0.05$) del ácido graso saturado 16:0 (30.0%) (Tabla 8).

Para la diatomea *Navicula* sp. (cepa 4) se obtuvo el mayor contenido de ácidos grasos moinsaturados (49.2%) y también mostró el mayor contenido ($P<0.05$) del ácido graso monoinsaturado 16:1n7 cis (46.8%), mientras que para la diatomea *Amphora* sp. (cepa 5) se obtuvo el mayor contenido de ácidos grasos poliinsaturados (60.7%), así como el mayor porcentaje del ácido graso poliinsaturado 20:5n-3 (EPA) (39.6%) (Tabla 8).

Para las diatomeas se obtuvieron un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados ω-3 y ω-6 (23.4% - 60.7%). La especie *Synedra* sp. tuvo una alta proporción de DHA:EPA (0.2) mientras que para *Tetraselmis suecica* se obtuvo una alta proporción de EPA:ARA (5.2) (Tabla 8).

Tabla 8. Valores promedio y desviación estándar del porcentaje de ácidos grasos de 21 especies de microalgas mantenidas en cultivos estáticos. Letras distintas indican diferencias significativas entre las especies por ácido graso obtenidas por una prueba *a posteriori* de Tukey, *P*<0.05: a>b>c>d>e>f>g>h>i>j. ALA: ácido alfa linoleico, ARA: ácido araquidónico, EPA: ácido eicosapentaenoico, DHA: ácido docosahexaenoico, PUFA: ácidos grasos poliinsaturados.

	Cyanophyceae			**Chlorodendrophyceae**	**Xanthophyceae**
	Aphanocapsa marina	*Komvophoron* sp.	*Phormidum* sp.	*Tetraselmis suecica*	*Heterococcus* sp.
Ácidos grasos					
Saturados					
14:0	29.5 ± 0.2 a			1.2 ± 0.0 i	6.7 ± 0.4 g
15:0					1.1 ± 0.0 c
16:0	21.5 ± 0.2 fg	32.0 ± 0.4 b	47.8 ± 2.0 a	30.3 ± 1.0 bc	23.3 ± 1.5 ef
18:0	2.0 ± 0.0 e	3.8 ± 0.0 b	2.3 ± 0.1 d	3.3 ± 0.0 c	
24:0					2.9 ± 0.3 b
Suma	53.0	35.8	50.1	34.8	34.1
Monoinsaturados					
14:1n-5 cis	1.5 ± 0.0				
15:1n-5 cis					
16:1n-7 cis	44.1 ± 0.0 a	15.3 ± 0.1 gh	5.8 ± 0.0 ij	9.7 ± 0.2 hi	4.3 ± 3.4 j
18:1n-9	1.4 ± 0.0 j	4.9 ± 0.0 cd	13.2 ± 0.6 a	7.5 ± 0.2 b	3.2 ± 0.6 fg
22:1n-9					
Suma	47.0	20.3	19.0	17.2	7.4
Poliinsaturados					
18:2n-6 tra		6.4 ± 0.0 c	17.5 ± 0.6 a	6.4 ± 0.2 c	9.9 ± 0.6 b
18:3n-6					1.4 ± 0.2 bc
18:3n-3 (ALA)		37.5 ± 0.4 a	13.4 ± 0.5 c	24.1 ± 0.5 b	42.4 ± 6.3 a
20:2n-6				1.1 ± 0.0	
20:4n-6 (ARA)				2.6 ± 0.0 i	3.2 ± 0.0 i
20:5n-3 (EPA)				13.8 ± 0.4 fg	1.5 ± 0.4 h
22:6n-3 (DHA)					
Suma PUFA		43.9	30.9	48.0	58.5
Suma n-3 PUFA		37.5	13.4	37.9	43.9
Suma n-6 PUFA		6.4	17.5	10.1	14.5
Total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
DHA:EPA				0.0	0.0
EPA:ARA				5.2	0.5

Tabla 8. Continuación…

	Bacillariophyceae				
	Amphora sp. (cepa 1)	*Amphora* sp. (cepa 2)	*Amphora* sp. (cepa 3)	*Amphora* sp. (cepa 4)	*Amphora* sp. (cepa 5)
Ácidos grasos					
Saturados					
14:0	9.6 ± 0.3 f	10.3 ± 0.2 f	5.7 ± 0.5 g	6.4 ± 0.0 g	13.9 ± 0.1 de
15:0	8.5 ± 0.1 a	9.5 ± 0.2 a		4.4 ± 0.0 b	1.1 ± 0.0 c
16:0	23.0 ± 0.0 efg	22.3 ± 0.4 fg	27.0 ± 1.0 cd	30.0 ± 0.2 bc	13.7 ± 0.0 i
18:0			4.3 ± 0.3 a	1.5 ± 0.0 fg	1.1 ± 0.0 i
24:0			6.4 ± 0.1 a		
Suma	41.0	42.1	43.5	42.3	29.8
Monoinsaturados					
14:1n-5 cis					
15:1n-5 cis	2.1 ± 0.0 bc	2.6 ± 0.0 ab			
16:1n-7 cis	22.3 ± 0.0 def	22.0 ± 0.4 defg	20.3 ± 0.4 efg	30.4 ± 0.2 bc	5.7 ± 0.1 ij
18:1n-9	4.3 ± 0.0 ce	3.6 ± 0.0 ef	5.2 ± 0.4 c	3.9 ± 0.0 def	3.7 ± 0.0 ef
22:1n-9					
Suma	28.6	28.1	25.5	34.4	9.4
Poliinsaturados					
18:2n-6 tra	1.7 ± 0.0 de	1.9 ± 0.0 d		2.0 ± 0.0 d	1.2 ± 0.0 f
18:3n-6	1.6 ± 0.0 bc	1.4 ± 0.0 bc		1.4 ± 0.0 bc	1.7 ± 0.0 b
18:3n-3 (ALA)			1.2 ± 0.0 d		
20:2n-6					
20:4n-6 (ARA)	5.7 ± 0.1 gh	6.0 ± 0.2 gh		5.1 ± 0.1 h	16.4 ± 0.1 a
20:5n-3 (EPA)	20.3 ± 0.2 df	19.5 ± 0.6 df	29.9 ± 0.5 b	14.8 ± 0.2 fg	39.6 ± 0.1 a
22:6n-3 (DHA)	1.0 ± 0.0 d	1.0 ± 0.0 d			1.8 ± 0.0 bc
Suma PUFA	30.3	29.7	31.1	23.4	60.7
Suma n-3 PUFA	21.3	20.4	31.1	14.8	41.4
Suma n-6 PUFA	9.0	9.3	0.0	8.6	19.3
Total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
DHA:EPA	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
EPA:ARA	3.5	3.3		2.9	2.4

Tabla 8. Continuación…

	Bacillariophyceae				
	Amphora sp. (cepa 6)	*Amphora* sp. (cepa 7)	*Cymbella* sp. (cepa 1)	*Cymbella* sp. (cepa 2)	*Navicula* sp. (cepa 2)
Ácidos grasos					
Saturados					
14:0	7.0 ± 0.7 g	12.4 ± 0.8 e	23.1 ± 1.4 b	15.6 ± 0.0 cd	5.8 ± 0.4 g
15:0	9.0 ± 0.7 a	1.1 ± 0.0 c	4.3 ± 0.7 b	4.6 ± 0.0 b	1.0 ± 0.0 c
16:0	20.0 ± 0.9 gh	14.3 ± 0.3 i	5.8 ± 0.9 j	7.2 ± 0.0 j	20.2 ± 0.0 gh
18:0	1.1 ± 0.0 i	1.7 ± 0.0 f	1.3 ± 0.0 gh	1.6 ± 0.0 f	2.1 ± 0.0 de
24:0					5.9 ± 0.3 a
Suma	37.1	29.5	34.6	29.1	35.1
Monoinsaturados					
14:1n-5 cis					
15:1n-5 cis	2.1 ± 0.2 bc		2.9 ± 0.5 a	1.5 ± 0.0 c	1.9 ± 0.0 bc
16:1n-7 cis	18.6 ± 1.5 fg	25.8 ± 1.0 cdef	24.8 ± 2.7 cdef	20.6 ± 0.1 efg	25.8 ± 0.1 cde
18:1n-9	5.0 ± 0.2 cd	4.5 ± 0.1 ce	1.6 ± 0.0 ij	2.4 ± 0.0 gi	2.2 ± 0.5 hi
22:1n-9					
Sum	25.7	30.3	29.3	24.5 ± 0.0	29.9
Poliinsaturados					
18:2n-6 tra	1.7 ± 0.1 de	1.2 ± 0.0 f		1.0 ± 0.0 f	
18:3n-6	1.2 ± 0.1 c	1.8 ± 0.0 b			
18:3n-3 (ALA)					
20:2n-6					
20:4n-6 (ARA)	6.9 ± 1.0 fgh	13.0 ± 0.7 bc	7.5 ± 1.6 eg	11.2 ± 0.1 cd	8.4 ± 0.2 ef
20:5n-3 (EPA)	25.8 ± 3.9 bd	24.2 ± 1.3 bde	28.6 ± 6.7 bc	31.8 ± 0.2 ab	24.6 ± 0.9 bde
22:6n-3 (DHA)	1.5 ± 0.2 c			2.3 ± 0.0 b	2.1 ± 0.2 b
Suma PUFA	37.1	40.2	36.1	46.4	35.0
Suma n-3 PUFA	27.3	24.2	28.6	34.1	26.7
Suma n-6 PUFA	9.8	16.0	7.5	12.3	8.4
Total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
DHA:EPA	0.1	0.0	0.0	0.1	0.1
EPA:ARA	3.7	1.9	3.8	2.8	2.9

Tabla 8. Continuación…

	Bacillariophyceae				
	Navicula sp. (cepa 3)	*Navicula* sp. (cepa 4)	*Diploneis* sp.	*Grammathophora angulosa*	*Synedra* sp.
Ácidos grasos					
Saturados					
14:0	4.0 ± 0.2 h	7.1 ± 0.1 g	15.1 ± 0.0 cd	17.1 ± 0.6 c	4.0 ± 0.2 h
15:0			4.2 ± 0.0 b		
16:0	26.1 ± 1.0 de	17.5 ± 0.3 h	13.3 ± 0.1 i	20.7 ± 1.1 fg	22.2 ± 0.3 fg
18:0	2.2 ± 0.0 de	2.1 ± 0.0 de	3.2 ± 0.0 c	1.2 ± 0.1 hi	1.4 ± 0.0 gh
24:0	5.3 ± 0.7 a				2.6 ± 0.1 b
Suma	37.7	26.6	35.8	38.9	30.2
Monoinsaturados					
14:1n-5 cis					
15:1n-5 cis					
16:1n-7 cis	29.5 ± 1.1 bd	46.8 ± 1.1 a	20.2 ± 0.1 efg	9.6 ± 0.5 hi	34.5 ± 0.6 b
18:1n-9	2.5 ± 0.3 gh	1.4 ± 0.0 j	5.0 ± 0.0 cd	11.5 ± 0.7 a	3.5 ± 0.1 ef
22:1n-9		1.0 ± 0.0			
Suma	32.0	49.2	25.2	21.1	38.0
Poliinsaturados					
18:2n-6 tra			1.3 ± 0.0 ef	9.1 ± 0.6 b	1.2 ± 0.0 f
18:3n-6				4.4 ± 0.3 a	
18:3n-3 (ALA)	3.3 ± 0.1 d				
20:2n-6					
20:4n-6 (ARA)		14.1 ± 0.1 ab		14.6 ± 0.3 ab	9.6 ± 0.2 de
20:5n-3 (EPA)	27.0 ± 1.3 bd	24.2 ± 0.8	21.9 ± 0.1 cde	11.9 ± 0.2 g	18.0 ± 0.4 efg
22:6n-3 (DHA)		1.6 ± 0.1 c			3.0 ± 0.3 a
Suma PUFA	30.3	24.2	39.0	39.9	31.8
Suma n-3 PUFA	30.3	24.2	23.6	11.9	20.9
Suma n-6 PUFA	0.0	0.0	15.4	28.1	10.9
Total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
DHA:EPA	0.0	0.0	0.1	0.0	0.2
EPA:ARA			1.6	0.8	1.9

5.8. Ensayo de toxicidad

Los resultados del ensayo de toxicidad de las 21 especies de microalgas aisladas, muestran que ningún medio residual de cultivo de las especies aisladas fue tóxico para los nauplios de *Artemia franciscana* y que la mayoría de las especies obtuvieron valores de supervivencia superiores al 94% (Tabla 9). La cianofita *Phormidium* sp. presentó el menor porcentaje de supervivencia (94%), seguida por los valores obtenidos para las diatomeas *Navicula* sp. (cepa 2) (95%), *Grammatophora angulosa* (97%), *Diploneis* sp. (97%) y *Navicula* sp. (cepa 3) (97%) (Tabla 9).

Tabla 9. Porcentaje de supervivencia de *Artemia franciscana* y las densidades celulares de 21 especies de microalgas utilizadas para realizar el ensayo de toxicidad.

	Supervivencia (%)	**Células ml^{-1} $x10^5$**
Tratamientos control		
Medio ”f”	100	
Agua de mar	97	
Cepas utilizadas en los tratamientos		
Cyanophyceae		
Aphanocapsa marina	100	147.38
Komvophoron sp.	100	9.13
Phormidium sp.	94	0.49
Chlorodendrophyceae		
Tetraselmis suecica	100	18.44
Xanthophyceae		
Heterococcus sp.	100	2.51
Bacillariophyceae		
Amphora sp. (cepa 1)	100	9.38
Amphora sp. (cepa 2)	100	6.13
Amphora sp. (cepa 3)	100	0.69
Amphora sp. (cepa 4)	100	6.00
Amphora sp. (cepa 5)	100	2.75
Amphora sp. (cepa 6)	100	11.06
Amphora sp. (cepa 7)	100	153.06
Cymbella sp. (cepa 1)	100	0.79
Cymbella sp. (cepa 2)	100	8.94
Diploneis sp.	97	2.50
Navicula sp. (cepa 1)	100	0.30
Navicula sp. (cepa 2)	95	3.19
Navicula sp. (cepa 3)	97	3.63
Navicula sp. (cepa 4)	100	2.63
Grammatophora angulosa	97	1.70
Synedra sp.	100	6.03

5.9. Efecto de distintas condiciones experimentales

5.9.1. Crecimiento de las cuatro especies seleccionadas

5.9.1.1. *Tetraselmis suecica*

Las curvas de crecimiento de *Tetraselmis suecica* mostraron que los cultivos tuvieron fase de crecimiento exponencial desde el inicio del cultivo (Figura 15).

La mayor tasa de crecimiento (0.54 divisiones día^{-1}) para *Tetraselmis suecica* se obtuvo con un aporte de nitrato de sodio, a una temperatura de 20 °C y a una irradiancia de 200 µE m^{-2} s^{-1} y fue significativamente diferente (P<0.05) al resto de las condiciones experimentales por efecto de la interacción de las variables estudiadas (Tabla 10). Tambien hubo diferencias significativas en los valores de tasa de crecimiento por efecto del aporte de nitrógeno (P<0.05) y por la interacción del aporte de nitrógeno con la irradiancia (P<0.05) (Tabla 10). No hubo diferencias significativas en la tasa de crecimiento por efecto de la temperatura (P>0.05) (Tabla 10).

Los tiempos de duplicación para *Tetraselmis suecica* en las diferentes condiciones experimentales presentaron diferencias significativas (P<0.05) por efecto del aporte de nitrógeno en el medio de cultivo y por la interacción del aporte de nitrógeno, la temperatura y la irradiancia (P<0.05). El tiempo de duplicación fue de 2 días para *Tetraselmis suecica* en la mayoría de las condiciones experimentales (Tabla 10). No existieron diferencias significativas en los tiempos de duplicación por efecto de la temperatura (P> 0.05), o la irradiancia (P>0.05) (Tabla 10).

La mayor densidad celular (5.71x10^{6} células ml^{-1}) de la especie *Tetraselmis suecica* fue obtenida al mantener los cultivos con una temperatura de 25 °C, con nitrato de amonio y una irradiancia de 100 µE m^{-2} s^{-1} y fue significativamente diferente (P<0.05) por efecto de la interacción del aporte de nitrógeno, la temperatura y la irradiancia (Tabla 10).

5.9.1.2. *Aphanocapsa marina*

Las curvas de crecimiento de los cultivos de *Aphanocapsa marina* mantenidos con un aporte de nitrato de amonio estuvieron en fase exponencial de crecimiento desde el inicio del cultivo (Figura 15).

La tasa de crecimiento de los cultivos de *Aphanocapsa marina* presentaron diferencias significativas ($P<0.05$) entre las distintas condiciones experimentales y se encontró interacción significativa entre el aporte de nitrógeno, la temperatura y la irradiancia (Tabla 10). La mayor tasa de crecimiento (0.57 divisiones día^{-1}) se obtuvo al mantener los cultivos en 20 °C con un aporte de nitrato de sodio y una irradiancia de 200 µE m^{-2} s^{-1} (Tabla 10).

Los tiempos de duplicación para los cultivos de *Aphanocapsa marina* mantenidas en las diferentes condiciones experimentales fueron significativamente diferentes ($P<0.05$). El mayor valor de tiempo de duplicación (2.74 días) fue obtenido en la condición experimental de 20 °C, con un aporte de nitrato de sodio y una irradiancia de 100 µE m^{-2} s^{-1} por efecto de la interacción del aporte de nitrógeno, temperatura e irradiancia (Tabla 10).

La mayor densidad celular (43.20x10^{6} células ml^{-1}) de los cultivos de *Aphanocapsa marina* entre las distintas condiciones experimentales se obtuvo con los cultivos mantenidos a una temperatura de 25 °C, con un aporte de nitrato de sodio y una irradiancia de 100 µE m^{-2} s^{-1} y fueron significativamente diferentes ($P<0.05$) por efecto de la interacción de la temperatura (20 °C) con la irradiancia (200 µE m^{-2} s^{-1}) (Tabla 10).

No hubo diferencias significativas en los valores de densidad celular por efecto del aporte de nitrógeno ($P>0.05$), o la temperatura ($P>0.05$), o la irradiancia ($P>0.05$). Tampoco existieron diferencias significativas por efecto de la interacción del aporte de nitrógeno, la temperatura y la irradiancia ($P>0.05$) (Tabla 10).

5.9.1.3. *Heterococcus* sp.

Los cultivos mantenidos en las distintas condiciones experimentales, presentaron una fase de acondicionamiento de 2 a 5 días (Figura 15). Las curvas de crecimiento

obtenidas en los cultivos mantenidos a una irradiancia de 200 µE m^{-2} s^{-1} mostraron crecimiento similares para ambos tipos de aporte de nitrógeno y de temperatura (Figura 15).

Las tasas de crecimiento para *Heterococcus* sp. presentaron diferencias significativas ($P<0.05$) entre las distintas condiciones experimentales por efecto del aporte de nitrógeno ($P<0.05$), además hubo interacciones significativas ($P<0.05$) entre la temperatura y el aporte de nitrógeno ($P<0.05$), así como entre la irradiancia y el aporte de nitrógeno ($P<0.05$). La mayor tasa de crecimiento (0.33 divisiones $día^{-1}$) para *Heterococcus* sp. fue obtenida en la condición experimental mantenida con un aporte de nitrato de sodio, a 20 °C y 100 µE m^{-2} s^{-1} (Tabla 10). No se encontró interacción significativa entre las variables estudiadas ($P>0.05$) (Tabla 10).

Los tiempos de duplicación para *Heterococcus* sp. mostraron diferencias significativas ($P<0.05$) por el efecto del aporte químico de nitrógeno y por la interacción entre la temperatura y el aporte de nitrógeno ($P<0.05$) además por la interacción del aporte de nitrógeno y la irradiancia. El mayor tiempo de duplicación (4 días) fue obtenido en los cultivos mantenidos a una temperatura de 20 ºC, con un aporte de nitrato de amonio y a una irradiancia de 100 µE m^{-2} s^{-1} (Tabla 10).

Las densidades celulares de los cultivos de *Heterococcus* sp. fueron significativamente diferentes ($P<0.05$) por efecto de la interacción del aporte de nitrato de sodio y la irradiancia de 100 µE m^{-2} s^{-1}. Los cultivos mantenidos a una temperatura de 25 °C, con aporte de nitrato de sodio y a una irradiancia de 100 µE m^{-2} s^{-1} obtuvieron la mayor densidad celular (0.25×10^6 células ml^{-1}) (Tabla 10).

Las densidades celulares no fueron estadísticamente diferentes por efecto de aporte de nitrógeno ($P>0.05$), o la temperatura ($P>0.05$), o la irradiancia ($P>0.05$) (Tabla 10). Tampoco hubo diferencias significativas ($P>0.05$) en los valores de densidad celular por la interacción del aporte de nitrógeno, la temperatura y la irradiancia (Tabla 10).

5.9.1.4. *Navicula* sp. (cepa 3)

Los cultivos de *Navicula* sp. (cepa 3) mantenidos con un aporte de nitrato de sodio presentaron una fase de acondicionamiento de 2 días, mientras que los cultivos mantenidos con un aporte de nitrato de amonio tuvieron 4 ó 5 días de acondicionamiento (Figura 15).

Las tasas de crecimiento de los cultivos de *Navicula* sp. (cepa 3) entre las distintas condiciones experimentales fueron significativamente diferentes por efecto de la temperatura ($P<0.05$) y por el aporte de nitrógeno ($P<0.05$). La mayor tasa de crecimiento (0.32 divisiones día^{-1}) se presentó al cultivar a *Navicula* sp. (cepa 3) con nitrato de sodio, a 25 °C y 100 µE m^{-2} s^{-1} (Tabla 10). No existieron diferencias signifcativas en las tasa de crecimiento por efecto de la irradiancia ($P>0.05$), y tampoco mostraron diferencias significativas ($P>0.05$) por la interacción del aporte de nitrógeno, la temperatura y la irradiancia (Tabla 10).

Los tiempos de duplicación de *Navicula* sp. (cepa 3) fueron sinificativamente diferentes entre las condiciones experimentales por efecto de la temperatura ($P<0.05$) y por el aporte de nitrógeno ($P<0.05$). El máximo valor del tiempo de duplicación (5 días) se obtuvo al cultivar a *Navicula* sp. (cepa 3) en un medio con un aporte de nitrato de amonio, a 20 °C y 200 µE m^{-2} s^{-1}. No existieron diferencias significativas en los tiempos de duplicación por el efecto de la la irradiancia ($P>0.05$), tampoco se presentó interacción significativa entre las variables estudiadas ($P>0.05$) (Tabla 10).

La densidad celular de los cultivos de *Navicula* sp. (cepa 3) fueron significativamente diferentes ($P<0.05$) por efecto del aporte de nitrógeno (nitrato de sodio). En los cultivos mantenidos en la condición experimental de 20 °C, con un aporte de nitrato de sodio y a una irradiancia de 100 µE m^{-2} s^{-1} fue obtenida la mayor densidad celular (2.02x10^{6} células ml^{-1}). No existieron diferencias significativas en los valores de densidad celular por efecto de la temperatura ($P>0.05$), o la irradiancia ($P>0.05$) (Tabla 10). Las densidades celulares de los cultivos mantenidos en diferentes condiciones experimentales no mostraron una interacción significativa ($P>0.05$) entre el aporte de nitrógeno, la temperatura y la irradiancia (Tabla 10).

5.9.1.5. Comparación del crecimiento de las cuatro especies

Para la especie *Aphanocapsa marina* se obtuvo la mayor tasa de crecimiento (0.57divisiones día^{-1}) en los cultivos mantenidos con un aporte de nitrato de sodio, a una temperatura de 20 °C y a una irradiancia de 200 µE m^{-2} s^{-1} y fue significativamente diferente a la evaluada para las otras especies estudiadas (P<0.05) por efecto de la interacción entre el tipo de especie, el aporte de nitrógeno, la irradiancia y la temperatura (Tabla 10). También hubo diferencias significativas en los valores de las tasas de crecimiento por el efecto del aporte de nitrógeno (P<0.05), o la temperatura (P<0.05), o la irradiancia (P<0.05) (Tabla 10).

Para la diatomea *Navicula* sp. (cepa 3) se obtuvo el mayor tiempo de duplicación (5 días) entre las cuatro especies, a una temperatura de 20 °C, con un aporte de nitrato de amonio y a una irradiancia de 200 µE m^{-2} s^{-1} y fue significativamente diferente (P<0.05) al resto de las especies por efecto de la interacción de la temperatura, el aporte de nitrógeno y irradiancia (Tabla 10).

Los tiempos de duplicación de los cultivos mantenidos a diferentes condiciones experimentales también presentaron diferencias significativas por el efecto del aporte de nitrógeno (P<0.05), o la temperatura (P<0.05), o la irradiancia (P<0.05) (Tabla 10). No existieron diferencias significativas en los tiempos de duplicación por la interacción del tipo de especie, la temperatura, el aporte de nitrógeno y la irradiancia (P>0.05) (Tabla 10).

Las densidades celulares presentaron diferencias significativas ($P<0.05$) entre las cuatro especies por efecto de la interacción del tipo de la especie, el aporte de nitrógeno y la irradiancia, se encontró que la cianobacteria *Aphanocapsa marina* fue quien obtuvo la mayor densidad celular (43.19x10^{6} células ml^{-1}) al cultivarla con nitrato de sodio, a una temperatura de 20 ºC y a una irradiancia de 200 µE m^{-2} s^{-1} (Tabla 10). No hubo diferencias en la densidad celular por el efecto del aporte de nitrógeno (P>0.05), o la temperatura (P>0.05), o la irradiancia (P>0.05) (Tabla 10). No existieron diferencias significativas (P>0.05) en los valores de densidad celular por la interacción del aporte químico de nitrógeno, la temperatura, la irradiancia.

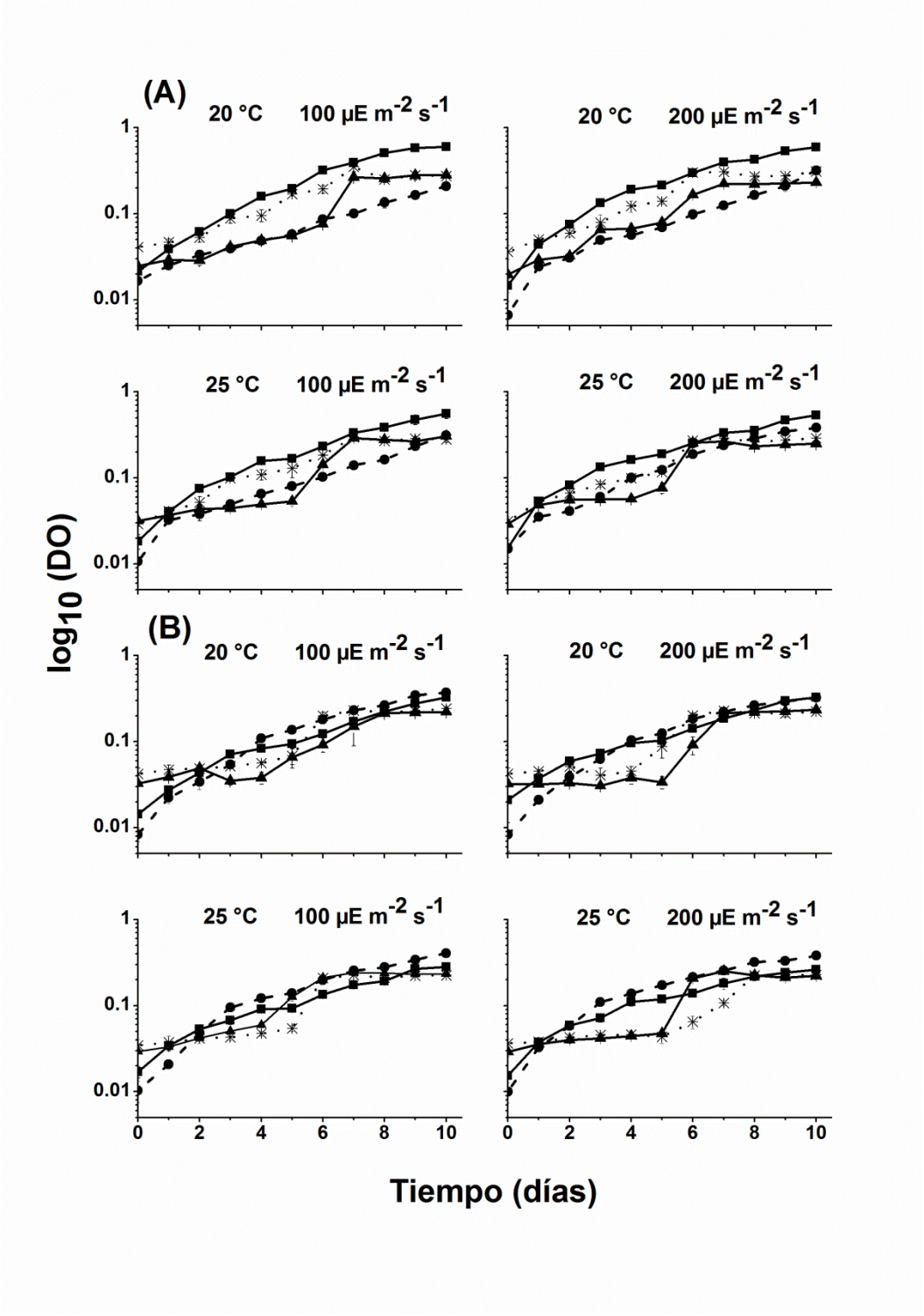

Figura 15. Curvas de crecimiento de *Tetraselmis suecica* ( ), *Aphanocapsa marina* ( ), *Heterococcus* sp. ( ) y *Navicula* sp. (cepa 3) ( ) mantenidas en sistema estático con dos temperaturas (20 y 25 °C), dos irradiancias (100 y 200 µE m^{-2} s^{-1}) y con dos aportes químicos de nitrógeno provistos por nitrato de sodio (A) y por nitrato de amonio (B). Las barras verticales representan ± 1 desviación estándar (n=3).

Tabla 10. Valores promedio y desviación estándar de la tasa de crecimiento (μ), el tiempo de duplicación (Tg) y densidad celular de cultivos estáticos de *Tetraselmis suecica*, *Aphanocapsa marina, Heterococcus* sp. y *Navicula* sp. (cepa 3) mantenidas en dos temperaturas (20 y 25 º C), con dos irradiancias (100 y 200 μE m^{-2} s^{-1}) y con dos aportes químicos de nitrógeno (nitrato de sodio y nitrato de amonio). Las letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos para cada especie (ANOVA factorial y prueba *a posteriori* de Tukey, *P* < 0.05: a>b>c>d). Números distintos indican diferencias entre las especies en las diferentes condiciones experimentales (ANOVA factorial y prueba *a posteriori* de Tukey, *P*<0.05: 1>2>3>4>5>6>7>8>9>10>11>12>13>14>15).

Especies	Condiciones experimentales			Parámetros de crecimiento			
	Aporte de nitrógeno	Temperatura (°C)	Irradiancia (μE m^{-2} s^{-1})	μ (divisiones $día^{-1}$)	Tg (día)	Densidad celular ($1x10^6$ células ml^{-1}) Inicial	Densidad celular ($1x10^6$ células ml^{-1}) Final
Tetraselmis suecica	$NaNO_3$	20	100	0.48 ± 0.01 ab,2,3,4,5,6	2.08 ± 0.02 cd, 3,4	0.08 ± 0.02	5.70 ± 0.22 a 3
			200	0.54 ± 0.03 a,1,2,3	1.87 ± 0.09 d,5	0.07 ± 0.02	4.22 ± 0.25 ad 3
		25	100	0.49 ± 0.03 ab,1,2,3,4	2.03 ± 0.11 cd,5	0.09 ± 0 .02	4.82 ± 0.62 ac 3
			200	0.52 ± 0.04 a,1,2,3,4	1.95 ± 0.14 d,4,5	0.08 ± 0.04	5.71 ± 0.06 a 3
	NH_4NO_3	20	100	0.45 ± 0.01 bc,4,5,6,7	2.22 ± 0.06 bc,1,2	0.09 ± 0.02	2.63 ± 0.41 bd 3
			200	0.40 ± 0.00 c,7,8,9,10	2.53 ± 0.03 a,1	0.07 ± 0.02	3.79 ± 0.55 bcd 3
		25	100	0.41 ± 0.02 c,6,7,8,9	2.47 ± 0.15 ab,2,3	0.07 ± 0.01	2.48 ± 0.47 b 3
			200	0.41 ± 0.01 c,5,6,7,8	2.45 ± 0.08 ab,1,3	0.07 ± 0.01	2.44 ± 1.22 b 3
Aphanocapsa marina	$NaNO_3$	20	100	0.37 ± 0.01 b,8,9,10,11	2.74 ± 0.06 a,3,4	1.13 ± 0.19	17.47 ± 3.01 b 2
			200	0.57 ± 0.06 a,1	1.78 ± 0.20 b,5	0.65 ± 0.41	43.20 ± 1.78 a 1
		25	100	0.49 ± 0.01 a,1,2,3,4,5	2.05 ± 0.21 b,5	1.03 ± 0.17	29.54 ± 1.61 a 1
			200	0.47 ± 0.01 ab,3,4,5,6,7	2.14 ± 0.06 b,4,5	0.52 ± 0.12	37.25 ± 9.07 ab 1
	NH_4NO_3	20	100	0.55 ± 0.03 a,1,2	1.83 ± 0.11 b,1,2	1.27 ± 0.41	15.05 ± 2.73 b 2
			200	0.54 ± 0.06 a,1,2,3	1.88 ± 0.20 b,1	0.41 ± 0.21	25.28 ± 0.97 a 1
		25	100	0.53 ± 0.04 a,1,2,3	1.88 ± 0.14 b,2,3	0.53 ± 0.08	21.23 ± 2.86 a 1
			200	0.53 ± 0.04 a,1,2,3,4	1.90 ± 0.15 b,1,3	0.35 ± 0.18	27.06 ± 8.49 ab 1

Tabla 10. Continuación…

Especies	Condiciones experimentales			Parámetros de crecimiento			
	Aporte de nitrógeno	Temperatura (°C)	Irradiancia (µE m^{-2} s^{-1})	µ (divisiones $día^{-1}$)	Tg (día)	Densidad celular ($1x10^6$ células ml^{-1}) Inicial	Final
***Heterococcus* sp.**	$NaNO_3$	20	100	0.33 ± 0.01 a,8,9,10,11,12	3.03 ± 0.10 c,3,4	0.27 ± 0.05	0.24 ± 0.04 a 3
			200	0.33 ± 0.01 a,9,10,11,12	3.07 ± 0.09 c,5	0.09 ± 0.03	0.21 ± 0.04 a 3
		25	100	0.31 ± 0.01 b,11,12,13,14	3.20 ± 0.07 c,5	0.09 ± 0.01	0.25 ± 0.03 a 3
			200	0.29 ± 0.01 b,11,12,13,14	3.43 ± 0.09 c,4,5	0.13 ± 0.03	0.18 ± 0.01 a 3
	NH_4NO_3	20	100	0.24 ± 0.01 d,14,15	4.26 ± 0.26 a,1,2	0.21 ± 0.08	0.09 ± 0.04 b 3
			200	0.25 ± 0.01 d,12,13,14,15	3.96 ± 0.14 a,1	0.10 ± 0.06	0.12 ± 0.02 b 3
		25	100	0.27 ± 0.01 c,12,13,14,15	3.68 ± 0.17 b,2,3	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.00 b 3
			200	0.28 ± 0.02 c,12,13,14,15	3.63 ± 0.26 b,1,3	0.16 ± 0.08	0.10 ± 0.01 b 3
***Navicula* sp. (cepa 3)**	$NaNO_3$	20	100	0.27 ± 0.00 a,12,13,14,15	3.71 ± 0.05 b,3,4	0.14 ± 0.03	2.66 ± 2.06 a 3
			200	0.30 ± 0.03 a,11,12,13,14	3.39 ± 0.31 b,5	0.23 ± 0.13	1.55 ± 0.46 a 3
		25	100	0.31 ± 0.01 a,11,12,13,14	3.25 ± 0.12 b,5	0.18 ± 0.06	1.11 ± 0.13 a 3
			200	0.32 ± 0.02 a,10,11,12,13	3.17 ± 0.15 b,4,5	0.22 ± 0.18	1.13 ± 0.16 a 3
	NH_4NO_3	20	100	0.23 ± 0.02 b,15	4.46 ± 0.36 a,1,2	0.15 ± 0.04	0.69 ± 0.54 b 3
			200	0.22 ± 0.02 b,15	4.67 ± 0.53 a,1	0.37 ± 0.15	0.40 ± 0.24 b 3
		25	100	0.25 ± 0.02 b,12,13,14,15	3.99 ± 0.37 a,2,3	0.36 ± 0.28	1.03 ± 0.49 b 3
			200	0.24 ± 0.02 b,13,14,15	4.14 ± 0.27 a,1,3	0.13 ± 0.05	0.31 ± 0.06 b 3

5.9.2 Peso seco total, peso de las cenizas y peso seco orgánico

5.9.2.1. *Tetraselmis suecica*

El mayor valor de peso seco total (1163.4 pg cél^{-1}) para *Tetraselmis suecica* evaluado en las diferentes condiciones experimentales, fue significativamente diferente (P<0.05) por la interacción entre la temperatura (20 °C) y el aporte de nitrógeno (nitrato de amonio) (Figura 16 y Anexo 1).

