

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



**Programa de posgrado en Ciencias
en Acuicultura**

**Efecto de la absorción y de la composición espectral de
la luz sobre el crecimiento y la composición proximal de
Amphora sp. y su influencia en la preservación en frío y
en la criopreservación**

Tesis

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

Presenta:

Celia Carolina Romero Romero

Ensenada, Baja California, México.

2015

Resumen de la tesis de Celia Carolina Romero Romero presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro En Ciencias con especialidad en Acuicultura.

Efecto de la absorción y de la composición espectral de la luz sobre el crecimiento y la composición proximal de *Amphora* sp. y su influencia en la preservación en frío y en la criopreservación

Resumen aprobado por:

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Directora de Tesis

Las microalgas son utilizadas en la acuicultura como alimento vivo en diversas etapas o durante todo el ciclo de vida de moluscos, crustáceos y peces. Por lo anterior se requiere encontrar métodos para tener en disponibilidad altas densidades celulares con composición proximal acorde a los requerimientos del organismo en cultivo. Además, se requiere buscar alternativas para disminuir el continuo mantenimiento de cultivos de microalgas vivas y optimizar la producción de biomasa incrementando la cantidad y calidad de los cultivos por medio de modificación de variables ambientales. La diatomea bentónica *Amphora* sp. produce sustancias poliméricas extracelulares lo que incrementa su fuerza de adhesión. También se ha encontrado que es alimento común de postlarvas de abulón en el medio natural. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la absorción y la composición espectral de la luz sobre el crecimiento y la composición proximal de *Amphora* sp. Además, se evaluó la viabilidad para el crecimiento de los cultivos almacenados en frío a 4 °C (por refrigeración, sin crioprotectantes) y a -196 °C (criopreservación) durante 8 y 16 semanas con adición de glicerol y DMSO durante 8 y 16 semanas. Las propiedades bio-ópticas de *Amphora* sp. fueron evaluadas para conocer el PUR (energía fotosintéticamente utilizable). El crecimiento, la composición proximal y el contenido de pigmentos de *Amphora* sp. son modificados por el efecto de la composición espectral de la luz y la fase de crecimiento. El contenido de proteínas fue mayor con luz blanca en fase exponencial; mientras que el mayor contenido de carbohidratos se encontró con GroLux en fase estacionaria. El mayor contenido de lípidos se encontró en la fase exponencial. El contenido de clorofila *a*, carotenoides, peso seco orgánico y cenizas fueron mayores en la fase exponencial al utilizar luz amarilla. La PUR calculada se encontró entre los 21.1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y los 27.5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz blanca. La fotosíntesis máxima (P_{max}) y la mayor eficiencia fotosintética (α) se presentaron al utilizar la luz azul. La mayor intensidad de luz de saturación (E_K) fue con la luz amarilla. Los cultivos de *Amphora* sp. preservados a 4 °C mantuvieron su viabilidad después de 8 y 16 semanas de almacenamiento. No se encontraron bacterias tipo *Vibrio* en los cultivos preservados ni en los criopreservados. El glicerol mostró ser el mejor crioprotectante para la criopreservación de *Amphora* sp. en los cultivos provenientes de luz blanca ya que tuvieron mayor crecimiento. La composición proximal de las células criopreservadas fue influenciada por la composición espectral de la luz y por el tipo de crioprotectante, obteniendo mayor contenido de proteínas y lípidos con el uso de glicerol y luz blanca. El mayor contenido de pigmentos se presentó con el DMSO con luz verde.

Palabras clave: ***Amphora* sp., calidad de luz, energía fotosintéticamente utilizable (PUR), preservación en frío y criopreservación, composición proximal y pigmentos, crecimiento, viabilidad celular.**

Abstract of the thesis presented **Celia Carolina Romero Romero** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree with orientation in Aquaculture.

“Effect of absorption and the spectral composition of light on growth and proximate composition of *Amphora* sp. and their influence on the preservation at cold and criopreservation”

Abstract approved by:

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Director Thesis

Microalgae are used in aquaculture as live food in several stages or throughout the life cycle of mollusks, crustaceans and fish. Therefore, it is necessary to find methods to obtain high cell densities with proximal composition according to the requirements of cultured organism. In addition, it is necessary to seek alternatives to reduce ongoing maintenance of live microalgae cultures and optimize biomass production to increase the quantity and quality of cultures through modification of environmental variables. The benthic diatom *Amphora* sp. produces extracellular polymeric substances that enhance and strong surface adhesion. Also, *Amphora* sp. is a common abalone post larvae food in the natural habitat. The aim of this study was to evaluate the effect of absorption and the spectral composition of light on cultures of *Amphora* sp. and the proximal composition. Furthermore, the viability *Amphora* sp. stored at 4 °C (refrigeration, without cryoprotectant) and at -196 °C (cryopreservation) with DMSO or glycerol was evaluated for 8 to 16 weeks. The bio-optics properties of de *Amphora* sp. were evaluated to determine the Photosynthetically Usable Radiation (PUR). Growth, proximate composition and content of pigments of *Amphora* sp. were modified due to the effect of the spectral composition of light and growth phase. The protein content was higher in exponential phase when white light was used; while carbohydrate content increased in stationary phase with GroLux. The lipid content increased in the exponential phase. Chlorophyll *a*, carotenoids, organic dry weight and ash content were higher in the exponential phase using yellow light. The calculated PUR was found between 21.1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 27.5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of white light. The maximum photosynthesis (P_{max}) and higher photosynthetic efficiency (α) were found when blue light was used. The higher light saturation (E_k) was with the yellow light. The cultures of *Amphora* sp. maintain their viability after 8 to 16 weeks of storage at 4 °C. No vibrio bacteria were found in the cultures preserved (4 °C) or cryopreserved (-196 °C). Glycerol was the best cryoprotectant for cryopreservation of *Amphora* sp. cultured with white light as they had higher growth. The proximate composition of the cryopreserved cells was influenced by the spectral composition of light and type of cryoprotectant. Higher content of proteins and lipids were found in samples containing glycerol and growth with white light. The highest content of pigments was found in samples containing DMSO and grown with green light.

Keywords: *Amphora* sp., light quality, PUR (Photosynthetically Usable Radiation), cold preservation y cryopreservation, proximal composition y pigments, growth, cellular viability.

Dedicatoria

¶ Dios y a los Santos

*Por Darme la fortaleza en los momentos más difíciles, por guiarme por un buen camino y por darme pruebas que han hecho valorar cada día de mi vida. **MAFEREFUN OLODUMARE!!!!***

¶ mi madre

Carolina.** Por darme amor incondicional, su apoyo en todo momento vida y por enseñarme a ser quien soy hoy en día. **TE QUIERO MUCHO!!!

¶ mi esposo

Eduardo.** Quien cree en mí y me permitió compartir la vida con él. Por ponerle sabor y sabiduría a mi vida. **TE AMO LOCAMENTE!!!

¶ mis perros, gallos y caballos

Blueberry, Nugget, Hashbrick Joint.** Por ser mis almas gemelas y darme momentos y recuerdos únicos e invaluables. **LOS AMO MIS PRECIOSOS!!!!

¶ mis costeros

Constantino, Kenia y los ahijados (Regina y Costin)** por ser mis amigos, cómplices y apoyo en momentos de suma dificultad. **LOS QUIERO MUCHÍSIMO!!!

**No vivas para que tu presencia se note,
sino para que tu ausencia se sienta.**

Bob Marley

Agradecimientos

A la **Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra** (mi Mamá académica) por darme la oportunidad de aprender a su lado, creer en mí, alentarme y brindarme todo su conocimiento y apoyo a lo largo de la realización de este trabajo. Gracias por su amistad!

A la **Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez** por su amistad y grandes ideas, correcciones, consejos y apoyo en la realización de este trabajo y en la vida, por proporcionar el equipo y material para la criopreservación del organismo de estudio.

Al **Dr. Eduardo Millán Núñez** por ayudarme en un paso crucial de este trabajo, por todo el tiempo y conocimiento dedicado en la tesis, por su ayuda en la obtención de los coeficientes de absorción y sobre todo gracias por su paciencia y amistad.

Al **Dr. Ernesto García Mendoza** por todas las sugerencias aportadas a la tesis con el fin de realizar un trabajo más completo y por permitirme utilizar su espectroradiómetro para la obtención de los espectros de las fuentes de luz.

A **mis catedráticos** por compartir sus conocimientos tanto académicos como personales, Gracias por ayudarme a lograr mis metas!!

A **mi familia** por su amor, apoyo y consejos a lo largo de mi vida.

A la **M. en C. Socorro Jiménez Valera**, por su amistad y ayuda al proporcionar la cepa para la realización de esta tesis, por toda la colaboración que brindó en el laboratorio y sus consejos tanto de trabajo como personales. Además, por facilitarme la cepa de *Amphora* sp. que ella aisló y que fue utilizada en este estudio.

A la **M. en C. Ceres Anabel Molina Cárdenas** por su amistad, por explicarme y ayudarme en el procedimiento de detección de bacterias tipo *Vibrio* en los cultivos preservados.

A la **M. en C. Diana María Cuesta Gómez** por su amistad, ayuda y explicación de procedimientos de laboratorio.

A la **Dra. Ana Bertha Castro Ceseña** por su amistad, y ayuda en todo momento en la realización de este trabajo.

Al **M. en C. Ruperto Francisco Barón Monterrubio**, amigo y compañero, por toda su ayuda brindada en los experimentos de esta tesis.

A mis amigüis, **Ingrid Bautista, Romy Peña, Sara Enciso, Denise Chávez, Lucía Suárez, Candy Armuelles, Connie, Steffany Córdova y Fernando Meza**, por ser unos loquillos y hacer la maestría más amena. Nunca cambien!!

Al microalgae team (**Ceres Molina, Socorro Jiménez, Diana Cuesta, Duahmed Ruíz, Karina Lugo, Ruperto Barón, Ana Castro y Laura Rangel**) por brindarme su amistad, conocimiento y tips en el uso del laboratorio, por hacer esas horas de laboratorio más divertidas. Muchas gracias!!!

A **mi generación** por ser compañeros y amigos en el transcurso de este capítulo de nuestras vidas. Éxito!!!

Al **Dr. Conal David True** por su amistad y proporcionar el agua de mar necesaria para llevar a cabo los experimentos de la tesis.

Al **Dr. Helmut Maske Rubach** y su grupo de trabajo, por la ayuda brindada en la obtención de los coeficientes de absorción del organismo de estudio.

A **Jenny de la Cerda Rivera Nuño**, por la toma de fotografías de los cultivos y los procedimientos llevados a cabo en esta tesis

Al técnico **Guillermo González** del Departamento de Microbiología por su ayuda en la liofilización de células.

A la **M. en C. Gissel Tinoco** por su ayuda en la realización de la criopreservación de las células de la especie de estudio.

Al **M. en C. Martín de la Cruz Orozco** por su ayuda en la utilización del fluorímetro para la obtención del contenido de Clorofila a, para el posterior cálculo del a^* .

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (**CICESE**) por el apoyo recibido durante este trabajo y por la oportunidad de realizar mi maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) por haberme brindado el apoyo económico por medio de una beca para continuar con mis estudios de maestría.

Al apoyo económico para la adquisición de materiales para la tesis recibido por el **proyecto de CICESE 623108** y por el **proyecto** de investigación financiado por **SEP-CONACyT** con clave de referencia 130074.

Al **personal administrativo del Departamento de Acuicultura** (Amparo, Bibi, Cecy y Dalila) por toda su ayuda en los trámites administrativos.

Al **personal de la Dirección de Estudios de Posgrado** (Ivonne, Citlali, Dolores y Norma) por su ayuda en los trámites de la beca y de las inscripciones.

Y a todos aquellos que contribuyeron en la realización de esta tesis, que en este momento no recuerdo pero que fueron y son importantes para mí.

Gracias a todos, besos bye!!!

Tabla de contenido

	Página
Resumen español.....	ii
Resumen inglés	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	x
Lista de tablas	xv
 Capítulo 1. Introducción	 1
Antecedentes	3
Características de las diatomeas	3
Efecto de la composición espectral de la luz	5
Absorción de la luz y fotosíntesis	10
Preservación de microalgas.....	13
Justificación	17
1.1 Hipótesis	19
1.2 Objetivos	19
1.2.1 Objetivo General	19
1.2.2 Objetivos Particulares	19
 Capítulo 2. Materiales y Método	 20
2.1 Origen de la cepa.....	20
2.2 Mantenimiento de los cultivos	20
2.3 Efecto de la composición espectral de la luz y de la irradiancia sobre el crecimiento y composición proximal	21
2.4 Crecimiento y parámetros poblacionales.....	22
2.4.1 Tasa de crecimiento específica	22
2.4.2 Tiempo de generación	23
2.4.3 Tamaño celular	23

2.5 Composición proximal	23
2.5.1 Proteínas	24
2.5.2 Carbohidratos	24
2.5.3 Lípidos	25
2.5.4 Pigmentos	25
2.5.5 Cuantificación de peso seco y contenido de cenizas.....	25
2.6 Utilización de la luz y propiedades ópticas de <i>Amphora</i> sp.....	26
2.7 Tasa fotosintética	29
2.8 Preservación en frío	30
2.8.1 Ensayos de viabilidad	30
2.8.2 Prueba para la presencia de <i>Vibrio</i> sp.	31
2.9 Criopreservación de <i>Amphora</i> sp.	31
2.10 Análisis estadístico	33
Capítulo 3. Resultados	35
3.1 Características espectrales de emisión las fuentes de luz	35
3.2 Crecimiento, tamaño celular y parámetros poblacionales	38
3.3 Composición proximal	43
3.3.1 Optimización en la extracción de proteínas	43
3.3.2 Contenido de proteínas.....	45
3.3.3 Contenido de carbohidratos.....	46
3.3.4 Contenido de lípidos	47
3.3.5 Contenido de pigmentos	48
3.3.6 Peso seco orgánico y cenizas	50
3.4 Propiedades de absorción de <i>Amphora</i> sp.	52
3.4.1 Coeficientes de absorción.....	52
3.4.3 Coeficiente específico de absorción	52
3.4.4 Energía fotosintéticamente utilizable (PUR)	55
3.5 Tasa fotosintética	56

3.6 Preservación en frío y viabilidad	58
3.6.1 Viabilidad semana 8.....	58
3.6.2 Viabilidad semana 16.....	62
3.7 Criopreservación	66
3.7.1 Viabilidad, tamaño celular y parámetros poblacionales	66
3.7.2 Composición proximal.....	71
Capítulo 4. Discusión	78
Capítulo 5. Conclusión.....	110
Capítulo 6. Recomendaciones	112
Lista de referencias bibliográficas	113

Lista de figuras

Figura		Página
1	Espectro de emisión de las lámparas fluorescentes de luz blanca (LB, marca Philips catálogo F40T12/DX), luz azul (LA, marca General Electric catálogo F40B), luz verde (LV, marca General Electric catálogo F40G), luz amarilla (LM, marca Sylvania Gold catálogo F40/GO) y luz GroLux (GL, marca Sylvania catálogo F40/GRO/WS).....	36
2	Distribución espectral de la densidad del flujo fotónico y PAR (radiación fotosintéticamente activa: $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de las lámparas fluorescentes de luz blanca (LB, marca Philips catálogo F40T12/DX), luz azul (LA, marca General Electric catálogo F40B), luz verde (LV, marca General Electric catálogo F40G), luz amarilla (LM, marca Sylvania Gold catálogo F40/GO) y luz GroLux (GL, marca Sylvania catálogo F40/GRO/WS).....	37
3	Valores promedio y desviación estándar de la densidad celular ($\text{Log}_2 \text{cél ml}^{-1}$) de <i>Amphora</i> sp. cultivada bajo distinta composición espectral de luz blanca (LB), luz azul (LA), luz verde (LV), luz amarilla (LM) y GroLux (GL), a una irradiancia de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y un periodo de ocho días. ANCOVA y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b$	38
4	Evolución del pH durante el crecimiento poblacional de <i>Amphora</i> sp. cultivada con luz blanca (LB), luz azul (LA), luz verde (LV), luz amarilla (LM) y GroLux (GL), a una irradiancia de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y durante un periodo de 8 días. ANCOVA y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b$	41
5	Valores promedio y desviación estándar del contenido de proteína (pg cél^{-1}) de <i>Amphora</i> sp., durante el ensayo de optimización de extracción de proteína utilizando una (■) o dos extracciones (■), dos tiempos de extracción (15 y 30 minutos) y tres distintas concentraciones de NaOH (0.1, 0.2 y 0.3 N). ANOVA de dos vías (concentración de NaOH y tiempo) y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey $\alpha=0.005$; $A>B$. ANOVA de tres vías (NaOH, tiempo y extracción) y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b>c>d$	44

6	Valores promedio y desviación estándar del contenido de proteínas (pg cél ⁻¹) de <i>Amphora</i> sp., cultivada con distinta composición espectral de luz blanca (LB), luz azul (LA), luz verde (LV), luz amarilla (LM) y GroLux (GL), a una irradiancia de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y dos fases de crecimiento: exponencial y estacionaria. Contenido de proteína obtenido con una concentración de NaOH 0.1N, con dos extracciones y con un tiempo de extracción de 15 minutos. ANOVA de dos vías y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b>c>d$	45
7	Valores promedio y desviación estándar del contenido de carbohidratos (pg cél ⁻¹) de <i>Amphora</i> sp., cultivada con distinta composición espectral de luz blanca (LB), luz azul (LA), luz verde (LV), luz amarilla (LM) y GroLux (GL), a una irradiancia de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y dos fases de crecimiento: exponencial y estacionaria. ANOVA de dos vías y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b>c>d$	46
8	Valores promedio y desviación estándar del contenido de lípidos (pg cél ⁻¹) de <i>Amphora</i> sp., cultivada con distinta composición espectral de luz blanca (LB), luz azul (LA), luz verde (LV), luz amarilla (LM) y GroLux (GL), a una irradiancia de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y dos fases de crecimiento: exponencial y estacionaria. ANOVA de dos vías y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b>c>d$	47
9	Valores promedio y desviación estándar del contenido de clorofila <i>a</i> (pg cél ⁻¹) de <i>Amphora</i> sp., cultivada con distinta composición espectral de luz blanca (LB), luz azul (LA), luz verde (LV), luz amarilla (LM) y GroLux (GL), a una irradiancia de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y dos fases de crecimiento: exponencial (día 3) y estacionaria (día 8). ANOVA de dos vías y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b>c>d$	48
10	Valores promedio y desviación estándar del contenido de carotenoides (pg cél ⁻¹) de <i>Amphora</i> sp., cultivada con distinta composición espectral de luz blanca (LB), luz azul (LA), luz verde (LV), luz amarilla (LM) y GroLux (GL), a una irradiancia de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y dos fases de crecimiento: exponencial y estacionaria. ANOVA de dos vías y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b>c$	49

11	Valores promedio y desviación estándar del peso orgánico (pg cél ⁻¹) de <i>Amphora</i> sp., cultivada con distinta composición espectral de luz blanca (LB), luz azul (LA), luz verde (LV), luz amarilla (LM) y GroLux (GL), a una irradiancia de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y dos fases de crecimiento: exponencial y estacionaria. ANOVA de dos vías y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b>c>d$	50
12	Valores promedio y desviación estándar del contenido del peso de cenizas (pg cél ⁻¹) de <i>Amphora</i> sp., cultivada con distinta composición espectral de luz blanca (LB), luz azul (LA), luz verde (LV), luz amarilla (LM) y GroLux (GL), a una irradiancia de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y dos fases de crecimiento: exponencial y estacionaria. ANOVA de dos vías y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b>c>d$	51
13	Coeficientes de absorción de luz por <i>Amphora</i> sp., cultivada con luz blanca (LB, marca Philips catálogo F40T12/DX) a una irradiancia de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Coeficiente de absorción de luz por material particulado (a_p), coeficiente de absorción de luz por detritus (a_d) y coeficiente de absorción de luz por fitoplancton (a_{ph}).....	53
14	A: Coeficientes de absorción (a_{ph}) y B: coeficientes específicos de absorción ($a *_{ph}$) de <i>Amphora</i> sp., cultivada con luz blanca (LB, marca Philips catálogo F40T12/DX) a una irradiancia de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y por un periodo de 10 días. En donde día 0 de cultivo (—) y día 10 de cultivo (- - -).....	54
15	Curvas P-E (fotosíntesis-irradiancia) de <i>Amphora</i> sp. cultivada con distinta composición espectral de la luz y a una irradiancia de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Fotosíntesis neta (Pn: 1×10^{-10}) como respuesta de la irradiancia incidente sobre los cultivos mantenidos con luz blanca (LB), luz azul (LA), luz verde (LV), luz amarilla (LM) y GroLux (GL)....	57
16	Valores promedio y desviación estándar del Log ₂ de la densidad celular (cél ml ⁻¹) de <i>Amphora</i> sp., cultivada previamente a la preservación con distinta composición espectral de luz blanca (LB), luz azul (LA), luz verde (LV), luz amarilla (LM) y GroLux (GL), a una irradiancia de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y preservada en frío (4 °C) por un periodo de 8 semanas. ANCOVA y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b$	59