Existieron diferencias significativas en los valores de peso seco por efecto de la irradiancia (100 µE m^{-2} s^{-1}) (P<0.05) y el aporte de nitrógeno (nitrato de amonio) (P<0.05), pero no existieron diferencias significativas por efecto de la temperatura (P>0.05). Tampoco existieron diferencias significativas por efecto de la interacción del aporte de nitrógeno, la temperatura y la irradiancia (P>0.05) (Anexo 1).

El mayor contenido de ceniza (916.3 pg cél^{-1}) se obtuvo en la condición experimental mantenida con nitrato de amonio, a 20 °C, 200 µE m^{-2} s^{-1}, y el valor fue significativamente diferente (P<0.05) por efecto de la interacción de la temperatura y el aporte de nitrógeno (Figura 16 y Anexo 1).

Existieron diferencias significativas en el contenido de cenizas por efecto del aporte de nitrógeno (P<0.05), la irradiancia (P<0.05), pero no hubo diferencias por efecto de la temperatura (P>0.05), tampoco existieron diferencias significativas por la interacción de las tres variables estudiadas (P>0.05) (Anexo 1).

Los valores de peso seco orgánico, presentaron diferencias significativas (P<0.05) entre las distintas condiciones experimentales por efecto del aporte de nitrógeno (nitrato de amonio) (Anexo 1). El mayor valor (247.1 pg cél^{-1}) se presentó en la condición experimental mantenida con nitrato de amonio, a 20 °C y 200 µE m^{-2} s^{-1} (Figura 16).

Sin embargo, no hubo diferencias significativas en el contenido de peso seco orgánico por efecto de la temperatura (P>0.05), o la irradiancia (P>0.05), y no se presentó una interacción significativa por efecto de las variables estudiadas (Anexo 1).

5.9.2.2. *Aphanocapsa marina*

El mayor peso seco total (42.6 pg cél^{-1}) de los cultivos de *Aphanocapsa marina* se obtuvo en la condición experimental mantenida con nitrato de sodio a 20 °C y 200 µE m^{-2} s^{-1} y fue significativamente diferente al resto de las condiciones experimentales por efecto de la temperatura (P<0.05), el aporte de nitrógeno (P<0.05) y por la irradiancia (P<0.05) (Figura 16 y Anexo 2). No hubo diferenicas significativas en el contenido de peso seco por efecto de la interacción de las variables estudiadas (P>0.05) (Anexo 2).

El mayor peso de cenizas (33.7 pg cél^{-1}) de *Aphanocapsa marina* fue significativamente diferente entre las condiciones experimentales por efecto de la temperatura (20 °C) (P<0.05) y el aporte de nitrógeno (nitrato de sodio) (P<0.05) (Figura 16 y Anexo 2). No existieron diferencias significativas en el contenido de ceniza por efecto de la irradiancia (P>0.05) y tampoco existió una interacción entre las variables estudiadas (P>0.05) (Anexo 2).

Los valores de peso seco orgánico de los cultivos de *Aphanocapsa marina* fueron significativamente diferentes por efecto del aporte de nitrógeno (P<0.05), la temperatura (P<0.05) y la irradiancia (P<0.05) (Figura 16 y Anexo 2). No existieron diferencias significativas (P>0.05) en el contenido de peso orgánico por la interacción de las variables estudiadas (Anexo 2).

5.9.2.3. *Heterococcus* sp.

El peso seco total de *Heterococcus* sp. evaluado en las diferentes condiciones experimentales presentó diferencias significativas (P<0.05) por efecto de la interacción de la irradiancia con el aporte de nitrógeno y presentó el mayor valor de peso seco total (1072.0 pg cél^{-1}) en los cultivos mantenidos con nitrato de amonio, a 20 °C y 100 µE m^{-2} s^{-1} (Figura 16 y Anexo 3).

Existieron diferencias significativas en el contenido de peso seco por efecto del aporte de nitrógeno (P<0.05), pero no hubo diferencias significativas por efecto de la irradiancia (P>0.05) o la temperatura (P>0.05) (Anexo 3). Tampoco hubo diferencias

significativas en el peso seco total por la interacción del aporte de nitrógeno, la temperatura y la irradiancia (*P*>0.05) (Anexo 3).

El contenido de cenizas presentó diferencias significativas (*P*<0.05) entre los cultivos de *Heterococcus* sp. por efecto de la interacación de la irradiancia con el aporte de nitrógeno y se obtuvieron los mayores valores (789.6 pg cél^{-1}) a una irradiancia de 100 µE m^{-2} s^{-1}, con nitrato de amonio y a 20 °C (Figura 16 y Anexo 3).

Los valores de cenizas fueron significativamente diferentes (*P*<0.05) por efecto del aporte de nitrógeno, pero no hubo diferencias signifcativas por efecto de la irradiancia (*P*>0.05), o la temperatura (*P*>0.05) (Anexo 3). Tampoco existieron diferencias significativas en el contenido de cenizas por la interacción del aporte de nitrógeno, la temperatura y la irradiancia (*P*>0.05) (Anexo 3).

El peso seco orgánico de los cultivos de *Heterococcus* sp. presentaron diferencias significativas (*P*<0.05) entre las distintas condiciones experimentales por efecto del aporte de nitrógeno. El mayor valor de peso seco orgánico (282.9 pg cél^{-1}) se obtuvo en la condición experimental a 25 °C, con un aporte de nitrato de amonio y una irradiancia de 100 µE m^{-2} s^{-1} (Figura 16 y Anexo 3).

Los valores de peso orgánico no mostraron diferencias significativas por el efecto de la irradiancia (*P*>0.05) o la temperatura (*P*>0.05), tampoco existió una interacción significativa entre las variables estudiadas (*P*>0.05) (Anexo 3).

5.9.2.4. *Navicula* sp. (cepa 3)

El peso seco total de *Navicula* sp. (cepa 3) evaluado en las diferentes condiciones experimentales presentó diferencias significativas (*P*<0.05) por la interacción de las variables estudiadas. El mayor peso seco total (469.8 pg cél^{-1}) se obtuvo en la condición experimental de 20 °C, con un aporte de nitrato de amonio y una irradiancia de 200 µE m^{-2} s^{-1}. (Figura 16 y Anexo 4). También existieron diferencias significativas en los valores de peso seco totoal por efecto del aporte de nitrógeno (*P*<0.05) o la temperatura (*P*<0.05) (Anexo 4). No hubo diferencias significativas en el peso seco total por efecto la irradiancia (*P*>0.05) (Anexo 4).

El mayor contenido de ceniza (327.1 pg cél^{-1}) de *Navicula* sp. (cepa 3) presentó diferencias significativas (P<0.05) entre las diferentes condiciones experimentales por efecto de interacción de la temperatura (20 °C), el aporte de nitrógeno (nitrato de amonio y la irradiancia (200 µE m^{-2} s^{-1}) (Figura 16 y Anexo 4). También existieron diferencias significativas en el contenido de cenizas por efecto del aporte de nitrógeno (P<0.05), y de la temperatura (P<0.05) (Anexo 4). No existieron diferencias significativas en el contenido de cenizas de *Navicula* sp. (cepa 3) por efecto de la irradiancia (P>0.05) (Anexo 4).

El peso seco orgánico de *Navicula* sp. (cepa 3) presentó diferencias significativas (P<0.05) entre las distintas condiciones experimentales por efecto de la interacción de la temperatura, con el aporte de nitrógeno y la irradiancia. El mayor valor de peso seco orgánico (142.7 pg cél^{-1}) se obtuvo en la condición experimental de 20 °C, con un aporte de nitrato de amonio y una irradiancia de 200 µE m^{-2} s^{-1} (Figura 16 y Anexo 4). No existieron diferencias significativas en el contenido de peso orgánico por efecto de la irradiancia (P>0.05) (Anexo 4).

5.9.2.5. Peso de las 4 especies

El mayor valor de peso seco total (1163.4 pg cél^{-1}) entre los cultivos de *Tetraselmis suecica*, *Aphanocapsa marina*, *Heterococcus* sp. y *Navicula* sp. (cepa 3), mantenidas a distintas condiciones experimentales fue obtenido para *Tetraselmis suecica* y fue significativamente diferente (P<0.05) al resto de las especies por efecto de la interacción del tipo de especie, con el aporte de nitrógeno (nitrato de amonio) y la irradiancia (100 µE m^{-2} s^{-1}) (Figura 16 y Anexo 5).

Existieron diferencias significativas en los valores de peso seco total de las cuatro especies por efecto de la especie (P<0.05), o el aporte de nitrógeno (P<0.05), o la irradiancia (P<0.05) (Anexo 5). También existieron diferencias significativas en los valores de peso seco total de las cuatro especies por efecto de la interacción del tipo de especie con la temperatura (P<0.05), del tipo de especie con el aporte de nitrógeno (P<0.05), del tipo de especie con la irradiancia (P<0.05) y del aporte de nitrógeno con la irradiancia (P<0.05) (Anexo 5).

Los valores de cenizas de las cuatro especies cultivadas a las distintas condiciones experimentales presentaron diferencias significativas ($P<0.05$), por efecto de la interacción del tipo de especie con el aporte de nitrógeno y la irradiancia. Para *Tetraselmis suecica* mantenida a una temperatura de 20 °C y a una irradiancia de 100 µE m^{-2} s^{-1} con un aporte de nitrato de amonio se obtuvo el mayor contenido de ceniza (916.3 pg $cél^{-1}$) (Figura 16 y Anexo 5).

Existieron diferencias significativas en el contenido de ceniza por efecto de la especie ($P<0.05$), el aporte de nitrógeno ($P<0.05$), la temperatura ($P<0.05$), y la irradiancia ($P<0.05$) (Figura 16). También existieron diferencias significativas en el contenido de cenizas de las cuatro especies por efecto de la interacción del tipo de especie con el aporte de nitrógeno ($P<0.05$), del tipo de especie con la irradiancia ($P<0.05$), además de la interacción de la temperatura con el aporte de nitrógeno ($P<0.05$), y de la interacción del aporte de nitrógeno con la irradiancia ($P<0.05$) (Figura 16) (Anexo 5). No hubo diferencias significativas en los valores de ceniza entre las especies estudiadas por la interacción de las cuatro variables ($P>0.05$)

El peso seco orgánico entre las cuatro especies presentó diferencias significativas ($P<0.05$) por efecto de la interacción entre el tipo de especie, y la irradiancia y en la especie *Heterococcus* sp. se obtuvo el mayor valor (282.9 pg $cél^{-1}$) en la condición experimental mantenida con nitrato de amonio a 25 °C y a una irradiancia de 200 µE m^{-2} s^{-1} (Figura 16 y Anexo 5).

Existieron diferencias significativas por efecto de la especie ($P<0.05$), el aporte de nitrógeno ($P<0.05$), además hubo diferencias significativas por la interacción del tipo de especie con el aporte de nitrógeno. No existieron diferencias significativas por efecto de la temperatura ($P>0.05$), y la irradiancia ($P>0.05$), tampoco hubo interacción significativa por efecto de las cuatro variables ($P>0.05$) (Anexo 5).

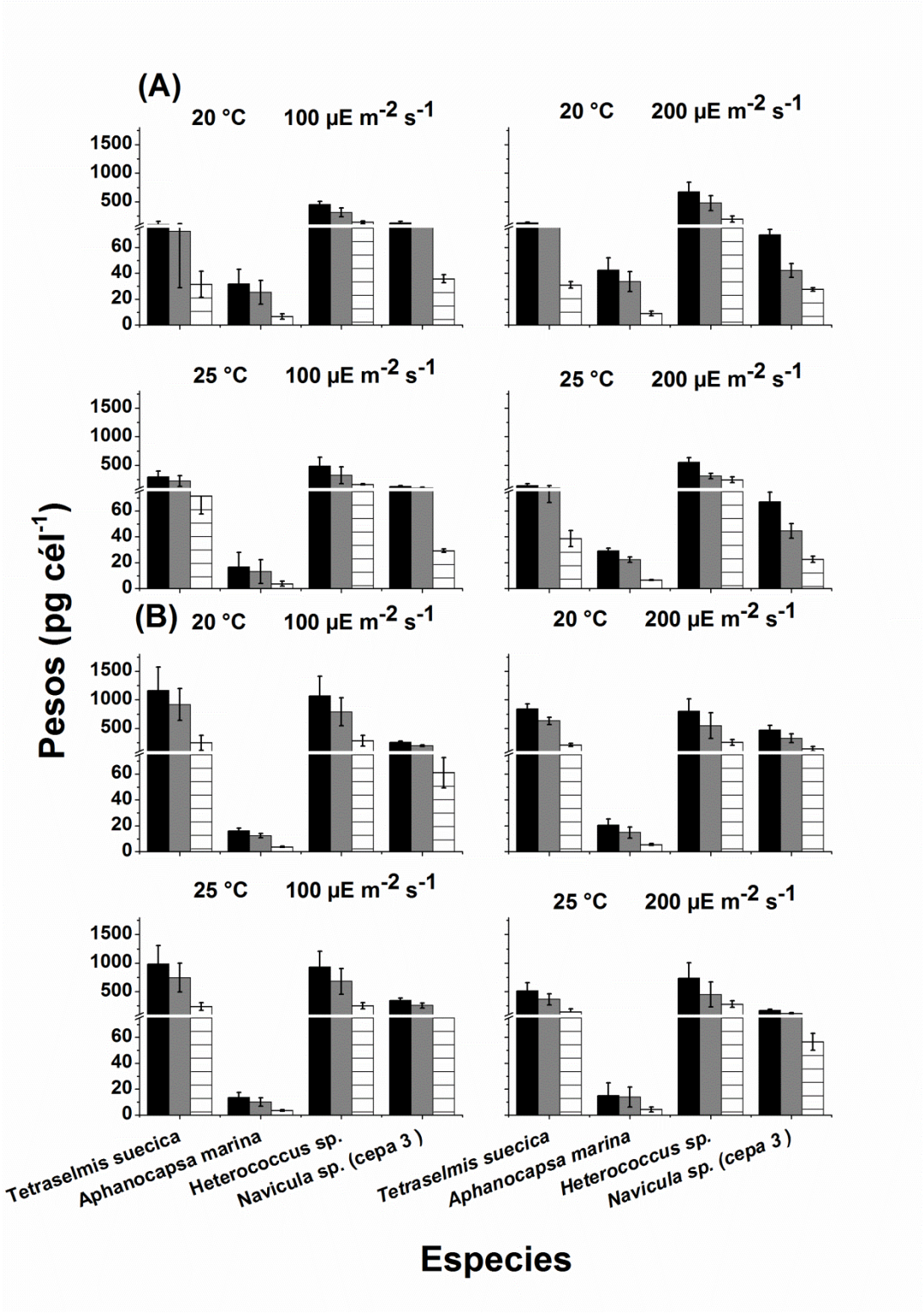

Figura 16. Valores promedio y desviación estándar de peso seco total (▬), peso de cenizas (▬) y peso seco orgánico (▭) de cultivos estáticos de *Tetraselmis suecica*, *Aphanocapsa marina*, *Heterococcus* sp. y *Navicula* sp. (cepa 3) mantenidos con dos temperaturas (20 y 25 ºC), dos irradiancias (100 y 200 µE m^{-2} s^{-1}) y dos aportes químico de nitrógeno provisto por nitrato de sodio (A) y por nitrato de amonio (B).

5.9.3. Composición proximal

5.9.3.1. *Tetraselmis suecica*

Los valores de proteínas obtenidos para *Tetraselmis suecica*, presentaron diferencias significativas por efecto de la irradiancia ($P<0.05$) y del aporte de nitrógeno ($P>0.05$), no hubo diferencias de la temperatura ($P>0.05$) (Anexo 6). Además no se encontraron diferencias significativas en el contenido de proteínas, por la interacción entre los factores aporte de nitrógeno, la temperatura, e irradiancia ($P>0.05$) (Anexo 6). El mayor contenido de proteínas (26.8%) se evaluó en los cultivos mantenidos en la condición experimental de 20 °C, con un aporte de nitrato de amonio y a una irradiancia de 100 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$ (Figura 17).

El contenido de carbohidratos entre las distintas condiciones experimentales no presentó diferencias significativas por efecto de la temperatura ($P>0.05$), o la irradiancia ($P>0.05$), o el aporte de nitrógeno ($P>0.05$) (Figura 17 y Anexo 6). Tampoco existieron diferencias significativas en los valores de carbohidratos ($P>0.05$) por efecto de la interacción del aporte de nitrógeno, la temperatura y la irradiancia (Anexo 6).

El contenido de lípidos de los cultivos mantenidos a distintas condiciones experimentales no presentó diferencias significativas por el aporte de nitrógeno ($P>0.05$), la temperatura ($P>0.05$), y la irradiancia ($P>0.05$) (Figura 17 y Anexo 6). Tampoco hubo diferencias significativas ($P>0.05$) en el contenido de lípidos entre las distintas condiciones experimentales por la interacción del aporte de nitrógeno, la temperatura, la irradiancia (Anexo 6).

5.9.3.2. *Aphanocapsa marina*

El contenido de proteínas de los cultivos de la cianofita *Aphanocapsa marina* mantenidos en las distintas condiciones experimentales mostraron diferencias significativas ($P<0.05$) por efecto del aporte de nitrógeno (nitrato de amonio) (Anexo 7). No hubo diferencias en el contenido de proteínas por efecto de la temperatura ($P>0.05$) o la irradiancia ($P>0.05$), ni por la interacción entre los factores irradiancia, temperatura y aporte de nitrógeno ($P>0.05$) (Anexo 7). El mayor porcentaje de proteínas (19.2%) fue

obtenido en los cultivos mantenidos a 25 °C, con un aporte de nitrato de amonio y a una irradiancia de 200 µE m^{-2} s^{-1} (Figura 17).

El contenido de carbohidratos no presentó diferencias significativas entre las distintas condiciones experimentales por efecto del aporte de nitrógeno (P>0.05), la temperatura (P>0.05), y la irradiancia (P>0.05) (Figura 17 y Anexo 7). Tampoco existieron diferencias significativas (P>0.05) entre las distintas condiciones experimentales por efecto de la interacción de los factores aporte de nitrógeno, la temperatura y la irradiancia (Anexo 7).

El contenido de lípidos (14.01%) fue mayor en la misma condición experimental descrita para las proteínas y fue significativamente diferente (P<0.05) entre las distintas condiciones experimentales por efecto de la interacción del aporte de nitrógeno y la irradiancia (Figura 17 y Anexo 7). No hubo diferencias significativas en el contenido de lípidos por efecto de la temperatura (P>0.05), la irradiancia (P>0.05), y el aporte de nitrógeno (P>0.05), o por la interacción de los tres factores (P>0.05) (Anexo 7).

V.9.3.3. *Heterococcus* sp.

Los valores de proteínas de los cultivos mantenidos en distintas condiciones experimentales no presentaron diferencias significativas por el efecto individual del aporte de nitrógeno (P>0.05), o la temperatura (P>0.05), o la irradiancia (P>0.05) (Figura 17 y Anexo 8). El contenido de proteínas tampoco mostraron diferencias significativas entre las distintas condiciones experimentales (P>0.05) por la interacción del aporte de nitrógeno, la temperatura y la irradiancia (Anexo 8).

El contenido de carbohidratos entre las distintas condiciones experimentales fue significativamente diferente (P<0.05) por efecto del aporte de nitrógeno (Anexo 8). No hubo diferencias significativas en los valores de carbohidratos por efecto de la temperatura (P>0.05) y la irradiancia (P>0.05), ni por la interacción de los tres factores (P>0.05) (Anexo 8). El mayor contenido de carbohidratos (27.9%) se obtuvo en cultivos mantenidos a 20 °C, con un aporte de nitrato de sodio y a una irradiancia de 200 µE m^{-2} s^{-1} (Figura 17).

Los valores de lípidos entre las distintas condiciones experimentales fueron significativamente diferentes por efecto del aporte de nitrógeno ($P<0.05$) y por efecto de la temperatura ($P<0.05$) (Anexo 8). No se presentaron diferencias significativas en el contenido de lípidos por efecto de la irradiancia ($P>0.05$), tampoco hubo diferencias por efecto de la interacción ($P>0.05$) entre los factores irradiancia, aporte de nitrógeno y la temperatura (Anexo 8). El mayor contenido de lípidos (11.92%) se midió en los cultivos mantenidos a 20 °C, con un aporte de nitrato de sodio y a una irradiancia de 100 µE m^{-2} s^{-1} (Figura 17).

5.9.3.4. *Navicula* sp. (cepa 3)

El contenido de proteínas presentó diferencias significativas entre las diferentes condiciones experimentales por efecto de aporte de nitrógeno ($P<0.05$) y por la interacción de la temperatura y la irradiancia ($P<0.05$) (Anexo 9). No hubo un efecto en la cantidad de proteínas por los factores temperatura ($P>0.05$) o irradiancia ($P>0.05$), ni por la interacción de los tres factores ($P>0.05$) (Anexo 9). El mayor contenido de proteínas (25.2%) se obtuvo en la condición experimental mantenida a una temperatura de 20 °C, con un aporte de nitrato de sodio y a una irradiancia de 200 µE m^{-2} s^{-1} (Figura 17).

Los valores de carbohidratos fueron significativamente diferentes entre las diferentes condiciones experimentales por efecto del aporte de nitrógeno ($P<0.05$) y por la interacción de la temperatura y la irradiancia ($P<0.05$) (Anexo 9).

Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas en el contenido de carbohidratos por efecto temperatura ($P>0.05$) o irradiancia ($P>0.05$), ni por la interacción de los tres factores ($P>0.05$) (Anexo 9). El mayor porcentaje de carbohidratos (14.5%) se obtuvo en la condición experimental de 20 °C, con un aporte de nitrato de sodio y a una irradiancia de 200 µE m^{-2} s^{-1} (Figura 17).

El contenido de lípidos mostró diferencias significativas por efecto del aporte de nitrógeno ($P<0.05$) y por efecto de la irradiancia ($P<0.05$) además por la interacción de la temperatura y la irradiancia ($P<0.05$) (Anexo 9). No se presentaron diferencias

significativas en los valores de lípidos por efecto de la interacción de los tres factores (*P*>0.05) (Anexo 9). En la condición experimental de 25 °C, con un aporte de nitrato de sodio y a una irradiancia de 100 µE m^{-2} s^{-1} se obtuvo el mayor contenido de lípidos (17.0%) (Figura 17).

5.9.3.5. Comparación de la composición proximal de las cuatro especies

El contenido de proteínas fue significativamente diferente entre las cuatro especies (*Tetraselmis suecica*, *Aphanocapsa marina*, *Heterococcus* sp. y *Navicula* sp.) y también entre las distintas condiciones experimentales por efecto de la interacción entre el tipo de la especie y el aporte de nitrógeno (*P*<0.05), así como por el efecto de la interacción del tipo de especie y la irradiancia (*P*<0.05) (Anexo 10). También existieron diferencias significativas en el contenido de proteínas por efecto del tipo de especie (*P*<0.05), el aporte de nitrógeno (*P*<0.05) y por la irradiancia (*P*<0.05) (Anexo 10).

No existieron diferencias significativas por el efecto de la temperatura (*P*>0.05), tampoco hubo diferencias por la interacción entre las variables especie, temperatura, aporte de nitrógeno e irradiancia (*P*>0.05) (Anexo10). La especie *Tetraselmis suecica* presentó el mayor valor de proteínas (26.8%) (*P*<0.05) entre las cuatro especies en los cultivos mantenidos a una temperatura de 20 °C, con un aporte de nitrato de amonio y a una irradiancia de 100 µE m^{-2} s^{-1} (Figura 17).

Los valores de carbohidratos presentaron diferencias significativas (*P*<0.05) entre las especies *Tetraselmis suecica*, *Aphanocapsa marina*, *Heterococcus* sp., *Navicula* sp. y entre las distintas condiciones experimentales por efecto del aporte de nitrógeno (*P*<0.05) y por la interacción del tipo de especie con el aporte de nitrógeno (*P*<0.05) (Anexo 10). El contenido de carbohidratos no presentaron diferencias significativas por efecto de la irradiancia (*P*>0.05), o la temperatura (*P*>0.05) (Anexo 10). La especie *Heterococcus* sp. fue quien presentó el mayor contenido (*P*<0.05) de carbohidratos (27.9%) en la condición experimental de 20 °C, con un aporte de nitrato de sodio y a una irradiancia de 200 µE m^{-2} s^{-1} (Figura 17).

Sin embargo, no existieron diferencias significativas en el contenido de carbohidratos por efecto de la interacción del tipo de especie, con la irradiancia, la temperatura y el aporte químico de nitrógeno (P>0.05) (Anexo 10).

El contenido de lípidos fue significativamente diferente (P<0.05) entre las cuatro especies y entre las diferentes condiciones experimentales por efecto de la interacción de los factores especie, temperatura e irradiancia (Figura 17). El mayor porcentaje de lípidos (17.6%) se obtuvo en la especie *Tetraselmis suecica* en los cultivos mantenidos a una temperatura de 20 °C, con un aporte de nitrato de amonio y a una irradiancia de 100 µE m^{-2} s^{-1} (Figura 17 y Anexo 10).

No existieron diferencias significativas en el contenido de lípidos por efecto de la temperatura (P>0.05), o el aporte de nitrógeno (P>0.05) o por la irradiancia (P>0.05) (Anexo 10). Tampoco existieron diferencias significativas en el contenido de lípidos por efecto de la interacción de los tipo de especie, aporte de nitrógeno, temperatura e irradiancia (P>0.05) (Anexo 10).

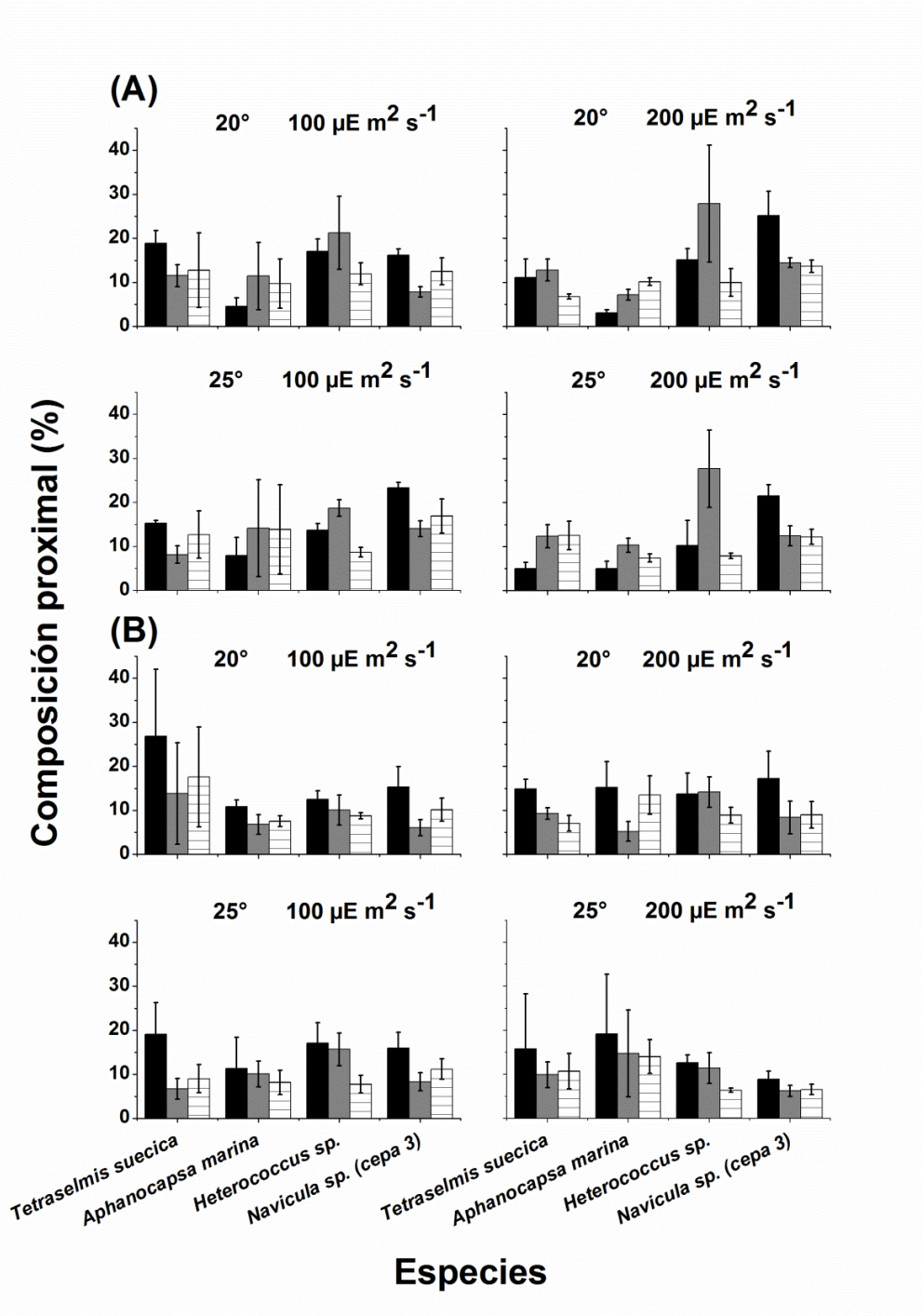

Figura 17. Valores promedio y desviación estándar de proteínas ( ), carbohidratos ( ) y lípidos ( ) de cultivos estáticos de *Tetraselmis suecica*, *Aphanocapsa marina*, *Heterococcus* sp. y *Navicula* sp. (cepa 3) mantenidos con dos temperaturas (20 y 25 °C), dos irradiancias (100 y 200 µE m^{-2} s^{-1}) y dos aportes químico de nitrógeno provisto por nitrato de sodio (A) y por nitrato de amonio (B).

5.9.4. Perfiles de ácidos grasos

5.9.4.1. *Tetraselmis suecica*

Los principales ácidos grasos en *Tetraselmis suecica* fueron 16:0 (38.1%), 18:1n-9 (18.9%) y 18:3n-3 (ALA; ácido alfa linoleico por sus siglas en inglés) (26.2%) y 20:5n-3 (EPA) (20.5%) (Tabla 11).

Los cultivos de *Tetraselmis suecica* mantenidos con un aporte de nitrato de amonio y a una temperatura de 25 °C en ambas irradiancias, mostraron una tendencia a tener un mayor contenido de ácidos grasos saturados (42.1%) y monoinsaturados (23.3%) (Tabla 11).

El contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de los cultivos mantenidos con un aporte de nitrato de sodio y a temperatura de 20 °C mostraron una tendencia a obtener un alto contenido de PUFA (51.1%), también presentaron una tendencia a una mayor producción del ácido graso 20:5n-3 (EPA) (20.5%) (Tabla 11).

Los cultivos de *Tetraselmis suecica* mantenidos con nitrato de sodio mostraron una tendencia a producir mayor contenido de PUFA, mientras que los cultivos mantenidos con un aporte de nitrato de amonio mostraron una tendencia a producir un mayor contenido de ácidos grasos monoinsaturados (Tabla 11).

Con respecto a la variable temperatura el contenido de ácidos grasos tienden a presentar porcentajes similares entre ambas temperaturas (20 y 25 °C), la misma tendencia se mostró para la variable irradiancia (Tabla 11).

5.9.4.2. *Aphanocapsa marina*

Los principales ácidos grasos presentes en *Aphanocapsa marina* fueron 14:0 (48.1%), 16:0 (38.4%) y 16:1n-7 cis (51.7%) (Tabla 11).

Los cultivos *Aphanocapsa marina* mantenidos con nitrato de amonio mostraron altos porcentajes de ácidos grasos saturados y monoinsaturados (Tabla 11). El mayor contenido de ácidos grasos saturados (89.6%) fue obtenido a una temperatura de 25 °C

y a una irradiancia de 100 µE m^{-2} s^{-1}, mientras que el mayor porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados (56.0%) se presentó en los cultivos mantenidos a 20 °C a una irradiancia de 100 µE m^{-2} s^{-1} (Tabla 11). Los cultivos de *Aphanocapsa marina* no presentaron una tendencia a producir ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) (Tabla 11).

V.9.4.3. *Heterococcus* sp.

Los ácidos grasos que presentaron altos porcentajes en *Heterococcus* sp. fueron 14:0 (29.4), 16:0 (36.8%), 16:1n-7cis (34.6%),18:3n-3 (ALA) (45.2%) y el 20:5n-3 (EPA) (25.6%) (Tabla 11).

El contenido de ácidos grasos saturados presentaron una tendencia a obtener un mayor porcentaje (62.3%) en los cultivos mantenidos a una temperatura 20 °C, con un aporte de nitrato de amonio y una irradiancia de 200 µE m^{-2} s^{-1} (Tabla 11).

Los ácidos grasos monoinsaturados presentaron una tendencia a un mayor contenido (37.0%) con un aporte de nitrato de amonio y a una irradiancia de 200 µE m^{-2} s^{-1} y a una temperatura de 25 °C (Tabla 11).