17	Valores promedio y desviación estándar del Log ₂ de la densidad celular (cél ml ⁻¹) de <i>Amphora</i> sp. cultivada previamente a la preservación bajo distinta composición espectral de luz blanca (LB), luz azul (LA), luz verde (LV), luz amarilla (LM) y GroLux (GL), a una irradiancia de 50 µmol m ⁻² s ⁻¹ y preservada en frío (4 °C) por un periodo de 16 semanas. ANCOVA y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey α=0.05.....	63
18	Valores promedio y desviación estándar del Log ₂ de la densidad celular (cél ml ⁻¹) de <i>Amphora</i> sp. cultivada previamente a la criopreservación con distinta composición espectral de luz blanca (LB), luz azul (LA), luz verde (LV), luz amarilla (LM) y GroLux (GL), a una irradiancia de 50 µmol m ⁻² s ⁻¹ y criopreservada con: A) Glicerol 10% y B) DMSO a -196°C por un periodo de 24 horas. ANCOVA y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey α=0.05; a>b.....	67
19	Valores promedio y desviación estándar del contenido de proteínas (pg cél ⁻¹) de <i>Amphora</i> sp., cultivada con distinta composición espectral de luz blanca (LB), luz azul (LA), luz verde (LV), luz amarilla (LM) y GroLux (GL) y criopreservados con: glicerol y dimetilsulfóxido (DMSO). ANOVA de dos vías y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey α=0.05; a>b>c>d.....	72
20	Figura 20. Valores promedio y desviación estándar del contenido de lípidos (pg cél ⁻¹) de <i>Amphora</i> sp., cultivada con distinta composición espectral de luz blanca (LB), luz azul (LA), luz verde (LV), luz amarilla (LM) y GroLux (GL) y criopreservados con: glicerol y dimetilsulfóxido (DMSO). ANOVA de dos vías y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey α=0.05; a>b>c.....	73
21	Valores promedio y desviación estándar del contenido de Clorofila a (pg cél ⁻¹) de <i>Amphora</i> sp., cultivada con distinta composición espectral de luz blanca (LB), luz azul (LA), luz verde (LV), luz amarilla (LM) y GroLux (GL) y criopreservados con: glicerol y dimetilsulfóxido (DMSO). ANOVA de dos vías y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey α=0.05; a>b>c>d>e>f.....	74
22	Valores promedio y desviación estándar del contenido de carotenoides (pg cél ⁻¹) de <i>Amphora</i> sp., cultivada con distinta composición espectral de luz blanca (LB), luz azul (LA), luz verde (LV), luz amarilla (LM) y GroLux (GL) y criopreservados con: glicerol y dimetilsulfóxido (DMSO). ANOVA de dos vías y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey α=0.05; a>b>c>d>e.....	75

23	Valores promedio y desviación estándar del peso orgánico (pg cél ⁻¹) de <i>Amphora</i> sp., cultivada con distinta composición espectral de luz blanca (LB), luz azul (LA), luz verde (LV), luz amarilla (LM) y GroLux (GL) y criopreservados con: glicerol y dimetilsulfóxido (DMSO). ANOVA de dos vías y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey $\alpha=0.05$; a>b>c>d>e>f.....	76
24	Valores promedio y desviación estándar del contenido del peso de cenizas (pg cél ⁻¹) de <i>Amphora</i> sp., cultivada con distinta composición espectral de luz blanca (LB), luz azul (LA), luz verde (LV), luz amarilla (LM) y GroLux (GL) y criopreservados con: glicerol y dimetilsulfóxido (DMSO). ANOVA de dos vías y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey $\alpha=0.05$; a>b>c>d.....	77

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Valores promedios y desviación estándar del Log_2 de la densidad celular (cél ml^{-1}) de <i>Amphora</i> sp. cultivada con distinta composición espectral durante un periodo de ocho días.....	40
2	Valores promedio y desviación estándar de la tasa de crecimiento (μ : divisiones día^{-1}), el tiempo de generación (T_g : días) y la densidad celular máxima (DCM: $\text{cél ml}^{-1} \times 10^6$) de los cultivos de <i>Amphora</i> sp., mantenidos con distinta composición espectral de la luz.....	42
3	Valores promedio y desviación estándar del tamaño celular de <i>Amphora</i> sp., cultivada con distinta composición espectral.....	43
4	Valores de la radiación fotosintéticamente utilizable (PUR en $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), obtenidos con los valores de los coeficientes específicos de absorción de <i>Amphora</i> sp., cultivada bajo una irradiancia de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En donde: a_{ph} es el coeficiente de absorción espectral del fitoplancton, a_{ph}^* es la media del coeficiente específico de absorción y a_{phm}^* es el coeficiente de absorción específica máxima (440 nm) y $\text{Clo } a$ (mg m^{-3}) es el contenido de clorofila <i>a</i>	55
5	Parámetros fotosintéticos de <i>Amphora</i> sp. cultivada con distinta composición espectral durante un periodo de 8 días. Valores promedios y desviación estándar de la tasa fotosintética (P_{max} : moles de O_2 $\text{mg clorofila } a \text{ min}^{-1}$; 1×10^{-10}), la pendiente inicial de la fotosíntesis o eficiencia fotosintética [α : moles de O_2 $\text{mg clorofila } a \text{ min}^{-1}(\mu\text{mol}^{-1} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1})^{-1}$; 1×10^{-13}] y la intensidad de luz de saturación (E_K : $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).....	56
6	Valores promedio y desviación estándar de la tasa de crecimiento (μ : divisiones día^{-1}), el tiempo de generación (T_g : días) y densidad celular máxima (DCM: cél ml^{-1} ; 1×10^5) de <i>Amphora</i> sp., cultivada previamente a la preservación con distinta composición espectral de la luz, a una irradiancia de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y preservada en frío (4°C) por un periodo de 8 semanas.....	60

7	Valores promedios y desviación estándar de los valores de pH de los cultivos de <i>Amphora</i> sp. expuestos a distinta composición espectral de la luz y después de 8 semanas de preservación en frío (4 °C: inicial) y al finalizar la curva de crecimiento de evaluación de la viabilidad para el crecimiento después del proceso de preservación (final).....	60
8	Valores promedios y desviación estándar del tamaño celular de los cultivos de <i>Amphora</i> sp., expuestos a distinta composición espectral de la luz (sin preservar) y después de 8 semanas de preservación en frío (4 °C: preservación).....	61
9	Valores promedio y desviación estándar de la tasa de crecimiento (μ : divisiones día ⁻¹), el tiempo de generación (T_g : días) y densidad celular máxima (DCM: cél ml ⁻¹ ; 1×10^5) de <i>Amphora</i> sp., cultivada previamente a la preservación con distinta composición espectral de la luz, a una irradiancia de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y preservada en frío (4 °C) por un periodo de 16 semanas.	64
10	Valores promedios y desviación estándar de los valores de pH de los cultivos de <i>Amphora</i> sp. expuestos a distinta composición espectral de la luz y después de 16 semanas de preservación en frío (4 °C: inicial) y al finalizar la curva de crecimiento de evaluación de la viabilidad para el crecimiento después del proceso de preservación (final).....	64
11	Valores promedios y desviación estándar del tamaño celular de los cultivos de <i>Amphora</i> sp., expuestos a distinta composición espectral de la luz (sin preservar) y después de 16 semanas de preservación en frío (4°C: preservación).....	65
12	Valores promedio y desviación estándar del Log ₂ de la densidad celular (cél ml ⁻¹) de <i>Amphora</i> sp. criopreservadas con dimetilsulfóxido 10% (DMSO) y previamente cultivada bajo distinta composición espectral de la luz.....	69
13	Valores promedio y desviación estándar de la tasa de crecimiento (μ : divisiones día ⁻¹) y el tiempo de generación (T_g : días) de <i>Amphora</i> sp., cultivada previamente a la criopreservación con distinta composición espectral de la luz, a una irradiancia de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y criopreservada a - 196 °C por un periodo de 24 horas.....	70

14	Valores promedio y desviación estándar del tamaño celular (μm) de <i>Amphora</i> sp., cultivada con distinta composición espectral previo a su criopreservación (CP) y posterior al uso de crioprotector y $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. En donde: LB (luz blanca), LA (luz azul), LV (luz verde), LM (luz amarilla), GL (GroLux); NP (no preservado).....	71
----	--	----

Capítulo 1. Introducción

Las microalgas son un grupo de organismos con una alta diversidad ya que habitan en diversos tipos de ambientes acuáticos. Su importancia radica en que son los productores primarios de los ambientes acuáticos, con una capacidad particular de transformación de la energía lumínica en energía química, la que almacenan en forma de aceites, carbohidratos y proteínas, principalmente. Son organismos fotoautótrofos con presencia de pigmentos captadores de luz y fotoprotectores (Margalef, 1993; Johnsen y Sakshaug, 1996; Stevenson *et al.*, 1996; Siqueiros-Beltrones, 2002; Del Pozo-Pérez, 2010; Demirbas y Demirbas, 2010; Kim, 2015).

Además de su importancia como productores primarios, los cultivos de microalgas son relevantes en la obtención de su biomasa y como fuente de polisacáridos, lípidos, proteínas, pigmentos, esteroides, enzimas, antibióticos y diversos tipos de compuestos farmacéuticos y muchos otros productos químicos (o sus precursores), como son el biohidrógeno, biometano y bioetanol que son producidos para su posterior uso en diversas industrias, que van desde el cuidado de la salud hasta la producción de energía y la alimentación animal y humana (Becker, 1994; Spolaore *et al.*, 2006; Marchetti *et al.*, 2012).

Una de las mayores aplicaciones de los cultivos de microalgas es en la industria acuícola, la cual se encuentra en rápida expansión. Las microalgas son utilizadas como alimento para todos los estadios de vida de los moluscos bivalvos, en los primeros estadios larvales de crustáceos y de peces, así como en el cultivo de zooplancton (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2006; Yoshioka *et al.*, 2012; Welladsen *et al.*, 2014). Un caso relevante del uso de las microalgas en la industria acuícola es la alimentación de las postlarvas y los juveniles de abulón, con diversas especies de diatomeas bentónicas (Correa-Reyes, 2001; Simental-Trinidad *et al.*, 2001; Mercado *et al.*, 2004; Sánchez-Saavedra, 2007; Correa-Reyes *et al.*, 2009; Sánchez-Saavedra, 2013). El cultivo de abulón es una actividad de con un valor comercial importante a nivel mundial y regional.

Debido al crecimiento mundial de la acuicultura, la demanda de microalgas va en aumento y su cultivo es considerado un punto clave en las instalaciones comerciales de criaderos acuícolas (Heasman *et al.*, 2000). Así mismo, el cultivo de microalgas representa un costo económico alto alcanzando entre aproximadamente el 30 a 40% de los costos de operación de las empresas (Heasman *et al.*, 2000).

En el desarrollo de las actividades acuiculturales es necesaria la optimización de los recursos, por lo que se requiere el uso de la tecnología para encontrar posibles soluciones al mantenimiento continuo de los cultivos de microalgas vivas (Coutteau y Sorgeloos, 1992). La preservación de la biomasa microalgal como dieta alternativa en pastas es un método eficiente para reducir los altos costos económicos que implica el mantenimiento continuo de los cultivos (Becker, 1994; Tzovenis *et al.*, 2004). Sin embargo, también es necesario buscar formas de preservación de la biomasa microalgal sin el uso de compuestos químicos y/o crioprotectores, ya que la biomasa microalgal no puede ser utilizada directamente como alimento para otros organismos después del proceso de preservación ya sea en frío (4 °C) o bien criopreservadas (-196 °C) (Cañavate y Lubian, 1995,1997; Sánchez-Saavedra y Núñez-Zarco, 2015).

Otro aspecto para optimizar la producción de biomasa microalgal es la modificación de las variables ambientales para variar el metabolismo celular y producir cambios en el crecimiento y en la composición proximal (Muller-Feuga *et al.*, 2007). Una de las variables ambientales para el crecimiento microalgal es la luz. Las características espectrales, así como la cantidad de la luz influyen en el crecimiento poblacional al afectar la fotosíntesis, modifican la cantidad y composición de los componentes celulares, por lo que se ve afectada su calidad nutricional para la aplicación en la acuicultura (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 1996; Mercado *et al.*, 2004; Muller-Feuga *et al.*, 2007; Dubinsky y Stambler, 2009).

Antecedentes

Características de las diatomeas

Las diatomeas son organismos unicelulares o coloniales (~1 a 500 μm de longitud), algunas son planctónicas y otras bentónicas, y constituyen uno de los grupos más comunes del fitoplancton, poseen una pared celular rígida de sílice denominada frústula, la cual consta de dos valvas, la epiteca (valva superior) y la hipoteca (valva inferior). La frústula se encuentra fuera del plasmalema y consta de una forma hidratada de dióxido de silicio (tipo hidratado u opalina) y de material orgánico (ácido péctico); su formación es el resultado del inicio de la valva dentro de una vesícula de deposición de sílice durante la división celular. La frústula puede estar bastante perforada (punteada, aureolada) u ornamentada (costillas nódulos, rafe, espinas), lo que sirve para la identificación de especies (Parkinson y Gordon, 1999; Siqueiros-Beltrones, 2002). Además, las diatomeas poseen adaptaciones morfológicas únicas y pueden ser céntricas (simetría radial) o pennadas (forma elongada y estrías), éstas últimas presentan una mayor diversidad morfológica y en consecuencia mayores adaptaciones al bentos (Parkinson y Gordon, 1999; Siqueiros-Beltrones, 2002).

Las diatomeas son componentes abundantes y comunes del plancton y son responsables del 25% al 40% de la productividad primaria neta mundial de carbono orgánico (Werner, 1977). Las diatomeas se clasifican dentro de la división Bacillariophyta. Los pigmentos que contienen las diatomeas son principalmente la clorofila *a*, *c* y *c*₂, además de fucoxantina, diatoxantina, diadinoxantina, β - β caroteno, dichos pigmentos están contenidos en numerosos cloroplastos (Siqueiros-Beltrones, 2002; Jeffrey *et al.*, 2011). La mayor absorción de los carotenoides contenidos por las diatomeas se da en la región verde-amarilla del espectro de luz visible (Arbones *et al.*, 1996). Los productos de reserva de este grupo de microalgas son el crosilaminarén y la glucosa, así como gotas de aceite conocidas como plastoglóbulos (Siqueiros-Beltrones, 2002; Larkum *et al.*, 2003).

Las diatomeas son ampliamente utilizadas como alimento para el cultivo de moluscos bivalvos, camarones, copépodos y rotíferos (Siqueiros-Beltrones, 2002; Welladsen *et al.*, 2014). Las diatomeas que habitan el bentos son organismos capaces

de formar biopelículas sobre el sustrato en el que viven, lo cual es una fuente importante de alimento para ciertos invertebrados marinos (Silva-Aciares y Riquelme, 2008).

En el medio natural las diatomeas bentónicas son consumidas directamente del bentos mediante el pastoreo, por una gran variedad de organismos acuáticos, entre los que destacan los moluscos con rádula (postlarvas de abulón), peces y crustáceos (Siqueiros-Beltrones, 2002; Kawamura *et al.*, 1995). Sin embargo, a pesar de que diversos organismos se alimentan de forma directa o indirecta de las diatomeas bentónicas es poco lo que se ha documentado sobre este tema (Siqueiros-Beltrones, 2002). Las diatomeas bentónicas son la fuente principal de alimento de postlarvas y juveniles de abulón (Correa-Reyes, 2001; Correa-Reyes *et al.*, 2009) y dentro de las especies reportadas para dicho fin se encuentra *Amphora* sp. (Siqueiros-Beltrones, 2002; Siqueiros-Beltrones y Argumedo-Hernández, 2015) que, pertenece al grupo de diatomeas bentónicas que se encuentran en modo solitario (Roberts *et al.*, 2000) y secreta sustancias poliméricas extracelulares o EPS (por sus siglas en inglés) y están compuestas por dos polisacáridos neutros como son la fucosa y la galactosa (Zhang *et al.*, 2008).

Todas las diatomeas bentónicas pertenecientes al género *Amphora* presentan una movilidad baja debido principalmente a su gran fuerza de adhesión al sustrato en que habitan (Hudon y Bourgetm, 1983). Se ha reportado que los juveniles de *Haliotis asinina* se alimentan principalmente de diatomeas bentónicas, tales como: *Nitzschia*, *Amphora*, *Cocconeis*, *Navicula* y *Diploneis* (Upatham *et al.*, 1998).

De acuerdo con Flores-Vergara (1998) la diatomea bentónica *Amphora catenula* forma tapetes en el sustrato, los que se adhieren con gran fuerza y se distribuyen homogéneamente. En comparación con los géneros *Navicula* y *Nitzschia*, la especie de *A. catenula* requiere un menor tiempo para realizar la fijación al sustrato. Se reporta que *Amphora catenula* es de tamaño celular pequeño (8.1 – 16.2 μm) y que posee altos porcentajes del ácido grasos 20:4 n-6 (ácido araquidónico), 20:4 n-3 (ácido eicosatetraenoico) y 22:6 n-3 (ácido docohexaenoico).

En la última década se ha desarrollado el interés de producir antioxidantes naturales, provenientes de organismos fotoautótrofos, por lo que se han desarrollado

investigaciones en las que se reportan a las diatomeas bentónicas como buenos candidatos para la obtención de dichos productos, entre las que destaca *Amphora coffeaeformis*, dado que contiene un efecto notable sobre los radicales libres en la fracción *n*-hexano, lo que sugiere que los compuestos bioactivos son liposolubles y que pueden ser obtenidos a partir de pigmentos y de esteroides de este grupo de organismos (Lee *et al.*, 2009).

En estudios realizados por de la Peña (2007) se concluyó que la intensidad de la luz y el medio de cultivo, no tienen efectos significativos sobre el crecimiento celular de *Amphora* sp. Sin embargo, la composición bioquímica varió con los niveles de enriquecimiento nutricional del medio de cultivo y puede tener un alto contenido de lípidos con el medio “f/2”. Los resultados obtenidos en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados de las series n-3 y n-6 de *Amphora* sp. indicaron que son niveles aceptados para la alimentación de larvas de abulón. Los contenidos de proteínas, carbohidratos y clorofila *a* de esta especie se ven afectados por el enriquecimiento de la concentración del medio de cultivo pero no por el nivel de la irradiancia.

En la fase de crecimiento exponencial *Amphora* sp. tienen altos contenidos de proteínas, lípidos y carbohidratos, que son necesarios para la alimentación adecuada de juveniles de abulón. El tamaño celular de *Amphora* sp. y sus parámetros biométricos cumplen con el criterio de Hahn (1989) respecto al tamaño adecuado de las células de diatomeas para ser suministradas como alimento, y se considera que esta especie es un buen candidato para la producción de abulón en cultivo (Courtois *et al.*, 2012).

Efecto de la composición espectral de la luz

El espectro de la luz visible corresponde a las longitudes de onda de 400 a 700 nm cuya función es esencial, ya que es el espectro utilizado para la reacción de la fotosíntesis (asimilación de carbono); esta porción del espectro de luz es conocido como radiación fotosintéticamente activa (PAR) (Geider y Osborne, 1992; Rodríguez-García y Virgós-Rovira, 1998; López-Figueroa y Viñegla, 2009; Beer *et al.*, 2014; Kula *et al.*, 2014 a). Sin embargo, para que la PAR se utilice de forma eficiente en la fotosíntesis necesita ser absorbida por los pigmentos fotosintéticos. Es justo esta porción del espectro la que

se define como Energía Fotosintéticamente Utilizable (PUR); es decir que, es la energía proveniente de la longitud de onda adecuada para ser absorbida por el aparato fotosintético de la microalga (Morel, 1978).

De acuerdo con Morel (1978) la PUR es dependiente tanto de la composición de los pigmentos como de la composición espectral de la luz. El PUR no puede ser medido directamente, por lo que es necesario conocer la irradiancia espectral y el espectro de absorción *in vivo* del fitoplancton, para así calcular la energía que realmente está utilizando la población fitoplanctónica para llevar a cabo sus procesos celulares. Por lo que, las propiedades ópticas de la célula definen la cantidad de energía incidente que se encuentra en disponibilidad para llevar a cabo todos los procesos involucrados en la fotosíntesis (Geider y Osborne, 1992).

La importancia de conocer la PUR radica en que es un concepto útil para la interpretación de las fotoadaptaciones que presentan los organismos fotosintéticos, por lo tanto es utilizado también en la fotobiología y fotoecología (Dunstan, 1982). Aunado a lo antes descrito, se encuentra la calidad y cantidad espectral de la luz, ya que son factores necesarios para la elucidación de la optimización de la PAR (Dunstan, 1982). Por lo tanto, la composición espectral de la luz es un factor que puede modificar la tasa de crecimiento en las microalgas, debido a que afecta el metabolismo y causa variaciones en la composición bioquímica (Correa-Reyes, 2001; Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2006; Vadiveloo *et al.*, 2015).

Las microalgas poseen gran plasticidad metabólica, lo que les confiere la capacidad de adaptarse a variaciones tanto en la calidad (composición) como en la intensidad (tasa de flujo de fotones) de luz (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2002). El metabolismo y la composición de las microalgas pueden ser manipulados entonces con la utilización de diferentes fuentes de luz con distinta composición espectral, lo que puede utilizarse en la acuicultura como una estrategia de obtención de diferentes dietas para alimentar a los organismos de cultivo con solamente una especie de microalga (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 1995; Sánchez-Saavedra y Voltolina, 1996).

Se han llevado a cabo numerosos estudios sobre el efectos de las distintas longitudes de onda de la luz en cultivos algales, comprobando que éstas variables

producen cambios en el crecimiento y metabolismo de las microalgas, así como en la estructura y composición de los pigmentos (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 1995; Sánchez-Saavedra y Voltolina, 1996; Correa-Reyes, 2001; Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2002; Mercado *et al.*, 2004; Godínez-Ortega *et al.*, 2008; Vadiveloo *et al.*, 2015). Se reporta que para *Chaetoceros* sp. y *Skeletonema costatum* el crecimiento se ve incrementado con el espectro producido por la mezcla de la luz azul y la luz verde (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2002) y para *Thalassiosira pseudonana* y *Tisochrysis lutea* la luz blanca es la que aumenta el crecimiento poblacional (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2002; Sánchez-Saavedra *et al.*, 2015). La luz azul genera las mayores densidades poblacionales en los cultivos de *Scenedesmus obliquus* (Fernández-Robledo, 2013), *Isochrysis galbana* (Yoshioka *et al.*, 2012; Gorai *et al.*, 2014), *Dunaliella salina*, *Chaetoceros gracilis*, *Heterocapsa circularisquama* (Gorai *et al.*, 2014), *Nannochloropsis* sp. (Vadiveloo *et al.*, 2015), *Haslea ostrearia* (Mouget *et al.*, 2005) y *Coscinodiscus granii* (Su *et al.*, 2015), en éstas últimas dos especies la luz amarilla produce el menor crecimiento poblacional.

Se conoce que de forma general que el espectro de la luz azul produce una mayor tasa de crecimiento en comparación con otras longitudes de onda de la luz. Esto ha sido demostrado para el cultivo de *Haslea ostrearia* (Mouget *et al.*, 2005), *Scenedesmus obliquus* (Fernández-Robledo, 2013), *Tisochrysis lutea* (Sánchez-Saavedra *et al.*, 2015) y *Halymenia floresii floresii* (Godínez-Ortega *et al.*, 2008). Además, por el uso de la luz azul se han encontrado cambios en el tamaño celular de distintas especies de diatomeas bentónicas (Mercado *et al.*, 2004).

El metabolismo de las microalgas es modificado por la composición espectral de luz en cultivos de diversas especies de microalgas, lo que resulta en variaciones en la composición proximal de la especie y en el contenido de pigmentos (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2002; Sánchez-Saavedra y Voltolina, 1996). Las concentraciones relativas de los componentes orgánicos e inorgánicos de las células cultivadas dependen de la irradiancia y de composición espectral de la luz (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 1996). Así mismo, otro factor que tiene influencia en la composición proximal es la fase de crecimiento del cultivo (Sánchez-Saavedra *et al.*, 2015), el aumento en el contenido de proteínas produce un descenso en el contenido de lípidos (Sánchez-Saavedra y Voltolina,

1996). De acuerdo con Morris (1981), el crecimiento continuo de fitoplancton en condiciones controladas y sistemas estáticos, puede generar un incremento en la síntesis de carbohidratos y lípidos, lo cual se debe principalmente a la deficiencia de nitrógeno lo que conlleva al incremento de compuestos no-nitrogenados y ocasiona el decremento en la síntesis de proteínas.

El efecto de la luz azul ha sido ampliamente investigado, confirmando el incremento en la síntesis de proteínas para distintas especies de microalgas (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 1996; Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2006; Marchetti *et al.*, 2013; Sánchez-Saavedra *et al.*, 2015). A pesar de esto, en el cultivo de la clorofita *Scenedesmus obliquus* el mayor contenido de proteínas se obtiene con la luz roja (Fernández-Robledo, 2013), con la diatomea bentónica *Navicula incerta* el mayor contenido de proteínas es evaluado con el espectro de la luz blanca (Mercado *et al.*, 2004) y con la diatomea planctónica *Chaetoceros* sp. el contenido de proteínas se incrementa con el espectro de la luz GroLux (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2006). La tendencia general de respuesta es que durante la fase de crecimiento exponencial el contenido de proteína es mayor en los cultivos de *Nitzschia laevis*, *Nitzschia thermalis* var. *minor* y *Navicula incerta* (Simental-Trinidad *et al.*, 2001), *Chaetoceros* sp. (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2006), *Rhodomonas* sp. (Lafarga-de la Cruz *et al.*, 2006) y en *Scenedesmus obliquus* (Fernández-Robledo, 2013).

La luz azul y la luz blanca producen un incremento en el contenido de carbohidratos en los cultivos de las diatomeas bentónicas *Nitzschia laevis*, *Nitzschia thermalis* var. *minor* y *Navicula incerta* (Simental-Trinidad *et al.*, 2001), la diatomea planctónica *Chaetoceros* sp. (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2006) y para la haptofita *Isochrysis* sp. (Marchetti *et al.*, 2012). Sin embargo, la luz azul produce un decremento en el contenido de carbohidratos en los cultivos de *Nannochloropsis* sp. (Vadiveloo *et al.*, 2015) y *Scenedesmus obliquus* (Fernández-Robledo, 2013), en esta última especie el contenido de carbohidratos disminuye con la luz roja, este efecto se produce por el hecho de que la luz azul incrementa la actividad de las enzimas de respiración y por lo tanto se obtiene un decremento en síntesis de carbohidratos (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 1996; Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2006; Marchetti *et al.*, 2012; Vadiveloo *et al.*, 2015).

La respuesta de síntesis de constituyentes celulares resulta diferente para distintas especies, el espectro de la luz blanca y la luz azul producen un aumento en el contenido de lípidos en *Chaetoceros* sp. (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 1996; Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2006), *Navicula incerta* (Simental-Trinidad et al., 2001), *Isochrysis* sp. (Marchetti et al., 2013), *Tisochrysis lutea* (Yoshioka et al., 2012; Sánchez-Saavedra et al., 2015) y en *Nannochloropsis* sp. (Vadiveloo et al., 2015). Mientras que el mayor contenido de lípidos en diatomeas bentónicas se presenta en la fase de crecimiento estacionaria al mantener los cultivos con luz blanca (Simental-Trinidad et al., 2001; Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2006).

La concentración de clorofila *a* se incrementa con el espectro de la luz blanca en el cultivo de especies como la macroalga *Gracilaria tenuistipitata* (Mercado et al., 2002), *Chaetoceros* sp., *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira costatum* (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2002), *Rhodomonas* sp. (Lafarga-de la Cruz et al., 2006), *Isochrysis* sp. (Marchetti et al., 2012) y *Nannochloropsis* sp. (Vadiveloo et al., 2015). Los espectros de la luz azul y la luz verde pueden producir también un incremento en la concentración de clorofila *a* para las siguientes especies *Chaetoceros* sp. (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 1996), *Nitzschia thermalis*, 3 cepas de *Nitzschia laevis* y *Navicula incerta* (Mercado et al., 2004), *Scenedesmus obliquus* (Fernández-Robledo, 2013), *Halymenia floresii* (Godínez-Ortega et al., 2008). Sin embargo, se han encontrado bajos contenidos de clorofila *a* por efecto de la luz azul para el cultivo de *Isochrysis galbana*, *Dunaliella salina*, *Heterocapsa circularisquama* (Gorai et al., 2014). Mientras que la haptofita *Tisochrysis lutea* puede producir altos contenidos de clorofila *a* al mantener los cultivos con un espectro de la luz roja y con luz azul (Sánchez-Saavedra et al., 2015). El mayor contenido de clorofila *a* se presenta usualmente en la fase de crecimiento exponencial de crecimiento, aunque depende de la irradiancia, de las condiciones de cultivo, de las características fotosintéticas y el tipo de pigmentos característicos del grupo en cuestión (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2002; Lafarga-de la Cruz et al., 2006; Fernández-Robledo, 2013; Sánchez-Saavedra et al., 2015).

Usualmente el contenido de carotenoides es mayor durante la fase de crecimiento exponencial en los cultivos de *Chaetoceros* sp., *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira costatum* (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2002) y *Scenedesmus obliquus* (Fernández-

Robledo, 2013). Además, el contenido de carotenoides también aumenta con el uso del espectro de la luz azul y la luz verde en *Halymenia floresii floresii* (Godínez-Ortega *et al.*, 2008). Sin embargo, para especies como *Chlorella vulgaris* (Kula *et al.*, 2014 a, b) y *Dunaliella bardawil* (Sánchez-Saavedra *et al.*, 1996) el contenido de carotenoides aumenta con la luz roja.

El peso seco orgánico y el contenido de cenizas tienden a aumentar conforme se incrementa el tiempo de cultivo en diatomeas bentónicas (Simental-Trinidad *et al.*, 2001; Yoshioka *et al.*, 2012). Altos contenidos de cenizas son atribuidos a la incorporación de sílice en la frústula de las diatomeas debido al proceso de crecimiento y de reproducción (Simental-Trinidad *et al.*, 2001).

Absorción de la luz y fotosíntesis

La absorción de la luz no depende solamente de las células fitoplanctónicas, sino que es importante considerar al material particulado y el material disuelto, como pueden ser: bacterias, células muertas, materia inorgánica, entre otros; la conjunción de los factores antes mencionados define el coeficiente de absorción espectral del cultivo (Mitchell, 1990; Arbones *et al.*, 1996; Mitchell *et al.*, 2002). A pesar de esto, existen otros aspectos propios del fitoplancton que influyen en la absorción, tal es el caso de la composición de los pigmentos, dando lugar al coeficiente específico de absorción, el cual es definido como: el coeficiente de absorción por unidad de concentración del pigmento en solución; parámetro utilizado en modelos oceánicos de productividad primaria (Kirk, 1994; Geider y Osborne, 1992; Millán-Núñez, 1999; Sakshaug *et al.*, 1997; Millán-Núñez *et al.*, 2004; Millán-Núñez y Millán-Núñez, 2010).

Como consecuencia, el espectro de absorción se encuentra regido por la presencia y concentración de los pigmentos fotosintéticos, la composición de los complejos proteína-pigmento y los constituyentes de la cadena de transporte de electrones, por lo tanto, la magnitud y forma del espectro es especie-específico (Sakshaug *et al.*, 1997; Tamburic *et al.*, 2014). De la misma manera, el espectro y por lo tanto el coeficiente de absorción son afectados por el efecto de paquete o de empaquetamiento, el cual resulta de la combinación de los factores: pigmentos

fotosintéticos y el tamaño celular; los que a su vez son consecuencia de la fotoaclimatación a la que fue sometida la población fitoplanctónica (Kirk, 1994; Geider y Osborne, 1992; Sakshaug *et al.*, 1997); entonces se tiene que, las células con altos contenidos de pigmentos o de gran tamaño poseen un efecto de paquete mayúsculo y viceversa para las células con bajo contenido de pigmentos y menor tamaño (Geider y Osborne, 1992); lo anterior también significa que las moléculas de los pigmentos se encuentran cerca de otras moléculas en los complejos proteína, es decir que los pigmentos se encuentran densamente empaquetados (Wilhelm *et al.*, 2014). A la suma de todos los aspectos que influyen en la absorción de la luz se les denomina características o propiedades bio-ópticas.

Se tiene entonces que el coeficiente específico de absorción presenta una correlación inversa con respecto al contenido de clorofila *a* y de la cantidad de la biomasa (Bricaud *et al.*, 1995; Millán-Núñez *et al.*, 2004). Mercado *et al.* (2004) mencionan que el coeficiente específico de absorción varía con respecto a la especie y es modificado por la composición espectral de la luz, pero no afecta la forma del espectro de absorción (Mercado *et al.*, 2004; Gorai *et al.*, 2014); teniendo así que, la luz azul reduce el coeficiente específico de absorción en tres cepas de *Nitzschia laevis*, y la luz blanca incrementa los valores del coeficiente específico en *Nitzschia thermalis* (Mercado *et al.*, 2004).

La fotosíntesis o tasa fotosintética, es el proceso biológico de conversión de la energía luminosa a energía química formando como consecuencia compuestos de carbono orgánico de alta energía a partir de compuestos inorgánicos de baja energía (Falkowski y Raven, 2007; Beer *et al.*, 2014); en las microalgas dicho proceso depende de la tasa de la captura de fotones, lo que está determinado por las propiedades bio-ópticas y por la calidad del espectro de la luz, teniendo así cambios en los productos finales de la fotosíntesis (Morris, 1981; Kirk, 1994; Falkowski y Raven, 2007). Sin embargo, la tasa fotosintética no es proporcional a la tasa de absorción de fotones, esto es debido a la eficiencia del aparato fotosintético de cada especie (Kirk, 1994).

Para comprender los efectos que producen la irradiancia y la composición espectral de la luz sobre la fotosíntesis microalgal es conveniente realizar la medición de la liberación de oxígeno como respuesta de la actividad fotosintética y específicamente

de la actividad del fotosistema II (PSII), esto es debido a que las microalgas poseen un sistema fotosintético más activo en comparación con otros organismos autótrofos; es entonces que en el análisis la tasa fotosintética se utiliza la relación existente entre la producción de oxígeno y la irradiancia, con las que se genera las llamadas “curvas P-E” (fotosíntesis-irradiancia), éstas modelan y predicen la fotosíntesis algal y por lo tanto contribuyen en la evaluación de la fisiología fotosintética y sus variaciones intra e inter-específicas (Kirk, 1994; Geider y Osborne, 1992; Falkowski y Raven, 2007).

Algunos factores que pueden intervenir en la respuesta de las curvas P-E son la aclimatación del aparato fotosintético durante el tiempo de cultivo y la intensidad de luz o irradiancia (Sakshaug *et al.*, 1997; Falkowski y Owens, 1978). El aumento en la irradiancia causa un rápido incremento en la tasa de producción de oxígeno (Falkowski y Owens, 1978). Los parámetros fotosintéticos difieren ampliamente en condiciones de cultivo y son afectados por la variación de la composición espectral de la luz, la fase de crecimiento y por el pH (Geider y Osborne, 1992; Mercado *et al.*, 2002; Fernández-Robledo, 2013). Bajas irradiancias causan un incremento en el tamaño del complejo antena en las unidades fotosintéticas y por lo tanto se produce un aumento en el contenido de pigmentos (Geider y Osborne, 1992).

Los parámetros fotosintéticos de mayor importancia en el análisis de las curvas P-E son: la pendiente inicial de la fotosíntesis (α), la intensidad de luz de saturación (E_k) y la fotosíntesis máxima (P_{max}) debido a su significado biológico (Kirk, 1994; Geider y Osborne, 1992; Sakshaug *et al.*, 1997). La intensidad de luz de saturación en la cual las células alcanzan el mayor crecimiento con una alta eficiencia de utilización de fotones proporcionados por el PAR es determinada por el valor de E_k . La pendiente de la curva P-E (α) es sumamente sensible a las propiedades ópticas de la célula y una pendiente pronunciada indica una alta eficiencia fotosintética (Wilhelm *et al.*, 2014); así mismo, se tiene que α y E_k son dependientes del espectro luminoso y P_{max} es independiente (Sakshaug *et al.*, 1997).

Las diatomeas son organismos capaces de absorber la energía de la misma manera a través del espectro de la energía fotosintéticamente activa (PAR). Se tiene además que la tasa fotosintética en diatomeas puede verse incrementada debido a su contenido del pigmento accesorio fucoxantina (Steemman Nielsen, 1975). Entonces en

el cultivo de algunas especies de diatomeas la fotosíntesis máxima ($P_{\max}$) se ve incrementada por el espectro de luz blanca (Falkowski y Owens, 1974; Mercado *et al.*, 2004); este mismo espectro genera la mayor eficiencia fotosintética (α), en *Nitzschia thermalis*, 3 cepas de *Nitzschia laevis* y *Navicula incerta* (Mercado *et al.*, 2004). En el cultivo de *Scenedesmus obliquus*, la eficiencia fotosintética es mayor en la luz azul (Fernández-Robledo, 2013). La luz roja produce altos valores de fotosíntesis máxima en *Haematococcus pluvialis* (Jeon *et al.*, 2005). La mayor intensidad de luz de saturación (E_k) se genera bajo la luz blanca en una variedad de *Nitzschia laevis* (Mercado *et al.*, 2004) y en *Haematococcus pluvialis* (Jeon *et al.*, 2005).

Preservación de microalgas

Debido al incremento actual de la acuicultura han surgido líneas de investigación dirigidas a solucionar los problemas y costos que genera el mantenimiento de cultivos de microalgas vivas (Cordero-Esquivel, 1994; Heasman *et al.*, 2000). El mantenimiento de cultivos de microalgas metabólicamente activos es uno de los objetivos necesarios para su utilización en la acuicultura (Lorenz *et al.*, 2005). Una de las recomendaciones hechas por Montaini *et al.* (1995), es que el método que se utilizará para preservar la biomasa microalgal debe de mantener el contenido de ácidos grasos y el valor nutricional de la especie invariable o con pequeñas modificaciones. Sin embargo, mencionan que para el mantenimiento celular en preservación, se requiere el consumo de productos de reserva (lípidos, carbohidratos).

Las posibles alternativas al continuo mantenimiento de los cultivos de microalgas puede ser la preservación de la biomasa, pero el método de preservación debe ser de bajo costo y de aplicación a gran escala; es así que numerosos métodos y protocolos han sido investigados en la preservación de la biomasa microalgal, dentro de los cuales se encuentran la liofilización, el secado y el almacenamiento a bajas o ultra-bajas temperaturas con o sin adición de crioprotectores (Cordero-Esquivel, 1994; Becker, 2004; Sánchez-Saavedra, 2013). La centrifugación de las microalgas forma una pasta, la que se puede mantener en refrigeración hasta su posterior uso, se tiene que en diatomeas bentónicas la concentración de la biomasa es más sencilla debido a las características

del grupo y a que se encuentran adheridas al sustrato (Sánchez-Saavedra, 2013). Sin embargo, la vida de anaquel difiere en tiempo y entre las especies de microalgas (Sánchez-Saavedra, 2006; Aráujo *et al.*, 2008; Núñez-Zarco y Sánchez-Saavedra, 2011; Sánchez-Saavedra y Núñez-Zarco, 2012, 2015).

La preservación en frío a una temperatura de 4 °C y en oscuridad total es un método económico y sencillo para preservar biomasa microalgal, pero este método causa cambios en el tamaño celular como consecuencias de modificaciones en el metabolismo celular y del aumento de almacenamiento de productos de reserva (Núñez-Zarco y Sánchez-Saavedra, 2011, 2015). Las bajas temperaturas causan rigidez en la bicapa lipídica de la membrana y una pérdida en la permeabilidad iónica (Los y Murata, 2004). Este método de preservación modifica la actividad fotosintética celular debido al mantenimiento y regulación de varias rutas del metabolismo para mantener la célula en condiciones aceptables de supervivencia (Descolas-Gross y De Billy, 1987).

Los procesos metabólicos de algunas especies de diatomeas son minimizados por su preservación en frío a una temperatura de 4 °C en oscuridad total y la viabilidad de éstas células se mantiene debido a la utilización de sus productos de reserva (Sánchez-Saavedra, 2006). Se conoce que la preservación en oscuridad y a baja temperatura en algunas especies de diatomeas, producen cambios en la actividad fotosintética (Sánchez-Saavedra y Núñez-Zarco, 2012). Los factores a considerar para la preservación en frío (4 °C) son: la densidad celular (abundancia celular) y el tamaño celular. Debido a que la densidad celular influye directamente en la viabilidad de del cultivo, así mismo la densidad celular apropiada es diferente para cada especie ya que debe considerarse que un porcentaje de células pueden no sobrevivir al tratamiento y dicha respuesta es especie-específica (Sánchez-Saavedra, 2006). La preservación en frío produce cambios en la composición proximal de las diatomeas, esto puede ser causado por la capacidad de generar crecimiento celular por medio de la estrategia de alimentación heterótrofa y lo cual puede producir un incremento en el contenido de proteína en la célula al ser comparado con los contenidos de lípidos y carbohidratos (Sánchez-Saavedra y Núñez-Zarco, 2012).