Los cultivos de *Heterococcus* sp. presentaron la tendencia a producir un alto contenido (55.0%) de ácidos grasos poliinsaturados en los cultivos mantenidos con un aporte de nitrato de sodio, a una temperatura de 20 °C y a una irradiancia de 100 µE m^{-2} s^{-1} (Tabla 11). En los cultivos de *Heterococcus* sp. mantenidos con nitrato de sodio, a 20 °C y a una irradiancia de 200 µE m^{-2} s^{-1} fue sintetizado el ácido graso 20:2n-6 (DHA) (1.1%) (Tabla 11). Sin embargo una alta concentración de 20:5n-3 (EPA) (25.6%) se obtuvo a una 25 °C, con un aporte de nitrato de amonio y una irradiancia de 100 µE m^{-2} s^{-1} (Tabla 11).

Los cultivos de *Heterococcus* sp. mantenidos con un aporte de nitrato de amonio mostraron una tendencia a obtener altos porcentajes de ácidos grasos poliinsaturados, mientras que los cultivos mantenidos con un aporte de nitrato de amonio tuvieron una tendencia a producir un alto contenido de ácidos monoinsaturados. Con respecto a la variable temperatura, los cultivos presentaron una tendencia a obtener valores similares

de ácidos grasos saturados, moinsaturados y poliinsaturados entre ambas temperaturas (20 y 25 °C) (Tabla 11). En general en los cultivos de *Heterococcus* sp. mantenidos a una irradiancia de 200 µE m^{-2} s^{-1} favorecio altos valores de ácidos grasos saturados y monoinsaturados (Tabla 11).

5.9.4.4. *Navicula* sp. (cepa 3)

Los principales ácidos grasos presentes en *Navicula* sp. (cepa 3) fueron 16:0 (35.5%), 16:1n-7cis (43.4%) y 20:5n-3 (EPA) (29.0%) (Tabla 11).

El contenido de ácidos grasos saturados presentó una tendencia a un mayor contenido (43.8%) en los cultivos mantenidos con un aporte de nitrato de amonio, a una temperatura de 25 °C y a una irradiancia de 200 µE m^{-2} s^{-1} (Tabla 11).

El mayor contenido de ácidos grasos monoinsaturados (46.9%) siguió la misma tendencia que los ácidos grasos saturados, con altos porcentajes en los cultivos mantenidos con nitrato de amonio, a una temperatura de 25 °C y a una irradiancia de 200 µE m^{-2} s^{-1} (Tabla 11).

Los ácidos grasos poliinsaturados presentaron una tendencia a un mayor contenido (33.8%) en los cultivos mantenidos con nitrato de sodio, a una temperatura de 20 °C y a una irradiancia de 100 µE m^{-2} s^{-1} (Tabla 11).

La diatomea *Navicula* sp. (cepa 3) produjo el ácido graso 20:5n-3 (EPA) (29.0%) en la condición experimental mantenida con un aporte de nitrato de amonio mientras el ácido graso 22:6n-3 (DHA) (1.2%) fue sintetizado en los cultivos mantenidos con nitrato de sodio (Tabla 11).

El perfil de ácidos grasos de los cultivos de *Navicula* sp. (cepa 3) presentaron poca variación en los porcentajes obtenidos en los cultivos mantenidos con ambos aportes de nitrógeno (Tabla 11).

5.9.4.5. Comparación de los ácidos grasos de las cuatro especies

La composición de ácidos grasos varió entre las especies y entre las condiciones experimentales (Tabla 11).

En general hubo una tendencia a una mayor de producción de ácidos grasos saturados con un aporte de nitrato de amonio y a una temperatura de 25 °C para las especies *Tetraselmis suecica*, *Aphanocapsa marina*, y *Navicula* sp. (cepa 3) mientras que para la especie *Heterococcus* sp. mostró una tendencia a producir un alto contenido de ácidos grasos saturados con un aporte de nitrato de amonio y a una temperatura de 20 °C (Tabla 11).

La especie *Aphanocapsa marina* presentó la tendencia a producir la mayor cantidad de ácidos grasos saturados entre las cuatro especies (89.6%) en la condición experimental mantenida a una temperatura de 25 °C, con un aporte de nitrato de amonio y a una irradiancia de 100 µE m^{-2} s^{-1} (Tabla 11).

Los ácidos grasos monoinsaturados en la mayoría de las especies presentaron la tendencia a un mayor contenido en los cultivos mantenidos con un aporte de nitrato de amonio, con excepción de *Aphanocapsa marina* en la cual se obtuvo el mayor contenido de ácidos grasos monoinsaturados con un aporte de nitrato de sodio (Tabla 11).

El contenido de ácidos grasos monoinsaturados entre las cuatro especies y entre las diferentes condiciones experimentales, tendió a presentar un alto contenido (56.0%) en la especie *Aphanocapsa marina* en los cultivos mantenidos a una temperatura de 20 °C, con un aporte de nitrato de amonio y a una irradiancia de 100 µE m^{-2} s^{-1} (Tabla 11).

El contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) entre las cuatro especies mostró la tendencia a un mayor contenido en los cultivos mantenidos con un aporte de nitrato de sodio (Tabla 11).

Por efecto de la irradiancia hubo una tendencia a una mayor producción de PUFAs a una irradiancia de 100 µE m^{-2} s^{-1} en las especies *Tetraselmis suecica* y *Navicula* sp. (cepa 3) (Tabla 11).

El porcentaje de PUFAs que fue obtenido para *Heterococcus* sp. tendió a un mayor valor (55.0%) entre las cuatro especies y en las diferentes condiciones experimentales al ser cultivada a una temperatura de 20 °C, con un aporte de nitrato de sodio y a una irradiancia de 100 µE m^{-2} s^{-1} (Tabla 11).

Para la diatomea *Navicula* sp. (cepa 3) se obtuvieron altos porcentajes de los ácidos grasos poliinsaturados 20:5n-3 (EPA) (29.0%) en los cultivos mantenidos a 20 °C y en los cultivos mantenidos a 25 °C se presentó un mayor contenido del ácido graso 22:6n-3 (DHA) (1.2%) (Tabla 11).

La razón de DHA:EPA (1.0) entre las cuatro especies y las diferentes condiciones experimentales mostró la tendencia a ser mayor en *Heterococcus* sp. en los cultivos mantenidos con nitrato de sodio, a una temperatura de 20 °C y a una irradiancia de 200 µE m^{-2} s^{-1} (Tabla 11).

Tabla 11. Porcentaje de ácidos grasos de *Tetraselmis suecica*, *Aphanocapsa marina, Heterococcus* sp. y *Navicula* sp. (cepa 3) mantenidos con dos temperaturas (20 y 25 °C), dos irradiancias (100 y 200 µE m^{-2} s^{-1}) y dos aportes químico de nitrógeno provistos por nitrato de sodio y por nitrato de amonio. ALA: ácido alfa linoleico, ARA: ácido araquidónico, EPA: ácido eicosapentaenoico, DHA: ácido docosahexaenoico, PUFA: ácidos grasos poliinsaturados.

Ácidos grasos	*Tetraselmis suecica*								*Aphanocapsa marina*							
	Aporte químico de nitrógeno															
	$NaNO_3$				NH_4NO_3				$NaNO_3$				NH_4NO_3			
	Temperatura (°C)															
	20		25		20		25		20		25		20		25	
	Irradiancia (µE m^{-2} s^{-1})															
	100	200	100	200	100	200	100	200	100	200	100	200	100	200	100	200
Saturados																
14:0	1.6	2.6	1.2	2.3	1.9	1.1	1.2	1.0	23.5	25.6	24.9	21.4	24.9	12.3	48.1	30.1
15:0																
16:0	37.7	36.6	34.0	35.9	34.6	35.6	35.8	38.1	26.7	25.1	27.8	29.7	17.2	34.3	38.4	21.8
18:0						2.6		3.0	3.9	3.4	4.5	3.2	1.9	11.1	3.1	1.8
24:0																
Suma	39.4	39.2	35.3	38.2	36.5	39.3	37.0	42.1	54.0	54.1	57.1	54.2	44.0	57.8	89.6	53.7
Monoinsaturados																
14:1n-5 cis													2.7		3.7	1.9
16:1n-7 cis			5.1	1.5	3.4	3.4	4.3	2.3	43.3	43.5	40.3	42.9	51.7	36.0	3.4	42.9
18:1n-9	9.6	10.8	9.0	10.8	18.7	18.8	18.9	18.5	2.7	2.4	2.5	2.9	1.6	6.2	3.2	1.4
Suma	9.6	10.8	14.0	12.2	22.1	22.3	23.3	20.8	46.0	45.9	42.9	45.8	56.0	42.2	10.4	46.3
Poliinsaturados																
18:2n-6 tra	5.6	4.6	5.9	5.0	7.5	7.3	7.6	7.2								
18:3n-6				0.5	1.2											
18:3n-3 (ALA)	26.2	22.2	26.2	24.3	18.3	17.0	17.8	16.8								
20:2n-6	2.1	2.7	1.8	2.6	2.9	2.9	2.9	2.4								
20:5n-3 (EPA)	17.2	20.5	16.8	17.2	11.4	11.2	11.4	10.7								
22:6n-3 (DHA)																
Suma PUFA	51.1	50.0	50.7	49.5	41.3	38.4	39.7	37.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Suma n-3 PUFA	43.5	42.6	43.0	41.5	29.7	28.2	29.2	27.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Suma n-6 PUFA	7.6	7.4	7.7	8.0	11.6	10.2	10.5	9.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
DHA:EPA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0								

Tabla 11. Continuación…

Ácidos grasos	*Heterococcus sp.*								*Navicula* sp. (cepa 3)							
	Aporte químico de nitrógeno															
	$NaNO_3$				NH_4NO_3				NaNO3				NH4NO3			
	Temperatura (°C)															
	20		25		20		25		20		25		20		25	
	Irradiancia (µE m^{-2} s^{-1})															
	100	200	100	200	100	200	100	200	100	200	100	200	100	200	100	200
Saturados																
14:0	7.3	8.2	8.5	7.7	4.7	29.4	3.9	5.0	3.5	3.5	3.8	4.4	4.0	3.9	4.3	4.6
15:0	1.5	2.2	1.3	2.2				1.5								
16:0	29.2	31.6	29.6	28.3	28.3	29.7	26.6	36.8	24.1	27.0	25.7	30.8	25.4	29.2	32.2	35.5
18:0		3.4			1.0	3.1		2.3						1.7		1.8
24:0	2.7	3.1	2.7	3.4	4.8		5.7	2.6	5.9	6.2	5.4	4.3	5.7	4.7	4.1	1.9
Suma	40.7	48.6	42.2	41.6	38.9	62.3	36.2	48.2	33.5	36.7	34.8	39.5	35.1	39.7	40.6	43.8
Monoinsaturados																
14:1n-5 cis																
16:1n-7 cis	1.2	2.4	1.9	1.8	31.5	25.4	34.6	33.1	29.5	33.6	30.5	36.2	31.5	35.8	39.6	43.4
18:1n-9	3.0	4.4	3.0	3.1	1.9	4.5	1.2	3.9	3.1	1.7	3.4	2.0	1.8	2.1	2.4	3.5
Suma	4.2	6.8	4.9	5.0	33.4	29.8	35.8	37.0	32.7	35.3	33.9	38.2	33.3	37.9	42.0	46.9
Poliinsaturados																
18:2n-6 tra	8.8	8.9	8.4	8.8	1.1	1.5		2.0	1.3		1.1	1.2				
18:3n-6	1.1	1.3	1.2	1.4								1.0				
18:3n-3 (ALA)	45.2	32.3	42.4	42.1	3.4	2.0	2.5	5.4	6.9	3.2	5.9	4.2	2.6	2.9	2.4	2.1
20:2n-6																
20:5n-3 (EPA)		1.1	1.0	1.2	23.2	4.4	25.6	7.4	25.7	24.8	24.2	14.7	29.0	19.6	15.0	7.2
22:6n-3 (DHA)		1.1										1.2				
Suma PUFA	55.0	44.7	52.9	53.5	27.7	7.9	28.1	14.8	33.8	28.0	31.2	22.2	31.7	22.5	17.4	9.3
Suma n-3 PUFA	45.2	34.4	43.4	43.3	26.6	6.4	28.1	12.8	32.5	28.0	30.1	20.1	31.7	22.5	17.4	9.3
Suma n-6 PUFA	9.9	10.3	9.5	10.2	1.1	1.5	0.0	2.0	1.3	0.0	1.1	2.2	0.0	0.0	0.0	0.0
Total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
DHA:EPA		1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0

5.9.5. Pigmentos

5.9.5.1. *Tetraselmis suecica*

Los valores de clorofila a de *Tetraselmis suecica* presentaron diferencias significativas ($P<0.05$) por el efecto de la temperatura y el aporte de nitrógeno en el medio. El mayor valor de clorofila a se obtuvo con 25 °C y con un aporte de nitrato de sodio (57.9 µg l^{-1}), mientras que el menor valor (32.8 µg l^{-1}) se presentó al tener los cultivos a 20 °C y con un aporte de nitrato de sodio (Figura 18). No existieron interacciones significativas ($P>0.05$) en el contenido de clorofila a por efecto de la temperatura, el aporte de nitrógeno y la irradiancia.

El contenido de clorofila b y c no presentaron diferencias significativas por efecto de las distintas condiciones experimentales ($P>0.05$) (Figura 18).

Los carotenoides presentaron diferencias significativas ($P<0.05$) por el efecto de la interacción de la irradiancia con la temperatura y también por efecto de la interacción de la irradiancia con el aporte de nitrógeno. Los valores mayores de carotenoides para esta especie se presentaron a 25 °C, con un aporte de nitrato de amonio y una irradiancia de 200 µE m^{-2} s^{-1} (Figura 18). Para esta variable no se encontró interacción significativa ($P>0.05$) entre los factores irradiancia, temperatura y aporte de nitrógeno (Figura 18).

5.9.5.2. *Aphanocapsa marina*

Para *Aphanocapsa marina* la clorofila a no presentó diferencias significativas en el contenido de clorofila a por efecto de la irradiancia ($P>0.05$), la temperatura ($P>0.05$), o el aporte de nitrógeno ($P>0.05$) (Figura 18). El contenido de clorofila a no mostró interacción significativa ($P>0.05$) entre los factores de irradiancia, temperatura y aporte de nitrógeno (Figura 18).

La clorofila b no presentó diferencias significativas por efecto de la irradiancia ($P>0.05$), o la temperatura ($P>0.05$) o el aporte de nitrógeno ($P>0.05$) (Figura 18). El contenido de clorofila b no presentó interacción significativa ($P>0.05$) por el efecto de la irradiancia, la temperatura y el aporte de nitrógeno.

No existieron diferencias significativas en el contenido de clorofila c por efecto de la irradiancia, (P>0.05), la temperatura (P>0.05), el aporte de nitrógeno (P>0.05) (Figura 18). La clorofila c no presentó interacción significativa (P>0.05) por efecto de la irradiancia, la temperatura y el aporte de nitrógeno.

El contenido de carotenoides obtenidos para *Aphanocapsa marina* presentaron diferencias significativas (P<0.05) por efecto de las distintas condiciones experimentales y con una interacción significativa entre los factores (P<0.05). El mayor valor de carotenoides (88.0 µg clorofila l^{-1}) se obtuvo a una temperatura de 25 °C, con un aporte de nitrato de sodio y a una irradiancia de 100 µE m^{-2} s^{-1} (Figuras 18).

5.9.5.3. *Heterococcus* sp.

El contenido de clorofila a obtenido para *Heterococcus* sp. en las diferentes condiciones experimentales, mostró diferencias significativas (P<0.05) por efecto del aporte de nitrógeno (nitrato de sodio). El mayor contenido (164.7 µg clorofila l^{-1}) se obtuvo en la condición experimental de 25 ºC, con un aporte de nitrato de sodio y una irradiancia de 100 µE m^{-2} s^{-1} (Figura 18). Sin embargo, no existieron diferencias significativas en el contenido de clorofila a por efecto de la temperatura (P>0.05) o la irradiancia (P>0.05) (Figura 18). La clorofila a no mostró interacción significativa (P>0.05) por efecto de la temperatura, la irradiancia y el aporte de nitrógeno (Figura 18).

El contenido de clorofila b también presentó diferencias significativas (P<0.05) entre las distintas condiciones experimentales por efecto del aporte de nitrógeno. Los mayores valores se evaluaron con un aporte de nitrato de sodio (Figura 18). Sin embargo, no existieron diferencias significativas en el contenido de clorofila b por efecto de la temperatura (P>0.05), el aporte de nitrógeno (P>0.05), o la irradiancia (P>0.05) (Figura 18). La clorofila b no mostró diferencias significativas (P>0.05) por la interacción de la temperatura, la irradiancia y el aporte de nitrógeno (Figura 18).

No existieron diferencias significativas en el contenido de clorofila c por efecto de la temperatura (P>0.05) o la irradiancia (P>0.05) o el aporte de nitrógeno (P>0.05) (Figura

18). La clorofila c no presentó diferencias significativas (*P*>0.05) por efecto de la interacción de los factores temperatura, irradiancia y aporte de nitrógeno (Figura 18).

Los carotenoides no mostraron diferencias significativas entre las diferentes condiciones experimentales por efecto de la irradiancia (*P*>0.05), o la temperatura (*P*>0.05) o el aporte de nitrógeno (*P*>0.05) (Figura 18). Los carotenoides no presentaron interacción significativa (*P*>0.05) por efecto de los factores temperatura, irradiancia y aporte de nitrógeno (Figura 18).

5.9.5.4. *Navicula* sp. (cepa 3)

El contenido de clorofila a en *Navicula* sp. (cepa 3) presentó diferencias significativas (*P*<0.05) entre las distintas condiciones experimentales por efecto de la irradiancia, los mayores valores de clorofila a se registraron en la irradiancia 100 µE m^{-2} s^{-1}. El mayor contenido de clorofila a (315.8 µg clorofila l^{-1}), se obtuvo a 20 ºC, con un aporte de nitrato de sodio y una irradiancia de 100 µE m^{-2} s^{-1} (Figura 18). Sin embargo, los valores de la clorofila a no mostraron diferencias significativas entre los cultivos mantenidos a diferentes condiciones experimentales por efecto de la temperatura (*P*>0.05), o el aporte de nitrógeno (*P*>0.05) (Figura 18). Tampoco existió interacción significativa (*P*>0.05) en el contenido de clorofila a por efecto de la interacción de la temperatura con la irradiancia y el aporte de nitrógeno.

La clorofila b no presentó diferencias significativas (*P*>0.05) para los cultivos mantenidos en las diferentes condiciones experimentales por efecto de la temperatura (*P*>0.05), o la irradiancia (*P*>0.05), o el aporte de nitrógeno (*P*>0.05) (Figura 18). Tampoco se encontró diferencias significativas (*P*>0.05) por efecto de la interacción de la temperatura, con la irradiancia y el aporte de nitrógeno (Figura 18).

El contenido de clorofila c presentó diferencias significativas entre las distintas condiciones experimentales (*P*<0.05), por la interacción entre los factores temperatura, irradiancia y aporte de nitrógeno (Figura 18). El mayor contenido de clorofila c (52.2 µg clorofila l^{-1}) se obtuvo a una temperatura de 20 ºC, con un aporte de nitrato de sodio y una irradiancia de 100 µE m^{-2} s^{-1}.

Los valores de carotenoides presentaron diferencias significativas (*P*<0.05) por el efecto del aporte de nitrógeno y los mayores valores se obtuvieron en el aporte de nitrato de sodio (Figura 18). El contenido de carotenoides no mostró diferencias significativas entre los cultivos mantenidos en las diferentes condiciones experimentales por efecto de la temperatura (*P*>0.05), o la irradiancia (*P*>0.05) (Figura 18). Además, no existió interacción significativa (*P*>0.05) en el contenido carotenoides por efecto de la interacción de la temperatura, la irradiancia y el aporte de nitrógeno.

5.9.5.5. Pigmentos entre de las 4 especies

El contenido de clorofila a de los cultivos de las especies *Tetraselmis suecica*, *Aphanocapsa marina*, *Heterococcus* sp. y *Navicula* sp. (cepa 3) mantenidos en las diferentes condiciones experimentales fueron significativamente diferentes entre las especies (*P*<0.05). Se encontró una interacción significativa (*P*<0.05) entre la temperatura, con la irradiancia y el aporte de nitrógeno. El mayor valor (315.8 $\mu g l^{-1}$) se obtuvo para *Navicula* sp. (cepa 3) a una temperatura de 20 ºC, con un aporte de nitrato de sodio y a una irradiancia de 100 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1.}$ (Figura 18).

Los valores de clorofila b no presentaron diferencias significativas (*P*>0.05) entre las especies y entre las diferentes condiciones experimentales y tampoco interacción significativa (*P*<0.05) por efecto de las variables estudiadas (Figura 18).

El contenido de clorofila c entre las cuatro especies mantenidas con dos aportes de nitrógeno, a dos temperaturas y a dos irradiancias presentaron diferencias significativas (*P*<0.05) (Figura 18). Para la especie *Navicula* sp. (cepa 3) se obtuvo el mayor valor de clorofila c (52.2 $\mu g\ l^{-1}$), a una temperatura de 20 ºC, con un aporte de nitrato de sodio y a una irradiancia de 100 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$ (Figura 18).

Los valores de carotenoides presentaron diferencias significativas (*P*<0.05) entre las cuatro especies y también por efecto de las diferentes condiciones de temperatura, aporte de nitrógeno e irradiancia (*P*<0.05). Para la diatomea *Navicula* sp. (cepa 3) se obtuvo el mayor valor (160.1 $\mu g\ l^{-1}$) de carotenoides a una temperatura de 20 ºC, con un aporte de nitrato de sodio y a una irradiancia de 200 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$ (Figura 18).

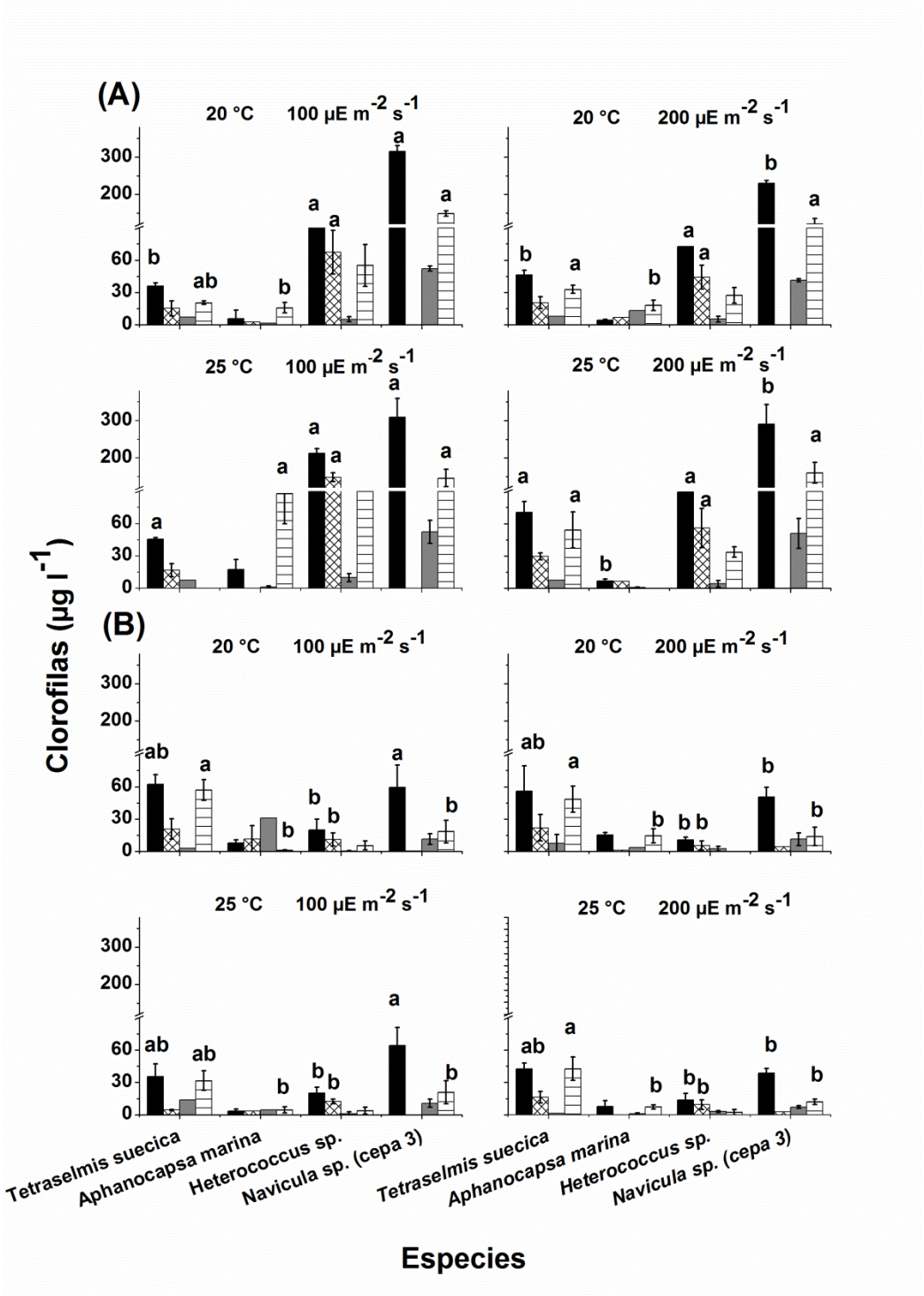

Figura 18. Valores promedio y desviación estándar de clorofila a ( ), clorofila b ( ), clorofila c ( ) y carotenoides ( ) de cultivos estáticos de *Tetraselmis suecica*, *Aphanocapsa marina*, *Heterococcus* sp. y *Navicula* sp. (cepa 3) mantenidos con dos temperaturas (20 y 25 ºC), dos irradiancias (100 y 200 µE m^{-2} s^{-1}) y con dos aportes químicos de nitrógeno provisto por nitrato de sodio (A) y por nitrato de amonio (B). Las letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos por especie (ANOVA factorial y prueba *a posteriori* de Tukey, *P*< 0.05: a>b).

5.10. Ensayo de alimentación

Se encontró que las variables de la calidad del agua de los cultivos de rotíferos (*Brachionus plicatilis*) mantenidos en distintas condiciones experimentales de alimentación, mostraron que la temperatura varió entre 21.2 a 21.6 ºC, el pH se mantuvo entre 7.3 a 7.5, el oxígeno disuelto se registró entre 4.3 y 4.6 mg l^{-1}, con respecto al amonio varió entre 0 a 1 mg l^{-1}, y la salinidad varió de 35 a 36‰ (Figura 19).

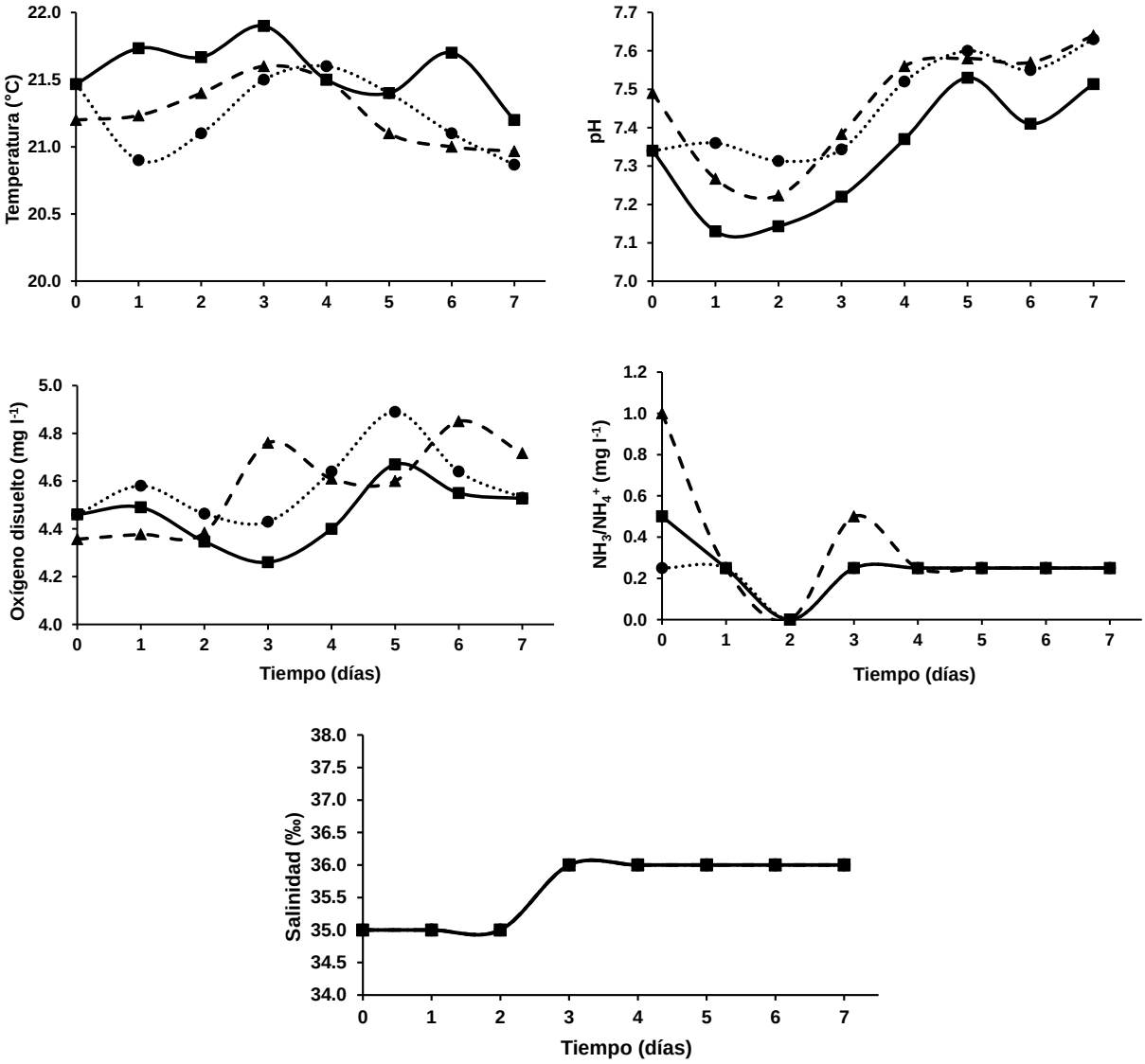

Figura 19. Variables ambientales de mantenimiento de los cultivos de rotíferos (*Brachionus plicatilis*) alimentados con *Tetraselmis suecica* ( ), *Navicula* sp. (cepa 3) ( ) e *Isochrysis galbana* ( ) como alimento control.

5.10.1. Crecimiento poblacional de los cultivos de rotíferos

La densidad de los cultivos de rotíferos alimentados con las 3 especies de microalgas fueron significativamente diferentes (*P<0.05*), los valores mayores de densidad final de rotíferos (107 rotíferos ml^{-1}), así como la significativamente mayor tasa de crecimiento de rotíferos (0.11 rotífero dia^{-1}) (*P<0.05*), fue obtenida al alimentar los rotíferos con *Tetraselmis suecica* (Figura 21), mientras que la menor densidad de rotíferos (13 rotíferos ml^{-1}) fue obtenida por los cultivos alimentados con *Navicula* sp. (cepa 3) (Figura 20 y Tabla 12).

El tiempo de duplicación de los cultivos de rotíferos alimentados con las distintas especies de microalgas fueron significativamente diferentes (*P<0.05*). Los rotíferos alimentados con *Isochrysis galbana* presentarón el mayor tiempo de duplicación (7.37 días), seguido por los rotíferos alimentados con *Tetraselmis suecica* (6.65 días). Los cultivos de rotíferos alimentados con *Navicula* sp. (cepa 3) mostraron el menor tiempo de duplicación (5.10 días) (Tabla 12).

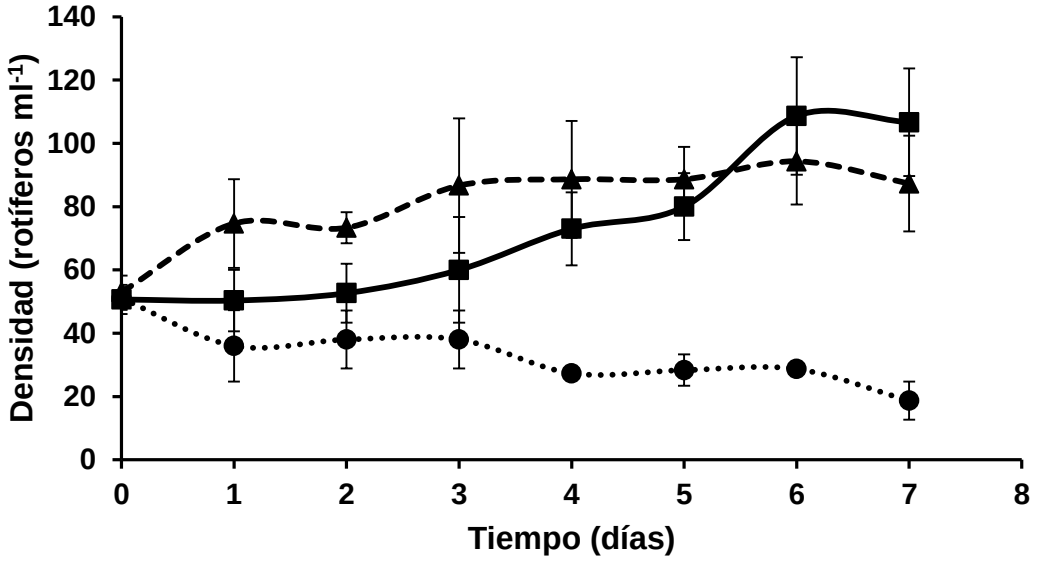

Figura 20. Valore promedio de la densidad de los cultivos de rotíferos (*Brachionus plicatilis*) alimentados con *Tetraselmis suecica* ( ), *Navicula* sp. (cepa 3) ( ) e *Isochrysis galbana* (control) ( ). Las barras verticales representan la desviación estándar (n=3).

Tabla 12. Valores promedio y desviación estándar de la densidad de rotíferos, la tasa de crecimiento, y el tiempo de duplicación de los cultivos de rotíferos (*Brachionus plicatilis*) alimentados con *Tetraselmis suecica*, *Navicula* sp. (cepa 3) e *Isochrysis galbana* (usado como alimento control). Las letras distintas indican diferencias significativas entre los distintos tipos de alimento (ANOVA de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey, *P*<0.05: a>b).

Especies	Densidad de rotíferos (rotíferos ml^{-1}) Inicial	Final	Tasa de crecimiento r (rotíferos día^{-1})	Tiempo de duplicación Td (días)
Tetraselmis suecica	51 ± 4.62	107 ± 17.01 a	0.11 ± 0.01 a	6.65 ± 0.93a
Navicula sp. (cepa 3)	51 ± 4.62	19 ± 6.03 b	-0.15 ± 0.05 b	-5.10 ± 1.82b
Isochrysis galbana	53 ± 4.62	87 ± 15.14 a	0.07 ± 0.04 a	7.37 ± 0.27a

El tamaño de los rotíferos obtenido al final del periodo de cultivo varió entre 383 a 402 µm de largo y entre 257 a 275 µm de ancho. No existieron diferencias significativas (*P*>0.05) en el tamaño (largo) de los rotíferos alimentados con los 3 tipos de microalgas usadas como alimento (Figura 21).

Tampoco existieron diferencias significativas (*P*>0.05) en el ancho de los rotíferos alimentados con los tres tipos de microalgas usadas como alimento (Figura 21).