La preservación en frío por 4 semanas de *Navicula incerta* y *Amphiprora paludosa* var. *hyalina* causaron cambios en el tamaño de las células, pero no modificó la densidad

poblacional o la tasa de crecimiento (Sánchez-Saavedra, 2006). Sin embargo, en la preservación por 8 y 16 semanas de las especies: *Navicula incerta*, *Amphiprora paludosa* var. *hyalina*, *Nitzschia laevis*, *Nitzschia thermalis* var. *minor*, *Navicula* sp. y *Amphora tenerrima* existieron diferencias en la densidad poblacional y la viabilidad entre las distintas especies (Núñez-Zarco y Sánchez-Saavedra, 2011). Las diatomeas bentónicas *Nitzschia thermalis* var. *minor*, *Nitzschia laevis*, *Navicula incerta* y *Navicula* sp., presentan viabilidad celular posterior a 16 semanas en preservación en frío (Sánchez-Saavedra y Núñez-Zarco, 2012), lo mismo sucede en la preservación de *Cylindrotheca closterium* por 21 semanas y no se presentan cambios en el tamaño celular (Aráujo *et al.*, 2008). La clorofita *Tetraselmis suecica* presentó una alta sobrevivencia al proceso de preservación en frío después de 5 meses (Montaini *et al.*, 1995).

Otro método con un gran potencial para la preservación de la biomasa microalgal por largos periodos de tiempo es la criopreservación a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ en nitrógeno líquido con la adición de crioprotectores (DMSO, glicerol, alcohol, entre otros); esta técnica provee una herramienta para asegurar la bioseguridad y la estabilidad genotípica (Tzovenis *et al.*, 2004; Buhmann *et al.*, 2013). Sin embargo, este método requiere de equipo especializado para el manejo del nitrógeno líquido (Sánchez-Saavedra, 2013). Se debe de tener en cuenta que la adición de ciertos crioprotectores puede resultar en una alta mortalidad de la población debido a efectos tóxicos (Cañavate y Lubian, 1995; Cordero y Voltolina, 1997; Rhodes *et al.*, 2006; Tanniou *et al.*, 2012). La velocidad de descongelamiento posterior a la criopreservación es uno de los factores que influyen en la supervivencia de la población y difiere entre las especies (Cañavate y Lubian, 1997). En el proceso de la criopreservación uno de los mayores problemas que se enfrenta es el congelamiento intracelular el cual ocasiona daño celular; éste último es dependiente de la velocidad de congelamiento. La velocidad moderada ($-3\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$) es la recomendada para congelar microalgas, debido principalmente a que la célula no libera de forma rápida el agua y por lo tanto no se deshidrata lo suficiente para ocasionar un daño celular (Lepesteur *et al.*, 1993; Cañavate y Lubian, 1997; Rhodes *et al.*, 2006).

En la criopreservación con la adición de crioprotectores (DMSO y glicerol al 10%) para *Synechocystis* sp., *Dunaliella* sp. y *Phaeodactylum tricornutum* causaron que la pérdida de la viabilidad celular fuera menor; sin embargo, se observó disminución en el

contenido de pigmentos (Lepesteur *et al.*, 1993). Al criopreservar células de *Tetraselmis suecica* con y sin la adición de crioprotectores (DMSO y glicerol) se ocasiona una pérdida total de viabilidad al sumergir a las células directamente a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$; sin embargo, la viabilidad y la actividad fotosintética aumentan si la criopreservación se realiza en dos pasos (Montaini *et al.*, 1995). En la criopreservación en dos pasos con DMSO al 15% para *Rhodomonas baltica*, *Tetraselmis chui*, *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis gaditana*, *Chaetoceros gracilis* y *Nannochloropsis atomus* se obtuvieron diferencias en la viabilidad entre especies (Cañavate y Lubián, 1995). La criopreservación en dos pasos consiste primeramente en congelar la muestra (microalga+crioprotector) en condiciones controladas de tiempo y temperatura ($-3\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ hasta $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$) para posteriormente sumergirla directamente en el nitrógeno líquido, esto con el fin de reducir el daño celular producido por la formación de hielo (Mitbavkar y Anil, 2006; Guermazi *et al.*, 2010; Tanniou *et al.*, 2012).

En la preservación a bajas temperaturas ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$) con la adición de crioprotectores (glicerol y DMSO al 10%) de *Chaetoceros* sp. y *Phaeodactylum tricornutum* se reporta viabilidad en ambas especies (Cordero y Voltolina, 1997). En la criopreservación de *Haslea ostrearia* con adición de DMSO y glicerol, solo éste último crioprotector resultó en cultivos viables pero fueron más propensos a contaminación por bacterias que los criopreservados con DMSO (Tanniou *et al.*, 2012). La criopreservación con la adición de DMSO de *Amphora coffeaeformis* y *Navicula transitans* var. *derasa* f. *delicatula* resulta con viabilidad celular para ambas especies (Mitbavkar y Anil, 2006), el mismo resultado es reportado para *Chaetoceros calcitrans*, *Chaetoceros muelleri*, *Chaetoceros* sp. y *Nitzschia ovalis* criopreservadas con DMSO al 10% y al 15% (Rhodes *et al.*, 2006). Con la adición de DMSO y la criopreservación de *Isochrysis galbana*, *Dunaliella tertiolecta*, *Chlorella stigmatophora*, *Chlorella minutissima* y *Chlorella capsulata* se obtuvo que la viabilidad es especie-específica (Tzovenis *et al.*, 2004).

En ambientes fríos, las células microalgales modifican su composición de ácidos grasos para la regulación de la fluidez de la membrana, lo cual se realiza con la incorporación de ácidos grasos poliinsaturados de cadena corta, cíclicos o ramificados (White *et al.*, 2000). El objetivo principal de la preservación de cultivos microalgales a bajas y ultra bajas temperaturas es mantener en condiciones óptimas el complejo antena,

debido a que es el componente prioritario para la realización de una fotosíntesis eficiente (Peters y Thomas, 1996). Otro propósito de la preservación de células vegetales es el mantenimiento de la integridad de las células así como conservarlas metabólicamente activas (Montaini *et al.*, 1995). Altas supervivencias al proceso de preservación pueden ser atribuidas a altos contenidos de productos de reserva, los cuales mantienen el movimiento y la integridad de la célula (Montaini *et al.*, 1995).

Las células dañadas por el efecto de las bajas temperaturas muestran una menor respiración, reducción en el transporte de los carbohidratos, inhibición de la síntesis de proteínas y un aumento de la degradación de las proteínas almacenadas. Todas estas respuestas dependen de un mecanismo primario que implica una alteración de la membrana celular durante las bajas temperaturas (Taiz y Zeiger, 2006). Las bajas temperaturas inducen también la síntesis de proteínas de choque térmico que protegen a las células contra los posibles daños generados por el efecto del frío (Sadava *et al.*, 2009).

Justificación

Debido a la gran importancia que poseen las diatomeas bentónicas tanto ecológica como acuicultural, aunado a las dificultades y altos costos del mantenimiento de los cultivos de microalgas en vivo, es importante aportar información de la diatomea bentónica *Amphora* sp. que fue aislada recientemente de la Península de Baja California, México. Al mantener cultivos de *Amphora* sp. con distinta composición espectral, se podrá conocer como es afectado el metabolismo y en consecuencia los cambios en la tasa de crecimiento y también en la composición proximal de las células. El conocimiento de las características de absorción de la luz en los cultivos microalgales, es de gran relevancia ya que rigen la cantidad de radiación fotosintéticamente utilizable (PAR) que la célula y sus tejidos absorben y dispersan. La evaluación de la PUR es importante dado que aporta elementos para conocer la cantidad de energía proveniente de la PAR que se está absorbiendo por las células. Estos aspectos de la absorción de la luz son poco frecuentes de considerar al realizar cultivos microalgales en la acuicultura, sin embargo, aportan información relevante sobre la cantidad de luz necesaria para el mantenimiento de los

cultivos. Es importante resaltar que el costo económico relacionado con el suministro de la luz, que es requerida para el mantenimiento de los cultivos microalgales, es uno de los rubros que incrementan el valor monetario de la producción masiva de microalgas. Además, uno de los grandes retos en el cultivo de microalgas, es el continuo mantenimiento de los cultivos de microalgas vivas, ya que requiere de una gran demanda de tiempo de mantenimiento y se necesita infraestructura especializada, por lo que tener a disposición especies que puedan ser criopreservadas ofrece una gran ventaja para la práctica acuicultural. Por lo anterior, se evaluará el efecto de preservar en frío (4 °C) y criopreservar (-196 °C) las células de *Amphora* sp. cultivadas en distinta composición espectral de la luz, considerando que se obtendrán distintas composiciones proximales en las células y esto afectará la viabilidad para el crecimiento después del proceso de almacenamiento.

1.1. Hipótesis

- 1) El crecimiento y la síntesis de proteínas en *Amphora* sp. es favorecida por la luz azul.
- 2) Un alto contenido de lípidos y proteínas favorecen la preservación en frío a 4 °C (por refrigeración) así como la criopreservación (-196 °C) de las células de *Amphora* sp.

1.2. Objetivos

1.2.1. General

Evaluar el efecto de la absorción y de la composición espectral de la luz sobre el crecimiento y la composición proximal de *Amphora* sp. y su influencia sobre la viabilidad de los cultivos de almacenados en frío y criopreservados.

1.2.2. Particulares

- Evaluar el crecimiento de cultivos de *Amphora* sp. mantenidos con distinta composición espectral de la luz.
- Cuantificar la composición proximal y la concentración de pigmentos de cultivos de *Amphora* sp. mantenidos con distinta composición espectral de la luz.
- Estimar los parámetros fotosintéticos, las propiedades de absorción de luz y la cantidad de la energía fotosintéticamente utilizable (PUR) de los cultivos *Amphora* sp.
- Evaluar la viabilidad para el crecimiento de los cultivos de *Amphora* sp. almacenados en frío (por refrigeración).
- Evaluar la viabilidad para el crecimiento y la composición proximal de los cultivos de *Amphora* sp. criopreservados y almacenados en nitrógeno líquido.

Capítulo 2. Materiales y Métodos

2.1. Origen de la cepa

La cepa que se utilizó es la diatomea bentónica *Amphora* sp. y fue obtenida de la colección particular del Laboratorio de Microalgas del Departamento de Acuicultura del CICESE. La especie provino de un aislamiento realizado en la zona costera de Mulegé, Baja California Sur, México (26° 38' 22.13" N - 111° 50' 13.92" W); el aislamiento de la diatomea fue efectuado por Jiménez-Valera (2015).

2.2. Mantenimiento de los cultivos

El cultivo de *Amphora* sp. se llevó a cabo en el Laboratorio de Microalgas del Departamento de Acuicultura del CICESE, se realizó un escalamiento del cultivo desde tubo (10 ml) hasta matraz Fernbach (1 L). El cultivo fue no axénico, estático y sin recambio de medio. El agua de mar que se utilizó para los cultivos fue obtenida de la Bahía de Todos Santos, Baja California, México y se filtró con una serie de sistemas de sedimentación, por una serie de filtros rápidos de arena, por una serie de cartuchos de algodón de 10, 5 y 1 μm , y se irradió con luz ultravioleta.

Los cultivos se mantuvieron por triplicado con medio "f" (Guillard y Ryther, 1962) preparado con agua de mar a 33 ± 1 ‰ y se esterilizó en una autoclave (marca Yamato modelo SE-300) a 121 °C y a una presión de 1.05 kg cm⁻¹ durante 20 minutos. Los cultivos se mantuvieron a una irradiancia de luz continua de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (luz blanca F40T12/DX), a una temperatura de 20 ± 1 °C controlada por el sistema de enfriamiento del laboratorio húmedo central del Departamento de Acuicultura.

2.3. Efecto de la composición espectral de la luz y de la irradiancia sobre el crecimiento y composición proximal

Se realizó un ensayo para evaluar el efecto de la composición espectral de la luz y de la irradiancia en los cultivos de *Amphora* sp. Para lo anterior se realizaron cultivos por triplicado en volúmenes de 1 L utilizando medio “f” bajo las mismas condiciones como ya fue descrito en la sección 2.2. La luz se suministró de forma continua con distinta composición espectral y fue provista por medio de lámparas fluorescentes de 40 watts de luz blanca (LB, marca Philips catálogo F40T12/DX), luz azul (LA, marca General Electric catálogo F40B), luz verde (LV, marca General Electric catálogo F40G), luz amarilla (LM, marca Sylvania Gold catálogo F40/GO) y GroLux (GL, marca Sylvania catálogo F40/GROWS). Cada tratamiento experimental se llevó a cabo con los distintos tipos de lámparas y se mantuvieron con un nivel de irradiancia de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, que se midió con un sensor 4π Biospherical Instrument (modelo QSL-100). El valor de la irradiancia utilizado fue elegido con base en la energía fotosintéticamente utilizable (PUR) y las propiedades ópticas de *Amphora* sp. descritas en la sección 2.6.

Se llevaron a cabo las mediciones de los espectros continuos de las lámparas fluorescentes utilizadas. Dichas mediciones se realizaron para caracterizar el espectro de emisión de cada fuente de luz, lo que se realizó con un espectroradiómetro marca International Light Technologies (modelo ILT 900-W) y con el software SpectrILight II. Cada uno de los espectros fue obtenido en el intervalo de los 350 a los 750 nm de longitud de onda con una resolución de 1 nm. Con los espectros obtenidos, se llevó a cabo el cálculo de la energía en quantas (ecuación 1) para obtener la densidad de flujo de fotones emitido por cada fuente de luz (ecuación 2). Se integro la emisión entre los 400 a los 700 nm para el cálculo de la PAR (energía fotosintéticamente activa).

- Energía en quantas (Kirk, 1994):

$$\varepsilon = 5.03\Phi\lambda \cdot (10^{15}) \quad (1)$$

En donde ε es la energía ($\text{quanta} \cdot \text{s}^{-1}$), Φ es el flujo de energía radiante (W m^{-2}) y λ es la longitud de onda (nm).

- Densidad de flujo fotónico (Lüning, 1981):

$$DFF = \frac{\varepsilon}{N_A} \quad (2)$$

En donde DFF es la densidad de flujo fotónico, ε es la energía y N_A es el número de Avogadro (6.02×10^{23}).

2.4. Crecimiento y parámetros poblacionales

Para cada condición experimental y cada día, se tomaron muestras de los cultivos para evaluar el pH con un potenciómetro marca Hanna. Además, se evaluó el crecimiento por medio de mediciones de la densidad óptica (D.O.) con un espectrofotómetro marca Hach modelo DR/4000 a una longitud de onda de 680 nm. También se realizaron conteos directos de la abundancia de células con un hematocitómetro (0.1 mm de profundidad marca Hausser Scientific) y con la ayuda de un microscopio compuesto Olympus CX-31. La abundancia o densidad celular se calculó con la siguiente formula:

$$C = N \cdot 10^4 \cdot dil \quad (1)$$

En donde C es la abundancia de células por ml, N es el número promedio de células en el hematocitómetro y dil , es la dilución de la muestra.

2.4.1. Tasa de crecimiento específica

La tasa de crecimiento específica o velocidad de crecimiento (μ : divisiones día⁻¹), se evaluó con los conteos celulares obtenidos durante la fase de crecimiento exponencial, y se calculó con la ecuación descrita por Fogg y Thake (1978):

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

En donde μ es la tasa de crecimiento específica en la fase exponencial, N_2 es la concentración de células al tiempo 2 (t_2) y N_1 es la concentración de células al tiempo 1 (t_1). $\log_2$ corresponde al logaritmo base dos de los datos de la concentración de células.

2.4.2. Tiempo de generación

El tiempo de generación o tiempo de duplicación (t_g : días) es definido como el tiempo requerido por una población celular para duplicar en número de células y está dado por la siguiente ecuación (Fogg y Thake, 1978):

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

En donde t_g es el tiempo de regeneración y μ es la tasa de crecimiento específica calculada con base a $\log_2$.

2.4.3. Tamaño celular

El tamaño de las células en los cultivos se evaluó en días alternos, con la medición de treinta células de cada condición experimental, y se tomaron las medidas de largo y ancho de la célula. Estas mediciones se realizaron con un microscopio compuesto, marca Olympus CX-31 utilizando un objetivo de 40x. Se obtuvieron fotografías de las células, las que posteriormente fueron analizadas con el software Image Pro-Discovery.

2.5. Composición proximal

Durante la fase exponencial y estacionaria de crecimiento de los cultivos, se tomó una alícuota de cada condición experimental, fue colectada en filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C de 2.4 cm de diámetro y con una apertura nominal de poro de 1 μm . Todas las muestras, colectadas para el análisis de la composición proximal fueron almacenadas a una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la realización de los análisis. Para los cálculos de la composición proximal se obtuvieron curvas de calibración para cada

variable usando métodos espectrofotométricos y las muestras se analizaron en un espectrofotómetro marca Hach modelo DR/4000.

2.5.1. Proteínas

Previo al análisis de proteínas, se realizó la optimización en la extracción y se tomó en consideración lo propuesto por Correa-Reyes (2001). Para la optimización de la extracción de las proteínas se utilizaron tres concentraciones de hidróxido de sodio (0.1, 0.2, y 0.3 N), dos tiempos para la extracción (15 y 30 minutos), y el número de extracciones (primera y segunda extracción). Para estas pruebas se mantuvo la temperatura de extracción a 100 °C mediante un baño María (Bio-Rad de 6 L) para todos los casos.

El contenido de proteínas fue evaluado con el método de Lowry *et al.* (1951), el cual se basa en la medición espectrofotométrica de la intensidad de color obtenido con el reactivo de Folin-Ciocalteu. La extracción se realizó con el método descrito por Malara y Charra (1972a), que utiliza hidróxido de sodio y se consideraron las condiciones determinadas en la optimización de la extracción. La curva de calibración para las proteínas se realizó con suero de albúmina de bovino (98%) Sigma® como estándar.

2.5.2. Carbohidratos

La concentración de carbohidratos fue medida con el método de Dubois *et al.* (1956) y Malara y Charra (1972b) utilizando fenol al 5% y ácido sulfúrico concentrado. Los carbohidratos fueron extraídos con ácido sulfúrico al 0.5 N siguiendo la técnica descrita por Whyte (1987). La curva estándar o de calibración para los carbohidratos se realizó con solución de glucosa (99%) marca Sigma®.

2.5.3. Lípidos

Los lípidos contenidos en las células fueron extraídos según lo descrito en el método de Blight y Dyer, (1959) y modificado por Chiaverini (1972), en la que se utiliza como solvente una mezcla de cloroformo-metanol-agua. Los lípidos se cuantificaron por el método de Pande *et al.* (1963). La curva de calibración se realizó con solución de tripalmitina (C16:0) al 99% marca Sigma®.

2.5.4. Pigmentos

La extracción de los pigmentos fue efectuada con acetona al 90% como solvente y se realizó por 24 horas a 4 °C. La extracción y cuantificación de pigmentos se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por Parsons *et al.* (1984).

2.5.5. Cuantificación de peso seco y contenido de cenizas

El peso seco total (PST) y el peso de las cenizas (PC) se evaluaron según la técnica propuesta por Sorokin (1973). Una alícuota de los cultivos de cada condición experimental se filtró a través de filtros de fibra de vidrio de 45 mm de diámetro y 1 µm de abertura de poro. Los filtros se incineraron en una mufla marca Barnstead Thermolyne (modelo 1400) a 490 °C por 4 horas, previos a ser utilizados. Con el fin de evitar el efecto de las sales presentes en el agua de mar, para cada caso se realizó un lavado de la muestra con formiato de amonio al 3%. Los filtros con la biomasa celular colectada se colocaron en contenedores de aluminio y fueron puestos en una estufa a 60 °C hasta obtener valores de peso seco constantes. Las cenizas se obtuvieron por incineración de las muestras contenidas en los filtros de forma análoga a la descrita en líneas atrás. El peso seco orgánico (PSO) se calculó por la diferencia entre el peso de las cenizas y el peso seco constante.

2.6 Utilización de la luz y propiedades ópticas de *Amphora* sp.

Para examinar las propiedades ópticas de *Amphora* sp. y conocer la cantidad incidente de energía radiante utilizable para la realización de la fotosíntesis (PUR), se llevaron a cabo mediciones de absorción espectral de las células de *Amphora* sp. retenidas en filtros; dichas mediciones se obtuvieron para cada uno de los días del cultivo durante las distintas fases de crecimiento. El cultivo de *Amphora* sp. se realizó en medio “f”, mantenido bajo las mismas condiciones descritas en la sección 2.2 con una irradiancia continua de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ provista por luz blanca fluorescente marca General Electric (catálogo F40T12/DX).

Para la retención de la biomasa microalgal en los filtros, se siguió el protocolo propuesto por Mitchell *et al.* (2002) y se realizó con una alícuota del cultivo de *Amphora* sp. que fue suspendida en filtros de fibra de vidrio GF/F de 2.4 cm de diámetro y una apertura de poro nominal de $0.7 \mu\text{m}$. Previo a la realización del filtrado de las muestras, el cultivo fue homogenizado con agitación manual e inmediatamente los filtros fueron preservados en nitrógeno líquido a -196°C hasta su posterior análisis que se llevó a cabo en el Laboratorio de Ecología de Lagunas Costeras del Departamento de Ecología Marina del CICESE.

Se llevaron a cabo las mediciones de las densidades ópticas de los filtros con la biomasa retenida, dichas mediciones se obtuvieron con un espectrofotómetro marca Shimadzu (modelo UV-2401 PC) equipado con una esfera integradora. El barrido espectral de los filtros con la biomasa retenida fue realizado de los 300 nm a los 800 nm de longitud de onda con un intervalo de 1 nm. Para el blanco o control, se utilizó un filtro GF/F humedecido con agua de mar estéril; con esto se obtuvo la curva espectral propia del material particulado (a_p).

Para la obtención de la curva espectral del detritus (a_d), se siguió la metodología propuesta por Kishino *et al.* (1985), en la que se utiliza metanol absoluto para la extracción de los pigmentos contenidos en la biomasa celular retenida en los filtros; debido a las características propias de *Amphora* sp. se realizó una modificación al método (Millán-Núñez, comunicación personal), la cual consistió en adicionar un enjuague a los

filtros con agua destilada e hipoclorito de sodio al 2.5% posterior a la aplicación del metanol y por último se llevó a cabo el barrido espectral del detritus.

Los espectros obtenidos de los coeficientes de absorción se corrigieron por el parámetro de amplificación de trayectoria (β), para lo cual se realizó un ajuste de la densidad óptica de las muestras filtradas (OD_{filt}) a la densidad óptica de las muestras en suspensión (OD_{sus}) (ecuación 3); así mismo fue necesario el cálculo de la amplificación de la trayectoria geométrica (l_s) (ecuación 4); ambos términos se sustituyeron en la ecuación 5 para obtener los coeficientes de absorción corregidos de las partículas filtradas (a_p y a_d).

- Ajuste de las densidades ópticas:

$$OD_{sus}(\lambda) = 0.368(OD_{filt}) + 0.4068(OD_{filt})^2 \quad (3)$$

En donde OD_{sus} es la densidad óptica de las muestras en suspensión en el cual β son las constantes de la ecuación cuadrática y OD_{filt} es la densidad óptica de las muestras filtradas.

- Amplificación de trayectoria geométrica (Mitchell *et al.*, 2002):

$$l_s = \frac{v_f}{A_f} \quad (4)$$

En donde V_f es el volumen filtrado de la muestra y A_f es el área del filtro, la cual se calculó a partir del diámetro D_f de la sección del filtro que fue ocupada por la biomasa retenida y se midió con un vernier (error ± 0.1 mm).

- Coeficiente de absorción de las partículas filtradas (Mitchell *et al.*, 1990):

$$a_p(\lambda) = \frac{2.303 OD_{sus}(\lambda)}{l_s} \quad (5)$$

En donde OD_{sus} es la densidad óptica de las muestras en suspensión y l_s es la amplificación de trayectoria geométrica.

Posteriormente se obtuvieron los coeficientes de absorción del material particulado (a_p) y del fitoplancton (a_{ph}) (ecuación 6), además se calculó el coeficiente de específico absorción (a_{ph}^*) (ecuación 7).

- Coeficiente de absorción espectral del fitoplancton (Mitchell *et al.*, 2002):

$$a_{ph}(\lambda) = a_p(\lambda) - a_d(\lambda) \quad (6)$$

En donde $a_p(\lambda)$ es el coeficiente de absorción de las partículas filtradas y $a_d(\lambda)$ es la absorción del filtro blanqueado o con extracción de pigmentos.

- Coeficiente de específico absorción (Geider y Osborne, 1991):

$$a_{ph}^* = a_{ph}/C \quad (7)$$

En donde a_{ph} es el coeficiente de absorción espectral del fitoplancton y C es la concentración de clorofila a en la muestra.

Además de las mediciones de la densidad óptica de las células de *Amphora* sp., se realizaron extracciones de los pigmentos contenidos en los filtros GF/F con la biomasa retenida. Dicha extracción de pigmentos se llevó a cabo con 20 ml de metanol absoluto, en el que se sumergieron los filtros con biomasa y fueron almacenaron por un periodo de 24 horas a 4 °C en obscuridad con el fin de remover los pigmentos fotosintéticos y así posteriormente obtener el contenido de clorofila a (mg m^{-3}) con la utilización de un fluorímetro Trilogy® Turner Desings (modelo 7200-00).

Con los resultados de los coeficientes de absorción se estimó la irradiancia escalar utilizable ($\dot{E}_{PUR}$) (ecuación 8), para así con el despeje de la ecuación obtener la energía fotosintéticamente utilizable (PUR) del microorganismo de estudio.

- Irradiancia escalar utilizable (Sakshaug *et al.*, 1997):

$$a_{ph}^* \dot{E}_{PAR} = a_{phm}^* \dot{E}_{PUR} \quad (8)$$

En donde a_{ph}^* es la media del coeficiente específico de absorción, $\dot{E}_{PAR}$ es la irradiancia escalar y a_{phm}^* es el coeficiente específico de absorción máxima, que generalmente se encuentra en la longitud de onda de 440 nm.

2.7. Tasa fotosintética

Para medir la tasa fotosintética de los cultivos mantenidos en cada condición experimental se utilizó el método de producción de oxígeno de las células. Para esta medición se realizó la colecta de una muestra representativa del cultivo con células de *Amphora* sp. durante la fase de crecimiento estacionaria (día 8 de cultivo). Para tener una mayor respuesta de la producción de oxígeno de los cultivos, la biomasa de células fue concentrada por sedimentación y eliminación del sobrenadante hasta obtener un volumen de 20 ml de agua de mar con el cultivo concentrado para cada caso. Previo a las mediciones de fotosíntesis, las células fueron colocadas en oscuridad total por un intervalo de 20 minutos.

Para cada muestra se midió la evolución del oxígeno disuelto a una temperatura de 23 °C, en una cámara de acrílico cerrada tipo Clark con un volumen de 7.5 ml, dicha cámara se equipó con un electrodo de oxígeno marca Yellow Spring Instruments (modelo 5221) y un micro agitador magnético con velocidad de agitación de 150 rpm. La cámara se encontraba conectada a un fotodetector y a un graficador de banda marca Hent Schlumberger interconectado a un modulador y amplificador.

Se utilizaron distintas irradiancias del espectro de luz que fue obtenido por una lámpara de halógeno marca Osram (modelo Xenophot HLX) de un proyector de diapositivas modificado para su utilización en laboratorio. Las distintas irradiancias fueron obtenidas por diferente número de mallas para obtener irradiancias entre los valores de los 106 a los 2,741 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las irradiancias fueron medidas con un radiómetro equipado con un sensor 4π marca Biospherical Instrument (modelo QSL-100).

Las tasas fotosintéticas fueron corregidas por la incorporación del oxígeno en oscuridad. Se calcularon los parámetros fotosintéticos a partir de las curvas fotosíntesis-irradiancia (P-E), tales como: la tasa de fotosíntesis máxima (P_{max}), la pendiente inicial de la fotosíntesis o eficiencia fotosintética (α) y la intensidad de luz de saturación (E_k), los valores se obtuvieron con un ajuste lineal aplicado directamente a los datos de la ecuación exponencial de las curvas P-E. Los parámetros fueron normalizados respecto al contenido promedio de clorofila a en cada uno de los tratamientos.

2.8. Preservación en frío

Para la preservación en frío de las células mantenidas en los cultivos de *Amphora* sp., se cosechó el total de la biomasa celular de cada uno de los cultivos mantenidos en las distintas condiciones experimentales de luz durante la fase estacionaria de crecimiento. El método de cosecha fue la concentración de la biomasa por sedimentación. A partir del concentrado de cada uno de los cultivos, se tomaron alícuotas de 9 ml que se colocaron en tubos de ensayo de vidrios con tapa de rosca, etiquetados, estériles y cubiertos con papel aluminio, se almacenaron en bolsas plásticas negras. Los tubos se mantuvieron a una temperatura de 4 °C en refrigeración por 8 y 16 semanas. Para la preservación en frío se tomaron en cuenta las recomendaciones descritas para diversas especies de diatomeas bentónicas (Sánchez-Saavedra, 2006; Núñez-Zarco y Sánchez-Saavedra, 2011; Sánchez-Saavedra y Núñez-Zarco, 2012).

2.8.1. Ensayos de viabilidad

Se evaluó la viabilidad celular para el crecimiento de los cultivos preservados en frío, y ésta se define como la capacidad que poseen las células que fueron conservadas en frío (4 °C) en un determinado intervalo de tiempo para crecer en un medio de cultivo nuevo como describe Miranda-Saucedo (2011). La evaluación de la viabilidad se realizó a las 8 y 16 semanas de almacenamiento. Para los inóculos de los cultivos con los que se mediría la viabilidad después de ser almacenados en frío (4 °C), se tomaron alícuotas ($250,000 \text{ cél ml}^{-1}$) de las muestras preservadas en frío de cada tratamiento y fecha de medición, las que fueron sembradas en tubos de ensayo de 15 ml con 10 ml de medio "f", este proceso se realizó por triplicado según lo indicado por Miranda-Saucedo (2011) para cada uno de las condiciones experimentales.

Los cultivos para evaluar la viabilidad en cada fecha de muestreo, se mantuvieron en las condiciones experimentales de luz y temperatura descritas en la sección 2.2 para el mantenimiento de cultivos. Para cada uno de estos cultivos se evaluó el crecimiento y los parámetros poblacionales, ya mencionados en la sección 2.4.

2.8.2. Prueba para la presencia de *Vibrio* sp.

Esta prueba fue realizada para descartar la presencia de bacterias tipo *Vibrio* en los cultivos, se llevó a cabo de acuerdo a la metodología seguida por Miranda-Saucedo (2011). Las mediciones se realizaron al inicio y al final de los ensayos de viabilidad en la semanas 8 y 16 de almacenamiento, utilizando medio de cultivo Difco TCBS Agar (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose, por sus siglas en inglés), siguiendo los procedimientos descritos en DIFCO (1984). Los cultivos se realizaron en cajas Petri de 51 mm de diámetro y se filtraron 10 ml de cultivo en condiciones asépticas utilizando filtros estériles marca Whatman de 47 mm con 0.2 μm de abertura de poro. Los filtros con muestra se colocaron dentro de las cajas Petri y sobre el medio de cultivo previamente preparado y gelificado. Las muestras fueron incubadas por 24 horas a 28 °C, se analizó la presencia o ausencia de unidades formadoras de colonias (UFC) y en el caso afirmativo de su presencia, se procedió al conteo de las colonias de *Vibrio*.

2.9. Criopreservación de *Amphora* sp.

Se llevó a cabo un ensayo para evaluar el efecto de la criopreservación en nitrógeno a una temperatura de -196 °C y con la adición de crioprotectores orgánicos en las células de *Amphora* sp. Las condiciones de cultivo fueron similares a las ya descritas en la sección 2.2.

Para la criopreservación se utilizó un cultivo de *Amphora* sp. con alta densidad celular ($\sim 3'000,000$ cél ml^{-1}) y en fase estacionaria de crecimiento. Los crioprotectores empleados para el ensayo fueron glicerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$) y dimetil sulfóxido (CH_3SO ; DMSO) (CH_3), ambos se utilizaron en una concentración final al 10% de forma individual para cada caso. Cada uno de los crioprotectores se mezcló con una alícuota del cultivo de *Amphora* sp. manteniendo una proporción 1:1 (7.5 ml de cultivo: 7.5 ml de crioprotector), las mezclas fueron agitadas y se empleó un tiempo de equilibrio de 10 minutos a temperatura ambiente, transcurrido dicho tiempo las mezclas fueron colocadas en pajillas (Cassou straw marca IMV Technologies®) con la utilización de una bomba de vacío (marca Cole-Parmer Instrument Company®).

Para la criopreservación, se empleó la técnica de congelación en “dos pasos” que es ampliamente utilizada para la criopreservación algal (Lepesteur *et al.*, 1993; Cañavate y Lubian, 1997; Rhodes *et al.*, 2006), dicha técnica consistió en el enfriamiento de las muestras en las pajillas a -80 °C por 10 minutos y posteriormente las pajillas fueron sumergidas en nitrógeno líquido (-196 °C) por 10 minutos. Las pajillas fueron recuperadas del nitrógeno líquido, colocadas en las portapajillas y guardadas en un estanque de almacenamiento (-196 °C) por 24 horas.

Transcurrido el periodo de criopreservación, se realizó el descongelamiento de las muestras a una temperatura de 45 °C que fue proporcionada por un baño María marca Boekel Scientific®, el tiempo de descongelamiento fue de 14 segundos aproximadamente. Al ser descongeladas, las muestras se recuperaron y se utilizaron como inóculo (3 ml) en tubos de ensayo previamente esterilizados y conteniendo 5 ml de medio “f” (Guillard y Ryther, 1962). El mantenimiento de los cultivos se realizó de acuerdo a la metodología descrita en la sección 2.2.

Se evaluó la viabilidad celular para el crecimiento de los cultivos criopreservados en nitrógeno líquido, de acuerdo a lo descrito previamente en la sección 2.8.1. El crecimiento, los parámetros poblacionales y el tamaño de las células fueron obtenidos de la manera descrita anteriormente en la sección 2.4. La composición proximal, que incluye proteínas, lípidos, pigmentos, peso seco y contenido de cenizas fue obtenida para cada caso conforme a lo descrito en la sección 2.5. Además, se verificó la presencia de *Vibrio* en los cultivos según lo descrito en la sección 2.8.2.

2.10. Análisis estadístico

Se tomaron en consideración las hipótesis que fundamentan la estadística paramétrica y que son, la normalidad, homogeneidad de varianzas e independencia de los datos (Zar, 1984). Se utilizó un diseño completamente aleatorizado (DCA).

Para identificar las diferencias significativas entre los tratamientos experimentales se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de una y de dos vías (Sokal y Rohlf, 1995) según lo siguiente:

El crecimiento y los parámetros poblacionales se evaluaron con un ANOVA de una vía, en donde el factor A (Fuente de luz; $a=5$) se encuentra conformado por 5 niveles (luz blanca, azul, verde, amarilla y GroLux), esto se realizó para comparación de medias entre los tratamientos para cada uno de los días de cultivo. Se evaluó el crecimiento poblacional por medio de un Análisis de covarianza o ANCOVA en donde se utilizó el tiempo en días como covariable. Para el análisis del tamaño celular y el efecto del tipo de luz en la fase exponencial y estacionaria de crecimiento se realizó un ANOVA de dos vías.

Para el análisis de la composición proximal, en el que incluye el análisis de proteínas, carbohidratos, lípidos y pigmentos, se utilizó una de varianza de una vía, para comparar las posibles diferencias entre los días de cultivo muestreados. Además, se aplicó a los datos un ANOVA de dos vías, en donde:

El factor A (Fuente de luz, $a=5$) se encuentra conformado por 5 niveles (luz blanca, azul, verde, amarilla y GroLux), el factor B (fases de crecimiento; $c=2$) en el cual se tienen 2 niveles (fase exponencial y fase estacionaria temprana).

Para evaluar las posibles diferencias en la optimización de proteínas, se utilizó un análisis de varianza de tres vías o ANOVA multivariado para comparar el efecto de la concentración de hidróxido, la temperatura y el número de extracciones.

En el análisis de las posibles diferencias estadísticas presentes en el ensayo de criopreservación se aplicó un ANOVA de dos vías, esto para evaluar los parámetros poblacionales y la composición proximal, en donde se tiene el factor A (Crioprotector $a=2$)

que se encuentra conformado por 2 niveles (glicerol y DMSO) y el factor B (Fuente de luz, $\alpha=5$) se encuentra conformado por 5 niveles (luz blanca, luz azul, luz verde, luz amarilla y GroLux). Para evaluar el crecimiento poblacional en el tratamiento del crioprotector glicerol, se realizó un Análisis de covarianza (ANCOVA) en donde se utilizó el tiempo en días como covariable y para la evaluación en el tratamiento del crioprotector DMSO se realizó un ANOVA para cada uno de los días de cultivo.

Los parámetros fotosintéticos, las propiedades ópticas y la cantidad de energía fotosintéticamente utilizable se compararon con un análisis de varianza de una vía para cada caso.

En aquellos casos que presentaron diferencias significativas en el análisis estadístico utilizado, se aplicó una prueba *a posteriori* de comparación de medias de Tukey.

Se trabajó con un nivel de confianza de 95% ($\alpha = 0.05$), utilizando el programa Statistica® versión 9 (StatSoft, 2014).

Capítulo 3. Resultados

3.1. Características espectrales de emisión las fuentes de luz

Se obtuvieron los espectros de las fuentes de luz utilizadas en los ensayos de evaluación del efecto de la composición espectral de la luz y de la irradiancia en los cultivos de *Amphora* sp. (Figura 1).

El espectro de emisión de la luz blanca (LB, marca Philips catálogo F40T12/DX) tiene su valor máximo de emisión entre los 500 a 550 nm y presenta un amplio espectro de emisión que se distribuye desde los 400 hasta los 700 nm. El espectro de emisión de la luz azul (LA, marca General Electric catálogo F40B) presenta un valor de emisión máxima entre los 450 a 500 nm; sin embargo, el espectro de emisión se extiende de los 380 a los 600 nm. El espectro de emisión de la luz verde (LV, marca General Electric catálogo F40G) presenta su valor máximo de emisión espectral entre los 510 a 550 nm y su espectro total se distribuye desde los 500 nm a 600 nm de longitud de onda. El espectro de emisión de la luz amarilla (LM, marca Sylvania Gold catálogo F40/GO) tiene un valor máximo de emisión entre los 580 y los 620 nm, y su espectro de emisión va de los 550 nm a 700 nm. La emisión máxima de la luz GroLux (GL, marca Sylvania catálogo F40/GROWS) se encontró entre los 600 y los 700 nm, presenta un amplio espectro que se distribuye de los 400 nm a 750 nm, lo que resulta en un espectro de emisión de menor energía radiante en comparación con la luz azul o con la luz verde.