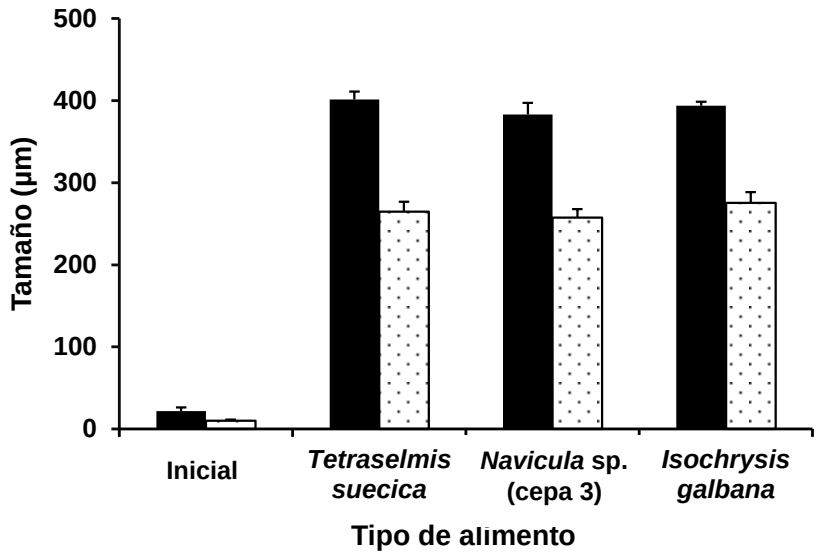

Figura 21. Valores promedio del largo (■) y ancho (□) en la fase inicial y final de los cultivos de rotíferos (*Brachionus plicatilis*) alimentados con *Tetraselmis suecica*, *Navicula* sp. (cepa 3) e *Isochrysis galbana* (control). Las barras verticales representan ± 1 desviación estándar (n=3).

5.10.2. Peso seco total, peso de cenizas y peso seco orgánico de los rotíferos

El peso seco total de los rotíferos alimentados con *Tetraselmis suecica* fue el tratamiento en el cual se obtuvo el mayor valor (217.6 µg ml^{-1}) y fue significativamente diferente ($P<0.05$) al peso seco total obtenido de los otros tipos de alimento suministrados (Figura 22).

Los valores de cenizas obtenidos para los rotíferos alimentados con las 3 especies de microalgas no fueron significativamente diferentes por efecto del tipo de alimento suministrado ($P>0.05$) (Figura 22).

Los valores del peso seco orgánico de los cultivos de rotíferos alimentados con *Tetraselmis suecica* fueron significativamente mayores (74.5 µg ml^{-1}) ($P<0.05$) a los obtenidos con los otros tipos de alimento suministrados (Figura 22).

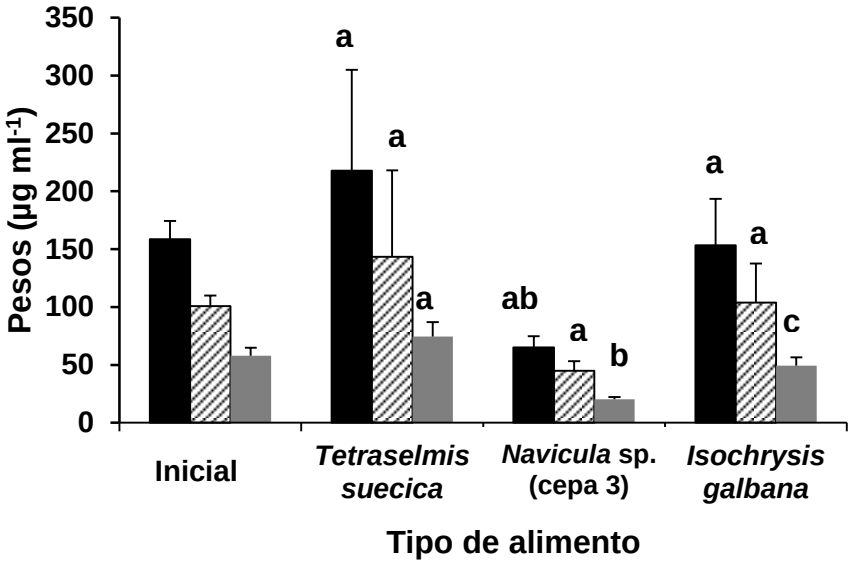

Figura 22. Valores promedio de peso seco total (■), peso de cenizas (▨) y peso seco orgánico (▬) de los rotíferos (*Brachionus plicatilis*) alimentados con *Tetraselmis suecica*, *Navicula* sp. (cepa 3) e *Isochrysis galbana* (control). Las barras verticales representan ± 1 desviación estándar (n=3). Las letras distintas indican diferencias significativas entre los distintos tipos de alimento (ANOVA de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey, $P<0.05$: a>b).

5.10.3. Composición proximal

No existieron diferencias significativas (*P*>0.05) en el porcentaje de proteínas de los rotíferos alimentados con los 3 diferentes tipos de microalgas (Figura 23).

El contenido de carbohidratos de los rotíferos alimentados con diferentes tipos de microalgas no mostraron diferencias significativas (*P*>0.05) (Figura 23).

Tampoco existieron diferencias significativas en el contenido de lípidos (*P*>0.05) en los cultivos de rotíferos alimentados con los diferentes tipos de microalgas (Figura 23).

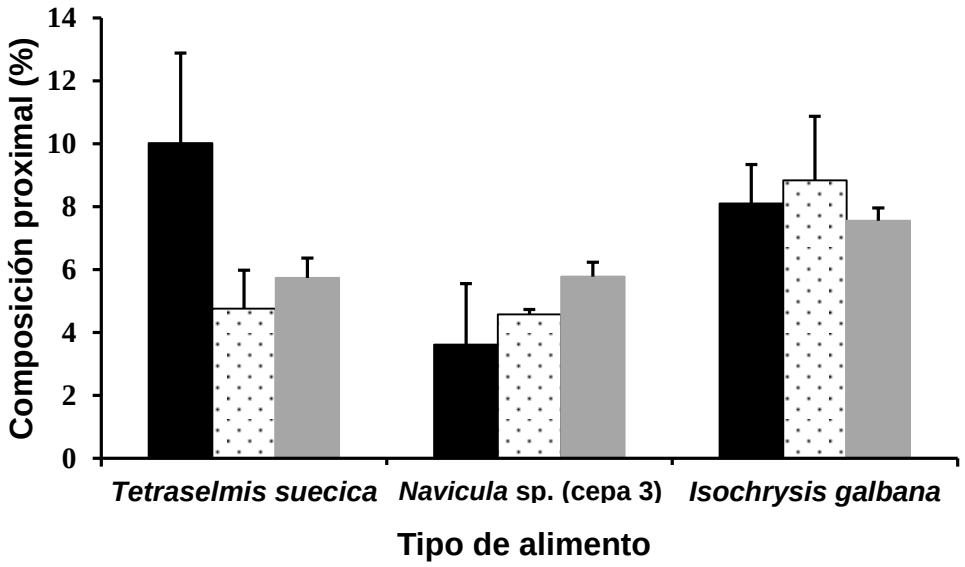

Figura 23. Porcentajes promedio de proteínas ( ), carbohidratos ( ) y lípidos ( ) de los rotíferos (*Brachionus plicatilis*) alimentados con *Tetraselmis suecica*, *Navicula* sp. (cepa 3) e *Isochrysis galbana* (control). Las barras verticales representan ± 1 desviación estándar (n=3).

Se hizo una correlación entre los valores de la composición proximal de las especies utilizadas como alimento y la composición proximal obtenida de los rotíferos, para relacionar la cantidad y la calidad de alimento que los rotíferos ingirieron y asimilaron. En *Tetraselmis suecica* se obtuvo una correlación positiva (0.6) en el contenido de lípidos, y una baja correlación negativa (-0.04) en el contenido de carbohidratos y en el contenido de proteínas se presentó una correlación positiva (0.2) pero con bajos valores (Tabla 13).

La diatomea *Navicula* sp. (cepa 3) mostró una alta correlación positiva (0.7) en el contenido de carbohidratos, mientras que una baja correlación (0.2) se presentó en el contenido de proteínas. El contenido de lípidos obtuvo una correlación positiva (0.4) (Tabla 13).

Para la especie control *Isochrysis galbana* se obtuvo una correlación positiva (1.0) en el contenido de carbohidratos y lípidos (1.0), mientras que presentó una correlación negativa de (-1.0) en el contenido de proteínas (Tabla 13).

Tabla 13. Valores promedio y desviación estándar de los porcentajes de proteínas, carbohidratos y lípidos de las microalgas usadas como alimento y de los cultivos de rotíferos (*Brachionus plicatilis*) así como el valor de correlación (R) entre ambas variables.

	Proteínas			Carbohidratos			Lípidos		
	Alimento	**Rotífero**	**R**	**Alimento**	**Rotífero**	**R**	**Alimento**	**Rotífero**	**R**
Tetraselmis suecica	18.9 ± 2.9	10.0 ± 2.9	0.2	11.5 ± 2.5	4.8 ± 1.2	-0.04	12.8 ± 8.5	5.7 ± 0.6	0.6
***Navicula* sp. (cepa 3)**	12.5 ± 1.9	5.9 ± 4.3	0.2	10.1 ± 3.4	5.4 ± 1.5	0.7	8.8 ± 0.7	6.1 ± 0.7	0.4
Isochrysis galbana	10.5 ± 1.3	8.1 ± 1.2	-1.0	4.4 ± 0.6	8.8 ± 2.0	1.0	7.2 ± 1.2	6.7 ± 1.4	1.0

5.10.4. Ensayo de sedimentación de *Navicula* sp. (cepa 3)

Se obtuvo que las células de *Navicula* sp. (cepa 3) se sedimentaron un 89% en los primeros 15 minutos después de agregar el inóculo y los porcentajes de sedimentación de las células de *Navicula* sp. (cepa 3) fueron significativamente diferentes ($P<0.05$) entre los diferentes intervalos de tiempo,

Después de 15 min, los valores de sedimentación de las células de *Navicula* sp. (cepa 3) se mantuvieron altos (85% a 93%) en los distintos tiempos de medición a pesar de utilizar aireación en los sistemas experimentales (Figura 24).

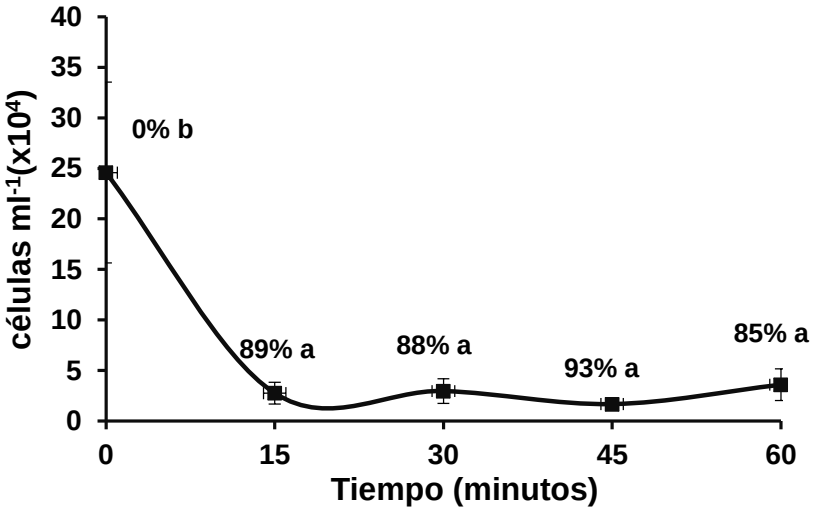

Figura 24. Valores promedio de las células sedimentadas de *Navicula* sp. (cepa 3) mantenidos en recipientes de plástico transparente (1 L). Las barras verticales representan ± 1 desviación estándar (n=3).

6. Discusión

Aislamiento

Se aislaron 21 cepas de microalgas de las cuales el grupo taxonómico más representado fueron las diatomeas (Bacillariophyceae), esta tendencia podría deberse a que los muestreos se realizaron en la costa y las diatomeas son el grupo de microalgas más abundante y diverso en las zonas costera, debido a su alta tolerancia a la variaciones medio ambientales (Round *et al*., 1990; Mann, 1999; Almaguer *et al*., 2004; Chen, 2012).

Durante el proceso de aislamiento existieron diferentes patrones de abundancia con respecto a los grupos taxonómicos (diatomeas, clorofíceas y cianobacterias) presentes en las muestras además, se observó que la diversidad de especies disminuyó durante el aislamiento debido a este patrón de sucesión de especies previamente mencionado.

En este estudio no todos las microalgas que estaban inicialmente en las muestras pudieron aislarse, ya que no todos los microorganismos son cultivables como ha sido previamente descrito por otros autores (Gerwick *et al*., 1994; Prieto *et al*., 2005) debido a que ciertas especies tienen requerimientos nutricionales muy específicos y a que algunas especies necesitan de otros organismos para su crecimiento (Andersen, 2005).

Por esta razón al realizar el aislamiento de las microalgas, se consideraron los requerimientos nutricionales de las posibles especies por aislar, por lo que la composición del medio de cultivo fue un factor importante a utilizar para el aislamiento (Chaichalerm *et al*., 2012). En el presente estudio se seleccionó el medio “f” descrito por Guillard y Ryther (1962) para mantener a las especies en proceso de aislamiento, debido a que por su composición, cubre un amplio rango de requerimientos de nutrientes para diversas especies desde cianobacterias hasta diatomeas.

Las condiciones de cultivo (temperatura, salinidad, irradiancia y tipo de luz) en las cuales las microalgas fueron mantenidas influyeron también en el aislamiento de microalgas, así como la capacidad competitiva de cada especie, su tasa de crecimiento, tamaño y su tolerancia a los cambios ambientales, las cuales fueron propiedades

importantes para su aislamiento como se ha determinado en otros trabajos acerca del asilamiento de especies de microalgas (Andersen, 2005; Borowitzka, 2013).

El mayor número de especies aisladas, en la localidad de Ensenada podría ser atribuido a las temperaturas similares entre el sitio de muestreo y la utilizada para el cultivo de las especies aisladas. Las especies que fueron aisladas en Ensenada, estuvieron mejor adaptadas a las condiciones de cultivo que las especies que fueron aisladas en los otros sitios de muestreo, este comportamiento selectivo por efecto de la temperatura ha sido descrito para otros grupos de microalgas (Robarts y Zohary, 1987; Kang *et al*., 2011).

Evaluación del crecimiento de las especies aisladas

Durante el ensayo preliminar de evaluación del crecimiento, fue *Amphora* sp. (cepa 6), para la cual se obtuvo la mayor tasa de crecimiento (0.58 divisiones día^{-1}), y este resultado fue mayor al obtenido por Prieto *et al*. (2005), donde aislaron y cultivaron diatomeas en dos tipos de medio (“f/2” y Conway) para fines acuícolas y obtuvieron tasas de crecimiento entre 0.0013 a 1.98 divisiones día^{-1}. Las tasas de crecimiento obtenidas en el presente trabajo fueron diferentes a lo obtenido por Prieto *et al*. (2005), lo cual pudo deberse al tipo de medio de cultivo utilizado, a los requerimientos nutricionales específicos y la capacidad de crecimiento de cada especie.

La mayoría de las especies de microalgas aisladas tuvieron una fase de acondicionamiento y otras especies tuvieron un crecimiento exponencial desde el inicio del cultivo, esta respuesta fue debida a la capacidad de adaptación de cada especie a las condiciones del medio, a la cantidad del inóculo, al tamaño de las células y al tipo de nutrientes disponibles en el medio de cultivo como ha sido descrito por otros autores para el crecimiento de diversas especies de microalgas y cianobacterias (Anderson, 2005; Barsanti y Gualtieri, 2006).

Los cultivos de diatomeas y cianofitas presentaron una fase de acondicionamiento, lo cual coincide con lo obtenido en el estudio de Prieto *et al*. (2005) al cultivar tres especies de diatomeas marinas (*Actinocyclus normanii*, *Cyclotella gromerata* y

Neodelphyneis pelagica), en donde los cultivos presentaron una fase de adaptación debido a que las células no estaban en condiciones de dividirse inmediatamente, ya que requerían aclimatarse a los nutrientes disponibles en el medio de cultivo. Este tipo de respuesta a tener una fase de acondicionamiento también está relacionada con la cantidad de células utilizadas como inóculo y su tamaño celular.

Reynolds (2006) sugiere que existe una dependencia de la tasa de crecimiento, respecto al tamaño y la forma celular, ya que células pequeñas como *Aphanocapsa marina* que es unicelular, con forma esférica y con un diámetro de 0.75 µm, tiene una mayor proporción de superficie-volumen y estructuras simples, por lo que no necesitan invertir recursos en producir tejidos por lo cual tienen altas tasas de crecimiento. En la presente investigación, existió una tendencia similar a la sugerida por Reynolds (2006) ya que la cianofita filamentosa *Komvophoron* sp. compuesta por células pequeñas fue la especie en la que se obtuvo la mayor tasa de crecimiento (2.98 divisiones día^{-1}), mientras que la xantofita *Heterococcus* sp. la cual forma racimos de células grandes con un tamaño promedio de 193.3 µm de longitud, con un ancho de 13.14 µm mostró la menor densidad celular.

La cianofita *Komvophoron* sp. fue la especie que presentó la mayor tasa de crecimiento (2.98 divisiones día^{-1}), esta tendencia podría deberse a que las cianoficeas se caracterizan por tener altas tasas de crecimiento debido a que incrementan su crecimiento a temperaturas en las cuales otras especies de microalgas eucarióticas disminuyen su crecimiento. Aunque las cianofitas tienden a crecer mejor a temperaturas entre 25 ºC a 30 ºC, en este estudio *Komvophoron* sp. creció a 20 ºC, debido a que las cianofitas pueden tolerar diversas condiciones ambientales (Cohen y Gurevitz, 2006; Reynolds, 2006; Gupta *et al*., 2013). Además, las cianofitas tienen estructuras simples, no necesitan invertir energía en formar estructuras celulares más complejas como las diatomeas y su reproducción es asexual por división celular simple (por bipartición o por fragmentación de los filamentos) lo que favorece que se reproduzcan más rápido (Barsanti y Gualtieri, 2006; Reynolds, 2006; Lürling *et al.,* 2013).

La tasa de crecimiento que fue obtenida para *Komvophoron* sp. (2.98 divisiones día^{-1}), fue mayor que la documentada para *Spirulina platensis* (0.11 a 0.92 divisiones dia^{-1}), que es una especie de cianofita comúnmente usada en actividades como la acuicultura,

biotecnología, farmacéutica y en nutraceútica (Kamilya *et al*., 2006; Mexia-Bernal, 2011; Borowitzka, 2013).

Debido a las altas tasas de crecimiento obtenidas para las cianobacterias aisladas en el presente estudio, estas especies pueden ser usadas como alimento de larvas de camarón (*Litopenaeus vannamei*) tal como fue usada la cianobacteria *Synechococus elongatus* en estudios previos (Moreno-Pérez y Sánchez-Saavedra, 2009). También las cianobacterias pueden ser usadas para alimentar zooplancton (*Brachionus plicatilis*) el cual típicamente es alimentado con microalgas como *Nannochloropsis oculata* (Campa-Ávila y Sánchez-Saavedra, 2009).

Brown (2002) recomienda que las microalgas deben tener un tamaño entre 1 a 100 µm para poder ser usadas como alimento vivo para larvas de peces y crustáceos así como para organismo filtradores. Por lo anterior las especies aisladas en el presente estudio podrian ser usadas como alimento vivo ya que el tamaño de las cepas aisladas es similar al rango sugerido por Brown (2002).

Es importante destacar que varias de las especies aisladas en este estudio no habían sido previamente descritas en la literatura (*Aphanocapsa marina, Komvophoron* sp.), por lo que el aislamiento de estas especies así como tener cultivos monoespecíficos resulta en una importante contribución para el conocimiento de la biodiversidad de especies de microalgas de la Península de Baja California y de México.

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

Para la diatomea *Amphora* sp. (cepa 5) se obtuvo el mayor peso seco total en la fase exponencial de crecimiento y también presentó el mayor contenido de cenizas de entre todas las especies aisladas, lo cual indica una mayor proporción inorgánica, debido a que las diatomeas tienen un mayor contenido de cenizas por el sílice que constituye su pared celular (Parsons, 1984).

El contenido de cenizas de las especies aisladas mostró valores mayores a los obtenidos en diversos estudios para otras especies pertenecientes al mismo grupo taxonómico (Lynn *et al*., 2000; Courtois de Viçose *et al*., 2012). Esta tendencia podría

deberse a que algunos grupos de microalgas que tienen altas tasas de crecimiento, acumulan minerales como consecuencia de sus requerimientos específicos de nutrientes, provocando un incremento en el contenido de las cenizas (31%-71%) (Vonshak, 1986; Roger *et al*., 1986; Roger, 2005). Además, posiblemente hubo un efecto de las sales presentes en el medio de cultivo usado, ya que estas sales pueden acumularse en la célula y quizá el formiato de amonio no fue suficiente para remover los residuos de sales como previamente ha sido descrito para otras especies de microalgas (Zhu y Lee 1997).

En cuanto al peso seco orgánico, fueron la diatomea *Amphora* sp. (cepa 5) y *Heterococcus* sp., las especies que obtuvieron el mayor peso seco orgánico, posiblemente a que hubo un incremento de componentes celulares de almacenamiento como lo obtuvo Zhu *et al*. (1997).

La alta tasa de crecimiento, la alta densidad celular y el mayor contenido de biomasa en peso seco total obtenidas para las especies de *Komvophoron* sp., *Aphanocapsa marina* y *Amphora* sp. (cepa 5) son importantes características para microalgas con potencial uso en la acuicultura.

Composición proximal por especie y por fase de crecimiento

La composición proximal presentó diferencias entre las diferentes especies y también por efecto de las dos fases de crecimiento evaluadas. Durante la fase de crecimiento exponencial fue mayor la producción de lípidos y resultó menor la síntesis de proteínas y carbohidratos. Durante la fase de crecimiento estacionaria fue mayor la producción de proteínas y carbohidratos que la síntesis de lípidos. Esta tendencia de los cambios en la composición proximal, fue debida a la respuesta de cada especie a las condiciones ambientales como luz, temperatura, salinidad, y nutrientes, y a la posterior producción de componentes celulares como ha sido descrita por otros autores para diversas especies de microalgas mantenidas en cultivo (Fernandez-Reiriz *et al*., 1989; Brown *et al*., 1996; Zhu *et al*., 1997; Lavoie *et al*., 2006; Lv *et al*., 2010).

Normalmente la acumulación de lípidos en las microalgas es mayor en la fase estacionaria de crecimiento, y es debida a que las células tienen bajo crecimiento causado por el proceso de limitación por luz y/o nutrientes (Brown *et al*., 1996; Courtois de Viçose *et al.*, 2012), sin embargo en este estudio el mayor contenido de lípidos se presentó en la fase exponencial de crecimiento, esto pudo deberse a que el inóculo provino de cultivos en fase estacionaria; en donde las microalgas continúan fijando carbono y produciendo lípidos, como ha sido descrito para otras especies de microalgas en donde se utilizó inóculo de una fase tardía del crecimiento exponencial (Valenzuela-Espinoza *et al*., 2005; Courtois de Viçose *et al*., 2012).

La mayoría de las cepas aisladas tuvieron altos porcentajes de lípidos con altas tasas de crecimiento y alto contenido de proteínas indicando que no exisitió limitación de nutrientes especialmente para las diatomeas que fue el grupo que mostró el mayor contenido de lípidos como previamente se ha descrito para otras diatomeas (Brown *et al*., 1997).

La producción de lípidos de las especies aisladas obtenida en el presente trabajo fue similar a los valores nutricionales (7.2%-23%) obtenidos por microalgas usadas comúnmente en la acuicultura (Brown, 2002; Conceição *et al*., 2010).

El contenido de proteínas fue diferente entre las especies aisladas y en algunas especies los valores de proteínas fue mayor durante la fase estacionaria de crecimiento respecto a lo obtenido en la fase exponencial, debido a que la mayoría de las especies aisladas estaban aún incorporando carbono e influye en el consumo de nutrientes como los nitratos y por lo tanto influye en la producción de proteínas como también fue observado para la especie *Rhodomonas* sp. (Valenzuela-Espinoza *et al*., 2005).

Al evaluar el contenido de proteínas entre las distintas especies de microalgas fue *Cymbella* sp. (cepa 2), la especie que mostró el mayor porcentaje (39.5%) de este constituyente en la fase estacionaria, y este resultado junto con sus caraterísticas de crecimiento indican que la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo fue suficiente para estimular la síntesis de proteínas por parte de las células, dicha tendencia ha sido descrita para otras diatomeas en cultivo (Fábregas *et al*., 1989; Fernández-Reiriz *et al*., 1989; Lourenço, 2002; Illman *et al.,* 2000).

El bajo contenido de proteínas obtenido para algunas especies de microalgas aisladas puede atribuirse a la redirección de su metabolismo por parte de la célula para producir componentes de almacenaje como lípidos y carbohidratos.

El contenido de carbohidratos de las especies de microalgas aisladas fue mayor en la fase estacionaria, lo cual en algunos grupos fue atribuido a que las mircoalgas consumieron el nitrógeno del medio de cultivo (Brown, 2002). La diatomea *Cymbella* sp. (cepa 2), presentó el mayor porcentaje de carbohidratos (47.5%), lo cual indica que las células tuvieron un factor limitante dentro del cultivo ya que esta especie además tuvo una baja tasa de crecimiento.

Las especies de microalgas aisladas en el presente estudio que presentaron un alto contenido de carbohidratos pueden ser usadas como alimento para ostiones y favorecer su crecimiento (Enright *et al.*, 1986).

Los resultados de carbohidratos y lípidos obtenidos para las 21 especies de microalgas aisladas en este trabajo fueron similares a los resultados obtenidos en otros estudios, en donde usaron especies de microalgas nativas como alternativa de alimento en la acuicultura (Renaud *et al*., 1994; Natrah *et al*., 2007; Tzovenis *et al*., 2009).

Las diferencias entre los valores obtenidos de la composición proximal para las 21 especies de microalgas aisladas, respecto a los obtenidos en otros estudios para especies similares, podrían ser debidos a las diferencias en las condiciones de cultivo, al estado fisiológico del inóculo y a la fase de crecimiento en la cual fueron cosechadas las muestras para su análisis tal como lo menciona Brown *et al*. (1997).

Perfil de ácidos grasos

El contenido de ácidos grasos varió entre las especies aisladas de acuerdo al grupo taxonómico al que pertenece, incluso entre especies del mismo género, se encontraron diferencias, como sucedió con el género *Amphora* al que pertenecen 7 cepas de las especies aisladas, en donde el contenido de ácidos grasos entre ellas fue diferente. Estas diferencias en el contenido de ácidos grasos, pueden atribuirse a que cada cepa o especie tiene una respuesta específica las condiciones ambientales y a que las cepas

aisladas vienen de diferente sitio de colecta y en consecuencia, distinta adaptación a las condiciones ambientales de cultivo. Esta diferencia en el contenido de ácidos grasos entre especies, e inclusive para una misma especie, han sido previamente descritas en otros estudios (Ling y Mai, 2005; Lang *et al*., 2011; Chen, 2012).

En general, el contenido de ácido palmítico (16:0) fue alto (5.8% a 47.8%) en todas las especies de microalgas aisladas, posiblemente debido al agotamiento de nitrógeno en el medio de cultivo, lo cual podría deberse a que las muestras para el análisis de ácidos grasos se cosecharon en la fase de crecimiento estacionaria temprana, cuando inicia la síntesis de metabolitos de reserva (lípidos y carbohidratos), y el ácido palmítico es uno de los primeros ácidos grasos que son sintetizados por microalgas (Go *et al*., 2012).

El perfil de ácidos grasos de las especies de cianofitas aisladas fue similar a lo obtenido por otros autores (Guedes *et al.,* 2011; Lang *et al*., 2011). En el presente estudio existieron diferencias en el contenido de ácidos grasos entre el grupo de cianofitas filamentosas (*Komvophoron* sp. y *Phormidium* sp.) y la cianofita unicelular (*Aphanocapsa marina*). Las cianofitas filamentosas presentaron un alto contenido de ácido α-linolénico (ALA) (13.4% a 37.5%), mientras que *Aphanocapsa marina* (colonias de células esféricas) presentó un alto porcentaje de ácido palmitoleico (44.1%), lo que podría estar asociado con su composición lipídica de la membrana como fue descrito en otras especies de microalgas (Tedesco y Duerr, 1989; Sato y Wada, 2009).

Aunque las cianobacterias filamentosas tuvieron un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (30.9% to 43.9%), no se encontraron los ácidos grasos esenciales EPA (ácido eicosapentaenoico) y DHA (ácido docosahexaenoico) los cuales son importantes para la acuicultura (García, 2000; Cardozo *et al*., 2007). Sin embargo, estas especies de cianobacterias aisladas antes mencionadas en el presente estudio (*Komvophoron* sp., *Phormidium* sp. y *Aphanocapsa marina*), pueden ser usadas como alimento para juveniles de camarón tal como fue utilizada la cianobacteria *Phormidium* sp., como alimento para *Penaeus monodon* (Sivakumar *et al*., 2011). Adicionalmente las especies de cianobacterias aisladas también podrían ser utilizadas para obtener pigmentos, compuestos antioxidantes y como suplemento alimenticio para peces (Belay *et al*., 1996; Abed *et al*., 2009; Varshney *et al*., 2015).

La clorofita *Tetraselmis suecica* mostró un alto contenido de ácido palmítico (16:0), α-linolénico (ALA) (18:3n-3), y ácido eicosapentaenoico (EPA) (20:5n-3), estos resultados coinciden con lo descrito en estudios realizados por otros autores para la misma especie (Brown, 2002; Patil *et al*. 2007; Guedes *et al* 2011), y señalan que los ácidos grasos encontrados para esta especie son esenciales para la nutrición en animales y humanos. El contenido de EPA obtenido para *Tetraselmis suecica* en el presente trabajo, fue mayor que el evaluado por Fernández-Reiriz *et al*. (1989) (0%) para la misma especie y por Lourenço *et al*. (2002) para *Tetraselmis gracilis* (10.7%) en la fase estacionaria temprana de crecimiento. Las diferencias en el contenido de ácidos grasos de *Tetraselmis suecica* obtenidas en el presente trabajo y lo mencionado en otros estudios, se debieron a las diferentes condiciones ambientales de cultivo, al medio de cultivo utilizado y posiblemente a diferencias en la respuesta fisiológica aún entre cepas de la misma especie.

La xantofita *Heteroccocus* sp. tuvo un perfil de ácidos grasos similar a lo obtenido por Patil *et al.* (2007) y Lang *et al*. (2011) para otras especies de xantofíceas. *Heteroccocus* sp. mostró un bajo porcentaje de EPA (1.5%), ARA (3.2%) y ALA (42.4%), que son importantes para la nutrición animal debido a que son componentes estructurales de lípidos de membrana (Cardozo *et al*., 2007; Guedes *et al*., 2011). Existen pocos estudios sobre la composición de ácidos grasos de xantofitas, lo cual hace difícil comparar los resultados obtenidos en el presente trabajo con otros estudios, sin embargo los datos evaluados no han sido previamente reportados y son una contribución al estudio de este grupo de microalgas.

El alto contenido de los ácidos grasos 14:0, 16:0, 16:1n-7, 20:4n-6 (ARA) y 20:5n-3 (EPA) obtenido para las diatomeas en el presente estudio fue similar a lo obtenido en otros estudios para el grupo de las diatomeas durante la fase de crecimiento estacionaria temprana (Ying y Kangsen, 2005; Chen, 2012).

Las diatomeas presentaron un alto porcentaje de PUFAs (n-3 y n-6), en particular el ácido eicosapentaenoico (EPA), pero su contenido varío entre las especies, aisladas posiblemente debido a que cada especie y cada cepa distribuye y acumula de manera diferente los diferentes tipos de lípidos en su estructura intracelular como mencionan previamente otros autores (Liang and Mai, 2005; Lv *et al*., 2010; Chen, 2012).

Particularmente *Amphora* sp. (cepa 5) presentó un alto contenido de EPA (39.6%) y fue mayor al obtenido por Correa-Reyes *et al*. (2009) para diferentes especies de diatomeas bentónicas y que son usadas como alimento para postlarvas de abulón rojo.

Ensayo de toxicidad

Los medios residuales de las especies aisladas no fueron tóxicos para los nauplios de *Artemia* debido a que, las especies aisladas no liberaron compuestos tóxicos extracelulares en las condiciones ambientales en las que fueron cultivadas las 21 especies de microalgas aisladas.

La producción de compuestos tóxicos depende de factores ambientales como la temperatura, el pH, la intensidad lumínica y la concentración y el tipo de nutrientes (especialmente el nitrógeno y el fósforo) (Carballo *et al*., 2003; Scholz y Liebezeit, 2012). Ross *et al*. (2006) realizaron un estudio sobre la toxicidad de la cianofita *Microcystis aeruginosa* y encontraron que la toxicidad se incrementó cuando fue estresada por aumento en la salinidad. Las condiciones de cultivo usadas en el presente trabajo, están en el rango de condiciones de cultivo estándar comúnmente usadas en la producción de microalgas bajo condiciones controladas como ha sido descrito por Andersen (2005). Además, ninguno de los sitios en donde fueron colectadas las muestras de agua para el aislamiento de microalgas, presentó un florecimiento algal nocivo, lo cual también indica que las microalgas aisladas no son tóxicas para otros organismos.

La producción de compuestos tóxicos también depende del grupo taxonómico al que pertenezca la microalga, en el presente estudio fueron aisladas cianofitas que pueden producir toxinas (Ortega *et al*., 2007; van Apeldoorn *et al*., 2007), sin embargo, en el presente estudio ninguno de los extractos obtenidos de los medios residuales de las cianofitas estudiadas resultó tóxico para los nauplios de Artemia en las condiciones de cultivo utilizadas.

Efecto de distintas condiciones experimentales para cuatro especies seleccionadas

A partir de las especies aisladas, se seleccionaron cuatro especies que presentaron alta tasa de crecimiento, con el propósito de conocer la respuesta del crecimiento, composición proximal y el perfil de ácidos grasos al ser mantenidas en distintas condiciones de cultivo. Las especies seleccionadas para ser evaluados fueron: *Tetraselmis suecica*, *Aphanocapsa marina, Heterococcus* sp., y *Navicula* sp. (cepa 3).

Existen diversos estudios sobre el efecto de la temperatura, el aporte de nitrógeno y la irradiancia respecto al crecimiento de microalgas, pero pocos estudios evalúan el efecto de la interacción de más de dos factores ambientales respecto al crecimiento y la composición proximal (Redalje y Laws, 1983; Lourenço *et al.,* 2002; Kang *et al*., 2011), con el propósito de conocer las mejores condiciones para su cultivo y la respuesta en la síntesis de lípidos.

Tetraselmis suecica

Las curvas de crecimiento de *Tetraselmis suecica* muestran un crecimiento continuo y en especial con el aporte de nitrato de sodio se obtuvieron los mayores valores de crecimiento, lo cual podría deberse a que *Tetraselmis suecica* puede crecer en un amplio rango de tipo y concentración de nutrientes en el medio natural ya que esta clorofita se encuentra comúnmente en aguas eutrofizadas como lo han descrito otros autores (Fabregas *et al*., 1985; Weiss *et al.,* 1985). Además, el nitrato de sodio fue el aporte de nitrógeno que previamente se utilizó como nutriente en el medio de cultivo usado para el aislamiento, por lo anterior posiblemente la especie ya tenía un preacondicionamiento a usar este tipo de forma química del nitrógeno del medio.