A partir de los espectros de las fuentes de luz, se obtuvieron las distribuciones espectrales del flujo de la energía radiante para cada tipo de luz (Figura 2). Se encontró que el mayor flujo de energía fue proporcionado por la luz verde y la cual aporta $1.2 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ como valor máximo, el menor flujo de energía radiante se presentó en la fuente de luz blanca con un valor de $0.2 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

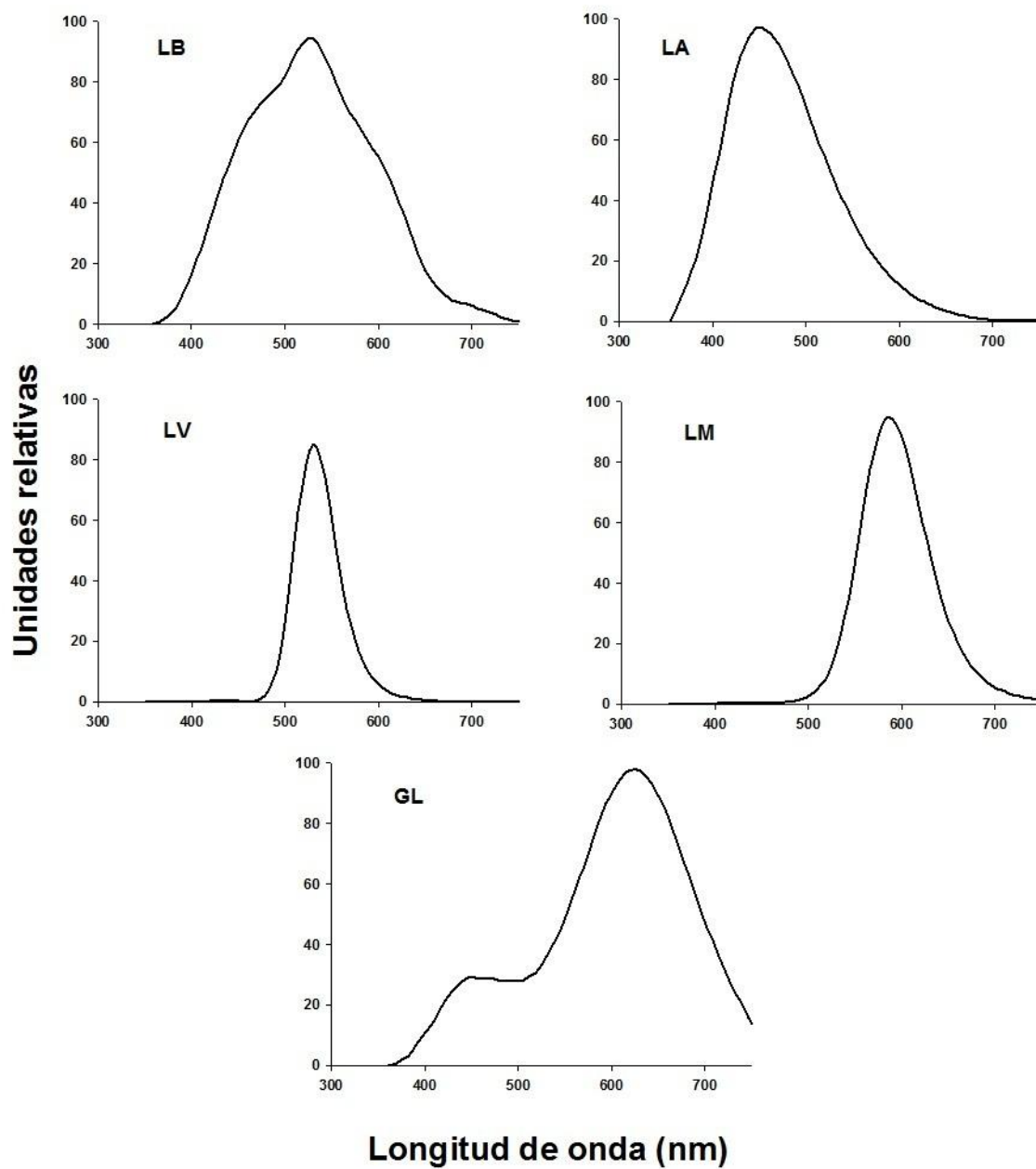


Figura 1. Espectro de emisión de las lámparas fluorescentes de luz blanca (LB, marca Philips catálogo F40T12/DX), luz azul (LA, marca General Electric catálogo F40B), luz verde (LV, marca General Electric catálogo F40G), luz amarilla (LM, marca Sylvania Gold catálogo F40/GO) y luz GroLux (GL, marca Sylvania catálogo F40/GRO/WS).

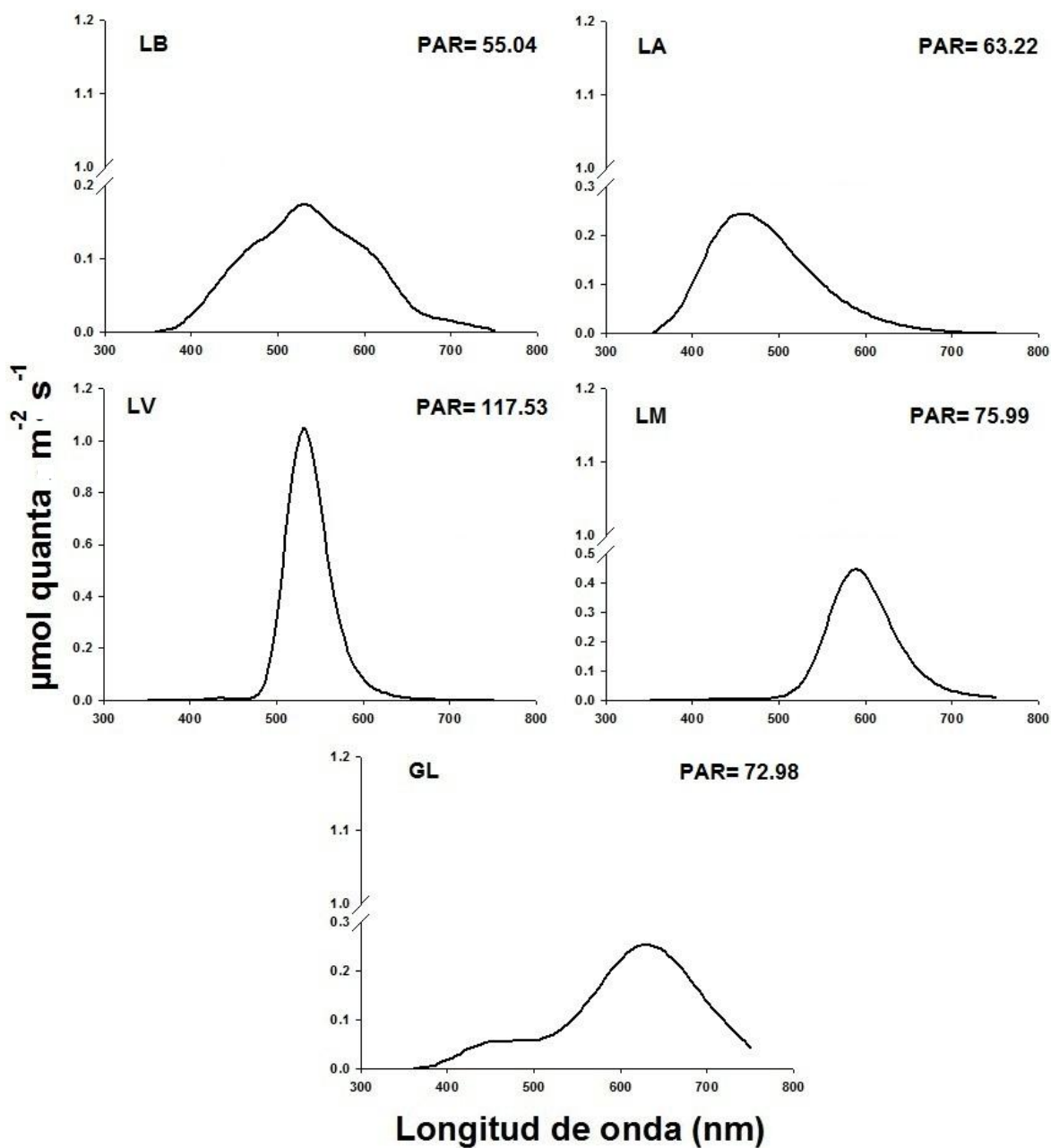


Figura 2. Distribución espectral de la densidad del flujo fotónico y PAR (radiación fotosintéticamente activa: $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de las lámparas fluorescentes de luz blanca (LB, marca Philips catálogo F40T12/DX), luz azul (LA, marca General Electric catálogo F40B), luz verde (LV, marca General Electric catálogo F40G), luz amarilla (LM, marca Sylvania Gold catálogo F40/GO) y luz GroLux (GL, marca Sylvania catálogo F40/GRO/WS).

3.2. Crecimiento, tamaño celular y parámetros poblacionales

Se presenta la curva del crecimiento poblacional de *Amphora* sp. obtenida con los distintos espectros de emisión de los tipos de luz durante un periodo de cultivo de ocho días (Figura 3). Los espectros de emisión que estimularon una mayor densidad celular son los de la luz azul ($1'293,750 \pm 59,261$) y los de la luz verde ($1'258,750 \pm 98,099$ cél ml^{-1}) al octavo día de cultivo. La menor densidad poblacional fue de $878,750 \pm 33,819$ cél ml^{-1} y se obtuvo con la utilización de la luz amarilla. Se encontró que la fase de crecimiento exponencial presentó una duración de 4 días para todos los espectros de emisión de luz utilizados, pero con excepción de la luz azul, la cual presentó una fase de crecimiento exponencial con una duración de 5 días. Para ninguno de los cultivos de *Amphora* sp. mantenidos con los distintos tipos de luz se evaluó fase de aclimatación del crecimiento.

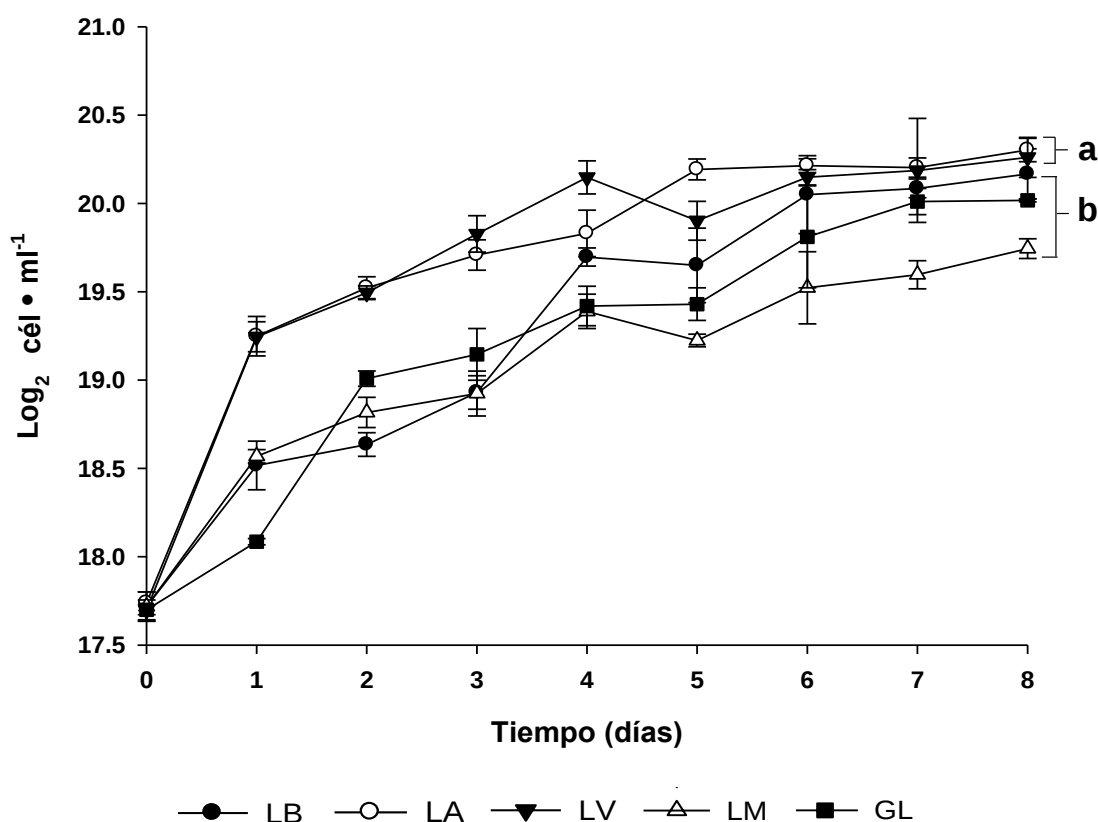


Figura 3. Valores promedio y desviación estándar de la densidad celular ($\text{Log}_2 \text{ cél } \text{ml}^{-1}$) de *Amphora* sp. cultivada con distinta composición espectral de luz blanca (LB), luz azul (LA), luz verde (LV), luz amarilla (LM) y GroLux (GL), a una irradiancia de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y un periodo de ocho días. Análisis de covarianza (ANCOVA) y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b$.

Al realizar un análisis de covarianza con el $\log_2$ de la densidad celular, se obtuvo que existían diferencias altamente significativas por efecto de la composición espectral de luz utilizada ($p = 0.0000$). Los distintos espectros de emisión de los tipos de luz ensayados presentaron relaciones lineales con el tiempo en días de cultivo, y el ajuste a dichas líneas, dado por los coeficientes de determinación (r^2), se encontraron entre el 89% y el 65%. No hay covarianza entre los tipos de luz y el tiempo en días de cultivo ($p = 0.0000$); por lo tanto, existe interacción entre ambos factores dado que las pendientes de las rectas presentaron diferencias altamente significativas ($p = 0.0000$).

Se presentan en la Tabla 1 los valores promedios en Log_2 obtenidos del crecimiento celular (cél ml^{-1}) de los cultivos de *Amphora* sp. con distinta composición espectral de la luz. El análisis de varianza de una vía para cada uno de los días de cultivo y los distintos tipos de luz, muestran que la luz verde y la luz azul presentan los valores mayores de densidad celular desde el día 1 hasta el día 3 de cultivo. La luz verde presenta el valor mayor (20.147 ± 0.094) al quinto día, mientras que la luz azul presenta el valor más alto también al quinto día de cultivo (20.192 ± 0.059). En los días 6 y 7 de cultivo se observa la fase de crecimiento estacionaria y no hay diferencias significativas en la densidad celular por efecto del espectro de emisión de la luz, excepto para la luz amarilla la cual presenta el menor crecimiento celular. Para el día 8 se tiene que los mayores crecimientos celulares fueron obtenidos con la luz blanca, la luz azul y la luz verde.

La evolución del pH de los cultivos de *Amphora* sp. obtenidos con distinta composición espectral de la luz (Figura 4), muestran un incrementó hasta el día 3 en donde se obtuvieron los valores máximos de pH, los que oscilaron entre 8.41 y 9.03 para todos los espectros de emisión de los tipos de luz, siendo el mayor valor obtenido con la luz verde (8 día de cultivo) sin presentar diferencia con la luz azul, amarilla y roja, mientras que el menor valor correspondiente al tratamiento de luz blanca. Al comparar los valores de pH y el tipo de luz, se encontró que los menores valores de pH se presentaron con la luz blanca durante todos los días de cultivo.

Tabla 1. Valores promedios y desviación estándar del Log₂ de la densidad celular (cél ml⁻¹) de *Amphora* sp. cultivada con distinta composición espectral de luz blanca (LB), luz azul (LA), luz verde (LV), luz amarilla (LM) y GroLux (GL), a una irradiancia de 50 µmol m⁻² s⁻¹ durante un periodo de ocho días.

Tiempo (días)	Tratamiento	Log ₂ densidad celular (cél ml ⁻¹)
0	LB	17.718 (0.083) ^{ns}
	LA	17.739 (0.000) ^{ns}
	LV	17.699 (0.056) ^{ns}
	LM	17.718 (0.083) ^{ns}
	GL	17.700 (0.028) ^{ns}
1	LB	18.517 (0.138) ^b
	LA	19.249 (0.112) ^a
	LV	19.245 (0.085) ^a
	LM	18.569 (0.038) ^b
	GL	18.085 (0.018) ^c
2	LB	18.635 (0.067) ^d
	LA	19.523 (0.062) ^a
	LV	19.494 (0.039) ^a
	LM	18.817 (0.085) ^c
	GL	19.008 (0.043) ^b
3	LB	18.930 (0.095) ^b
	LA	19.708 (0.086) ^a
	LV	19.827 (0.103) ^a
	LM	18.924 (0.127) ^b
	GL	19.145 (0.146) ^b
4	LB	19.696 (0.051) ^b
	LA	19.831 (0.131) ^b
	LV	20.147 (0.094) ^a
	LM	19.389 (0.097) ^c
	GL	19.419 (0.112) ^c
5	LB	19.649 (0.211) ^{bc}
	LA	20.192 (0.059) ^a
	LV	19.902 (0.110) ^{ab}
	LM	19.224 (0.036) ^d
	GL	19.430 (0.092) ^{cd}
6	LB	20.049 (0.211) ^a
	LA	20.214 (0.039) ^a
	LV	20.148 (0.043) ^a
	LM	19.523 (0.204) ^b
	GL	19.811 (0.289) ^{ab}
7	LB	20.085 (0.053) ^a
	LA	20.203 (0.055) ^a
	LV	20.187 (0.295) ^a
	LM	19.596 (0.079) ^b
	GL	20.011 (0.074) ^a
8	LB	20.167 (0.142) ^{ab}
	LA	20.302 (0.066) ^a
	LV	20.261 (0.114) ^a
	LM	19.744 (0.056) ^c
	GL	20.017 (0.009) ^b

Análisis de varianza de una vía para cada día de cultivo y tipo de luz, prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha=0.05$; a>b>c>d; ns (diferencia no significativa).

Se realizó un análisis de covarianza con los valores de pH y se obtuvo que existían diferencias altamente significativas entre los tipos de luz utilizados ($p = 0.0000$). Los distintos tipos de la luz ensayados no presentaron relaciones lineales con el tiempo en días de cultivo. No hay covarianza entre los tipos de luz y el tiempo en días de cultivo ($p = 0.0000$); por lo tanto, existe interacción entre ambos factores dado que las pendientes de las rectas presentaron diferencias altamente significativas ($p = 0.0000$).

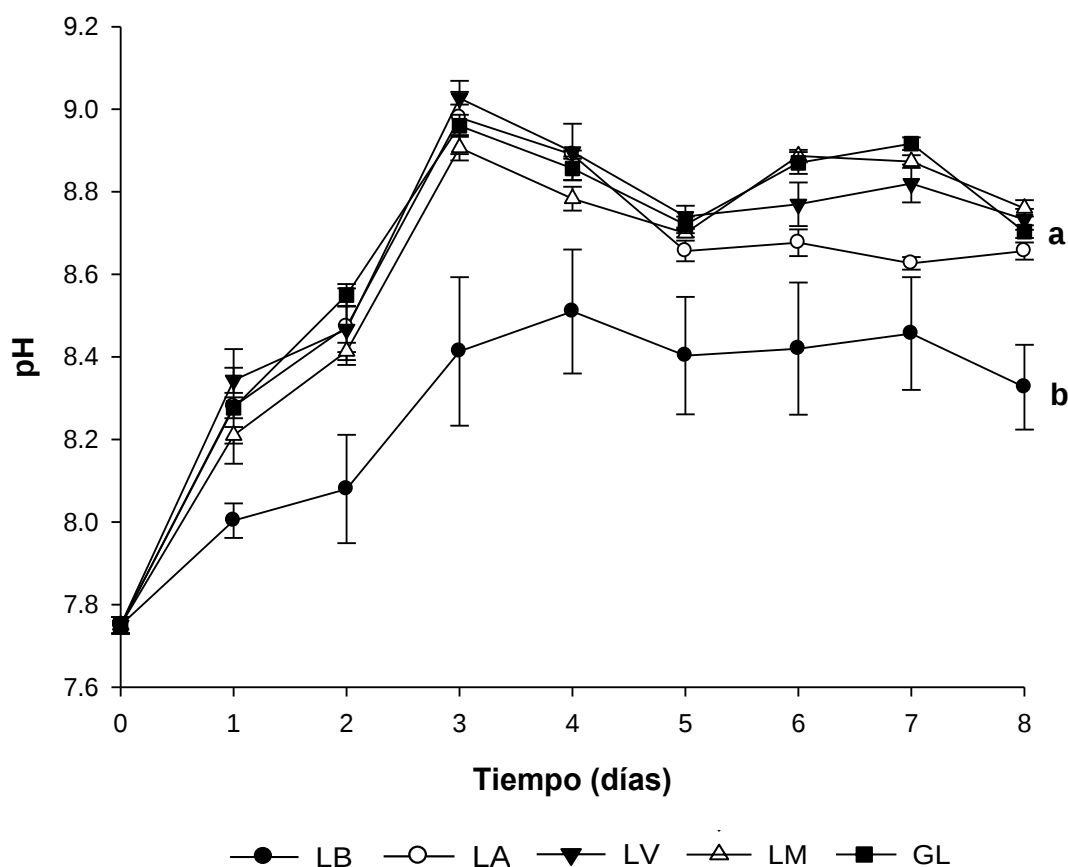


Figura 4. Evolución del pH durante el crecimiento poblacional de *Amphora* sp. cultivada con luz blanca (LB), luz azul (LA), luz verde (LV), luz amarilla (LM) y GroLux (GL), a una irradiancia de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y durante un periodo de 8 días. Análisis de covarianza (ANCOVA) y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b$.

Los parámetros poblacionales de *Amphora* sp. obtenidos con los distintos tipos de luz y durante un periodo de cultivo de ocho días (Tabla 2), muestran que la tasa de crecimiento presentó diferencias altamente significativas por efecto de los distintos tipos de luz ($p = 0.0000$). La mayor tasa de crecimiento se presentó con la luz verde con un

valor de 0.612 ± 0.023 divisiones día⁻¹ y las menores tasas de crecimiento se obtuvieron con la luz amarilla y la GroLux con valores de 0.417 ± 0.024 días y 0.430 ± 0.028 divisiones día⁻¹, respectivamente.

El análisis de varianza de una vía realizado con los valores del tiempo de generación, resultó que existen diferencias altamente significativas por efecto de los distintos tipos de luz ($p = 0.0000$). El mayor tiempo de generación se presentó en el tratamiento con luz amarilla (2.402 ± 0.143 días), mientras que el menor tiempo de generación se obtuvo con el tratamiento con luz verde (1.636 ± 0.062 días).

Tabla 2. Valores promedio y desviación estándar de la tasa de crecimiento (μ : divisiones día⁻¹), el tiempo de generación (T_g : días) y la densidad celular máxima (DCM: cél ml⁻¹ x10⁶) de los cultivos de *Amphora* sp., mantenidos con distinta composición espectral de la luz.

Tratamiento	μ	T_g	DCM
Luz Blanca	0.494 (0.013) ^b	2.024 (0.051) ^b	1.181 (0.119) ^{ab}
Luz Azul	0.491 (0.012) ^b	2.039 (0.049) ^b	1.294 (0.059) ^a
Luz Verde	0.612 (0.023) ^a	1.636 (0.062) ^c	1.259 (0.981) ^{ab}
Luz Amarilla	0.417 (0.024) ^c	2.402 (0.143) ^a	0.878 (0.338) ^c
GroLux	0.430 (0.028) ^c	2.333 (0.147) ^a	1.061 (0.006) ^{bc}

ANOVA de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b>c$.

Los resultados del tamaño celular de *Amphora* sp. se muestran en la Tabla 3, se encontró que en el largo de las células existieron diferencias altamente significativas por el factor tiempo o fase de crecimiento ($p = 0.0085$) y no existieron diferencias significativas entre los distintos tipos de luz ensayados ($p = 0.5885$). Resultó que no existe interacción entre ambos factores ($p = 0.9087$). En general se tiene que las células de *Amphora* sp., fueron más largas en la fase de crecimiento exponencial (día 3) y estacionaria (día 8) con respecto a la fase inicial (día 0) de crecimiento.

El análisis del ancho celular de *Amphora* sp. mostró que existieron diferencias altamente significativas en el factor tiempo o fase de crecimiento ($p = 0.0000$) y no existieron diferencias significativas entre los distintos tipos de luz ensayados ($p = 0.1002$), además existió interacción entre ambos factores ($p = 0.0304$). Las células de *Amphora* sp. fueron más delgadas en la fase inicial de crecimiento (día 0), y el mayor ancho celular fue 15.299 ± 1.485 μm en la fase de crecimiento estacionaria (día 8) con el tratamiento de GroLux.

Tabla 3. Valores promedio y desviación estándar del tamaño celular de *Amphora* sp., cultivada con distinta composición espectral.

Tratamiento	Día 0		Día 3		Día 8	
	Largo	Ancho	Largo	Ancho	Largo	Ancho
Luz blanca	22.956 (3.129) ^b	12.878 (1.717) ^c	24.123 (2.965) ^a	12.641 (1.406) ^c	24.439 (2.661) ^a	13.667 (1.972) ^{bc}
Luz azul	22.956 (3.129) ^b	12.878 (1.717) ^c	24.117 (3.022) ^a	13.551 (1.441) ^{bc}	24.127 (2.333) ^a	14.556 (2.127) ^{ab}
Luz verde	22.956 (3.129) ^b	12.878 (1.717) ^c	23.185 (3.099) ^a	12.520 (1.372) ^c	23.645 (2.698) ^a	14.332 (1.806) ^{ab}
Luz amarilla	22.956 (3.129) ^b	12.878 (1.717) ^c	23.776 (3.612) ^a	12.357 (1.196) ^c	23.560 (2.667) ^a	14.714 (1.559) ^{ab}
GroLux	22.956 (3.129) ^b	12.878 (1.717) ^c	24.093 (3.316) ^a	12.547 (1.757) ^c	24.761 (2.514) ^a	15.299 (1.485) ^a

ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b>c$.

3.3. Composición proximal

3.3.1 Optimización en la extracción de proteínas

Al efectuar la optimización de la extracción de proteínas para los cultivos de *Amphora* sp., se encontró que el mayor contenido de proteínas fue de 37.108 ± 3.019 pg cél⁻¹, el cual resultó al utilizar el NaOH al 0.3 N con un periodo de 15 minutos en baño María a 100 °C de temperatura y con una sola extracción. El menor contenido de proteínas 6.538 ± 0.583 pg cél⁻¹ se obtuvo con NaOH al 0.2 N durante 30 minutos en baño María y con una doble extracción (Figura 5).

Al realizar un análisis de varianza de dos vías con los valores del contenido total de proteína, se obtuvo que existían diferencias altamente significativas entre los tiempos de extracción de 15 y 30 minutos ($p = 0.0006$), siendo mayor el contenido de proteína total en el tiempo de 15 minutos con dos extracciones.

Con el análisis de varianza de tres vías se observó que existían diferencias altamente significativas entre los diferentes tiempos de extracción ensayados ($p = 0.0001$) y el número de extracciones ($p = 0.0000$). No se encontraron diferencias significativas entre las distintas concentraciones de hidróxido de sodio utilizadas ($p = 0.3670$). Sin

embargo, se detectó una interacción entre las distintas concentraciones de hidróxido de sodio y el número de extracciones ($p= 0.0450$), lo que indica que el efecto de la concentración del hidróxido de sodio depende del número de extracción.

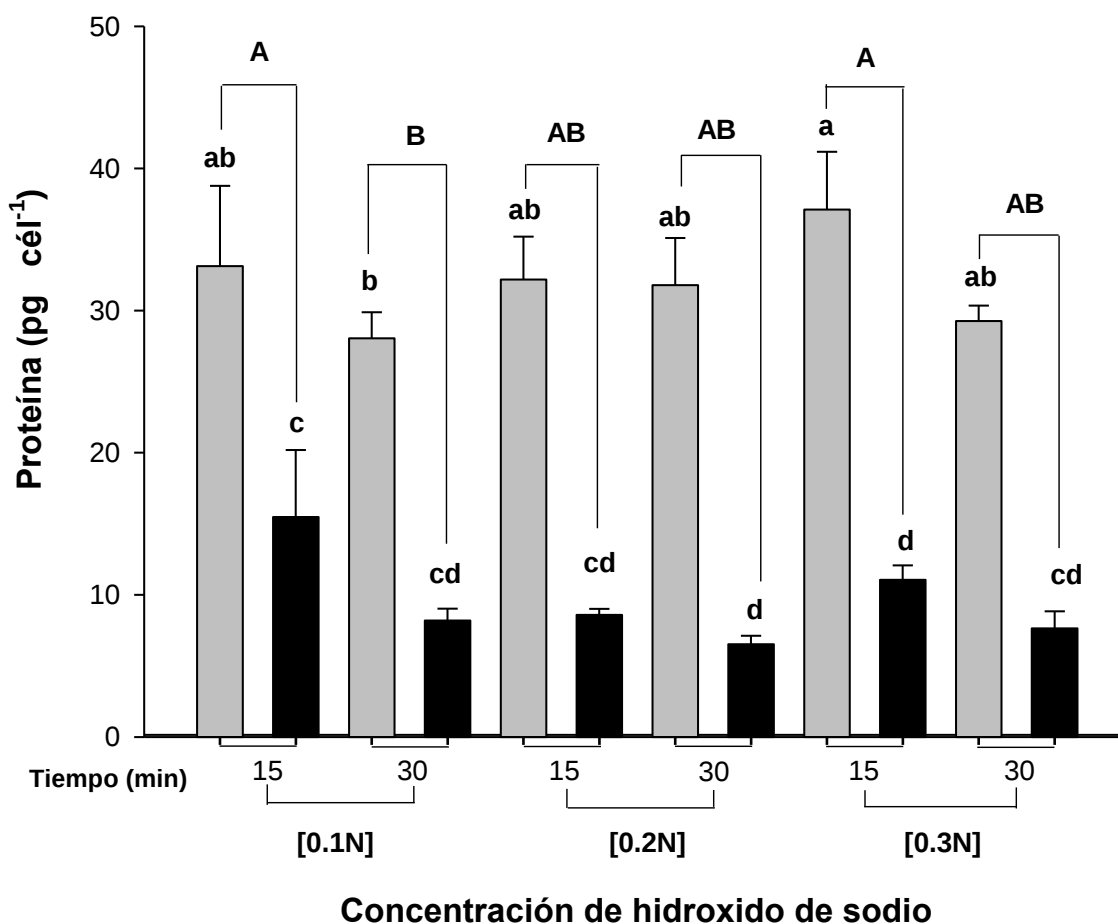


Figura 5. Valores promedio y desviación estándar del contenido de proteína (pg cél⁻¹) de *Amphora* sp., durante el ensayo de optimización de extracción de proteína utilizando una (■) o dos extracciones (■), dos tiempos de extracción (15 y 30 minutos) y tres distintas concentraciones de NaOH (0.1, 0.2 y 0.3 N). ANOVA de dos vías (concentración de NaOH y tiempo) y prueba a posteriori de Tukey $\alpha=0.005$; A>B. ANOVA de tres vías (NaOH, tiempo y extracción) y prueba a posteriori de Tukey $\alpha=0.05$; a>b>c>d.

3.2.2 Contenido de proteínas

El contenido de proteína (pg cél^{-1}) de *Amphora* sp. presentó diferencias altamente significativas por efecto de los distintos tipos de luz utilizados en los cultivos ($p = 0.0000$) y por efecto de las fases de crecimiento ($p = 0.0062$) (Figura 6). Existió también una interacción entre ambos factores ($p = 0.0030$). El mayor contenido de proteína se obtuvo con la luz amarilla en la fase de crecimiento estacionaria (día 8) y fue de $54.813 \pm 4.759 \text{ pg cél}^{-1}$; sin embargo, no existieron diferencias significativas con los contenidos de proteína alcanzados con la luz amarilla ($52.018 \pm 7.191 \text{ pg cél}^{-1}$) y la luz blanca ($51.089 \pm 6.331 \text{ pg cél}^{-1}$) en la fase de crecimiento exponencial (día 3). El menor contenido de proteína resultó con la luz verde en la fase de crecimiento exponencial ($27.170 \pm 2.542 \text{ pg cél}^{-1}$).

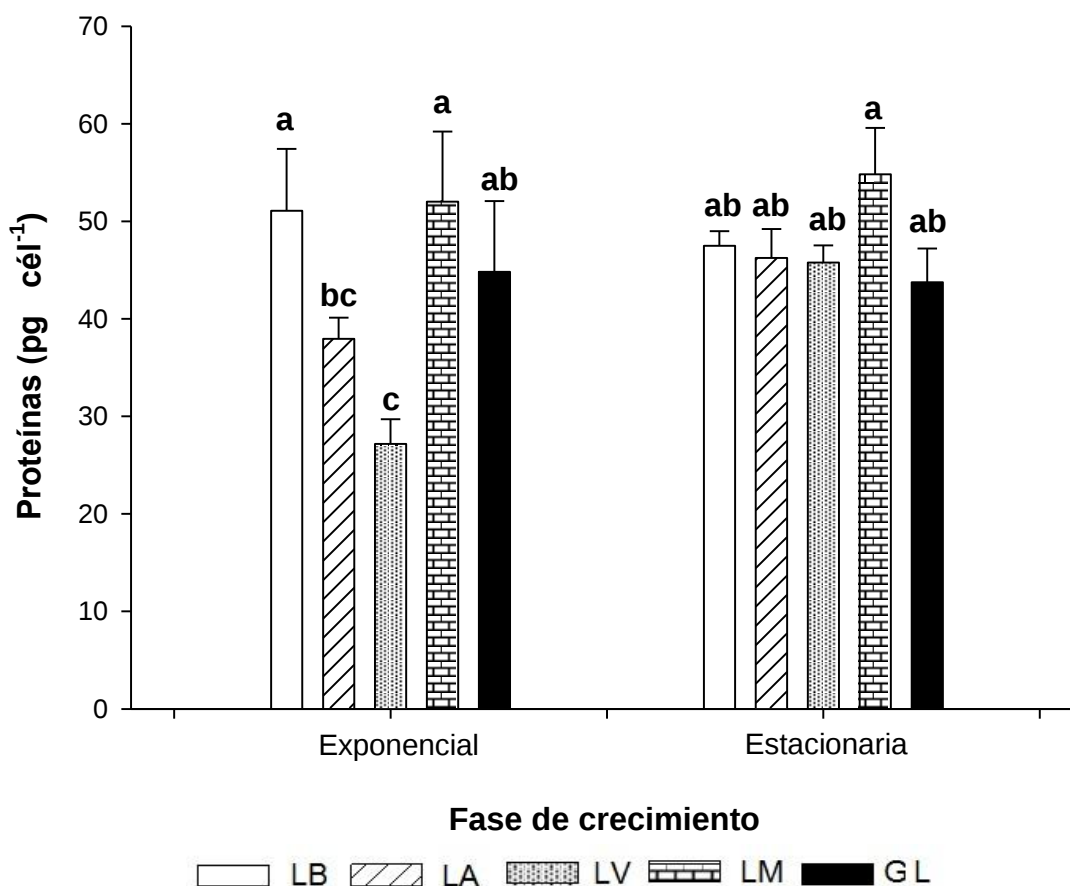


Figura 6. Valores promedio y desviación estándar del contenido de proteínas (pg cél^{-1}) de *Amphora* sp., cultivada con distinta composición espectral de luz blanca (LB), luz azul (LA), luz verde (LV), luz amarilla (LM) y GroLux (GL), a una irradiancia de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y dos fases de crecimiento: exponencial y estacionaria. Contenido de proteína obtenido con una concentración de NaOH 0.1N, con dos extracciones y con un tiempo de extracción de 15 minutos. ANOVA de dos vías y prueba a posteriori de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b>c$.

3.3.3 Contenido de carbohidratos

El análisis de varianza de dos vías mostró que existían diferencias altamente significativas entre los distintos tipos de luz utilizados ($p = 0.0000$) y por las fases de crecimiento ($p = 0.0000$). Existió también una interacción entre ambos factores ($p = 0.0283$) (Figura 7). El mayor contenido de carbohidratos (12.592 ± 2.341 pg cél⁻¹) se obtuvo con la luz GroLux durante el octavo día de cultivo, mientras que el menor contenido se presentó bajo la luz azul (1.689 ± 0.758 pg cél⁻¹) durante la fase exponencial del cultivo (día 3).

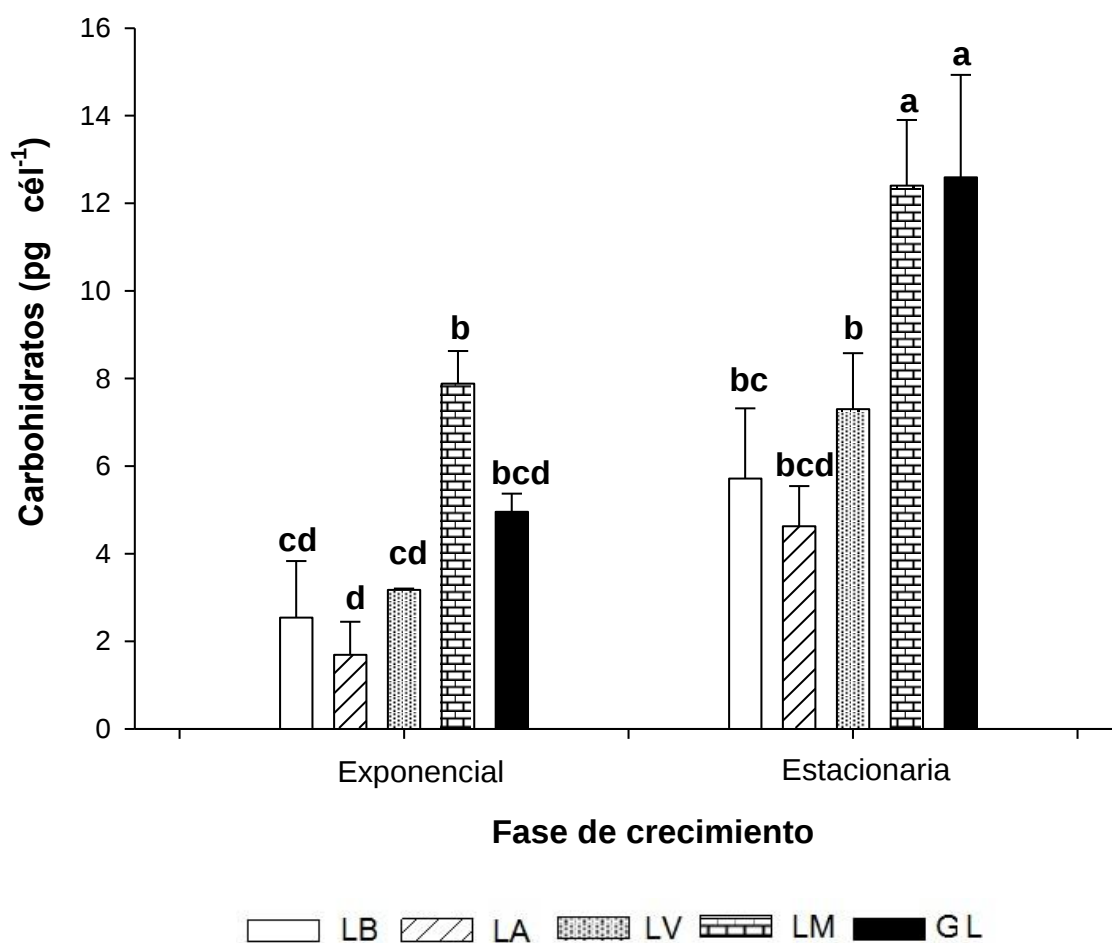


Figura 7. Valores promedio y desviación estándar del contenido de carbohidratos (pg cél⁻¹) de *Amphora* sp., cultivada con distinta composición espectral de luz blanca (LB), luz azul (LA), luz verde (LV), luz amarilla (LM) y GroLux (GL), a una irradiancia de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y dos fases de crecimiento: exponencial y estacionaria. ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b>c>d$.

3.3.4. Contenido de lípidos

El contenido de lípido resultó con diferencias altamente significativas entre los distintos tipos de luz utilizados ($p = 0.0004$) y las fases de crecimiento ($p = 0.0079$). Existió también una interacción entre ambos factores ($p = 0.0000$) (Figura 8). El contenido de lípido disminuyó con el tiempo, obteniendo los mayores valores en la fase exponencial, respecto los valores obtenidos en la fase estacionaria de crecimiento. El mayor contenido de lípidos se presentó durante la fase de crecimiento exponencial (día 3) bajo la luz GroLux (27.058 ± 6.310 pg cél⁻¹). El menor contenido de lípidos resultó en la fase de crecimiento estacionaria (día 8) (6.565 ± 0.314 pg cél⁻¹) al mantener los cultivos con la luz GroLux.

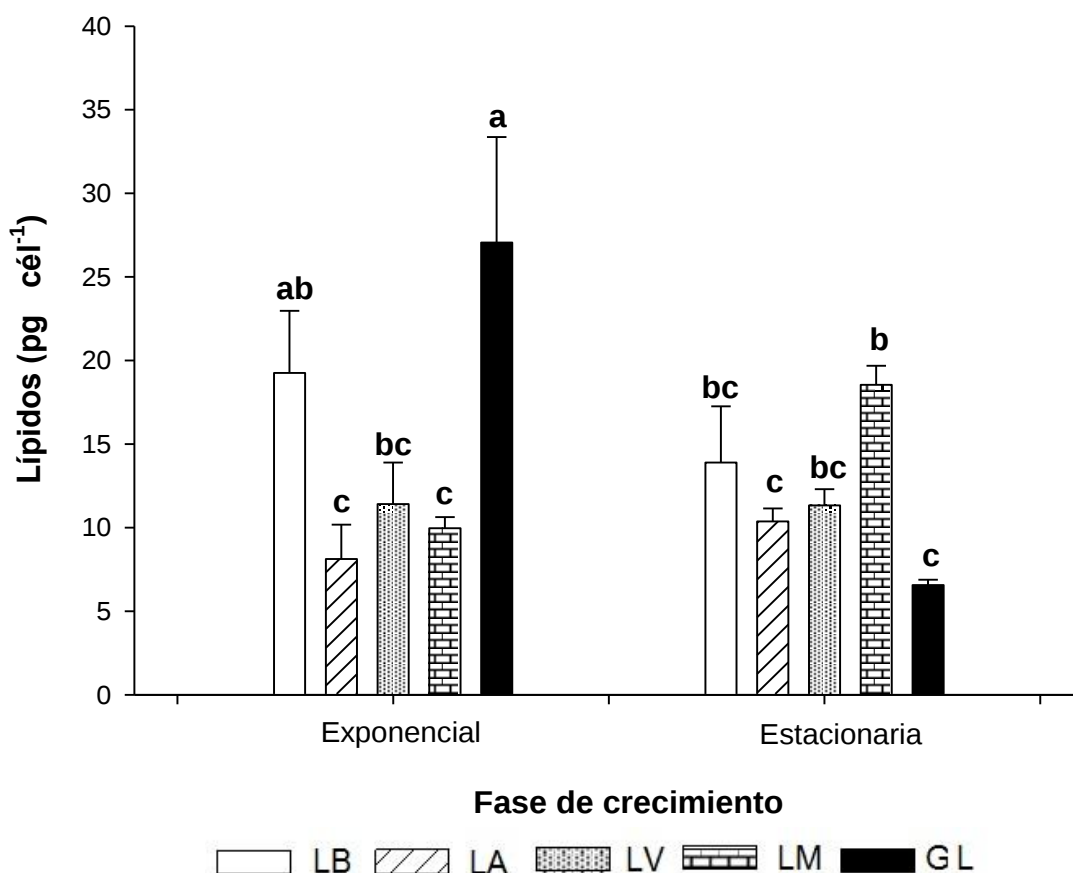


Figura 8. Valores promedio y desviación estándar del contenido de lípidos (pg cél⁻¹) de *Amphora* sp., cultivada con distinta composición espectral de luz blanca (LB), luz azul (LA), luz verde (LV), luz amarilla (LM) y GroLux (GL), a una irradiancia de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y dos fases de crecimiento: exponencial y estacionaria. ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b>c>d$.