La mayor densidad celular cuantificada para *Tetraselmis suecica* en este estudio fue evaluada a una temperatura de 25 ºC con un aporte de nitrato de sodio y a una irradiancia de 200 µE m^{-2} s^{-1}. Se ha evaluado que hay un mayor crecimiento de *Tetraselmis suecica* conforme aumenta la temperatura, mientras que el nitrato de sodio es esencial para la producción de biomasa, la irradiancia utilizada suministró la energía

suficiente para el crecimiento (Go *et al*., 2012; Chen *et al*., 2012). Nieves *et al*. (2005) realizaron cultivos de *Tetraselmis suecica* a 25 °C, en medio "f" con una adición de 5, 10 y 20 mg l^{-1} de productos de zeolita, a una irradiancia de 120-130 µE m^{-2} s^{-1} y obtuvieron una densidad celular en un rango de 0.6-0.7x10^6 células ml^{-1}, estos valores reportados por los autores antes mencionados fueron menores a los que se obtuvieron en este estudio con la especie aislada y mantenida en distintas condiciones de cultivo, estas diferencias en las densidades celulares obtenidas se deben a la diferentes aportes de nutrientes y de irradiancia.

En el presente estudio hubo un efecto de la temperatura sobre la tasa de crecimiento obtenida para *Tetraselmis suecica*, mostrando los mayores valores de crecimiento a una temperatura de 20 °C, similar a lo descrito en el estudio realizado por Weiss *et al*. (1985) quienes mencionan que la temperatura óptima para el crecimiento de *Tetraselmis suecica* se encuentra en un rango de entre 25 °C a 27 °C, pero puede obtener altas densidades celulares en un rango de temperatura de 15 °C a 32 °C, lo anterior ocurre siempre que se tenga una alta concentración de nutrientes en el medio de cultivo.

Las tasas de crecimiento obtenidas en este estudio para *Tetraselmis suecica* fueron similares a las obtenidas por Fábregas *et al*. (1985) (0.53-0.63 divisiones $día^{-1}$) en condiciones similares de cultivo a las del presente trabajo, así como a los valores mostrados en el estudio realizado por Weiss *et al.* (1985) (0.61 divisiones $día^{-1}$) al mantener a esta clorofita en agua de mar con un aporte de nitrato de potasio y a una temperatura de 22 °C.

La mayor tasa de crecimiento y la mayor densidad celular de *Tetraselmis suecica* se obtuvieron con una irradiancia de 200 µE m^{-2} s^{-1}, esta tendencia coincide con lo mostrado en un estudio realizado por Meseck *et al*. (2005) con la especie *Tetraselmis chui* (cepa PLY429), en el cual tuvieron mayores densidades celulares (2.5x10^6 células ml^{-1}) y una tasa de crecimiento (0.58 divisiones $día^{-1}$) en los cultivos mantenidos con altas irradiancias (220 µE m^{-2} s^{-1}).

Con respecto a los tiempo de duplicación obtenidos para *Tetraselmis suecica* en este estudio, se encontraron similares resultados a los obtenidos por Weiss *et al*. (1985) (2 días).

Los resultados obtenidos en este trabajo para *Tetraselmis suecica* en las distintas condiciones de cultivo, muestran que esta clorofícea es capaz de crecer y aclimatarse a diferentes condiciones de cultivo.

Aphanocapsa marina

Las curvas de crecimiento de la cianofita *Aphanocapsa marina* muestran que tuvo una preferencia por el aporte de nitrato de amonio en el medio de cultivo, esto podría deberse a que las cianofitas son capaces de crecer con amonio como aporte de nitrógeno, que es la forma química de nitrógeno más fácil de incorporar y asimilar por las cianobacterias (Flores y Herrero, 1994).

Las tasas de crecimiento obtenidas en este estudio para *Aphanocapsa marina*, fueron menores a las evaluadas por Lourenço *et al.* (2002) para *Synechococcus subsalsus* con aporte de nitrato de sodio (1.34 divisiones día^{-1}) y nitrato de amonio (1.44 divisiones día^{-1}). En este estudio el crecimiento de *Aphanocapsa marina* fue mayor a una irradiancia de 200 µE m^{-2}s^{-1} mientras que en el estudio realizado por Loreto *et al*. (2003) con *Anabaena* PCC 7120 no obtuvieron diferencias en las tasas de crecimiento debidas a las diferentes concentraciones de nitrato de sodio (0, 1, 2, 4, 8 mM) y diferentes irradiancias (78, 156 y 238 µmoles m^{-2} s^{-1}) usadas en el estudio.

Las mayores tasas de crecimiento en *Aphanocapsa marina* se obtuvieron a una temperatura de 20 °C, sin embargo a 25 °C se ha visto que es la temperatura óptima de crecimiento para diversas especies de cianofitas, pero estos organismos pueden crecer a otras temperaturas diferentes a las óptimas, debido a su alta capacidad de aclimatación (Robarts y Zohary, 1985; Lürling *et al*., 2013). Lürling *et al*. (2013) realizaron un estudio comparativo de las tasas de crecimiento entre cianofitas y clorofitas de agua dulce cultivadas a diferentes temperaturas (20 °C a 35 °C), y encontraron que las tasas de crecimiento (0.40-0.93 divisiones día^{-1}) que obtuvieron a

25 °C, fueron mayores a las obtenidas en este estudio a la misma temperatura para los cultivos de *Tetraselmis suecica* y *Aphanocapsa marina.*

***Heterococcus* sp.**

La especie *Heterococcus* sp. presentó una fase de acondicionamiento y una preferencia por el aporte de nitrato de sodio lo que propició un mayor crecimiento a una irradiancia de 100 µE m^{-2} s^{-1}, estos resultados muestran para esta especie una preferencia por este aporte de nitrógeno y por una baja irradiancia. En un estudio realizado por Casselton (1966) con la especie *Heterococcus caespitosus* y otras microalgas de la clase Xanthophyceae, encontraron que esta especie de xantofita puede crecer en condiciones de obscuridad y con un aporte de glucosa.

En este estudio hubo un efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *Heterococcus* sp. ya que obtuvo una alta tasa de crecimiento a una temperatura de 20 °C sin embargo, en un estudio realizado por Belcher y Fogg (1958) con la xantofita *Tribonema aequale* obtuvieron que su temperatura óptima de crecimiento fue de 25 °C, y que es capaz de utilizar diferentes compuestos orgánicos de nitrógeno.

***Navicula* sp. (cepa 3)**

Las curvas de crecimiento de la diatomea *Navicula* sp. (cepa 3) presentaron una fase de acondicionamiento en todas las condiciones experimentales, lo anterior puede deberse al estado fisiológico de las células y que a pesar de que en el medio de cultivo existiera una alta concentración de nutrientes en el medio, no había incorporación de los nutrientes hacia la célula, posiblemente debido a que la concentración del inóculo fue baja permitiendo una mayor penetración de la luz, y provocando un estrés en la célula y por consiguiente afectó la tasa de crecimiento como previamente ha sido descrito para una rodofícea marina (Lafarga-de la Cruz *et al*., 2006).

En el presente estudio las tasas de crecimiento de *Navicula* sp. (cepa 3) mostraron diferencias entre las condiciones experimentales por efecto del aporte de nitrógeno y

por la temperatura y que resulta contrario a lo obtenido por Lourenço *et al*. (2002), quienes evaluaron el crecimiento de dos especies de diatomeas al cultivarlas con tres aportes de nitrógeno (nitrato de sodio, amonio y urea), y en este estudio no obtuvieron diferencias por efecto del tipo de aporte de nitrógeno, señalando los autores que el sílice pudo ser el nutriente limitante para la asimilación de nitrógeno.

Las altas tasas de crecimiento obtenidas para *Navicula* sp. (cepa 3) al cultivar las células con un aporte de nitrato de sodio es una tendencia que ha sido descrita por otros autores para el genero *Navicula* (Lewin y Guillard, 1963; Fisher y Cowdell, 1982; Lebeau y Robert, 2003). Sin embargo cuando las células de *Navicula* sp. (cepa 3) fueron cultivadas con un aporte de nitrato de amonio presentaron las menores tasas de crecimiento debido a un posible efecto de inhibición por la absorción del amonio como ha sido descrito para otras especies de diatomeas como *Skeletonema costatum* (Bates, 1976) y *Thalassiosira pseudonana* (Yin *et al.*, 1998).

Con respecto al efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *Navicula* sp. (cepa 3) se obtuvieron altas tasas de crecimiento a 25 °C. Esta tendencia es debida a que las diatomeas tienen un amplio rango de tolerancia a diferentes temperaturas, además de que el crecimiento es dependiente de la interacción de la temperatura con otros factores como la luz, los nutrientes y las caracteristicas fisiológicas de la especie (Admiraal, 1977; Renaud *et al*., 1995; Tian *et al*., 2002).

Las tasas de crecimiento obtenidas en este estudio para *Navicula* sp. (cepa 3) fueron similares a las obtenidas por Correa-Reyes *et al*. (2001) para la diatomea *Navicula incerta* (0.40 divisiones por día^{-1}) mantenida en condiciones similares de cultivo.

Las densidades celulares de *Navicula* sp. (cepa 3) se modificaron debido al tipo de aporte químico de nitrógeno en el medio de cultivo, presentando altas densidades celulares con el aporte de nitrato de sodio. Esta tendencia es debida a que las diatomeas pueden aclimatarse y crecer en diferentes medios de cultivo tanto con aportes orgánicos como inorgánicos, sin embargo la síntesis de compuestos orgánicos es lenta. En el caso del uso de amonio como nutriente en algunas especies de diatomeas, este nutriente no promueve el crecimiento debido a la poca tolerancia por este nutriente, por lo cual se obtuvo una mayor densidad con nitrato de sodio en

diversas investigaciones realizadas con distintas especies de diatomeas (Lewin y Guillard, 1962; Fisher y Cowdell, 1982; Lebeau y Robert, 2003).

Comparación entre las cuatro especies de microalgas en distintas condiciones de cultivo

La especie *Tetraselmis suecica* mostró las mayores densidades celulares obtenidas en las curvas de crecimiento entre las cuatro especies seleccionadas y mantenidas con un aporte de nitrato de sodio, estos resultados son debidos a que esta especie es muy tolerante a cambios de salinidad, pH y puede crecer con diferentes aportes de nutrientes como ha sido descrito previamente por otros autores (Fabregas, *et al*. 1985; Weiss, *et al*. 1985). Fábregas *et al*. (1985) mostraron que al cultivar a *Tetraselmis suecica* en altas concentraciones de nitrato de sodio ($2x10^{-6}$ a $1.6x10^{-5}$ M $NaNO_3$), a 15 ºC y con un inóculo inicial de $50x10^4$ células ml^{-1}, obtuvieron curvas de crecimiento con una fase de acondicionamiento de dos días. Estas diferencias entre las curvas de crecimiento obtenidas por Fabregas *et al*. (1985) y las mostradas en el presente trabajo, son debidas a la diferente cantidad de inóculo de los cultivos y a la concentración molar de nitratos en el medio de cultivo, ya que en el presente trabajo la concentración molar del nitrato de sodio fue mayor ($1.7x10^{-3}$ M).

Las características de las cuatro especies seleccionadas, el tipo de aporte de nitrógeno y la irradiancia, son factores que influyeron en las densidades celulares obtenidas en los ensayos experimentales. La cianofita *Aphanocapsa marina* fue la especie en la que se obtuvo los mayores valores de densidad celular, mostrando una preferencia por el aporte de nitrato de sodio y una irradiancia de 200 µE m^{-2} s^{-1}. La alta densidad celular de *Aphanocapsa marina* podría deberse a su menor tamaño, por consiguiente a su acelerado metabolismo y a el tipo de reproducción asexual de estos organismos, como previamente ha sido descrito para otras especies de cianobacterias (Barsanti y Gualtieri, 2006; Reynolds, 2006).

La especie *Aphanocapsa marina* también presentó la mayor tasa de crecimiento de entre las cuatro especies cultivadas en las diferentes condiciones experimentales, con un aporte de nitrato de sodio debido a que las cianobacterias pueden asimilar del nitrato

a través de la reducción de nitrato intracelular a amonio (vía nitrito), además que es la forma de incorporar el nitrógeno a los compuestos orgánicos (Lourenço *et al*., 2002; Flores y Herrero, 1994).

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

La temperatura, la irradiancia así como la interacción entre los factores temperatura y el nitrato de amonio fueron los factores que influyeron en el peso seco total, el contenido de cenizas y el peso seco orgánico de *Tetraselmis suecica* y de acuerdo a Kang *et al*. 2011, tanto la temperatura como la luz son factores importantes que controlan el crecimiento y los procesos intracelulares de las microalgas.

El peso seco total, el contenido de cenizas y el peso orgánico de *Aphanocapsa marina* presentaron diferencias en los cultivos por efecto de la temperatura, la irradiancia y el aporte de nitrógeno e influyeron en la producción de biomasa. De acuerdo a Pandey *et al*. (2010) la irradiancia afecta el crecimiento y la tasa fotosintética de las células y por consiguiente la producción de biomasa.

La temperatura es otro factor que influyó en la producción de biomasa microalgal, en un estudio realizado por Kenekar y Deodhar (2013) donde evaluaron el efecto de la variables fisicoquímicas sobre la productividad de *Geitlerinema sulphureum*, obtuvieron diferencias en el peso al cultivar a esta cianofita a 20 ºC y 25 ºC, dicha tendencia fue similar a lo obtenido en el presente estudio.

Con respecto a el peso seco total, el contenido de cenizas y el peso seco orgánico de la xantofita *Heterococcus* sp., se presentaron cambios por efecto de la irradiancia (100 µE m^{-2} s^{-1}) y el aporte de nitrógeno (nitrato de amonio). Sin embargo, en otros estudios realizados con otras especies de xantofitas obtuvieron una mayor acumulación de biomasa a irradiancias de 134 µE m^{-2} s^{-1} a 450 µE m^{-2} s^{-1} (Řezanka *et al.,* 2010; Gigova *et al*., 2012; Nelson *et al*., 2013). Esta diferencia entre los resultados de peso obtenidos para *Heterococcus* sp. en el presente trabajo y los obtenidos en los estudios previamente mencionado, podrían deberse a las diferencias fisiológicas entre las especies utilizadas y al sitio de donde fueron aisladas, ya que la mayoría de las

especies de los otros trabajos antes descritos en este párrafo fueron aisladas de muestras del suelo o de hábitats con temperaturas entre los 4 °C a 22 °C.

La temperatura, la irradiancia y el aporte de nitrato de sodio modificaron el peso seco total, las cenizas y el peso seco orgánico de *Navicula* sp. (cepa 3). Esta tendencia se debió a que las condiciones de cultivo influyeron en el tamaño y grosor de la frústula así como en la acumulación de sílice relacionada con la disponibilidad de nutrientes en el medio como ha sido descrito por otros autores para diatomeas en cultivo (Sicko-Goad *et al*., 1984).

Las diferencias en el peso de las cuatro especies seleccionadas muestran alta producción de biomasa y tolerancia de *Tetraselmis suecica* a los cambios en las condiciones de cultivo, lo que le permitieron obtener los mayores valores de peso seco total, contenido de ceniza y peso seco orgánico.

Composición bioquímica

Tetraselmis suecica

El alto contenido de proteínas de *Tetraselmis suecica* presentó un incremento por efecto de la irradiancia y del aporte de nitrato de amonio, lo cual indica que la irradiancia afectó el crecimiento e influyó en la asimilación de nitrógeno favoreciendo la síntesis de proteínas. La asimilación de nitrógeno es dependiente de la luz, ya que es necesaria la energía (ATP) obtenida en la fotosíntesis para el transporte activo de nitrato, la síntesis de proteínas y para el crecimiento (Barsanti y Gualtiere, 2006; Vásquez-Suárez *et al.,* 2013).

En el presente trabajo el aporte de nitrato de amonio no favoreció el crecimiento microalgal de *Tetraselmis suecica* pero si la producción de proteínas, lo cual podría deberse a que la asimilación del amonio no requiere de un sistema enzimático para su reducción y posterior producción de aminoácidos y síntesis de proteínas como ha sido descrito para otras especies de microalgas (Lourenço *et al*., 1997).

El mayor porcentaje de proteínas (26.8%) obtenido para *Tetraselmis suecica* en el presente estudio fue similar al valor de proteínas (20%) obtenido por Brown *et al*. (1997), quienes evaluaron el valor nutricional de *Tetraselmis suecica* en condiciones similares de temperatura (20 ºC) e irradiancia (80 µE m^{-2} s^{-1}). La diferencia en el contenido de proteínas entre los ambos estudios se debió a los diferentes tipos de medios de cultivo utilizado.

El contenido de carbohidratos de *Tetraselmis suecica* fue similar (6.7%-13.8%) entre todas las condiciones experimentales evaluadas en este estudio, y los porcentajes obtenidos en el presente trabajo resultaron similares a los obtenidos por Brown, *et al*. (1997) para *Tetraselmis suecica* (14%) y por Lourenço, *et al*. (2002) (24.4%) para *Tetraselmis gracilis* mantenida en condiciones de cultivo similares a las del presente trabajo.

Los porcentajes de lípidos obtenidos en este estudio (6.8%-17.6%) para *Tetraselmis suecica* en las diferentes condiciones experimentales, fueron similares a los obtenidos por Lourenço *et al*. (2002) para *Tetraselmis gracilis* (9.1%-12.9%) al cultivarla con tres tipos de aportes de nitrógeno (nitrato de sodio, amonio y urea).

El similar contenido de carbohidratos, así como similares valores de lípidos entre las diferentes condiciones experimentales para *Tetraselmis suecica*, pueden ser debidos a la etapa del cultivo en la cual fue obtenida la muestra (estacionaria temprana) para el análisis de composición proximal. Se conoce que en la fase estacionaria temprana de crecimiento, aún hay nitrógeno disponible en el medio favoreciendo la producción de proteínas, pero no la síntesis de productos de reserva como los carbohidratos y lípidos, esta tendencia ha sido descrita por otros autores para diversas especies de microalgas (Brown *et al.,* 1996, 1997).

El mayor contenido de ácidos grasos saturados y monoinsaturados obtenido para *Tetraselmis suecica* en el presente trabajo, mostró que hubo un mayor contenido de este tipo de ácidos grasos con un aporte de nitrato de amonio en el medio de cultivo, lo cual pudo deberse a un estrés nutricional causado por una deficiencia en el aporte de nitrógeno promoviendo en consecuencia la síntesis de estos ácidos grasos (Vásquez-Suárez *et al.,* 2013; Sánchez-García *et al.,* 2013).

En los cultivos de *Tetraselmis suecica,* para el ácido graso saturado 16:0 se obtuvieron altos porcentajes en todas las condiciones experimentales, esta tendencia es debida a la acumulación de ácidos grasos saturados por limitación de nutrientes, coincidiendo con lo obtenido por Sánchez-García *et al.* (2013) y por Otero y Fábregas (1997) en *Tetraselmis suecica*.

En el presente trabajo *Tetraselmis suecica* mostró un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados en todas las condiciones experimentales, y de entre los PUFAs fueron los ácidos grasos 18:3n-3 (ALA) y 20:5n-3 (EPA) en los cuales se obtuvieron los mayores porcentajes con un aporte de nitrato de sodio. Esta tendencia previamente descrita para *Tetraselmis suecica* en este estudio, puede ser debida a la alta disponibilidad del nitrato sodio en el medio de cultivo, ya que Otero y Fábregas (1997) proponen que hay un aumento en el grado de insaturación de los ácidos grasos cuando hay disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo.

La clorofita T*etraselmis suecica* en el presente trabajo mostró un alto porcentaje (20.5%) del ácido graso 20:5n-3 (EPA), al cultivar a esta clorofita a una temperatura de 20 ºC, con una irradiancia de 200 µE m^{-2} s^{-1} y con un aporte de nitrato de sodio, resultando que el contenido de EPA fue mayor al obtenido en otros estudios para especies del género *Tetraselmis* (Zhukova y Aizdaicher, 1995; Lourenço *et al*., 2002; Sánchez-García *et al*., 2013).

Aphanocapsa marina

La especie *Aphanocapsa marina* presentó un incremento en el contenido de proteínas por efecto del aporte de nitrato de amonio. De acuerdo a lo mencionado por Flores y Herrero (1994) y Florencio (1999), esta tendencia se debe a que las cianobacterias son organismos capaces de asimilar distintas formas de nitrógeno entre ellas el amonio que puede ser incorporado rápidamente por su grado de oxidación a compuestos orgánicos para la síntesis de proteínas.

Al mantener a los cultivos de *Aphanocapsa marina* con una irradiancia de 200 µE m^{-2} s^{-1} y a una temperatura de 25 °C se incrementó el contenido de proteínas, esta tendencia

también fue obtenida por Loreto *et al*. (2003) con la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120, ya que obtuvieron una mayor producción de proteínas a una similar irradiancia (156 µE m^{-2} s^{-1}). Esta respuesta del incremento de proteínas, se debe a que la producción de proteínas tanto en microalgas como en cianobacterias es dependiente del proceso de fotofosforilación y de la disponibilidad de luz (Loreto *et al*., 2003).

No hubo diferencias en el contenido de carbohidratos de *Aphanocapsa marina* entre las diferentes condiciones experimentales, (5.22-14.75%), lo cual indica que no hubo limitación de nutrientes o saturación de luz que causara un aumento de carbohidratos. Además, los valores del porcentaje de carbohidratos obtenidos para *Aphanocapsa marina* en el presente estudio fueron similares a lo reportado en otros estudios para otras especies de microalgas y cianobacterias (Volkman *et al*., 2006)

La producción de lípidos de la cianobacteria *Aphanocapsa marina* fue modificada por efecto del tipo de aporte de nitrógeno (nitrato de amonio) y de la irradiancia (200 µE m^{-2} s^{-1}), estas condiciones de cultivo promovieron un incremento en la síntesis de lípidos, pero se obtuvo la menor densidad celular. En algunas especies de microalgas y cianobacterias se ha encontrado una relación inversa entre el contenido de biomasa y la producción de lípidos (Sánchez-García *et al*., 2013), esta tendencia previamente descrita es acorde a los resultados del incremento de lípidos evaluados en este estudio para *Aphanocapsa marina*.

Los resultados de lípidos obtenidos en *Aphanocapsa marina* en el presente trabajo, también indican que posiblemente hubo una disminución en el contenido de nitrógeno disponible en el medio, lo cual favoreció la producción de lípidos, pero disminuyó la tasa de crecimiento, esta tendencia previamente ha sido descrita para otras especies de microalgas en similares condiciones de cultivo (Brown *et al*., 1997; Sánchez-García *et al*., 2013).

Diversos autores (Fernández-Reiriz *et al*., 1989; Courtois de Viçose, 2012; Pignolet *et al.,* 2013) señalan que cuando las condiciones de cultivo son óptimas para el crecimiento, no lo son para la producción de lípidos, y esto causa que se incremente la producción de lípidos usualmente en la fase estacionaria de crecimiento, ya sea por

efecto de la limitación de algún nutriente en el medio de cultivo, o bien por un decremento en la cantidad de luz disponible debido a la alta densidad celular.

El perfil de ácidos grasos de la cianobacteria *Aphanocapsa marina* en las diferentes condiciones experimentales de éste estudio, se caracterizó por un alto contenido de ácidos grasos saturados y monoinsaturados, y sin producción de ácidos grasos poliinsaturados, lo cual se debe a que las cianobacterias unicelulares carecen de ácidos grasos poliinsaturados o hay una baja producción de éste tipo de compuestos, sin embargo han encontrado que en cianobacterias filamentosas si hay síntesis de PUFAs (Oren *et al*., 1985). Como en el presente estudio, hubo altos porcentajes del ácido graso poliinsaturado 18:3n-3 en dos de las especies de cianobacterias filamentosas aisladas *Komvophoron* sp. (37.5%) y *Phormidium* sp. (13.4%). Esta diferencia en la producción de ácidos grasos poliinsaturados entre cianobacterias unicelulares y filamentosas también fue obtenida por Guedes *et al*. (2011).

Los principales ácidos grasos 14:0 (48.1%), 16:0 (38.4%) y 16:1n-7cis (51.7%) obtenidos para *Aphanocapsa marina* coinciden con los valores obtenidos por Merritt *et al*. (1991) en cepas de cianobacterias unicelulares marinas.

En este estudio al utilizar una irradiancia de 100 µE m^{-2} s^{-1} en los cultivos de *Aphanocapsa marina*, se presentó un mayor contenido de ácidos grasos, lo cual podría deberse a que la irradiancia influyó en la composición de ácidos grasos saturados. Esta especie de cianobacteria fue aislada de la zona costera de Ensenada y al cultivarla a 100 µE m^{-2} s^{-1} pudo causar un estrés en la célula y favorecer la síntesis de ácidos grasos (Kumari *et al*., 2013).

Por efecto de la temperatura, también se modificó el contenido de ácidos grasos saturados de *Aphanocapsa marina*. De acuerdo a Murata y Los (1997) y Merritt *et al*. (1991), el grado de saturación de los ácidos grasos se incrementa cuando la temperatura aumenta, y en este estudio para *Aphanocapsa marina* se presentó un mayor contenido de ácidos grasos saturados a 25 °C.

***Heterococcus* sp.**

El contenido de proteínas de *Heterococcus* sp. fue similar entre las distintas condiciones experimentales y presentó tasas de crecimiento similares, lo cual indica que conforme se desarrolló el cultivo fue sintetizando proteínas, como previamente fue descrito para cultivos de *Rhodomonas* sp. mantenidos en distintas irradiancias y concentraciones de nutrientes (Lafarga-de la Cruz *et al*., 2006).

La mayor producción de carbohidratos de *Heterococcus* sp. se obtuvo con un aporte de nitrato de sodio, coincidiendo con la mayor densidad celular, lo cual indica que hubo una disminución del aporte de nitrógeno y dio inicio la síntesis de productos de reserva como los carbohidratos, una tendencia similar de síntesis ha sido descrita previamente para otras especies de microalgas en condiciones de cultivo (Solovchenko *et al*., 2008).

El contenido de lípidos de *Heterococcus* sp. fue mayor por efecto del aporte de nitrógeno y la temperatura, estos dos factores afectaron la tasa de crecimiento, así como la composición bioquímica. En diversos estudios se ha visto que cuando hay una disminución del contenido de nutrientes en el medio, especialmente el nitrógeno, hay una acumulación de lípidos (Lafarga-de la Cruz *et al*., 2006; Solovchenko *et al*., 2008). El mayor contenido de lípidos para *Heterococcus* sp. pudo deberse a la fase en la cual se cosecharon los cultivos, posiblemente se produjo una limitación por nutrientes y luz en las células, lo cual pudo causar la mayor producción de lípidos para esta especie en las condiciones experimentales utilizadas.

La xantofita *Heterococcus* sp. presentó altos contenidos de ácidos grasos poliinsaturados con un aporte de nitrato de sodio, lo anterior puede indicar que hubo una deficiencia del aporte de nitrógeno en el medio de cultivo causada por el consumo de nitratos por las células lo que favoreció la producción de ácidos grasos saturados, como previamente se ha documentado para otras especies de microalgas (Lv *et al*., 2010).

Un aporte de nitrato de amonio y una irradiancia de 100 µE m^{-2} s^{-1} favoreció un mayor contenido del ácido graso poliinsaturado 20:5n-3, en otros estudios de la literatura del área mencionan que este ácido graso es característico del grupo de las xantofitas y se encuentra en altas proporciones en las células (Lang *et al.,* 2011; Nelson *et al*., 2013).

Esta especie de xantofita también mostró un alto contenido del ácido graso poliinsaturado 18:3n-3 (ALA), que es un precursor de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga como el 20:4n-6 (ARA, ácido araquidónico), el 20:5n-3 (EPA, ácido eicosapentaenoico) y el 22:6n-3 (DHA, ácido docosahexaenoíco) los cuales son sintetizados por vías alternas de saturación y elongación (Khozin-Goldberg y Isakandarov, 2011). El tipo y cantidad de los ácidos grasos poliinsaturados evaluados en los cultivos de *Heterococcus* sp. son del tipo y concentraciones que se requieren en la nutrición de larvas y juveniles de organismos marinos (Volkman *et al*., 2006).

***Navicula* sp. (cepa 3)**

Para la diatomea *Navicula* sp. (cepa 3) se obtuvo el mayor contenido de proteínas por efecto del nitrógeno (nitrato de sodio), la irradiancia (200 µE m^{-2} s^{-1}) y la temperatura (20 °C) utilizada para los cultivos. La irradiancia influyó en la producción de proteínas de *Navicula* sp. (cepa 3) debido a que la luz tiene un efecto sobre el metabolismo del carbono y causa variaciones en el contenido de proteínas (Leonardos y Geider, 2004). Se encontró que la temperatura fue la adecuada para la asimilación de nitrógeno y posterior síntesis de proteínas en *Navicula* sp. (cepa 3), otros estudios muestran que la temperatura óptima para el crecimiento de las diatomeas es de 20 °C (Lürling *et al*., 2013).

El contenido de carbohidratos de *Navicula* sp. (cepa 3) presentó un mayor contenido por efecto del nitrato de amonio en el medio de cultivo, además los porcentajes obtenidos en las diferentes condiciones experimentales fueron menores con respecto a los obtenidos para los lípidos. Esta tendencia antes mencionada puede deberse a que los carbohidratos son productos intermedios de reserva, mientras que los lípidos tienen una ruta metabólica que se activa a largo plazo (Valenzuela-Espinoza *et al*., 2005).

La producción de lípidos de *Navicula* sp. (cepa 3) fue favorecida por efecto del nitrato de sodio en el medio de cultivo, y los valores obtenidos en el presente estudio fueron similares a los obtenidos (5%-20%) en otros estudios (Lourenço *et al*., 2002, Scholz y Liebezeit, 2013) en donde el aporte de nitrógeno fue el nitrato de sodio. Los lípidos son los principales metabolitos de las diatomeas, pero estos varían entre las especies

debido a las condiciones de cultivo, por lo anterior, se tiene que en este estudio el uso de nitrato de sodio, la irradiancia de 100 µE m^{-2} s^{-1} y una temperatura 25 °C favoreció la producción de lípidos en *Navicula* sp. (cepa 3).

El perfil de ácidos grasos de *Navicula* sp. (cepa 3) evaluado en este estudio, mostró un alto contenido de ácidos grasos saturados y monoinsaturados, así como una menor proporción de ácidos grasos poliinsaturados, esta tendencia es similar a lo obtenido por Liang y Mai (2005), debido a que hay una disminución de los ácidos grasos poliinsaturados conforme avanza la edad del cultivo, ya que existen cambios en el metabolismo del carbono relacionados con la síntesis de ácidos grasos y con la concentración de nutrientes en el medio, lo anterior es debido a que la ruta de saturación de ácidos grasos se activa cuando hay nitrógeno disponible en el medio de cultivo (Xu *et al*., 2007; Lv *et al.,* 2010).

Los ácidos grasos 16:0, 16:1n-7cis y 20:5n-3 (EPA) presentaron un alto contenido en todas las condiciones experimentales en los cultivos de *Navicula* sp. (cepa 3), estos ácidos grasos son característicos de las diatomeas, aunque sus contenidos varían dependiendo de la especie, usualmente se presenta un alto contenido del 16:1n-7cis, respecto al contenido del 16:0 (Liang y Mai, 2005; Guede *et al.,* 2011; Scholz y Liebezeit, 2013), esta misma tendencia descrita para estos ácidos grasos se encontró en el presente estudio para *Navicula* sp. (cepa 3).

En *Navicula* sp. (cepa 3) se encontró un mayor contenido de ácidos grasos poliinsaturados con el uso de aporte de nitrato de sodio en el medio de cultivo para todas las condiciones experimentales, esta tendencia fue inversa a lo obtenido por Lourenço *et al*. (2002) al estudiar 10 especies de microalgas de diversos grupos taxonómicos, estos autores concluyen que no hubo diferencias en la composición de ácidos grasos por el tipo de aporte de nitrógeno en el medio de cultivo, estas diferencias entre lo obtenido en este estudio y lo reportado por los autores antes descritos, podrían ser debidos a las diferentes condiciones de cultivo y a las características de las especies utilizadas en ambos estudios.

El ácido eicosapentaenoico (20:5n-3, EPA) presentó un alto contenido para *Navicula* sp. (cepa 3), este valor fue mayor al obtenido en otros estudios realizados con otras

especies de diatomeas mantenidas en condiciones similares de cultivo y cosechadas en la misma fase de crecimiento (estacionaria temprana) (Lourenço *et al*., 2002; Liang y Mai, 2005). El contenido del ácido docosahexaenoico (DHA) en *Navicula* sp. (cepa 3) se incrementó con el uso de una irradiancia de 200 µE m^{-2} s^{-1}, mientras que el contenido del ácido eicosapentaenoico (EPA) se incrementó a una irradiancia de 100 µE m^{-2} s^{-1}, esta respuesta puede ser debida a una fotoinhibición de la biosíntesis de ácidos grasos por exceso de luz como fue encontrado en otros estudios realizados con diversas especies de microalgas (Guedes *et al*., 2011).

Comparación entre las cuatro especies de microalgas en distintas condiciones de cultivo

La especie *Tetraselmis suecica* presentó el mayor contenido de proteínas (26.8%), de entre las cuatro especies cultivadas en las distintas condiciones experimentales. De acuerdo a una revisión hecha por Pignolet *et al*. (2013) el porcentaje de proteínas para *Tetraselmis suecica* varía entre 26%-69% dependiendo de las condiciones de cultivo, estos datos son similares a los valores de proteínas obtenidos para *Tetraselmis suecica* en el presente trabajo.

Los cambios en el contenido de proteínas podría deberse a que *Tetraselmis suecica* es una especie muy tolerante a las diferentes condiciones ambientales y al tipo de medio de cultivo. Fernández- Reiriz *et al*. (1989) al cultivar a *Tetraselmis suecica* a una temperatura de 15 °C y a una irradiancia de 60 µE m^{-2} s^{-1}, obtuvieron un mayor porcentaje de proteínas (40.85%), respecto a lo evaluado en el presente estudio, estas diferencias pueden deberse a la distinta temperatura e irradiancia utilizada para los cultivos en ambos estudios.

De entre las cuatro especies utilizadas, fue en *Tetraselmis suecica* donde se obtuvo el mayor contenido de lípidos (17.6%) en las diferentes condiciones experimentales, aun cuando la células se encontraban sintetizando proteínas, lo cual muestra que existe una relación entre el metabolismo del carbono y la asimilación de nitrógeno, ya que la disminución de nitrógeno en el medio de cultivo influye en el decremento de la síntesis de proteínas y en el aumento en la producción de productos de reserva como los lípidos

como previamente se ha descrito para otras especies de microalgas en condiciones de cultivo (Fernández- Reiriz *et al.,* 1989; Lafarga-de la Cruz *et al*., 2006).

Para la especie *Heterococcus* sp. se obtuvo el mayor contenido de carbohidratos de entre las cuatro especies estudiadas y mantenidas en las diferentes condiciones experimentales, lo cual podría se debió a que en los cultivos existía deficiencia de nitrógeno disponible en el medio de cultivo y causó un decremento en la producción de proteínas y un aumento en la síntesis de carbohidratos, una respuesta similar ha sido obtenida en otros estudios para diversas especies de microalgas (Fernández-Reiriz *et al.,* 1989; Lourenço *et al.,* 2002; Lafarga-de la Cruz *et al.,* 2006).

El contenido de ácidos grasos fue diferente entre las cuatro especies de microalgas seleccionadas, debido a que cada clase taxonómica de microalgas tienen un perfil característico de ácidos grasos, también estas diferencias en la composición de ácidos grasos pudieron deberse a la respuesta de cada clase de microalga a las condiciones de cultivo (Zhukova y Aizdaicher, 1995). Se ha estudiado que existen diferencias en la composición de ácidos grasos incluso entre especies y cepas pertenecientes al mismo género taxonómico, como lo estudiado en nueve cepas pertenecientes al género *Tetraselmis* y recolectadas en el mismo sitio, las cuales presentaron variaciones en el contenido de DHA (Lang *et al.,* 2011).

También se encontró variaciones en la composición de ácidos grasos entre las cuatro especies seleccionadas debido a las condiciones de cultivo, ya que las especies *Tetraselmis suecica*, *Heterococcus* sp. y *Navicula* sp. (cepa 3) presentaron un mayor contenido de ácidos grasos poliinsaturados con un aporte de nitrato de sodio, mientras que el contenido de ácidos grasos saturados y monoinsaturados de estas especies fue mayor con un aporte de nitrato de amonio. Posiblemente estas microalgas tuvieron un estrés por el tipo de aporte de nitrógeno (nitrato de amonio) utilizado en el de medio de cultivo, ya que de acuerdo a Kumari *et al*. (2013) este estrés causa alteraciones en el grado de insaturación de los ácidos grasos.

En el presente trabajo para las especies *Tetraselmis suecica* y *Navicula* sp. (cepa 3) hubo una disminución de PUFAs n-3, al usar la irradiancia de 200 µE m^{-2} s^{-1}, en especial disminuyó el contenido del ácido eicosapentaenoico (EPA), esta tendencia se

debió a que en altas irradiancias hay una disminución de los ácidos grasos poliinsaturados, en especial del ácido eicosapentaenoico (20:5n-3, EPA) como ha sido evaluado en otras especies de microalgas (Kumari *et al.,* 2013).

En este estudio los cultivos de *Navicula* sp. (cepa 3) mantenidos a una temperatura de 20 °C presentaron un aumento del contenido de ácidos grasos poliinsaturados, lo cual pudo deberse a un estrés en las células por efecto de la temperatura, ya que *Navicula* sp. (cepa 3) está adaptada a crecer a 15 °C, que es la temperatura del sitio donde fue aislada (San Quintín). De acuerdo a Kumari *et al.* (2013) y Scholz y Liebezeit (2013), existe un aumento del contenido de ácidos grasos poliinsaturados en las diatomeas que están adaptadas a crecer a bajas temperaturas.

Pigmentos

Tetraselmis suecica

La respuesta general del fitoplancton cuando existe bajas irradiancias es aumentar el contenido pigmentario (MacIntyre *et al*., 2002). Esta tendencia fue inversa a lo obtenido para los cultivos de *Tetraselmis suecica*, ya que se obtuvo un mayor contenido de clorofila a, por efecto de una alta irradiancia 200 µE m^{-2} s^{-1} y a una temperatura de 25 °C y con un aporte de nitrato de sodio. Fabregas *et al*. (1985) sugieren que el contenido de clorofila a esta relacionado con la disminución de nitrógeno en el medio, ya que obtuvieron un mayor de contenido de clorofila a (23 μml^{-1}) en *Tetraselmis suecica* en una concentración de nitrato de sodio de 16 mM, siendo este resultado mayor al obtenido para *Tetraselmis suecica* (0.70 µg ml^{-1}) en este estudio con una concentración de nitrato de sodio de 1.7 mM, por lo cual las diferencias entre ambos trabajos se debió a la concentración del nitrato de sodio en el medio de cultivo.

Estos resultados sugieren que la producción de pigmentos está en función de la interacción del tipo de aporte de nitrógeno, la temperatura y la irradiancia y no solo en la cantidad de luz (Bartual *et al.,* 2002). Almaguer *et al*. (2004), realizaron un estudio de aislamiento y cultivo de dos especies de diatomeas bentónicas y obtuvieron diferencias en los contenidos de clorofila a y c, mencionan que estas diferencias se deben a

diversos factores como la iluminación, el tipo de medio de cultivo utilizado, la edad del cultivo y las características de cada especie.

De acuerdo a Roy *et al*. (2011), las clorofitas son organismos fotosintéticos los cuales contienen clorofila a y b, además carotenoides como la luteína, neoxantina, violaxantina y otros carotenoides secundarios como la astaxantina, esta tendencia coincide con los resultados obtenidos para los cultivos de *Tetraselmis suecica* en los cuales para todas las condiciones experimentales hubo una mayor producción de clorofila a, b y carotenoides.

Aphanocapsa marina

La producción de pigmentos para *Aphanocapsa marina* presentó la tendencia que a una menor irradiancia hubo una mayor producción de pigmentos mientras que con una mayor irradiancia se presentó una menor producción de clorofilas.

En este estudio no hubo diferencias en el contenido de clorofilas para *Aphanocapsa marina* entre las diferentes condiciones experimentales, esta tendencia coincide con lo mostrado por Loreto *et al.* (2003) al evaluar el contenido de clorofila a de *Anabaena* PCC 7120 cultivada con cinco concentraciones de $NaNO_3$ (0, 1, 2, 4, y 8 mM) y con tres irradiancias (78, 156 y 238 µmol m^{-2} s^{-1}), en este estudio tampoco obtuvieron diferencias en el contenido de clorofila a por efecto del contenido de nitrógeno, pero si obtuvieron un mayor contenido de clorofila a irradiancias bajas e intermedias.

Hagen *et al.* (1993) mencionan que en la fase estacionaria de crecimiento hay una mayor producción de carotenoides, debido a la deficiencia de algún nutriente principalmente de nitrógeno. Esta tendencia fue similar a lo obtenido en los cultivos de *Aphanocapsa marina* mantenidos a 25 °C, con un aporte de nitrato de sodio y a una irradiancia de 100 µE m^{-2} s^{-1}, estas condiciones presentaron una mayor producción de carotenoides debido a que los pigmentos fueron evaluados durante la fase estacionaria de crecimiento y pudo haber una deficiencia de nitrato de sodio. Además, debido a la edad del cultivo se produce un aumento en la densidad de células que causa

autosombreado, en consecuencia disminuye la irradiancia y las células producen mayor cantidad de carotenoides y menor proporción de clorofila a.

Chaneva *et al.* (2007) encontraron una tendencia contraria a lo medido en el presente estudio para *Aphanocapsa marina,* ya que al evaluar el efecto de la intensidad de la luz y la temperatura en la cianobacteria filamentosa *Arthronema africanum* obtuvieron un mayor contenido de clorofila a, con una alta irradiancia (150 µmol fotones m^{-2} s^{-1}) y a temperatura de 36 °C. Las diferencias en los resultados obtenidos entre ambos trabajos se debieron a las condiciones de cultivo y por las características de la especie utilizada, sin embargo, la temperatura también influyó ya que hay una menor producción de pigmentos a bajas temperaturas (Darley, 1987).

***Heterococcus* sp.**

En este estudio el alto contenido de clorofila a y carotenoides, así como un bajo contenido de clorofila c obtenidos para *Heterococcus* sp., son tendencias que coinciden con lo mostrado para el grupo de las xantofitas, ya que tienen como pigmento principal a la clorofila a, además pequeñas cantidades de clorofila c y producen carotenoides como esteres de vaucheriaxantina, diadinoxantina, diatoxantina, heteroxantina y β carotenos (Roy *et al*., 2011).

Las diferentes condiciones experimentales influyeron en el contenido de clorofila a siendo la condición de 25 °C, con un aporte de nitrato de amonio y a una irradiancia de 100 µE m^{-2} s^{-1}, las condiciones en donde hubo un alto contenido de clorofila a, lo cual indica que la producción de este pigmento se ve favorecida por una baja irradiancia, esta tendencia coincide con lo obtenido para otras especies de microalgas en diversos estudios (Bartual *et al*., 2002; Loreto *et al*., 2003).

***Navicula* sp. (cepa 3)**

El contenido de clorofila a y c para los cultivos de *Navicula* sp. (cepa 3) se vio favorecido por la temperatura de 20 °C, un aporte de nitrato de sodio y una irradiancia

de 100 µE m^{-2} s^{-1}, mientras que el contenido de carotenoides se modificó por efecto del aporte de nitrógeno. Esta respuesta en el contenido pigmentario por efecto de las condiciones de cultivo, coincide con lo mostrado por Peng *et al*. (2011) al hacer una clasificación de las diatomeas marinas usando los contenidos de pigmentos.

Sin embargo, en este estudio no hubo una clara diferencia en el contenido de los distintos tipos de clorofilas y carotenoides de *Navicula* sp. (cepa 3) debido al efecto de la irradiancia o de la temperatura en la cual se mantuvieron los cultivos.

Comparación entre las cuatro especies de microalgas en distintas condiciones de cultivo

Para la diatomea *Navicula* sp. (cepa 3) se obtuvieron los mayores contenidos de clorofila a, c, y carotenoides de entre las cuatro especies cultivadas en distintas condiciones experimentales. Esta tendencia podría deberse a que ésta especie de diatomea obtuvo bajas densidades celulares en todas las condiciones experimentales, lo cual permitió una mayor penetración de la luz e influyó en la producción de estos pigmentos antes mencionados.

Algunos autores (Yun *et al.,* 2010; Chan, 1980) señalan que existe una relación entre el tamaño de las diatomeas, y la adaptación a las diferentes irradiancias y a los cambios de temperatura, ya que cuando las diatomeas tienen una mayor superficie/volumen, se adaptan mejor a las altas temperaturas e irradiancias. En el presente estudio al ser *Navicula* sp. (cepa 3) una diatomea que tiene un tamaño relativamente pequeño (6.61x3.73 µm) puede tener poca adaptación a las irradiancias y temperaturas utilizadas en este trabajo, lo cual influyó en la producción de los pigmentos.

Ensayo de alimentación

El cultivo de rotíferos es esencial en la acuicultura porque son organismos ampliamente utilizados como alimento para larvas de peces y crustáceos, por lo cual es importante su calidad nutricional ya que de ésta dependerá la tasa de crecimiento y la supervivencia de los organismos que los consumen (Rezeq y James, 1987; Mostary *et al*., 2010).

La calidad nutricional de los rotíferos dependerá de las condiciones de cultivo, del tipo de alimento y de la ración de alimento suministrada (James *et al.*, 1983; Rueda-Jasso, 1996), en este estudio se obtuvo la mayor densidad de rotíferos (107 rotíferos) en los cultivos alimentados con *Tetraselmis suecica* con una ración de alimento de 0.001 mg de peso seco total rotífero^{-1} (1.9x10^{6} células ml^{-1}).

La mayor densidad de rotíferos (107 rot ml^{-1}) y la mayor tasa de crecimiento de los cultivos (0.11 rot dia^{-1}) fueron obtenidas al utilizar como alimento a *Tetraselmis suecica*. Se encontró que la densidad de rotíferos obtenida en el presente trabajo, fue menor a la obtenida por Rueda-Jasso (1996) al utilizar como alimento a *Nannochloris* sp. (233.4 rot ml^{-1}) con una ración de alimento de 25x10^{6} células ml^{-1}, posiblemente estas diferencias se deben a las distintas temperaturas utilizadas para el mantenimiento de éstos organismos.

Sin embargo, la máxima tasa de crecimiento de los rotíferos encontrada en éste estudio, fue similar a lo obtenido (0.11 rot día^{-1}) por James *et al.* (1983) quienes evaluaron la producción de rotíferos al ser alimentados con *Chlorella* sp.

Esta diferencia en las densidades de rotíferos y las tasas de crecimiento entre ambos trabajos, podría deberse a la concentración celular del alimento utilizado y al tipo de microalga suministrada, ya que los intervalos de filtración e ingestión de los rotíferos dependen de estos dos factores, así como de la temperatura de mantenimiento de los cultivos de rotíferos (James *et al.,* 1983; Ferreira *et al.,* 2011).

La clorofita *Tetraselmis suecica* es una de las especies ampliamente usada para la alimentación de rotíferos, con el uso de esta especie se han obtenido altas tasas de crecimiento y de composición proximal, sin embargo estos resultados pueden variar

dependiendo de la especie de microalga utilizada como alimento así como de su composición proximal y de sus características de crecimiento y distribución en la columna de agua (Scott y Baynes, 1978; Planas y Estévez, 1989).

En este estudio la diatomea *Navicula* sp. (cepa 3) fue un ejemplo de que la filtración e ingestión de los rotíferos depende del tipo de microalga, ya que esta diatomea forma tapetes y aun cuando las diatomeas fueron disgregadas por medio del uso de baño con ultrasonido por 20 minutos antes de ser suministrada a los rotíferos, las diatomeas se volvían hacer agregados de células.

Las diatomeas formaron grumos de células a pesar de utilizar aireación para el mantenimiento de los rotíferos, así como para evitar la sedimentación de las células de microalgas utilizadas como alimento. A pesar de lo anterior, las células de *Navicula* sp. (cepa 3) permanecían en el fondo de los recipientes de cultivo, y dificultó la ingestión de las células de esta especie de diatomeas por parte de los rotíferos, por dicha razón, los rotíferos presentaron un bajo crecimiento comparativamente al uso de las otras especies de microalgas suministradas como alimento en este ensayo.

Debido a la naturaleza bentónica y la característica de *Navicula* sp. (cepa 3) para formar grumos de células, se evaluó la sedimentación de células de *Navicula* sp. (cepa 3) con el propósito de conocer la disponibilidad de alimento para los rotíferos. Se obtuvo que el 89% de las células de *Navicula* sp. (cepa 3) se sedimentaron en los primeros 15 minutos, a pesar de utilizar aireación, por lo cual el alimento no quedó disponible en la columna de agua y por esta razón los rotíferos alimentados con esta especie de diatomea presentaron el menor crecimiento, ya que solo cerca del 7% al 15% de las células quedaron disponibles en la columna de agua.

En el presente estudio no se encontró variación en el tamaño de los rotíferos por efecto de los distintos tipos de alimento suministrado, pero el tamaño pequeño (22 µm X10 µm) que presentaron los rotíferos al inicio del cultivo pudo influir en la ingestión del alimento, y por consiguiente influyó en el crecimiento de los rotíferos. Algunos autores (Scott y Baynes, 1978; Yúfera *et al.,* 1993; Kobayashi *et al.* 2008) mencionan que las variaciones en el tamaño de rotíferos son un factor que también influye en el crecimiento del cultivo de rotíferos.

La composición proximal de los rotíferos alimentados con los diferentes tipos de microalgas no mostraron diferencias entre los tratamientos, los contenidos de proteínas (5.9%-10%), carbohidratos (4.8%-8.8%) y lípidos (5.7%-6.7%) fueron bajos con respecto a lo obtenido por Rueda-Jasso (1996), Ferreira *et al.* (2011), y por Campa-Ávila (2002). Lo anterior podría deberse a la ración de alimento suministrado, a las condiciones de cultivo y al tipo de microalgas utilizadas como alimento (Rezeq y James, 1987; Lubzens *et al*., 2001).

Además, el tamaño de los rotíferos *Brachionus plicatilis* es otro factor importante en esta comparación de resultados de la composición proximal, ya que los rotíferos utilizados en este ensayo son organismos talla tipo S (22-402 µm), mientras que los utilizados en los otros trabajos antes mencionados son talla L (longitud de la loriga 130-340 µm). Estas diferencias en el tamaño de los rotíferos implican modificaciones en el metabolismo de los organismos y en la asimilación del alimento, por consiguiente en la composición proximal de estos organismos.

Otro factor que pudo haber influido en los resultados obtenidos de la composición proximal de los rotíferos, es que los organismos utilizados en los ensayos eran individuos previamente alimentados con pasta de microalgas (*Nannochloropsis* sp.) en una ración de 98,000 células rotífero^{-1}, y aunque tuvieron dos días de aclimatación al tipo de alimento vivo suministrado en los ensayos de alimentación, posiblemente requieran de un mayor tiempo para aclimatarse al tipo de alimento vivo suministrado.

Es importante mencionar que previo al ensayo de alimentación con las tres especies de microalgas, se utilizó un período de 24 horas sin suministro de alimento para evitar el efecto del tipo de alimento previamente consumido y que esto pudo afectar la composición proximal del organismo en estudio.

Es importante mencionar que en los distintos tratamientos utilizados en estos ensayos de alimentación de los rotíferos, las condiciones ambientales y de calidad de agua fueron las adecuadas para el mantenimiento de cultivos de este tipo de organismos (Rueda-Jasso, 1996; Ferreira *et al*., 2011).

7. Conclusiones

- En la Bahía de Ensenada se obtuvo el mayor número de especies aisladas, la clase Bacillariophyceae fue la más representada con 16 especies, seguido por la clase Cyanophyceae con 3 especies.
- Las condiciones de cultivo utilizadas para el aislamiento y la sucesión de especies durante este proceso fueron factores que pudieron influir en la selección de las especies aisladas.
- Se aislaron tres especies de cianobacterias (*Aphanocapsa marina, Komvophoron* sp. y *Phormidium* sp.) que no han sido previamente registradas en Baja California, México, siendo una importante contribución a los registros taxonómicos del país.
- Las cianobacterias fueron las especies que presentaron el mayor crecimiento (*Komvophoron* sp.) y la mayor densidad celular (*Aphanocapsa marina*) de entre las 21 especies de microalgas aisladas.
- La composición proximal fue diferente entre las distintas especies aisladas, y entre las fases de crecimiento. *Amphora* sp. (cepa 3) presentó el mayor contenido de lípidos entre todas las especies en la fase exponencial de crecimiento y *Cymbella* sp. (cepa 2) presentó el mayor contenido de proteínas y carbohidratos durante la fase estacionaria de crecimiento.
- El contenido de ácidos grasos de las 21 especies aisladas varío entre las diferentes clases taxonómicas y el grupo de las diatomeas obtuvo altos porcentajes de ácidos grasos polinsaturados (n-3 y n-6), en especial mostraron un alto contenido del ácido eicosapentaenoico (20:5n-3).
- Ninguno de los medios residuales de las 21 especies de microalgas aisladas mostró un efecto tóxico para nauplios de *Artemia franciscana*.
- Con base en los resultados de crecimiento y composición bioquímica, se concluye que las 21 especies aisladas tienen potencial para ser usadas como alimento en la acuicultura ya sea como parte de una dieta mixta o como único ingrediente
- Se eligieron las especies *Aphanocapsa marina, Tetraselmis suecica*, *Heterococcus* sp. y *Navicula* sp. (cepa 3) por su alta tasa de crecimiento y composición bioquímica para evaluar la producción de lípidos al cultivarlas a

diferentes condiciones de temperatura, irradiancia y tipo de aporte químico de nitrógeno.

- *Tetraselmis suecica* presentó el mayor contenido de lípidos y proteínas de entre las cuatro especies seleccionadas, al ser cultivadas con un aporte de nitrato de amonio e influyó en una mayor síntesis de ácidos grasos saturados y monoinsaturados. Los principales ácidos grasos sintetizados en *Tetraselmis suecica* fueron los ácidos: ácido palmítico (16:0), α-linolénico (ALA), y ácido eicosapentaenoico (EPA) que son esenciales para la nutrición en animales y humanos.
- *Aphanocapsa marina* mostró la mayor densidad celular y la mayor tasa de crecimiento entre las cuatro especies seleccionadas al mantener los cultivos a 20 ºC, en un medio de cultivo con un aporte de nitrato de amonio y a una irradiancia de 200 µE m^{-2} s^{-1}.
- La especie *Heterococcus* sp. al ser cultivada con una irradiancia de 200 µE m^{-2} s^{-1} presentó el mayor contenido de carbohidratos entre las cuatro especies cultivadas en distintas condiciones experimentales.
- La diatomea *Navicula* sp. (cepa 3) mostró el mayor contenido de clorofila a, c y carotenoides, así como el mayor contenido de ácidos grasos poliinsaturados entre las cuatro especies cultivadas.
- *Aphanocapsa marina, Tetraselmis suecica*, *Heterococcus* sp. y *Navicula* sp. (cepa 3) presentaron un alto contenido de los ácidos grasos 16:0, 16:1n-7cis y 20:5n-3 en las distintas condiciones experimentales utilizadas.
- Las especies *Tetraselmis suecica* y *Navicula* sp. (cepa 3) fueron elegidas para el ensayo de alimentación con rotíferos de *Brachionus plicatilis* debido a su composición proximal y perfil de ácidos grasos.
- La mayor tasa de crecimiento y la mayor densidad de rotíferos *Brachionus plicatilis* fue obtenida al suministrar como alimento a la microalga *Tetraselmis suecica*.
- *Tetraselmis suecica* resultó ser una especie con alta tasa de crecimiento, un alto contenido de lípidos y proteínas, así como un alto porcentaje del ácido graso poliinsaturado 20:5n-3, que son características que le permiten a esta especie de microalga ser una buena candidata para uso como alimento en la acuicultura.

8. Recomendaciones

Evaluar el contenido de aminoácidos de las 21 especies de microalgas aisladas al ser mantenidas en las mismas condiciones de cultivo que el ensayo de crecimiento de las especies aisladas.

Cultivar las 21 especies de microalgas en otros medios de cultivo para evaluar el crecimiento y composición bioquímica de las especies.

Realizar extractos acuosos y orgánicos a partir de la biomasa de las 21 especies aisladas y evaluar su posible toxicidad.

Evaluar el contenido pigmentario y la fotosíntesis de las 21 especies de microalgas al ser cultivadas en diferentes condiciones ambientales.

Cultivar las 21 especies de microalgas en diferentes condiciones ambientales para evaluar el contenido de ácidos grasos para uso como biocombustible.

Realizar ensayos de alimentación utilizando dietas mixtas de las 21 especies de microalgas.

9. Literatura citada

Abed, R. M. Dobretsov, S. y Sudesh, K. (2009). Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal Applied Microbiology*, *106*(1), 1-12.

Admiraal, W. (1977). Influence of light and temperature on the growth rate of estuarine benthic diatoms in culture. *Marine Biology, 39*, 1-9.

Aguilar-May, B. (2002). *Remoción de nutrientes con microalgas marinas en un medio equivalente al efluente tipo promedio de una granja camaronícola.* Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada Baja California, México. 104 pp.

Aguilar-May, B. y Sánchez-Saavedra, M. P. (2009). Growth and removal nitrogen and phosphorus by free-living and chitosan-immobilized cells of *Synechococcus elongatus*. *Journal of Applied Phycology*, *21*(3), 353-360.

Almaguer, Y., Alfonso, E. y Leal, S. (2004). Aislamiento y cultivo de dos especies de diatomeas bentónicas. *Revista de Investigaciones Marinas*, *25*(1), 57-64.

Alveal, K. (1995). Manejo de algas marinas. En: K. Alveal, M. E. Ferrario, E. C. Oliveira y E. Sar (Eds.). *Manual de Métodos Ficológicos*. Ediciones Universidad de Concepción. 825-863 pp.

Andersen, R. A. (2005). *Algal Culturing Techniques*. Amsterdam, Academic Press. 578 pp.

Arangúren, N., Bolivar, A., Canosa, A., Galvis, G., Mojica, J. I., Donato, J. C., Rueda-Delgado, G., Ruíz, E. y Schmidt-Mumm, U. (2002). *Manual de Métodos en Limnología*. Colombia, Asociación Colombiana de Limnología. 76 pp.

Arredondo, B. O. y Voltolina, D. (2007). *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal.* La Paz, Baja California Sur. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. 97 pp.

Barsanti, L. y Gualtieri, P. (2006). *Algae. Anatomy, Biochemistry and Biotechnology.* Boca Raton, Florida. Taylor and Francis. 320 pp.

Bartual A., Lubián, L. M., Gálvez, F. X. (2002). Effect of irradiance on growth photosynthesis, pigment content and nutrient consumption in dense cultures of *Rhodomonas salina* (Wislouch) (Cryptophyceae). *Ciencias Marinas*, *28*(4), 381-392.

Barrón Monterubio, R. F. (2014). *Evaluación de la actividad antifúngica de extractos de microalgas de Baja California, México*. Tesis en Maestría en Ciencias de la Vida. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 141 pp.

Bates, S. S. (1976). Effects of light on nitrate uptake by two species of estuarines phytoplankton. *Limnology and Oceanography*. *21*(2), 212-218.

Belay, A., Kato, T., y Ota, Y. (1996). *Spirulina* (*Arthrospira*): potential application as an animal feed supplement. *Journal of Applied Phycology*, *8*(4-5), 303-311.

Belcher, J. H. y Fogg, G. E. (1958). Studies on the growth of Xanthophyceae in pure culture. *Archiv für Mikrobiologie*, *30*(1), 17-22.

Ben-Amotz, A. y Avron, M. (1983). Accumulation of metabolites by halotolerant algae and its industrial potential. *Annual Reviews Microbiology*, *37*(1), 95-119.

Benemann, J. (2013). Microalgae for biofuels and animal feeds. *Energies*, *6*, 5869-5886.

Björn, L. O., Cunningham, A., Dubinsky, Z., Estrada, M., Figueroa, F. L., García-Pichel, F. Häder, D. P., Hanelt, D., Levavasseur, G. y Lüning, K. (1996). Technical Discussion I: Underwater light measurements and light absorption by algae. *Scientia Marina*, *60*(1), 293-297.

Bligh, E. G. y Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, *37*, 911-917.

Borowitzka, M. A. (2013) Species and strain selection. En: M. A. Borowitzka and N. R. Moheimani (Eds.). *Algae for Biofuels and Energy*. Springer. 77-89 pp.

Bouterfas, R., Belkoura, M. y Dauta, A. (2002). Light and temperature effects on the growth rate of three freshwater algae isolated from a eutrophic lake. *Hydrobiologia*, *489*, 207-217.

Brown, M. R., Dunstan, G. A., Norwood, S. J. y Miller. K. A. (1996). Effects of harvest stage and light on the biochemical composition of the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Journal of Phycology*, *34*, 64-73.

Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K. y Dunstan, G. A. (1997). Nutritional properties of microalgae for maricultures. *Aquaculture*, *151*, 315-331.

Brown, M. R. (2002). Nutritional value and use of microalgae for aquaculture. En: L. E. Cruz-Suárez, D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M. G. Gaxiola-Cortez, y N. Simoes. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola* VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3-6 de septiembre del 2002. Cancún Quintana Roo, México. 281-291 pp.

Campa-Ávila, A. (2002). *Evaluación del valor nutricional en dos especies de microalgas al ser suministradas como alimento al rotifero Branchionus plicatilis.* Tesis de Maestria en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada Baja California, México. 97 pp.

Carbajal-Miranda, M., Sánchez-Saavedra, M. P. y Simental, J. A. (2005). Effect of monospecific and mixed benthic diatom cultures on the growth of red abalone *Haliotis rufescens* (Swainson 1822). *Journal Shellfish Research*, *24*(2), 401-405.

Carballo, O. H., Arencibia-Carballo, G., Isla, M. M., González, C., González, T., Mantilla, N. G. (2003). Bioensayo de toxicidad con *Artemia franciscana* (Crustacea-Branchiopoda) en extractos de sedimento superficial del golfo de Guacanayabo, Cuba. *Revista de Toxicología en Línea*, *38*, 32-50.

Cardozo, K. H. M., Guaratini, T., Barros, M. P., Falcao, V. R., Tonon, A. P., Lopes, N. P., Campos, S., Torres, M. A., Souza, A. O., Colepicolo, P., y Pinto, E. (2007). Metabolites from algae with economic impact. *Comparative Biochemistry and Physiology*, *146*, 60–78.

Carvalho, A. P. y Malcata, F. X. (2003). Kinetic modeling of the autotrophic growth of *Pavlova lutheri*: study of the combined influence of light and temperature. *Biotechnology Progress*, *19*, 118-135.

Castro-Ceseña, A. B. y Sánchez-Saavedra, M. P**.** (2014). Evaluation of sodium tripolyphosphate-alginate coating and re-calcifying on the entrapment of microalgae in alginate beads. *Journal of Applied Phycology*, *27*, 1205-1212DOI:10.1007/s10811-014-0411-6.

Castro-Ceseña, A. B. y Sánchez-Saavedra, M. P. (2015). Effect of glycerol and PEGMA coating on the efficiency of cell holding in alginate immobilized *Synechococcus elongatus*. *Journal of Applied Phycology*, *28*, 63-71. DOI:10.1007/s10811-015-0552-2.

Castro-Ceseña, A., Sánchez-Saavedra, M. P. y Ruíz-Güereca, D. A. (2015). Optimization of entrapment efficiency and evaluation of nutrient removal (N and P) of *Synechococcus elongatus* in novel core-shell capsules. *Journal of Applied Phycology*, DOI: 10.1007/s10811-015-0771-6.

Casselton, P. J. (1966). Chemo-organotrophic growth of Xanthophycean algae. *New Phytologist*, *65*(2), 134-140.

Chaichalerm, S., Pokethitiyook, P., Yuan, W., Meetam, M., Sritong, K., Pugkaew, W., Kungvansaichol, K., Kruatrachue, M., y Damrongphol, P. (2012). Culture of microalgal strains isolated from natural habitats in Thailand in various enriched media. *Applied Energy*, *89*, 296-302.

Chan, A. T. (1980). Comparative physiological study of marine diatoms and dinoflagellates in relation to irradiance and cell size. ii. relationship between photosynthesis, growth, and carbon/chlorophyll *a* ratio. *Journal of Phycology*, *16*(3), 428-432.

Chaneva, G., Furnadzhieva, S., Minkova, K. y Lukavsky, J. (2007). Effect of light and temperature on the cyanobacterium *Arthronema africanum* - a prospective phycobiliprotein-producing strain. *Journal of Applied Phycology*, *19*, 537-544.

Chávez-Medrano, C. I. (2008). *Efecto de distintas variables ambientales en la fisiología y composición bioquímica de Navicula incerta.* Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 116 pp.

Chen, Y. C. (2012). The biomass and total lipid content and composition of twelve species of marine diatoms cultured under various environments. *Food Chemistry*, *131*, 211-219.

Chiaverini, J. (1972). *Tecniques d'extraction et d'analyse des lipides*. Université de Paris et Marie Curie, Paris. Station Zoologique Ville France Sur Mer. Notes de Travail, 12, 12 pp.

Cohen, Y. y Gurevitz, M. (2006). The Cyanobacteria-Ecology, Physiology and Molecular Genetic. En: M. S. Dworkin, E. Falkow, K. H. Rosenberg, E. Schleifer, M. Stackebrandt. (Eds.). *The Prokaryotes* Springer. 1074-1098 pp.

Coles, J. F. y Jones, R. C. (2000). Effect of temperature on photosynthesis-light response and growth of four phytoplankton species isolated from a tidal freshwater river. *Journal of Phycology*, *36*, 7-16.

Conceição, L. E. C., Yúfera, M., Makridis, P., Morais, S., y Dinis, M. T. (2010). Live feeds for early stages of fish rearing. *Aquaculture Research*, *41*, 613-640.

Correa-Reyes, J. G., Sánchez-Saavedra, M. P., Siqueiros-Beltrones D. A. y Flores-Acevedo, N. (2001). Isolation and growth of eight strains of benthic diatoms, cultured under two light conditions. *Journal Shellfish Research*, *20*(2), 603-610.

Correa, R. J. G., Sánchez-Saavedra, M. P., Viana, M. T., Flores-Acevedo, N. y Vásquez-Peláez, C. (2009). Effect of eight benthic diatoms as feed on the growth of red abalone postlarvae (*Haliotis rufescens*). *Journal of Applied Phycology*, *21*(4), 387-393.

Courtois de Viçose, G., Porta, A. Viera, M. P., Fernández-Palacios, H. y Izquierdo. M. S. (2012). Effects of density on growth rates of four benthic diatoms and variations in biochemical composition associated with growth phase. *Journal of Applied Phycology*, *24*(6), 1427-1437.

Darley, W. M. (1987). *Biología de las Algas: enfoque fisiológico*. México. Editorial Limusa. 231 pp.

Day, G. J., Benson, E. E. y Fleck, R. A. (1999). *In vitro* culture and conservation of microalgae, applications for aquaculture, biotechnology and environment research. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, *35*, 127-136.

de la Peña, M. R. (2007). Cell growth and nutritive value of the tropical benthic diatom, *Amphora* sp., at varying levels of nutrients and light intensity, and different culture locations. *Journal of Applied Phycology*, *19*, 647–655.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. y Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, *28*, 350-356.

Enright, C. T., Newkirk, G. F., Craigie, J. S., y Castell, J. D. (1986). Evaluation of phytoplankton as diets for juvenile *Ostrea edulis* L. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *96*, 1-13.

Eriksen, N. T. y Iversen, L. J. J. (1995). Photosynthetic pigments as nitrogen stores in the cryptophyte alga *Rhodomonas* sp. *Journal Marine Biotechnology*, *3*, 193-195.

Fábregas, J., Herrero C., Cabezas B., y Abalde J. (1985). Mass culture and biochemical variability of the marine microalgae *Tetraselmis suecica* Kylin (Butch) with high nutrient concentrations. *Aquaculture*, *49*(3), 231-244.

Fernández-Reiriz, M. J., Pérez-Camacho, A., Ferreiro, M. J., Blanco, J., Planas, M., Campos, M. J. y Labarta, U. (1989). Biomass production and variation in the biochemical profile (Total protein, carbohydrates, RNA, lipids, and fatty acids) on seven species of marine microalgae. *Aquaculture*, *83*, 17-37.

Ferreira, M., Seixas, P., Coutinho, P, Fábregas, J. y Otero, A. (2011). Effect of the nutritional status of semi-continuous microalgal cultures on the productivity and biochemical composition of *Brachionus plicatilis*. *Marine Biotechnology*, *13*, 1074-1085.

Fierro-Reséndiz, S., Sánchez-Saavedra, M. P. y Copalcúa, C. (2008). Nitrate and phosphate removal by chitosan immovilized *Scenedesmus*. *Bioresource Technology*, *99*, 1274-1279.

Fisher, N. S. y Cowdell, R. A. (1982). Growth of marine planktonic diatoms on inorganic and organic nitrogen. *Marine Biology*, *72*,147-155.

Flores, E. y Herrero, A. (1994). Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation. En: D. A. Bryant (Ed.). *The Molecular Biology of the Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers. 487-517 pp.

Florencio, B. F. J. (1999). Biología molecular de la asimilación de amonio en cianobacterias. En: C. Herrero-López y J. A. Abalde. (Eds.). *Biotecnología y aplicaciones de microorganismos pigmentados.* Universidade da Coruña. 147-167 pp.

Fogg, G. E. y Thake, B. J. (1987). *Algal cultures and phytoplankton ecology*. London. University of Wisconsin Press. 269 pp.

Folch, J., Lee, M. y Sloane-Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *The Journal of Biological Chemistry*, *22*, 477-509.

García. U. G. M., (2000). *Fundamentos de nutrición acuícola*. Guadalajara. Universidad Autónoma de Guadalajara. 220 pp.

Garza-Sánchez, F. y Chapman, D. J. (2009). *Nitzschia ovalis* (Bacillariophyceae) monolake strain accumulates 1,4/2,5 ciclohexanetetrol in response to increased salinity. *Journal of Phycology*, *45*, 395-403.

Gerwick, W. H., Roberts, M. A., Proteau, P. J., y Chen J. L. (1994). Screening cultured marine microalgae for anticancer-type activity. *Journal of Applied Phycology*, *6*, 143-149.

Gigova, L., Ivanova, N., Gacheva, G., Andreeva, R. y Furnadzhieva, S. (2012). Response of *Trachydiscus minutus* (Xanthophyceae) to temperatura and light. *Journal of Phycology*, *48*, 85-93.

Go, S., Lee, S. J., Jeong, G. T., y Kim, S. K. (2012). Factors affecting the growth and the oil accumulation of marine microalgae, *Tetraselmis suecica*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *35*(1), 145-150.

Gómez, V. J. (1983). Estructura hidrográfica promedio frente a Baja California. *Ciencias Marinas*, *9*(2), 75-86.

Gómez-Luna., L. M. (2007). Microalgas: Aspectos Ecológicos y Biotecnológicos. *Revista Cubana de Química*, *19*(2), 3-20.

González-Davis, O. (2010). *Bioprospección de cianobacterias y microalgas como agentes de biocontrol contra Vibrio campbellii M1 y uso en el cultivo de Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestria en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 93 pp.

Gorrostieta-Hurtado, E. y Searcy-Bernal, R. (2004). Combined effect of light conditions constant illumination or darkness and diatom density on postlarval survival and growth of the abalone *Haliotis rufescens*. *Journal of Shellfish Research*, *23*, 1001-1008.

Guedes, A. C., Amaro, H. M., Barbosa, C. R., Pereira, R. D. y Malcata, F. X. (2011). Fatty acid composition os several wild microalgae and cyanobacteria, with a focus on eicosapentaenoic, docosahexaenoic and α-linolenic acids for eventual dietary uses. *Food Research International*, *44*, 2721-2729.

Guihéneuf, F., Fouqueray, M., Mimouni, V., Ulmann, L., Jacquette, B. y Tremblin, G. (2010). Effect of UV stress on the fatty acid and lipid class composition in two marine microalgae *Pavlova lutheri* (Pavlovophyceae) and *Odontella aurita* (Bacillariophyceae). *Journal of Applied Phycology*, *22*, 629-638.

Guillard, R. L. L. y Rhyter. J. H. (1962). Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detenula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian. Journal of Microbiology*, *8*, 229-239.

Gupta, V. S., Ratha, K., Sood, A., Chaudhary, V., y Prasanna, R. (2013). New insights into the biodiversity and applications of cyanobacteria (blue-green algae) - Prospects and challenges. *Algal Research*, *2*, 79-97.

Hach. (1997). *Water Analysis Handbook*. Loveland, Colorado. Hach Company, 675 pp.

Hagen, C., Braune, W. Birckner, E. y Nüske, J. (1993). Functional aspects of secondary carotenoids in *Haematococcus lacustris* (Girod) Rostafinski (Volvocales). I. the

accumulation period as an active metabolic process. *New Phytologist*, *125*(3), 625-633.

Hemerick, G. (1973). Mass culture. En: J. R. Stein. (Ed.). *Handbook of Phycological Methods*, *Culture Methods and Growth Measurement*. Cambridge University Press. 255-273 pp.

Hernández-Carlos, B. y Gamboa-Angulo, M. M. (2011). Metabolites from freshwater aquatic microalgae and fungi as potential natural pesticides. *Phytochemistry Reviews*, *10*, 261-286.

Hernández-Pérez, A. y Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, *49*(2), 157-173.

Hinzpeter, I., Shene, C. y Masson, L. (2006). Alternativas biotecnológicas para la producción de ácidos grasos poliinsaturados omega-3. *Grasas y Aceites*, *57*(3), 336-342.

Huang, X., Huang, Z., Wen, W. y Yan, J. (2013). Effects of nitrogen supplementation of the culture medium on the growth, total lipid content and fatty acid profiles of three microalgae (*Tetraselmis subcordiformis*, *Nannochloropsis oculata* and *Pavlova viridis*). *Journal of Applied Phycology*, *25*(1), 129-137.

Huarachi, R. O., Yapo, U., Dueñas, A., Soto, J., y González, R. (2013). Production of *Spirulina platensis* (Cyanophyta) in conical photobioreactor tubules under laboratory conditions. *The Biologist (Lima)*, *11*(27), 217-227.

Instituto Nacional de Estadística y Geografia (INEGI). (2012). *Perspectiva estadística de Baja California*. México. 90 pp.

James, C. M., Bou-Abbas, M., Al-Khars, A. M., Al-Hinty, S. y Salman, A. E. (1983). Production of the rotifer *Brachionus plicatilis* for aquaculture in Kuwait. *Hydrobiologia*, *104*, 77-84.

Jiménez-Valera, S. (2008). *Remoción de nutrientes inorgánicos con microalgas coinmovilizadas en quitosano* Tesis de Maestria en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 86 pp.

Jun-hui, J. H. y Chi-Keung, P. C. (2011). UVA treatment increases the degree of unsaturation in microalgal fatty acids and total carotenoid content in *Nitzschia closterium* (Bacillariophyceae) and *Isochrysis zhangijiangensis* (Chrysophyceae). *Food Chemistry*, *129*, 783-791.

Kamilya D, Sarkar, S., Maiti, T. K., Bandyopadhyay, S. y Mal B. C. (2006). Growth and nutrient removal rates of *Spirulina platensis* and *Nostoc muscorum* in fish culture effluent: a laboratory-scale study. *Aquaculture Research*, *37*, 1594-1597.

Kang, K. H., Qian, Z. J., Ryu, B. y Kim, S-K. (2011). Characterization of growth and protein contents from microalgae *Navicula incerta* with the investigation of

antioxidant activity of enzymatic hydrolysates. *Food Science Biotechnology*, *20*(1), 183-191.

Kenekar, A. A. y Deodhar, M. A. (2013). Effect of varying physicochemical parameters on the productivity and phycobiliprotein content of indigenous isolate *Geitlerinema sulphureum*. *Biotechnology*, *12*, 146-154.

Khozin-Goldberg, I. y Iskandarov, U. (2011). LC.PUFA from photosynthetic microalgae: occurrence, biosynthesis, and prospects in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *91*, 905-915.

Kobayashi, T., Nagase, T., Hino, A., Takeuchi, T. (2008). Effect of combination feeding of *Nannochloropsis* and freshwater *Chlorella* on the fatty acid composition of rotifer *Brachionus plicatilis* in a continuous culture. *Fisheries Science*, *74*, 249-256.

Komárek, J. y Anagnostidis, K. (2005). *Cyanoprokaryota. 2. Teil/2nd Part: Oscillatoriales.* Italy. Elsevier. 757 pp.

Kumari, P. Kumar, M., Reddy, C. R. K. y Jha B. (2013). Algal lipids, fatty acids and sterols. En: H. Domínguez (Ed.). *Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals*. Woodhead Publishing. 87-134 pp.

Kyle, D. (1989). Market applications for microalgae. *Journal of the American Oil Chemists Society*, *66*(5), 648-658.

Lafarga-de la Cruz, F., Valenzuela-Espinoza, E., Millán-Núñez, R., Trees, C. C. Santamaría-del-Ángel, E. y Núñez-Cebrero, F. (2006). Nutrient uptake, chlorophyll *a* and carbón fixation by *Rhodomonas* sp. (Cryptophyceae) cultured at different irradiance and nutrient concentrations. *Aquacultural Engineering*, *35*, 51-60.

Lang, I., Hodac, L., Friedl, T. y Feussner, I. (2011). Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection. *BMC Plant Biology*, *11*, 1-16.

Lavoie, I., Campeau, S., Fallu, M. A., y Dillon, P. J. (2006). Diatoms and biomonitoring: should cell size be accounted for?. *Hydrobiologia*, *573*, 1-16.

Lebeau, T. y Robert, J. M. (2003). Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part I: Cutivation at various scales. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *60*, 612-623.

Lee, K. y Lee, C. G. (2001). Effect of light/dark cycles on wastewater treatments by microalgae. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, *6*, 194-199.

Lee, K. y Lee, C. G. (2002). Nitrogen removal from wastewaters by microalgae without consuming organic carbon sources. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *12*(6), 979-985.

Leonardos, N. y Geider, R. J. (2004). Responses of elemental and biochemical composition of *Chaetoceros muelleri* to growth under varying light and nitrate: phosphate supply ratios and their influence on critical N:P. *Limnology and Oceanography*, *49*(6), 2105-2114.

Leu, E., Wängberg, S.Å., Wulff, A., Petersen, S. F., Ørbæk, J. B. y Hessen, D. O. (2006). Effects of changes in ambient PAR and UV radiation on the nutritional quality of an Arctic diatom (*Thalassiosira antarctica* var. *borealis*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *337*, 65–81.

Lewin, J. C., y Guillard, R. (1963). Diatoms. *Annual Review of Microbiology*, *17*, 373-414.

Lian, Y. y Mai, K. (2005). Effect of growth phase on the fatty acid compositions of four species of marine diatoms. *Journal of Ocean University of China*, *4*(2), 157-162.

Licea, S., Moreno, J. L., Santoyo, H., y Figueroa, G. (1995). *Dinoflagelados del Golfo de California.* México, Distrito Federal. Universidad Autónoma de Baja California Sur. Secretaria de Educación Pública-Fondo de Modernización para Educación Superior, PROMARCO. 165 pp.

López-Elías, J. A., Voltolina, D., Nieves, M. y Figueroa, O. L. (2004). Producción y composición de microalgas en laboratorios comerciales del noreste de México. En: S. L. E. Cruz, M. D. Ricque, L. M. Nieto, D. Villareal, U. Scholz, y M. González (Eds.). *Avances de Nutrición Acuícola* VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 16-19 de Noviembre. Hermosillo, Sonora México. 636-648 pp.

Loreto, C., Rosales, N., Bermúdez, J. y Morales, E. (2003). Producción de pigmentos y proteínas de la cianobacteria *Anabaena* PCC7120 en relación a la concentración de nitrógeno e irradiancia. *Gayana Botánica*, *60*(2), 83-89.

Lourenço, S., Lanfer, M. U. M., Mancini-Filho, J., Barbarino, E. y Aidar, E. (1997). Changes in biochemical profile of *Tetraselmis gracilis* I. Comparasion of two culture media. *Aquaculture*, *148*,153-168.

Lourenço, S., Barbarino, E. Mancini-Filho, J., Schinke, K. P. y Aidar, E. (2002). Effects of different nitrogen sources on the growth and biochemical profile of 10 marine microalgae in batch culture: an evaluation for aquaculture. *Phycologia*, *41*(2), 158-168.

Lowry, O. H., Rosebrought, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biology Chemestry*, *193*, 265-275.

Lürling, M., Eshetu, F., Faassen, E. J., Kosten, S. y Huszar, V. L. M. (2013). Comparison of cyanobacterial and green algal growth rates at the different temperatures. *Freshwater Biology*, *58*, 552-559.

Lubzens, E., Zamora, O. y Barr, Y. (2001). Biotechnology and aquaculture of rotifers. *Hydrobiologia*, *446/447*, 337-353.

Lv, X., Zou, L., Sun, B., Wang, J. y Sun, M-Y. (2010). Variations in lipid yields and compositions of marine microalgae during cell growth and respiration, and within intracellular structures. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *391*, 73-83.

Lynn, S. G., Kilham, S. S., Kreeger, D. A., y Interlandi, S. J. (2000). Effect of nutrient availability on the biochemical and elemental stoichiometry in the freshwater diatom *Stephanodiscus minutulus* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, *36*, 510-522.

MacIntyre, H. L., Kana, T. M., Anning, T. y Geider, R. J. (2002). Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthethic pigment in microalgae and cyanobacteria. *Journal of Phycology*, *38*, 17-38.

Malara, G. y Charra, R. (1972a). *Dosages des proteines particulaires selon la méthode de Lowry*. Université de Paris. Sation Zoologique. Villefrenche-Sur-Mer. Notes de Travail 6:11 pp.

Malara, G. y Charra, R. (1972b). *Dosages des glucides particulaires de phytoplankton selon la methode de Dubois*. Université de Paris. Station Zoologique. Villefrenche-Sur-Mer. Notes de Travail. 6:12 pp.

Mann, D. G. (1999). The species concept in diatoms. *Phycologia*, *38*, 437-495.

Márquez-Reyes, L., I. Valdez-Vazquez y Sánchez-Saavedra, M.P. (2015). Improvement of hydrogen production by reduction of the photosynthetic oxygen in microalgae cultures of *Chlamydomonas gloeopara* and *Scenedesmus obliquus*. *International Journal of Hydrogen Energy*, *40*, 7291-7300.

Mendoza, H., Molina-Cedres, C., de la Jara, A., Nordström, L., Freijanes, K. y Carmona, L. (2008). Variación cuantitativa y cualitativa de la composición en ácidos grasos de *Crypthecodinium cohnii* en condiciones de supresión de nitrógeno. *Grasas y Aceites*, *59*(1), 27-32.

Merrit, M. V., Roseustein, S. P., Loh, C., Chou, R. H. y Allen, M. M. (1991). A comparison of the major lipid classes and fatty acid composition of marine cellular cyanobacteria with freshwater species. *Archives of Microbiology*, *155*, 107-113.

Meseck, S. L., Alix, J. H. y Wikfors, G. H. (2005). Photoperiod and light intensity effects on growth and utilization of nutrients by the aquaculture feed microalga *Tetraselmis chui* (PLY429). *Aquaculture*, 246, 393-404.

Metcalfe, L. D., Schmitz, A. A. y Pelka, J. R. (1966). Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Analytical Chemistry*, *38*, 514–515.

Metting, F. B. Jr. (1996). Biodiversity and application of microalgae. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *17*, 477-489.

Mexia-Bernal, K. H. (2011). *Efecto de la salinidad e irradiancia en el crecimiento, fotosíntesis y composición de Spirulina maxima para su utilización en la acuicultura*. Bachelor Thesis, Universidad de Occidente, Unidad Guasave, Sinaloa, México. 96 pp.

Mishra, A., Mandoli, A. y Jha, B. (2008). Physiological characterization and stress-induced metabolic responses of *Dunaliella salina* isolated from salt pan. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *35*, 1093-1101.

Moheimani, N. R. Borowitzka, M. A., Isdepsky, A., y Fon Sing, S. (2013). Standard methods for measuring growth of algae and their composition. En: M. A. Borowitzka and N. R. Moheimani. (Eds.). *Algae for Biofuels and Energy*. Springer. 265-284 pp.

Molina-Cárdenas, C.A. (2011). *Efecto inhibitorio de diferentes especies de microalgas sobre Vibrio spp.* Tesis de Maestría en Acuicultura. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 80 pp.

Mora, R., Ortiz, N., Clemente, Y., Bermúdez, J., Avendaño, D. y Morales, E. (2002). Efecto del nitrato, irradiancia y salinidad sobre la producción de clorofila “a” de microalgas cultivadas y aisladas en la región noroccidental de Venezuela. *Oceánides*, *17*(2), 73-83.

Moreno, J. L., Licea, S. y Santoyo, H., (1996). *Diatomeas del Golfo de California*. Baja California Sur. Universidad Autónoma de Baja California Sur, 272 pp.

Moreno-Pérez, M. P. A. (2008). *Efecto de dietas monoespecíficas y mixtas en el crecimiento y la supervivencia de larvas de camarón Litopenaeus vannamei* (Bonne, 1931). Tesis de Maestria en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 76 pp.

Mostary, S. Rahman, M. S., Mandal, A. S. M. S., Hasan, K. M. M., Rehena, Z. y Basar, S. M. A. (2010). Culture of *Brachionus plicatilis* feeding with powdered dried *Chlorella*. *The Bangladesh Veterinarian*, *27*(2), 91-98.

Murata, N. y Los, D. A. (1997). Membrane Fluidity and Temperature Perception. *Plant Physiology*, *115*, 875-879

Natrah, F. M. I., Yusoff, F. M., Shariff, M. Abas, F. y Mariana, N. S. (2007). Screening of Malaysian indigenous microalgae for antioxidante properties and nutritional value. *Journal Applied of Phycology*, *19*, 711-718.

Nelson, D. R., Jin, Z. T. y Lefebvre, P. A. (2013). *Heterococcus* sp. DN1 draft genome: focus on cold tolerance and lipid production. *Microbiome Science and Medicine*, *1*(1), 30-38.

Nelson, D. R., Mengistu, S. y Ranum P. (2013). New lipid-producing, cold-tolerant yellow-green alga isolated from the Rocky Mountains of Colorado. *Biotechnology Progress*, *29*(4), 853-860.

Nieves, M., Voltolina, D. y Piña, P. (2005). Growth and biomass production of *Tetraselmis suecica* and *Dunaliella tertiolecta* in a standard medium added with three products of zeolitic nature. *Aquacultural Engineering*, *32*, 403-410.

Núñez-Zarco, E. y Sánchez-Saavedra. M. P. (2011). Cold storage of six marine benthic diatoms native to the Mexico Pacific Coast. *Journal of the World Aquaculture Society*, *42*(4), 530-538.

Øie, G., Reitan, K. I. y Olsen, Y. (1994). Comparison of rotifer culture quality with yeast plus oil and algal-based cultivation diets. *Aquaculture International*, *2*, 225-38.

Oliveira, M. A., Monteiro, C. L., Robbs, M. P. C. y Leite, S. G. F. (1999). Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures. *Aquaculture International*, *7*, 261-275.

Oren, A., Fattom, A., Padan, E. y Tietz, A. (1985). Unsaturated fatty acid composition and biosynthesis in *Oscillatoria limnetica* and other cyanobacteria. *Archives of Microbiology*, 141,138-142.

Ortega, M. M. (1984). *Catálogo de Algas Continentales Recientes de México*. México, D.F.Instituto de Biología Universidad Autónoma de México. 566 pp.

Ortega, J., Rivas, R., Jonte, L., Mora, R. y Morales. E. (2007). Evaluación de la toxicidad de cianofitas sobre el microcrustáceo *Artemia*. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Zulia*, *24*(1), 238-243.

Otero, A. y Fabregas, J. (1997). Changes in the nutrient composition of *Tetraselmis suecica* cultured semicontinuously with different nutrient concentrations and removal rates. *Aquaculture*, *159*, 111-123.

Pande, S. V., Khan, R. P. y Venkitasubramanian, T. A. (1963). Microdetermination of lipids and serum total acids. *Analytical Biochemistry*, *6*, 415-423.

Pandey, J. P., Pathak, N. y Tiwari, A. (2010). Standardization of pH and light intensity for the biomass production of *Spirulina platensis*. *Journal of Algal Biomass Utilization*, *1*(2), 93-102.

Park, K. C., Whitney, C., McNichol, J. C., Dickinson, K. E., MacQuarrie, S., Skrupski, B. P., Zou, J., Wilson, K. E., O'Leary, S. J. B. y McGinn, P. (2012). Mixotrophic and photoautotrophic cultivation of 14 microalgae isolates from Saskatchewan, Canada: potential applications for wastewater remediation for biofuel production. *Journal Applied of Phycology*, *24*, 339-348.

Parke, M. (1949). Studies on marine flagellates. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, *28*, 255-288.

Parsons, T. R., Maita, Y. y Lalli, C. M. (1984). *A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis*. Oxford. Pergamon Press, 193 pp.

Parsons, T. R., Takahashi, M. y Hargrave, B. (1984). *Biological oceanographic process*. Oxford, England. Pergamon Press Ltd. 330 pp.

Patil, V., Källqvist, T., Olsen, E., Vogt, G. y Gislerod, H. R. (2007). Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Aquaculture International*, *15*, 1-9.

Peng, Y., Zhigang, Y., Chunmei, D., Shuxia, L., y Yu, Z. (2011). Classification of marine diatoms using pigment ratio suites. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, *29*(5), 1075-1085.

Pignolet, O., Jubeau, S., Vaca-García, C. y Michaud, P. (2013). Highly valuable microalgae: biochemical and topological aspects. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *40*(8), 781-796.

Planas, M. y Estévez, A. (1989). Effects of diet on population development of the rotifer *Brachionus plicatilis* in culture. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, *43*, 171-181.

Pratoomyot, J., Srivilas, P. y Noiraksar, T. (2005). Fatty acids composition of 10 microalgal species. *Journal of Science and Technology*, *27*(6), 1179-1187.

Prieto, M. J., Mogollon, M. J., Castro, A. L. y Sierra, L. A. (2005). Efecto del medio y condiciones de cultivo en la productividad de tres diatomeas marinas con potencial acuícola. *Revista MVZ Córdoba*, *10*(1), 26-29.

Pulz, O. y Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *65*, 635-649.

Ratha, S. K., Prasanna, R., Gupta, V., Dhar, D. W. y Saxena, A. K. (2012). Bioprospecting and indexing the microalgal diversity of different ecological habitats of India. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *28*, 1657-1667.

Rech, M., Jean-Luc, M., Annick, M. M., Rosa, P. y Gérard, T. (2005). Long-term acclimation to UV radiation: effects on growth, photosynthesis and carbonic anhydrase activity in marine diatoms. *Botánica Marina*, *48*(5), 407-420.

Redalje, D. G. y Laws, E. A. (1983). The effects of environmental factor on growth and the chemical and biochemical composition of marine diatoms. I. Light and temperature effects. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *68*, 59-79.

Renaud, S. M., Parry, D. L., Luang-Van, T., Padovan, A. y Sammy, N. (1991). Effect of light intensity in the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis* sp. and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, *3*, 43-53.

Renaud, S. M., Parry, D. L., y Loung-Van, T. (1994). Microalgae for use in tropical aquaculture I: Gross chemical and fatty acid composition of twelve species of microalgae from the Northern Territory. Aust. *Journal of Applied Phycology*, *6*, 337-345.

Renaud, S. M., Zhou, H. C., Parry, D. L., Thinh, L. V. y Woo, K. C. (1995). Effect of temperature on the growth, total lipid content and fatty acid composition of recently isolated tropical microalgae *Isochrysis* sp., *Nitzschia closterium*, *Nitzschia paleacea*, and commercial species *Isochrysis* sp. (clone T.ISO). *Journal of Applied Phycology*, *7*, 595-602.

Reynolds, C. S. (2006). *Ecology of Phytoplankton*. New York. Cambridge University Press. 535 pp.

Řezanka, T., Petránková, M., Cepák, V. Přibyl, P., Sigler, K. y Cajthaml, T. (2010). *Trachydiscus minutus*, a new biotechnological source of eicosapentaenoic acid. *Folia Microbiologica*, *55*(3), 265-269.

Rezeq, T. A. y James, M. (1987). Production and nutritional quality of the rotifer *Brachionus plicatilis* fed marine *Chlorella* sp. at different cell densities. *Hydrobiologia*, 147, 257-261.

Richmond, A. (2005). *Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology*.Great Britain. Blackwell Publishing. 566 pp.

Rivkin, R. B. (1989). Influence of irradiance and spectral quality on the carbon metabolism of phytoplankton. I. Photosynthesis, chemical composition and growth. *Marine Ecology Progress Series*, *55*, 291-304.

Robarts, R. D. y Zohary, T. (1987). Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration, and growth rates of Bloom-forming cyanobacteria. New Zealand *Journal of Marine and Freshwater Research*, *21*(3), 391-399.

Rodríguez, M. A., Pereira, C., Yoneshigue, Y., Strbac, D. y Hall, D. O. (2000). Photosynthetic light-response curves and photoinhibition of the deep water *Laminaria abyssalis* and the intertidal *Laminaria digitata* (Phaeophyceae). *Journal of Phycology*, *36*, 97-106.

Roger, P. A. (2005). N_2-fixing cyanobacteria as biofertilizers in rice fields. En: A. Richmond. (Ed.). *Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Publishing Oxford. 392-402 pp.

Roger, P. A., Tirol, A, Santiago-Ardales. S, y Watanabe, I. (1986). Chemical composition of cultures and natural samples of N_2-fixing blue-green algae from rice fields. *Biology and Fertility of Soils*, *2*, 131-146.

Román-Reyes, J. C., Castañeda-Rodríguez, D. O., Castillo-Uretra, H., Bojórquez-Domínguez, R. y Rodríguez-Montes de Oca, G. A. (2014). Dinámica poblacional del rotífero *Brachionus ibericus* aislado de estanques para camarón, alimentado

con diferentes dietas. *Latin American Journal of Aquatic Research*, *42*(5), 1159-1168.

Rosales, N., Jonte, L. y Morales. E. (2006). Crecimiento y composición bioquímica de *Synechococcus* sp. modulados por nitrato de sodio. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, *40*(2), 120-132.

Rosales, N., Ortega, J., Mora, R. y Morales. E. (2005). Influencia de la salinidad sobre el crecimiento y composición bioquímica de la cianobacteria *Synechococcus* sp. *Ciencias Marinas*, *31*(2), 349-355.

Ross, C., Santiago-Vázquez, L. y Paul, V. (2006). Toxin release in response to oxidative stress and programmed cell death in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Toxicology*, *78*, 66-73.

Round, F. E., Crawford, R. M. y Mann, D. G. (1990). *The diatoms, biology and morphology of the genere*. Cambridge Cambridge University Press. 747 pp.

Roy, S., Llewellyn, C. A., Egeland, E. S. y Johnsen, G. (2011). *Phytoplankton pigments.* United Kingdom. Cambridge University Press. 845 pp.

Rueda-Jasso, R. A. (1996). Efecto nutricional de tres microalgas y una cianobacteria en el cultivo de *Brachionus plicatilis* Müller: 1786. *Ciencias Marinas*, *22*(3), 313-328.

Ruíz-Güereca, D. A. y Sánchez-Saavedra, M. P. (2015). Growth and phosphorus removal by *Synechococcus elongatus* coimmobilized in alginate beads with *Azospirillum brasilense*. *Journal of Aplied Phycology*. *28*, 1501-1507. DOI:10.1007/s10811-015-0728-9.

Sánchez-Saavedra, M. P., Licea-Navarro, A. y Bernáldez-Sarabia. J. (2010). Evaluation of the antibacterial activity of different species of phytoplankton. *Revista de Biología Marina y Oceanografía, 45*(3), 531-536.

Sánchez-Alejandro, F. G. y Sánchez-Saavedra, M. P. (2014). Characterization of the growth, biochemical composition and nutrient uptake by the cyanobacterium *Geitlerinema lemmermannii*. *Journal of Applied Phycology*, *27*, 1177-1184. DOI:10.1007/s10811-014-0416-1.

Sánchez-García, D., Resendiz-Isidro, A., Villegas-Garrido, T. L., Flores-Ortiz, C. M., Chávez-Gómez, B., y Cristiani-Urbina, E. (2013). Effect of nitrate on lipid production by *T. suecica, M. Contortum* and *C. minutissima*. *Central European Journal of Biology*, *8*(6), 578-590.

Sánchez-Molina, I. J., González-Ceballos, J., Zetina-Maguel, C. y Casanova-Cetz, R. (2007). Análisis de la biodiversidad de algas marinas situadas entre Uaymitún y Chuburná, Yucatán. *Ingeniería*, *11*(1), 43-51.

Sánchez-Saavedra, M. P. y Núñez-Zarco, E. (2012). Photosynthetic and biochemical effects of cold storage of marine benthic diatoms of Mexican Pacific Coast. *Journal of the World Aquaculture Society*, *43*(2), 249-258.

Sánchez-Saavedra, M.P. y Núñez-Zarco, E. (2015). Growth of red abalone (*Haliotis rufescens)* fed cold stored benthic diatoms. *Journal of de World Aquaculture Society*, *46*(2), 210-218.

Sánchez-Saavedra, M. P. y Voltolina, D. (1994). The chemical composition of *Chaetoceros* sp. (Bacillariophyceae) under different light conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology*, *107B*, 39-44.

Sánchez-Saavedra, M. P. y Voltolina, D. (1995). The effect of different light quality on the food value of the diatom *Chaetoceros* sp. for *Artemia franciscana* Kellogg. *Rivista Italiana di Aquacoltura*, *30*,135-138.

Sánchez-Saavedra, M. P. y Voltolina, D. (1996). The effect of different photon fluence rates of blue-green light on the biomass quality of a coastal diatom in pilot scale, semicontinuous cultures. *Scientia Marina*, *60*, 267-272.

Sánchez-Saavedra, M. P., Viana, M. T., Flores-Acevedo, N. y Cartillo-Barrera, F. (2011). Effect of fresh and short-storage preservation of *Dunaliella tertiolecta* and *Synechococcus elongatus* used as food to *Artemia franciscana*. Por someter en *Journal of Applied Phycology.*

Sandnes, J. M., Källquist, T., Wenner, D. y Gislerød, H. R. (2005). Combined influence of light and temperature on growth rates of *Nannochloropsis oceanica*: linking cellular responses to large scale biomass production. *Journal of Applied Phycology*, *17*, 515-525.

Sato, N. y Wada. H. (2009). Lipid Biosynthesis and its Regulation in Cyanobacteria. En: H. Wada, and Murata N. (Eds). *Lipids in Photosynthesis: Essential and Regulatory Functions*. Springer. 157-177 pp.

Scholz, B. y Liebezeit, G. (2012). Screening for biological activities and toxicological effects of 63 phytoplankton species isolated from freshwater, marine and brackish water habitats. *Harmful Algae*, *20*, 58-70.

Scholz, B. y Liebezeit, G. (2013). Biochemical characterisation and fatty acid profiles of 25 benthic marine diatoms isolated from the Solthörn tidal flat (southern North Sea). *Journal of Applied Phycology*, *25*, 453-465.

Scott, A. P. y Baynes, S. M. (1978). Effect of algal diet and temperature on the biochemical composition of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture*, *14*, 247-260.

Sciandra, A., Lazzara, L. Claustre, H. y Babin, M. (2000). Response of growth rate, pigment composition and optical proprieties of *Cryptomona* sp. to light and nitrogen stress. *Marine Ecology Progress Series*, *201*, 107-120.

Sicko-Goad, L. M., Schelske, C. L. y Stoermer, E. F. (1984). Estimation of intracellular carbon and silica content of diatoms from natural assemblages using morphometric techniques. *Limnology and Oceanography Journal*, *29*(6), 1170-1178.

Simental-Trinidad, J. A., Sánchez-Saavedra, M. P. y Correa-Reyes, J. G. (2001). Biochemical composition of benthic marine diatoms using as culture medium a common agricultural fertilizer. *Journal Shellfish Research*, *20*(2), 611-617.

Simental, J. A. y Sánchez-Saavedra. M. P. (2003). Effects of agricultural fertilizer on growth rate of three benthic diatoms. *Aquacultural Engineering*, *27*, 265-272.

Simental, J. A., Sánchez-Saavedra, M. P. y Carbajal-Miranda, M. (2004). Growth and survival of juvenile of red abalone (*Haliotis rufescens*) fed with macroalgae enriched with a benthic diatom biofilm. *Journal Shellfish Research*, *23*(4), 995-999.

Siqueiros-Beltrones, D. A. (2002). *Diatomeas bentónicas de la Península de Baja California; Diversidad y potencial ecológico*. La Paz, Baja Califronia Sur. Secretaría de educación Pública-Universidad Autónoma de Baja California Sur-Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Instituto Politecnico Nacional México. 102 pp.

Sivakumar, N., Sundararaman, M.y Salvakumar, G. (2011). Efficacy of micro algae and cyanobacteria as live feed for juveniles of shrimp *Penaeus nomodon*. *Journal. Biotechnology*, *10*(55),11594-11599.

Solovchenko, A. E., Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Cohen, Z. y Merzlyak, M. N. (2008). Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*. *Journal of Applied Phycology*, 20, 245-251.

Sokal, R. R. y Rohlf, F. J. (1979). *Biometría. Principios y Métodos Estadísticos en la Investigación Biológica*. Madrid. H Blume Ediciones. 832 pp.

Sorokin, C. (1973). Dry weight, packed cell volume and optical density. En: J. Stein (Ed.). *Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge University Press. 321-344 pp.

Sournia, A. (1978). *Phytoplankton Manual*. United Kingdom. United Nations Educational Scientific and Cultural Organization. 337 pp.

South, G. R. y Whittick, A. (1987). *Introduction to Phycology*. Great Britain. Blackwell Scientific Publications. 341 pp.

StatSoft, Inc. (2002). Statistica for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2300 East 14th Street, Tulsa, OK 74104, phone: (918) 749-1119, fax: (918) 749-2217, email:info@statsoft.com.

Stein, J. R. (1973). *Handbook of Phycological Methods*. *Culture Methods and Growth Measurement.* New York. Cambridge University Press, 448 pp.

Su, C., Chien, L., Gomes, J., Lin, Y., Liou, J., y Syu, R. (2011). Factors affecting lipid accumulation by *Nannochloropsis oculata* in a two-stage cultivation process. *Journal of Applied Phycology*, *23*(5), 903-908.

Taoka, Y., Nagano, N., Okita, Y., Izumida, H., Sugimoto, S. y Hayashi, M. (2009). Influences of culture temperatura on the growth, lipid content and fatty acid composition of *Aurantiochytrium* sp. strain mh0186. *Marine Biotechnology*, *11*(3), 368-374.

Tedesco, M. A. y Duerr, E. O. (1989). Light, temperature and nitrogen starvation effects on the total lipid and fatty acid content and composition of *Spirulina platensis* UTEX 1928. *Journal of Applied Phycology*, *1*, 201-209.

Thompson, P. A. y Guo, M. (1992a). Effects of variation in temperature I. On the biochemical composition of eight species of marine phytoplankton. *Journal of Phycology*, *28*, 481-488.

Thompson, P. A. y Guo, M. (1992b). Effects of variation in temperature II. On the fatty acid composition of eight species of marine phytoplankton. *Journal of Phycology*, *28*, 488-492.

Tian, Y., Mingjiang, Z., y Q. Peiyuan. (2002). Combined effects of temperature, irradiance, and salinity on growth of diatom *Skeletonema costatum*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, *20*(3), 237-243.

Tomas, C. R. (1997). *Identifying marine phytoplankton*. New York. Academic Press. Elsivier. 858 pp.

Trujillo-Valle, M. D. L. (1993). *La colección de microalgas del CICESE*. Departamento de Acuicultura. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Reporte Técnico CIACT9301. 56 pp.

Turpin, D. H. (1991). Algal carbon uptake and the difference between alkalinity and high pH, exemplified with to pH drift experiment. *Sciences Marines*, *60*, 129-134.

Tzovenis, I., Fountoulaki, N., Dolapsakis, N., Kotzamanis, I., Nengas, I., Bitis, I., Cladas, Y., y Economou-Amilli, A. (2009). Screening for marine nanoplanktic microalgae from Greek coastal lagoons (Ionian Sea) for use in mariculture. *Journal of Applied Phycology*, *21*(4), 457-469.

Valenzuela-Espinoza, E., Lafarga-de la Cruz, F., Millan-Nuñez, R. y Núñez-Cebrero, F. (2005). Crecimiento, consumo de nutrientes y composición proximal de *Rhodomonas* sp. Cultivada con medio f/2 y fertilizantes agrícolas. *Ciencias Marinas*, *31*(1A), 79-89.

Valle-Ramírez de Arellano, G. (2007). *Utilización de microalgas para la remoción de cadmio y zinc de efluentes de aguas residuales urbanas*. Tesis de Maestria en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 70 pp.

van Apeldoorn, M. E., van Egmond, H. P., Speijers, G. J. A., y Bakker, G. J. I. (2007). Toxins of cyanobacteria. *Molecular Nutrition and Food Research*, *51*, 7-60.

van Stappen, G. (1996). Use of cysts. En: P. Lavens and P. Sorgeloos (Eds). *Manual on the production and use of live food for aquaculture*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 130-136 pp.

Varshney, P., Mikulic, P., Vonshak, A., Beardall, J., y Wangikar, P. P. (2015). Extremophilic micro-algae and their potential contribution in biotechnology. *Bioresource Technology*, *184*, 363-372.

Vásquez-Suárez, A., Guevara, M., González, M., Cortez, R. y Arredondo-Vega, B. (2013). Crecimiento y composición bioquímica de *Thalassiosira pseudonana* (Thalassiosirales: Thalassiosiraceae) bajo cultivo semicontinuo en diferentes medios y niveles de radiación. *Revista de Biología Tropical*, *61*(3), 1003-1013.

Venrick, E. (1978). Sampling Design. En: A. Sournia. *Phytoplankton Manual*. United Nations Educational Scientific and Cultural Organization. 7–16 pp.

Volkman, J. K., Brown, M. R., & Subba Rao, D. V. (2006). Nutritional value of microalgae and applications. En: D. V. Subba Rao (Ed.). *Algal cultures, analogues of blooms and applications Volume 1*. Science Publishers. 407-457 pp.

Vonshak, A. (1986). Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. En: D. A. Richmond (Ed.). *CRC Handbook of Microalgal Mass Culture*. Boca Raton, Florida. Taylor and Francis Group. 117-145 pp.

Wehr, J. D. y Sheath, R. G. (2003). *Freshwater Algae of North America, Ecology and Classification.*San Diego, California. Academic Press. 918 pp.

Weiss, V., Gromet-Elhanan, Z. y Halmann M. (1985). Batch and continuous culture experiments on nutrient limitations and temperature effects in the marine algae *Tetraselmis suecica*. *Water Research*, *19*(2), 185-190.

Werner, D. (1977). *The Biology of Diatoms*. Berkeley and Los Angeles, California. University of California Press. 498 pp.

Whyte, J. N. C. (1987). Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture*, *60*, 231-241.

Xu, Z., Yan, X., Pei, L., Luo, Q. y Xu, J. (2007). Changes in fatty acids and sterols during batch growth of *Pavlova viridis* in photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*, *20*, 237-243.

Yen, T. T. D., Sivaloganathan, B. y Obbard, J. P. (2011). Screening of marine microalgae for biodiesel feedstock. *Biomass and Bioenergy*, *35*, 2534-2544.

Yin K., Harrison, J. P. y Dortch, Q. (1998). Lack of ammonium inhibition of nitrate uptake for a diatom grown under low light conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. *228*(1), 151-165.

Yúfera, M. Pascual, E. y Guinea, J. (1993). Factors influencing the biomass of the rotifer *Brachionus plicatilis* in culture. *Hydrobiologia*, *255/256*, 159-164.

Yun, M. S., Lee, S. H, y Chung, I. K. (2010). Photosynthetic activity of benthic diatoms in response to different temperatures. *Journal of Applied Phycology*, *22*(5), 559-562.

Zar, J. H. (1984). *Bioestatistical Analysis*. London. Prentice Hall. International Editions Inc. 718 pp.

Zepka, L. Q., Jacob-Lopes, E. y Queiroz, M. I. (2007). Efecto del procesamiento térmico sobre el perfil de ácidos grasos de la microalga *Aphanothece microscopica* Nägeli. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, *5*(5), 368-371.

Zhu, C. J., Lee, Y. K. y Chao. T. M. (1997). Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1. *Journal of Applied Phycology*, *9*, 451-457.

Zhu, C. J. y Lee, Y. K. (1997). Determination of biomass dry weight of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, *9*: 189-194.

Zhukova, N. V. y Aizdaicher N. A. (1995). Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. *Phytochemistry*, *39*(2), 351-356.

10. Anexo

Anexo 1. Resumen de los resultados obtenidos por una ANOVA factorial y las comparaciones obtenidas por una prueba *a posteriori* de Tukey, de los pesos (pg cél^{-1}) de cultivos estáticos de *Tetraselmis suecica*, mantenidos con dos temperaturas (20 y 25 °C), dos aportes químico de nitrógeno (nitrato de sodio y por nitrato de amonio) y dos irradiancias (100 y 200 µE m^{-2} s^{-1}). Las letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos (*P* < 0.05: a>b>c).

	ANOVA FACTORIAL			Prueba *a posteriori* de Tukey			
	Efecto	**F**	**p**	**Temperatura (°C)**	**Aporte de nitrógeno**	**Irradiancia (µE m^{-2} s^{-1})**	
Peso Seco	Temperatura	0.867	0.366				
	Nitrógeno	**76.9859**	**0.000**		NH_4NO_3		**a**
					$NaNO_3$		**b**
	Irradiancia	**8.180**	**0.011**			100	**a**
						200	**b**
	T*N	**4.843**	**0.043**	20	NH_4NO_3		**a**
				25	NH_4NO_3		**a**
				25	$NaNO_3$		**b**
				20	$NaNO_3$		**b**
	T*I	1.032	0.325				
	N*I	4.305	0.054				
	T*N*I	0.007	0.936				
Cenizas	Temperatura	1.398	0.254				
	Nitrógeno	**84.307**	**0.000**		NH_4NO_3		**a**
					$NaNO_3$		**b**
	Irradiancia	**10.441**	**0.005**			100	**a**
						200	**b**
	T*N	**6.355**	**0.0223**	20	NH_4NO_3		**a**
				25	NH_4NO_3		**a**
				25	$NaNO_3$		**b**
				20	$NaNO_3$		**b**
	T*I	1.053	0.320				
	N*I	**5.948**	**0.027**		NH_4NO_3	100	**a**
					NH_4NO_3	200	**b**
					$NaNO_3$	100	**c**
					$NaNO_3$	200	**c**
	T*N*I	0.042	0.841				
Peso orgánico total	Temperatura	0.059	0.812				
	Nitrógeno	**52.933**	**0.000**		NH_4NO_3		**a**
					$NaNO_3$		**b**
	Irradiancia	3.111	0.097				
	T*N	1.610	0.223				
	T*I	0.877	0.363				
	N*I	1.076	0.315				
	T*N*I	0.056	0.816				

Anexo 2. Resumen de los resultados obtenidos por una ANOVA factorial y las comparaciones obtenidas por una prueba *a posteriori* de Tukey, de los pesos (pg cél^{-1}) de cultivos estáticos de *Aphanocapsa marina*, mantenidos con dos temperaturas (20 y 25 °C), dos aportes químico de nitrógeno (nitrato de sodio y por nitrato de amonio) y dos irradiancias (100 y 200 µE m^{-2} s^{-1}). Las letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos (*P* < 0.05: a>b).

	ANOVA FACTORIAL			Prueba *a posteriori* de Tukey				
	Efecto	**F**	**p**	**Temperatura (°C)**	**Aporte de nitrógeno**	**Irradiancia (µE m^{-2} s^{-1})**		
Peso Seco	Temperatura	**8.296**	**0.011**	20			**a**	
				25				**b**
	Nitrógeno	**18.915**	**0.000**		$NaNO_3$		**a**	
					NH_4NO_3			**b**
	Irradiancia	**5.253**	**0.036**			200	**a**	
						100		**b**
	T*N	2.708	0.119					
	T*I	0.009	0.927					
	N*I	1.805	0.198					
	T*N*I	0.112	0.742					
Cenizas	Temperatura	**8.151**	**0.011**	20			**a**	
				25				**b**
	Nitrógeno	**19.732**	**0.000**		$NaNO_3$		**a**	
					NH_4NO_3			**b**
	Irradiancia	4.171	0.058					
	T*N	2.785	0.115					
	T*I	0.006	0.938					
	N*I	1.917	0.185					
	T*N*I	0.073	0.791					
Peso orgánico total	Temperatura	**8.553**	**0.010**	20			**a**	
				25				**b**
	Nitrógeno	**14.634**	**0.001**		$NaNO_3$		**a**	
					NH_4NO_3			**b**
	Irradiancia	**11.300**	**0.004**			200	**a**	
						100		**b**
	T*N	2.254	0.153					
	T*I	0.024	0.880					
	N*I	1.269	0.277					
	T*N*I	0.385	0.543					

Anexo 3. Resumen de los resultados obtenidos por una ANOVA factorial y las comparaciones obtenidas por una prueba *a posteriori* de Tukey, de los pesos (pg cél^{-1}) de cultivos estáticos de *Heterococcus* sp. mantenidos con dos temperaturas (20 y 25 °C), dos aportes químico de nitrógeno (nitrato de sodio y por nitrato de amonio) y dos irradiancias (100 y 200 µE m^{-2} s^{-1}). Las letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos (*P* < 0.05: a>b).

	ANOVA FACTORIAL			Prueba *a posteriori* de Tukey				
	Efecto	**F**	**p**	**Temperatura (°C)**	**Aporte de nitrógeno**	**Irradiancia (µE m^{-2} s^{-1})**		
Peso Seco	Temperatura	0.683	0.421					
	Nitrógeno	**15.299**	**0.001**		NH_4NO_3		**a**	
					$NaNO_3$			**b**
	Irradiancia	0.263	0.615					
	T*N	0.129	0.724					
	T*I	0.057	0.814					
	N*I	**4.586**	**0.048**		NH_4NO_3	100	**a**	
					NH_4NO_3	200	**a**	**b**
					$NaNO_3$	200		**b**
					$NaNO_3$	100		**b**
	T*N*I	0.407	0.532					
Cenizas	Temperatura	1.570	0.228					
	Nitrógeno	**13.000**	**0.002**		NH_4NO_3		**a**	
					$NaNO_3$			**b**
	Irradiancia	1.198	0.290					
	T*N	0.028	0.869					
	T*I	0.329	0.574					
	N*I	**4.572**	**0.048**		NH_4NO_3	100	**a**	
					NH_4NO_3	200	**a**	**b**
					$NaNO_3$	200		**b**
					$NaNO_3$	100		**b**
	T*N*I	0.429	0.522					
Peso orgánico total	Temperatura	0.694	0.417					
	Nitrógeno	**13.762**	**0.002**		NH_4NO_3		**a**	
					$NaNO_3$			**b**
	Irradiancia	2.442	0.138					
	T*N	0.778	0.391					
	T*I	0.874	0.364					
	N*I	2.220	0.156					
	T*N*I	0.150	0.704					

Anexo 4. Resumen de los resultados obtenidos por una ANOVA factorial y las comparaciones obtenidas por una prueba *a posteriori* de Tukey, de los pesos (pg cél^{-1}) de cultivos estáticos de *Navicula* sp. mantenidos con dos temperaturas (20 y 25 °C), dos aportes químico de nitrógeno (nitrato de sodio y por nitrato de amonio) y dos irradiancias (100 y 200 µE m^{-2} s^{-1}). Las letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos (*P* < 0.05: a>b>c>d>e).

	ANOVA FACTORIAL			Prueba *a posteriori* de Tukey							
	Efecto	**F**	**p**	**Temperatura (°C)**	**Aporte de nitrógeno**	**Irradiancia (µE m^{-2} s^{-1})**					
Peso Seco	Temperatura	**11.933**	**0.003**	20			**a**				
				25				**b**			
	Nitrógeno	**212.752**	**0.000**		NH_4NO_3		**a**				
					$NaNO_3$			**b**			
	Irradiancia	2.043	0.172								
	T*N	**11.863**	**0.003**	20	NH_4NO_3		**a**				
				25	NH_4NO_3			**b**			
				20	$NaNO_3$				**c**		
				25	$NaNO_3$				**c**		
	T*I	**45.690**	**0.000**	20		200	**a**				
				25		100	**a**	**b**			
				20		100		**b**			
				25		200			**c**		
	N*I	**7.368**	**0.015**		NH_4NO_3	200	**a**				
					NH_4NO_3	100	**a**				
					$NaNO_3$	100		**b**			
					$NaNO_3$	200			**c**		
	T*N*I	**43.513**	**0.000**	20	NH4NO3	200	**a**				
				25	NH4NO3	100		**b**			
				20	NH4NO3	100		**b**	**c**		
				25	NH4NO3	200			**c**	**d**	
				25	$NaNO_3$	100				**d**	**e**
				20	$NaNO_3$	100				**d**	**e**
				20	$NaNO_3$	200					**e**
				25	$NaNO_3$	200					**e**
Cenizas	Temperatura	**6.057**	**0.026**	20			**a**				
				25				**b**			
	Nitrógeno	**122.428**	**0.000**		NH_4NO_3		**a**				
					$NaNO_3$			**b**			
	Irradiancia	4.192	0.057								
	T*N	**8.181**	**0.011**	20	NH_4NO_3		**a**				
				25	NH_4NO_3			**b**			
				25	$NaNO_3$				**c**		
				20	$NaNO_3$				**c**		
	T*I	**25.171**	**0.000**	20		200	**a**				
				25		100	**a**				
				20		100	**a**				
				25		200		**b**			
	N*I	3.167	0.094								
	T*N*I	**22.909**	**0.000**	20	NH_4NO_3	200	**a**				
				25	NH_4NO_3	100	**a**	**b**			
				20	NH_4NO_3	100		**b**	**c**		
				25	NH_4NO_3	200			**c**	**d**	
				25	$NaNO_3$	100			**c**	**d**	
				20	$NaNO_3$	100				**d**	
				25	$NaNO_3$	200				**d**	
				20	$NaNO_3$	200				**d**	

Anexo 4. Continuación…

	ANOVA FACTORIAL			Prueba *a posteriori* de Tukey					
	Efecto	**F**	**p**	**Temperatura (°C)**	**Aporte de nitrógeno**	**Irradiancia (µE m^{-2} s^{-1})**			
Peso orgánico total	Temperatura	**6.238**	**0.024**	20			**a**		
				25				**b**	
	Nitrógeno	**83.084**	**0.000**		NH_4NO_3		**a**		
					$NaNO_3$			**b**	
	Irradiancia	1.333	0.265						
	T*N	2.645	0.123						
	T*I	**19.884**	**0.000**	20		200	**a**		
				25		100	**a**	**b**	
				20		100		**b**	
				25		200		**b**	
	N*I	**5.246**	**0.036**		NH_4NO_3	200	**a**		
					NH_4NO_3	100	**a**		
					$NaNO_3$	100		**b**	
					$NaNO_3$	200		**b**	
	T*N*I	**21.022**	**0.000**	20	NH_4NO_3	200	**a**		
				25	NH_4NO_3	100		**b**	
				20	NH_4NO_3	100		**b**	**c**
				25	NH_4NO_3	200		**b**	**c**
				20	$NaNO_3$	100			**c**
				25	$NaNO_3$	100			**c**
				20	$NaNO_3$	200			**c**
				25	$NaNO_3$	200			**c**

Anexo 5. Resumen de los resultados obtenidos por una ANOVA factorial y las comparaciones obtenidas por una prueba *a posteriori* de Tukey, de los pesos (pg cél^{-1}) de cultivos estáticos de *Tetraselmis suecica* (T), *Aphanocapsa marina* (A), *Heterococcus* sp. (H) y *Navicula* sp. (N) mantenidos con dos temperaturas (20 y 25 °C), dos aportes químico de nitrógeno (nitrato de sodio y por nitrato de amonio) y dos irradiancias (100 y 200 µE m^{-2} s^{-1}). Las letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos (*P* < 0.05: a>b>c>d>e>f>g).

	ANOVA FACTORIAL			Prueba *a posteriori* de Tukey									
	Efecto	**F**	**p**	**Especie**	**Temperatura (°C)**	**Aporte de nitrógeno**	**Irradiancia (µE m^{-2}s^{-1})**						
				H				**a**					
				T					**b**				
	Especie	**106.130**	**0.000**	N						**c**			
				A							**d**		
	Temperatura	2.975	0.089										
	Nitrógeno	**108.231**	**0.000**			NH_4NO_3		**a**					
						$NaNO_3$			**b**				
	Irradiancia	**5.789**	**0.019**				100	**a**					
							200	**a**					
	E*T	0.258	0.855										
				H		NH_4NO_3		**a**					
				T		NH_4NO_3		**a**					
				H		$NaNO_3$			**b**				
				N		NH_4NO_3				**c**			
	E*N	**25.197**	**0.000**	T		$NaNO_3$				**c**	**d**		
				N		$NaNO_3$					**d**		
				A		$NaNO_3$					**d**		
				A		NH_4NO_3					**d**		
					20	NH_4NO_3		**a**					
	T*N	**4.470**	**0.038**		25	NH_4NO_3			**b**				
					25	$NaNO_3$				**c**			
					20	$NaNO_3$				**c**			
				H			100	**a**					
				H			200	**a**					
				T			100	**a**					
	E*I	**3.206**	**0.029**	T			200		**b**				
Peso Seco				N			100			**c**			
				N			200			**c**	**d**		
				A			200				**d**		
				A			100				**d**		
	T*I	2.826	0.098										
						NH_4NO_3	100	**a**					
	N*I	**7.090**	**0.010**			NH_4NO_3	200		**b**				
						$NaNO_3$	200			**c**			
						$NaNO_3$	100			**c**			
	E*T*N	1.742	0.167										
	E*T*I	0.619	0.605										
					T	NH_4NO_3	100	**a**					
					H	NH_4NO_3	100	**a**	**b**				
					H	NH_4NO_3	200		**b**	**c**			
					T	NH_4NO_3	200			**c**			
					H	$NaNO_3$	200			**c**	**d**		
					H	$NaNO_3$	100			**c**	**d**	**e**	
					N	NH_4NO_3	200				**d**	**e**	**f**
	E*N*I	**3.635**	**0.017**		N	NH_4NO_3	100					**e**	**f** **g**
					T	$NaNO_3$	100					**e**	**f** **g**
					T	$NaNO_3$	200						**f** **g**
					N	$NaNO_3$	100						**f** **g**
					N	$NaNO_3$	200						**f** **g**
					A	$NaNO_3$	200						**f** **g**
					A	$NaNO_3$	100						**f** **g**
					A	NH_4NO_3	200						**g**
					A	NH_4NO_3	100						**g**
	T*N*I	0.084	0.773										
	E*T*N*I	1.125	0.346										

Anexo 5. Continuación…

	ANOVA FACTORIAL			Prueba *a posteriori* de Tukey									
	Efecto	**F**	**p**	**Especie**	**Temperatura (°C)**	**Aporte de nitrógeno**	**Irradiancia ($\mu E\ m^{-2}s^{-1}$)**						
				H				**a**					
				T					**b**				
	Especie	**83.848**	**0.000**	N						**c**			
				A							**d**		
	Temperatura	**4.573**	**0.036**		20			**a**					
					25				**b**				
	Nitrógeno	**99.695**	**0.000**			NH_4NO_3		**a**					
						$NaNO_3$			**b**				
	Irradiancia	**9.580**	**0.003**				100	**a**					
							200		**b**				
	E*T	0.616	0.607										
				T		NH_4NO_3		**a**					
				H		NH_4NO_3		**a**					
				H		$NaNO_3$			**b**				
	E*N	**24.012**	**0.000**	N		NH_4NO_3			**b**	**c**			
				T		$NaNO_3$				**c**	**d**		
				N		$NaNO_3$					**d**		
				A		$NaNO_3$					**d**		
				A		NH_4NO_3					**d**		
					20	NH_4NO_3		**a**					
	T*N	**4.286**	**0.042**		25	NH_4NO_3			**b**				
					20	$NaNO_3$				**c**			
					25	$NaNO_3$				**c**			
				H			100	**a**					
				T			100	**a**					
				H			200	**a**	**b**				
Cenizas	E*I	**3.257**	**0.027**	T			200		**b**	**c**			
				N			100			**c**	**d**		
				N			200				**d**		
				A			200				**d**		
				A			100				**d**		
	T*I	3.308	0.074										
						NH_4NO_3	100	**a**					
	N*I	**8.625**	**0.005**			NH_4NO_3	200		**b**				
						$NaNO_3$	100			**c**			
						$NaNO_3$	200			**c**			
	E*T*N	2.107	0.108										
	E*T*I	0.425	0.736										
				T		NH_4NO_3	100	**a**					
				H		NH_4NO_3	100	**a**	**b**				
				H		NH_4NO_3	200		**b**	**c**			
				T		NH_4NO_3	200		**b**	**c**			
				H		$NaNO_3$	200			**c**	**d**		
				H		$NaNO_3$	100			**c**	**d**	**e**	
				N		NH_4NO_3	100				**d**	**e**	**f**
	E*N*I	**3.888**	**0.013**	N		NH_4NO_3	200				**d**	**e**	**f**
				T		$NaNO_3$	100					**e**	**f**
				T		$NaNO_3$	200					**e**	**f**
				N		$NaNO_3$	100					**e**	**f**
				N		$NaNO_3$	200						**f**
				A		$NaNO_3$	200						**f**
				A		$NaNO_3$	100						**f**
				A		NH_4NO_3	200						**f**
				A		NH_4NO_3	100						**f**
	T*N*I	0.007	0.936										
	E*T*N*I	1.017	0.391										

Anexo 5. Continuación…

	ANOVA FACTORIAL			Prueba *a posteriori* de Tukey								
	Efecto	**F**	**p**	**Especie**	**Temperatura (°C)**	**Aporte de nitrógeno**	**Irradiancia ($\mu E\ m^{-2}s^{-1}$)**					
	Especie	**137.805**	**0.000**	H				**a**				
				T					**b**			
				N						**c**		
				A							**d**	
	Temperatura	0.025	0.874									
	Nitrógeno	**88.742**	**0.000**			NH_4NO_3		**a**				
						$NaNO_3$			**b**			
	Irradiancia	0.010	0.919									
	E*T	0.794	0.502									
	E*N	**18.618**	**0.000**	H		NH_4NO_3		**a**				
				T		NH_4NO_3			**b**			
				H		$NaNO_3$			**b**			
				N		NH_4NO_3				**c**		
				T		$NaNO_3$				**c**	**d**	
Peso Orgánico Total				N		$NaNO_3$					**d**	
				A		$NaNO_3$					**d**	
				A		NH_4NO_3					**d**	
	T*N	3.221	0.077									
	E*I	**3.643**	**0.017**	H			200	a				
				H			100	a				
				T			100		**b**			
				T			200		**b**	**c**		
				N			200			**c**	**d**	
				N			100				**d**	**e**
				A			200					**e**
				A			100					**e**
	T*I	0.857	0.358									
	N*I	1.701	0.197									
	E*T*N	0.619	0.605									
	E*T*I	1.901	0.138									
	E*N*I	1.792	0.158									
	T*N*I	0.698	0.407									
	E*T*N*I	1.024	0.388									

Anexo 6. Resumen de los resultados obtenidos por una ANOVA factorial y las comparaciones obtenidas por una prueba *a posteriori* de Tukey, de la composición proximal (% de peso orgánico) de cultivos estáticos de *Tetraselmis suecica*, mantenidos con dos temperaturas (20 y 25 °C), dos aportes químico de nitrógeno (nitrato de sodio y por nitrato de amonio) y dos irradiancias (100 y 200 µE m^{-2} s^{-1}). Las letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos (*P* < 0.05: a>b).

	ANOVA FACTORIAL			Prueba *a posteriori* de Tukey			
	Efecto	**F**	**p**	**Temperatura (°C)**	**Aporte de nitrógeno**	**Irradiancia (µE m^{-2} s^{-1})**	
Proteínas	Temperatura	2.423	0.139				
	Nitrógeno	**4.505**	**0.050**		NH_4NO_3		**a**
					$NaNO_3$		**b**
	Irradiancia	**8.987**	**0.009**			100	**a**
						200	**b**
	T*N	0.133	0.720				
	T*I						
	N*I						
	T*N*I						
Carbohidratos	Temperatura	1.991	0.177				
	Nitrógeno	0.921	0.352				
	Irradiancia	0.695	0.417				
	T*N	0.077	0.784				
	T*I	2.058	0.171				
	N*I	0.556	0.467				
	T*N*I	0.321	0.579				
Lípidos	Temperatura	0.118	0.736				
	Nitrógeno	0.018	0.895				
	Irradiancia	2.616	0.125				
	T*N	1.384	0.257				
	T*I	4.163	0.058				
	N*I	0.070	0.795				
	T*N*I	0.452	0.511				

Anexo 7. Resumen de los resultados obtenidos por una ANOVA factorial y las comparaciones obtenidas por una prueba *a posteriori* de Tukey, de la composición proximal (% de peso orgánico) de cultivos estáticos de *Aphanocapsa marina*, mantenidos con dos temperaturas (20 y 25 °C), dos aportes químico de nitrógeno (nitrato de sodio y por nitrato de amonio) y dos irradiancias (100 y 200 µE m^{-2} s^{-1}). Las letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos (*P* < 0.05: a>b).

	ANOVA FACTORIAL			Prueba *a posteriori* de Tukey			
	Efecto	**F**	**p**	**Temperatura (°C)**	**Aporte de nitrógeno**	**Irradiancia (µE m^{-2} s^{-1})**	
Proteínas	Temperatura	0.821	0.378				
	Nitrógeno	**14.392**	**0.002**		NH_4NO_3		**a**
					$NaNO_3$		**b**
	Irradiancia	0.157	0.698				
	T*N	0.301	0.591				
	T*I	0.013	0.909				
	N*I	2.542	0.130				
	T*N*I	0.136	0.717				
Carbohidratos	Temperatura	4.011	0.062				
	Nitrógeno	0.581	0.457				
	Irradiancia	0.325	0.577				
	T*N	0.607	0.447				
	T*I	0.531	0.477				
	N*I	0.739	0.403				
	T*N*I	0.223	0.643				
Lípidos	Temperatura	0.055	0.818				
	Nitrógeno	0.141	0.712				
	Irradiancia	0.927	0.350				
	T*N	0.007	0.934				
	T*I	0.909	0.354				
	N*I	**5.509**	**0.032**		NH_4NO_3	200	**a**
					$NaNO_3$	100	**a**
					$NaNO_3$	200	**a**
					NH_4NO_3	100	**a**
	T*N*I	0.846	0.371				

Anexo 8. Resumen de los resultados obtenidos por una ANOVA factorial y las comparaciones obtenidas por una prueba *a posteriori* de Tukey, de la composición proximal (% de peso orgánico) de cultivos estáticos de *Heterococcus* sp., mantenidos con dos temperaturas (20 y 25 °C), dos aportes químico de nitrógeno (nitrato de sodio y por nitrato de amonio) y dos irradiancias (100 y 200 µE m^{-2} s^{-1}). Las letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos (*P* < 0.05: a>b).

	ANOVA FACTORIAL			Prueba *a posteriori* de Tukey			
	Efecto	**F**	**p**	**Temperatura (°C)**	**Aporte de nitrógeno**	**Irradiancia (µE m^{-2} s^{-1})**	
Proteínas	Temperatura	0.792	0.387				
	Nitrógeno	0.004	0.953				
	Irradiancia	2.466	0.136				
	T*N	4.187	0.058				
	T*I	1.662	0.216				
	N*I	0.233	0.636				
	T*N*I	0.232	0.637				
Carbohidratos	Temperatura	0.021	0.887				
	Nitrógeno	**17.900**	**0.001**		$NaNO_3$	**a**	
					NH_4NO_3		**b**
	Irradiancia	1.816	0.197				
	T*N	0.259	0.617				
	T*I	0.546	0.470				
	N*I	1.773	0.202				
	T*N*I	1.303	0.271				
Lípidos	Temperatura	**9.625**	**0.007**	20		**a**	
				25			**b**
	Nitrógeno	**5.458**	**0.033**		$NaNO_3$	**a**	
					NH_4NO_3		**b**
	Irradiancia	2.054	0.171				
	T*N	0.164	0.691				
	T*I	0.032	0.860				
	N*I	0.248	0.625				
	T*N*I	0.813	0.381				

Anexo 9. Resumen de los resultados obtenidos por una ANOVA factorial y las comparaciones obtenidas por una prueba *a posteriori* de Tukey, de la composición proximal (% de peso orgánico) de cultivos estáticos de *Navicula* sp. (cepa 3), mantenidos con dos temperaturas (20 y 25 °C), dos aportes químico de nitrógeno (nitrato de sodio y por nitrato de amonio) y dos irradiancias (100 y 200 µE m^{-2} s^{-1}). Las letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos (*P* < 0.05: a>b).

	ANOVA FACTORIAL			Prueba *a posteriori* de Tukey				
	Efecto	**F**	**p**	**Temperatura (°C)**	**Aporte de nitrógeno**	**Irradiancia (µE m^{-2} s^{-1})**		
Proteínas	Temperatura	0.589	0.454					
	Nitrógeno	**22.090**	**0.000**		$NaNO_3$		**a**	
					NH_4NO_3			**b**
	Irradiancia	0.002	0.969					
	T*N	3.705	0.072					
	T*I	**10.037**	**0.006**	20		200	**a**	
				25		100	**a**	
				20		100	**a**	
				25		200	**a**	
	N*I	4.266	0.055					
	T*N*I	0.000	0.985					
Carbohidratos	Temperatura	1.665	0.215					
	Nitrógeno	**31.856**	**0.000**		$NaNO_3$		**a**	
					NH_4NO_3			**b**
	Irradiancia	2.021	0.174					
	T*N	1.107	0.308					
	T*I	**12.580**	**0.003**	20		200	**a**	
				25		100	**a**	
				25		200	**a**	**b**
				20		100		**b**
	N*I	1.782	0.201					
	T*N*I	0.657	0.429					
Lípidos	Temperatura	0.055	0.817					
	Nitrógeno	**20.561**	**0.000**		$NaNO_3$		**a**	
					NH_4NO_3			**b**
	Irradiancia	**5.401**	**0.034**			100	**a**	
						200		**b**
	T*N	1.029	0.326					
	T*I	**5.043**	**0.039**	25		100	**a**	
				20		100	**a**	**b**
				20		200	**a**	**b**
				25		200		**b**
	N*I	0.688	0.419					
	T*N*I	0.137	0.716					

Anexo 10. Resumen de los resultados obtenidos por una ANOVA factorial y las comparaciones obtenidas por una prueba *a posteriori* de Tukey, de la composición proximal (% de peso orgánico) de cultivos estáticos de *Tetraselmis suecica* (T), *Aphanocapsa marina* (A), *Heterococcus* sp. (H) y *Navicula* sp. (N) mantenidos con dos temperaturas (20 y 25 °C), dos aportes químico de nitrógeno (nitrato de sodio y por nitrato de amonio) y dos irradiancias (100 y 200 µE m^{-2} s^{-1}). Las letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos (*P* < 0.05: a>b>c>d).

	ANOVA FACTORIAL			Prueba *a posteriori* de Tukey							
	Efecto	**F**	**p**	**Especie**	**Temperatura (°C)**	**Aporte de nitrógeno**	**Irradiancia (µE $m^{-2}s^{-1}$)**				
				N				**a**			
				T				**a**			
	Especie	**12.420**	**0.000**	H				**a**			
				A					**b**		
	Temperatura	0.978	0.326								
	Nitrógeno	**4.778**	**0.032**			NH_4NO_3		**a**			
						$NaNO_3$			**b**		
	Irradiancia	**4.809**	**0.032**				100	**a**			
							200		**b**		
	E*T	1.609	0.196								
				N		$NaNO_3$		**a**			
				T		NH_4NO_3		**a**	**b**		
				N		NH_4NO_3		**a**	**b**		
	E*N	**11.093**	**0.000**	H		NH_4NO_3		**a**	**b**		
				H		$NaNO_3$		**a**	**b**		
				A		NH_4NO_3			**b**		
Proteínas				T		$NaNO_3$			**b**		
				A		$NaNO_3$			**c**		
	T*N	0.001	0.972								
				T			100	a			
				N			200	a	b		
				N			100	**a**	**b**		
	E*I	**3.766**	**0.015**	H			100	**a**	**b**	**c**	
				H			200	**a**	**b**	**c**	**d**
				T			200		**b**	**c**	**d**
				A			200			**c**	**d**
				A			100				**d**
	T*I	1.815	0.183								
	N*I	0.642	0.426								
	E*T*N	1.360	0.263								
	E*T*I	1.038	0.382								
	E*N*I	1.821	0.152								
	T*N*I	0.359	0.551								
	E*T*N*I	0.373	0.773								

Anexo 10. Continuación…

	ANOVA FACTORIAL			Prueba *a posteriori* de Tukey						
	Efecto	**F**	**p**	**Especie**	**Temperatura (°C)**	**Aporte de nitrógeno**	**Irradiancia (µE m^{-2}s^{-1})**			
Carbohidratos	Especie	**15.853**	**0.000**	H				**a**		
				T					**b**	
				N					**b**	
				A					**b**	
	Temperatura	1.016	0.317							
	Nitrógeno	**22.454**	**0.000**			$NaNO_3$		**a**		
						NH_4NO_3			**b**	
	Irradiancia	1.321	0.255							
	E*T	2.524	0.065							
	E*N	**3.383**	**0.023**	H		$NaNO_3$		**a**		
				H		NH_4NO_3			**b**	
				N		$NaNO_3$			**b**	**c**
				T		$NaNO_3$			**b**	**c**
				A		$NaNO_3$			**b**	**c**
				T		NH_4NO_3			**b**	**c**
				A		NH_4NO_3			**b**	**c**
				N		NH_4NO_3				**c**
	T*N	0.147	0.702							
	E*I	0.878	0.458							
	T*I	0.031	0.861							
	N*I	0.801	0.374							
	E*T*N	0.500	0.684							
	E*T*I	2.169	0.100							
	E*N*I	1.192	0.320							
	T*N*I	0.015	0.902							
	E*T*N*I	0.816	0.490							

Anexo 10. Continuación…

	ANOVA FACTORIAL			Prueba *a posteriori* de Tukey					
	Efecto	**F**	**p**	**Especie**	**Temperatura (°C)**	**Aporte de nitrógeno**	**Irradiancia (µE m^{-2}s^{-1})**		
	Especie	2.335	0.082						
	Temperatura	0.113	0.738						
	Nitrógeno	3.930	0.052						
	Irradiancia	2.859	0.096						
	E*T	0.901	0.446						
	E*N	2.305	0.085						
	T*N	0.997	0.322						
	E*I	2.121	0.106						
	T*I	0.002	0.961						
	N*I	1.102	0.298						
	E*T*N	0.717	0.545						
Lípidos	E*T*I	**3.819**	**0.014**	T	20		100	**a**	
				N	25		100	**a**	**b**
				A	20		200	**a**	**b**
				T	25		200	**a**	**b**
				N	20		100	**a**	**b**
				N	20		200	**a**	**b**
				T	25		100	**a**	**b**
				A	25		200	**a**	**b**
				A	25		100	**a**	**b**
				H	20		100	**a**	**b**
				H	20		200	**a**	**b**
				N	25		200	**a**	**b**
				A	20		100	**a**	**b**
				H	25		100	**a**	**b**
				H	25		200	**a**	**b**
				T	20		200		**b**
	E*N*I	2.351	0.081						
	T*N*I	0.811	0.371						
	E*T*N*I	0.499	0.684						