3.3.5. Contenido de pigmentos

El contenido de clorofila *a* (clo *a*) resultó con diferencias altamente significativas por efecto de los distintos tipos de luz ($p = 0.0000$) y por las fases de crecimiento ($p = 0.0000$). Existió también una interacción entre ambos factores ($p = 0.0042$) (Figura 9). El mayor contenido de clorofila *a* se presentó con la luz amarilla (0.258 ± 0.026 pg cél⁻¹) durante la fase de crecimiento exponencial, mientras que el menor contenido (0.115 ± 0.023 pg cél⁻¹) fue en el tratamiento con luz azul en las dos fases de crecimiento (exponencial y estacionaria).

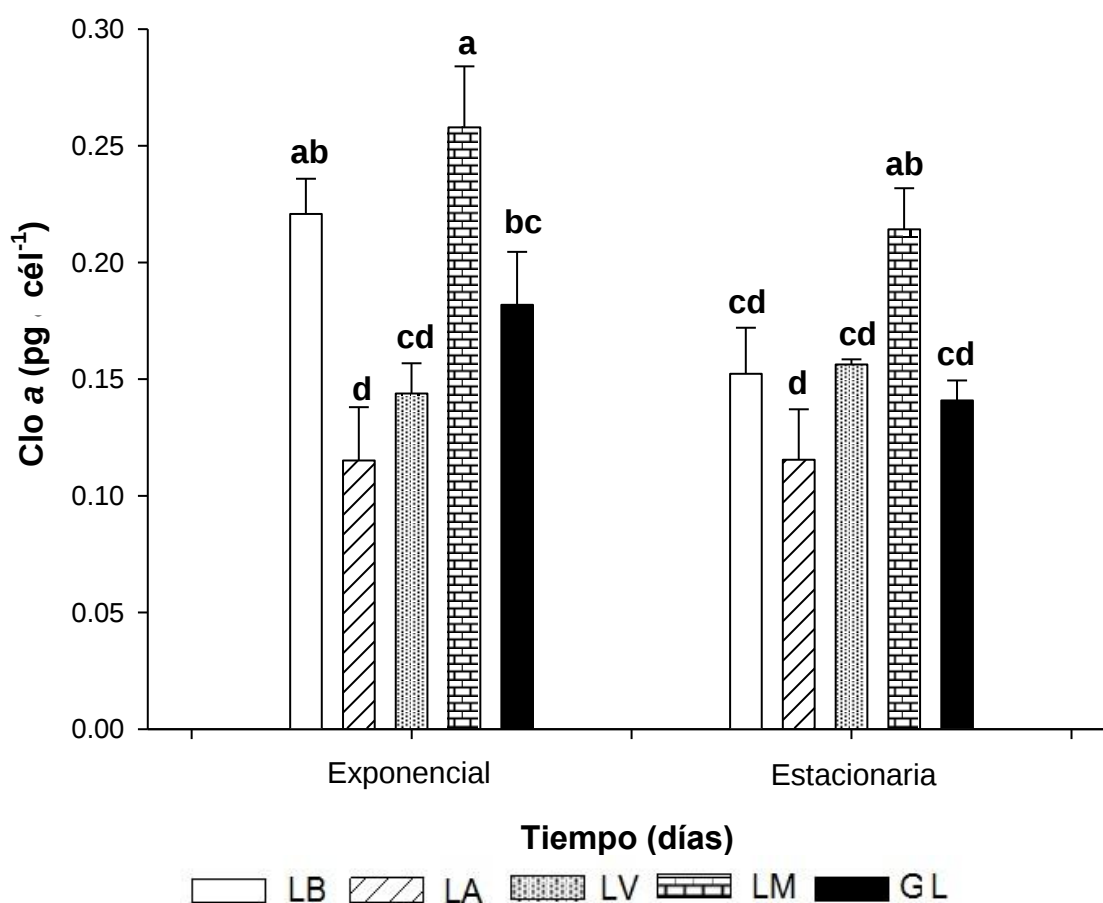


Figura 9. Valores promedio y desviación estándar del contenido de clorofila *a* (pg cél⁻¹) de *Amphora* sp., cultivada con distinta composición espectral de luz blanca (LB), luz azul (LA), luz verde (LV), luz amarilla (LM) y GroLux (GL), a una irradiancia de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y dos fases de crecimiento: exponencial (día 3) y estacionaria (día 8). ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b>c>d$.

El contenido de carotenoides presentó diferencias altamente significativas por efecto los distintos tipos de luz ($p = 0.0000$) y no existió diferencia significativa por efecto de las fases de crecimiento ($p = 0.8717$). No existió interacción entre los factores ($p = 0.0512$) (Figura 10). El mayor contenido de carotenoides resultó con el uso de la luz amarilla durante la fase exponencial (0.070 ± 0.006 pg cél⁻¹), seguido por el valor obtenido en la fase de crecimiento estacionaria por la misma fuente de luz de (0.067 ± 0.008 pg cél⁻¹), mientras que el menor contenido de carotenoides fue evaluado con luz azul en la fase de crecimiento exponencial (0.033 ± 0.006 pg cél⁻¹).

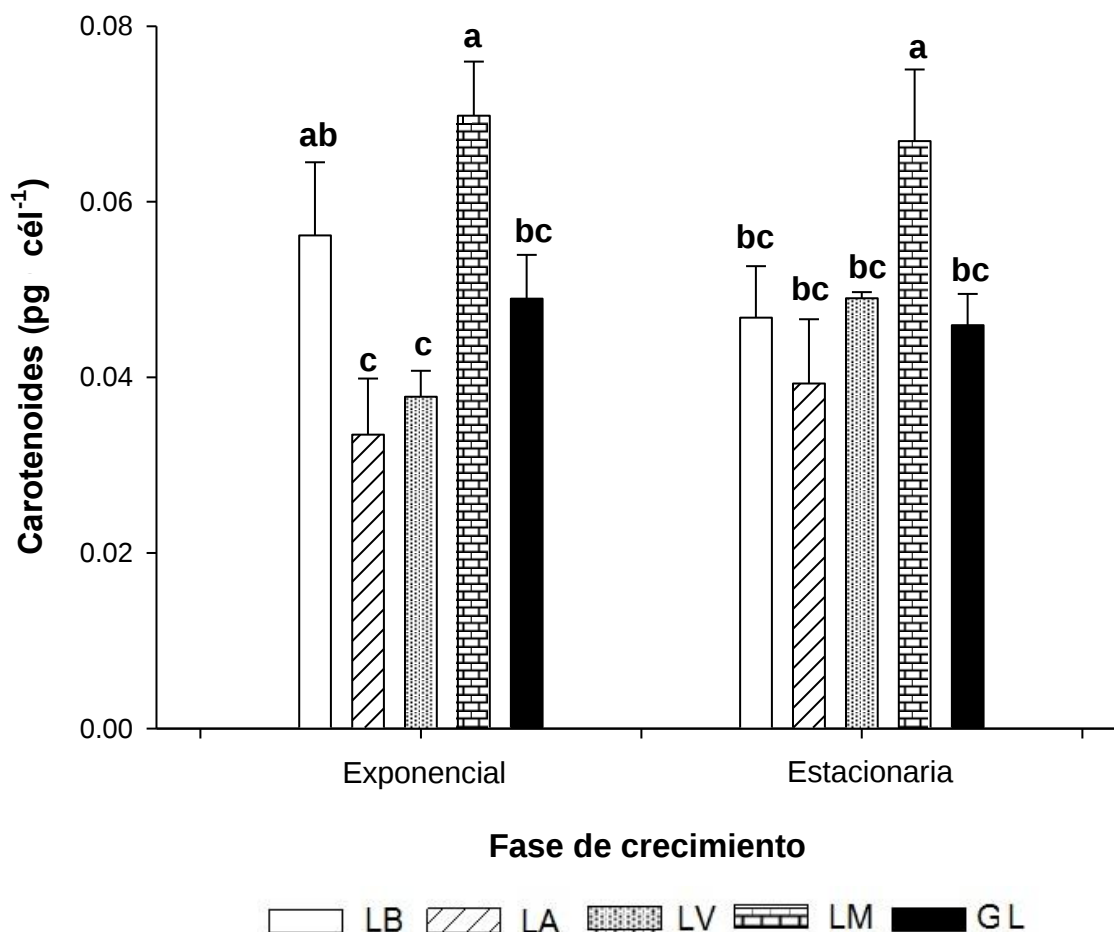


Figura 10. Valores promedio y desviación estándar del contenido de carotenoides (pg cél⁻¹) de *Amphora* sp., cultivada con distinta composición espectral de luz blanca (LB), luz azul (LA), luz verde (LV), luz amarilla (LM) y GroLux (GL), a una irradiancia de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y dos fases de crecimiento: exponencial y estacionaria. ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b>c$.

3.3.6. Peso seco orgánico y cenizas

Con base en los valores de peso seco orgánico (PSO) se observaron diferencias altamente significativas entre los distintos tipos de luz ($p = 0.0000$), existieron diferencias significativas entre las fases de crecimiento ($p = 0.0095$). Así mismo, se presentó una interacción entre ambos factores ($p = 0.0020$). Se tiene que en general, el PSO fue mayor en la fase de crecimiento exponencial (Figura 11), y el mayor valor de PSO se obtuvo con la luz amarilla en la fase de crecimiento exponencial (día 3) ($9.993 \pm 1.474 \text{ pg cél}^{-1}$). Sin embargo, el menor valor de PSO se midió en el tratamiento con luz verde en la fase de crecimiento exponencial (día 3) ($5.054 \pm 0.469 \text{ pg cél}^{-1}$) (Figura 11).

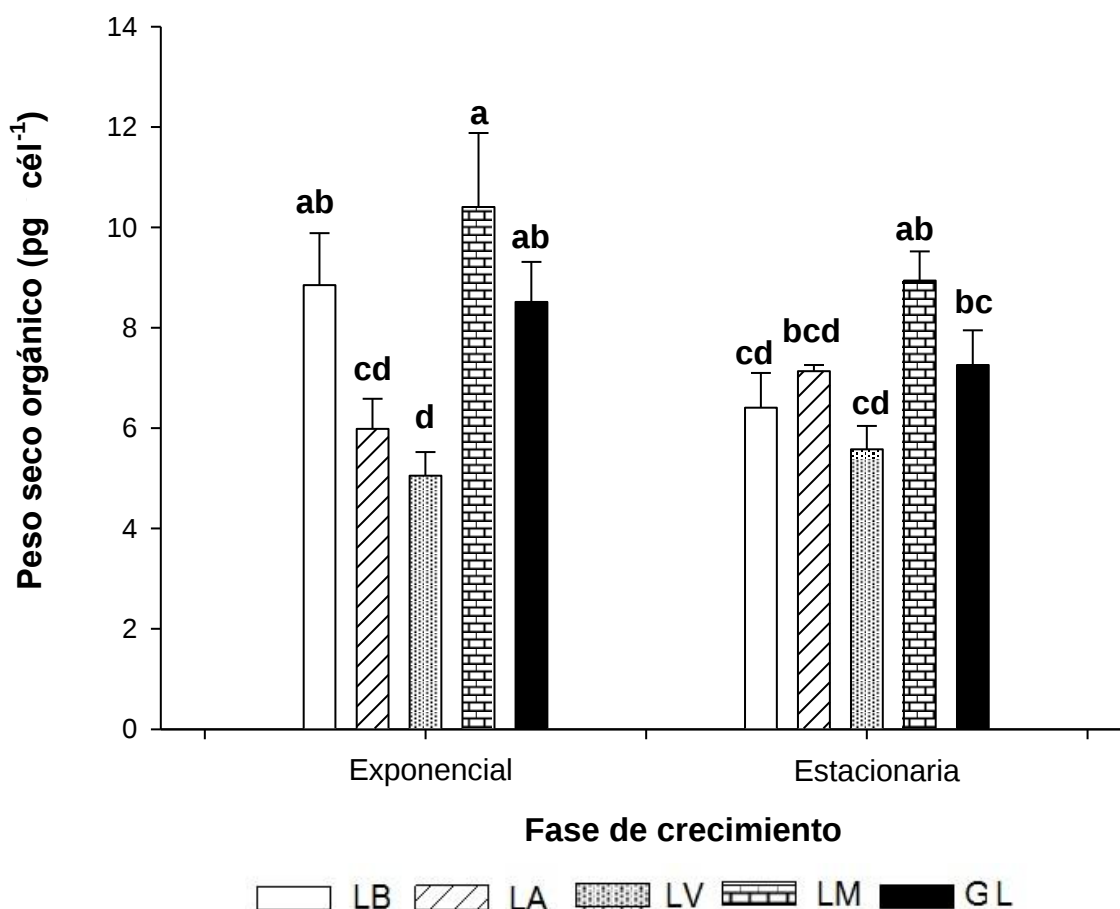


Figura 11. Valores promedio y desviación estándar del peso orgánico (pg cél^{-1}) de *Amphora* sp., cultivada con distinta composición espectral de luz blanca (LB), luz azul (LA), luz verde (LV), luz amarilla (LM) y GroLux (GL), a una irradiancia de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y dos fases de crecimiento: exponencial y estacionaria. ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b>c>d$.

Los valores de peso de cenizas (PC) mostraron diferencias altamente significativas por efecto de los distintos tipos de luz ensayados ($p = 0.0000$) y entre las fases de crecimiento ($p = 0.0000$), además se presentó una interacción entre ambos factores ($p = 0.0002$). El valor mayor de PC fue evaluado con el uso de la luz amarilla en el tercer día de cultivo (fase exponencial) ($24.017 \pm 3.261 \text{ pg cél}^{-1}$). Mientras que la luz verde produjo el menor valor de PC durante el octavo día (fase estacionaria) ($8.143 \pm 0.242 \text{ pg cél}^{-1}$) (Figura 12).

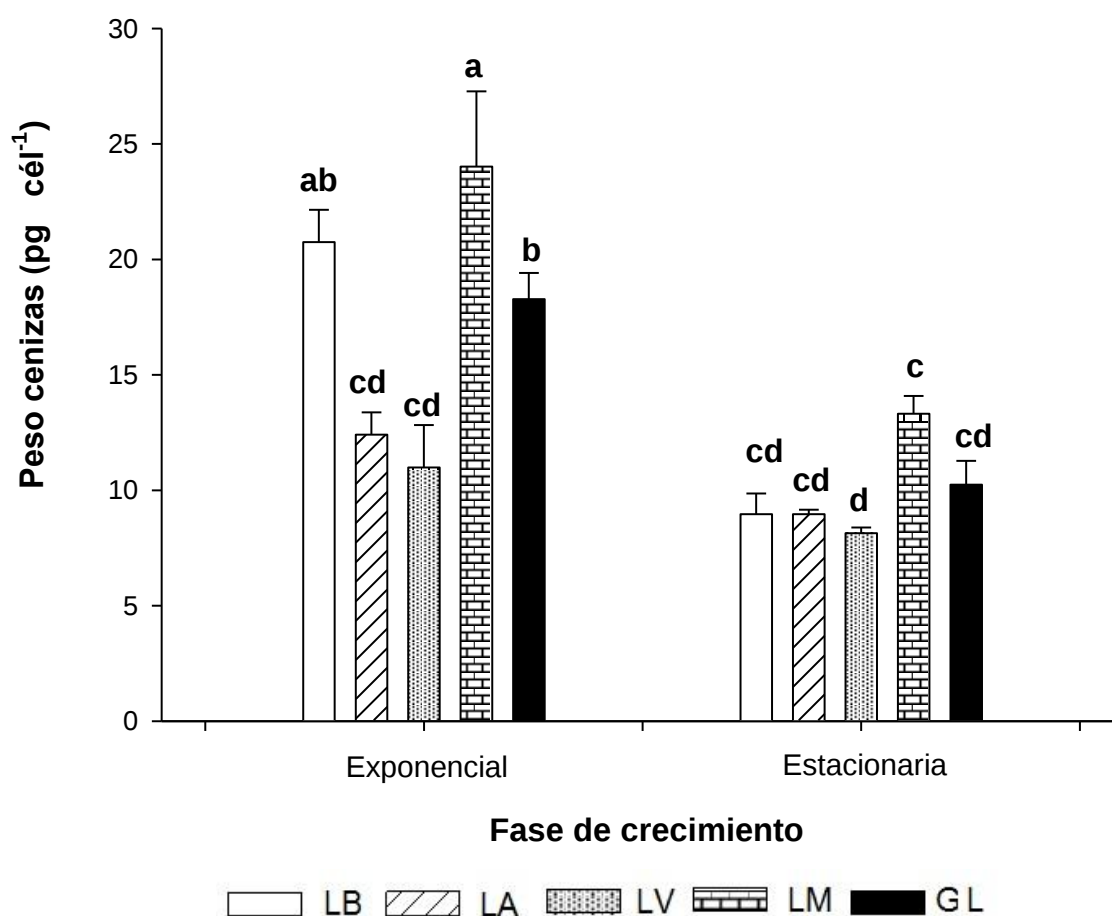


Figura 12. Valores promedio y desviación estándar del peso de cenizas (pg cél^{-1}) de *Amphora* sp., cultivada con distinta composición espectral de luz blanca (LB), luz azul (LA), luz verde (LV), luz amarilla (LM) y GroLux (GL), a una irradiancia de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y dos fases de crecimiento: exponencial y estacionaria. ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b>c>d$.

3.4. Propiedades de absorción de *Amphora* sp.

3.4.1. Coeficientes de absorción

Los coeficientes de absorción de *Amphora* sp. cultivada con luz blanca a una irradiancia de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, se obtuvieron para cada uno de los días de cultivo y se encontró que el coeficiente de absorción del material particulado (a_p) fue disminuyendo a lo largo del tiempo de cultivo, al igual que el coeficiente de absorción del detritus (a_d) (Figura 13).

Se obtuvieron los coeficientes de absorción del fitoplancton (a_{ph}) y de manera general se observan dos picos de absorción máxima, el primero de ellos entre los 400 y los 480 nm (440 nm) que se encuentra a la región del color azul (440 nm) y el segundo se encuentra entre los 650-700 nm (674 nm), que corresponde a la región del color rojo del espectro electromagnético. Se observa que la forma de los espectros se mantiene en cada uno de los días con la excepción de la magnitud, ya que está fue aumentando conforme la densidad poblacional también aumentaba (Figura 14A). El coeficiente de absorción del fitoplancton ($a_{ph(440)}$) se encontró entre 4.139 y 37.009 m^{-1} los cuales corresponden al día 0 y al día 10 de cultivo, respectivamente (Tabla 4).

3.4.2. Coeficiente específico de absorción

Se obtuvieron los coeficientes específicos de absorción del fitoplancton (a^*_{ph}) para el cultivo de *Amphora* sp. (Figura 14B) y se observa que los valores del coeficiente específico de absorción disminuyen conforme aumentaba el contenido de clorofila *a* (clo *a*) celular. El coeficiente específico de absorción ($a^*_{ph(440)}$) se encontró entre 0.024 (día 0 de cultivo) y 0.058 (día 8 de cultivo) $\text{m}^2 (\text{mg Clo } a)^{-1}$.

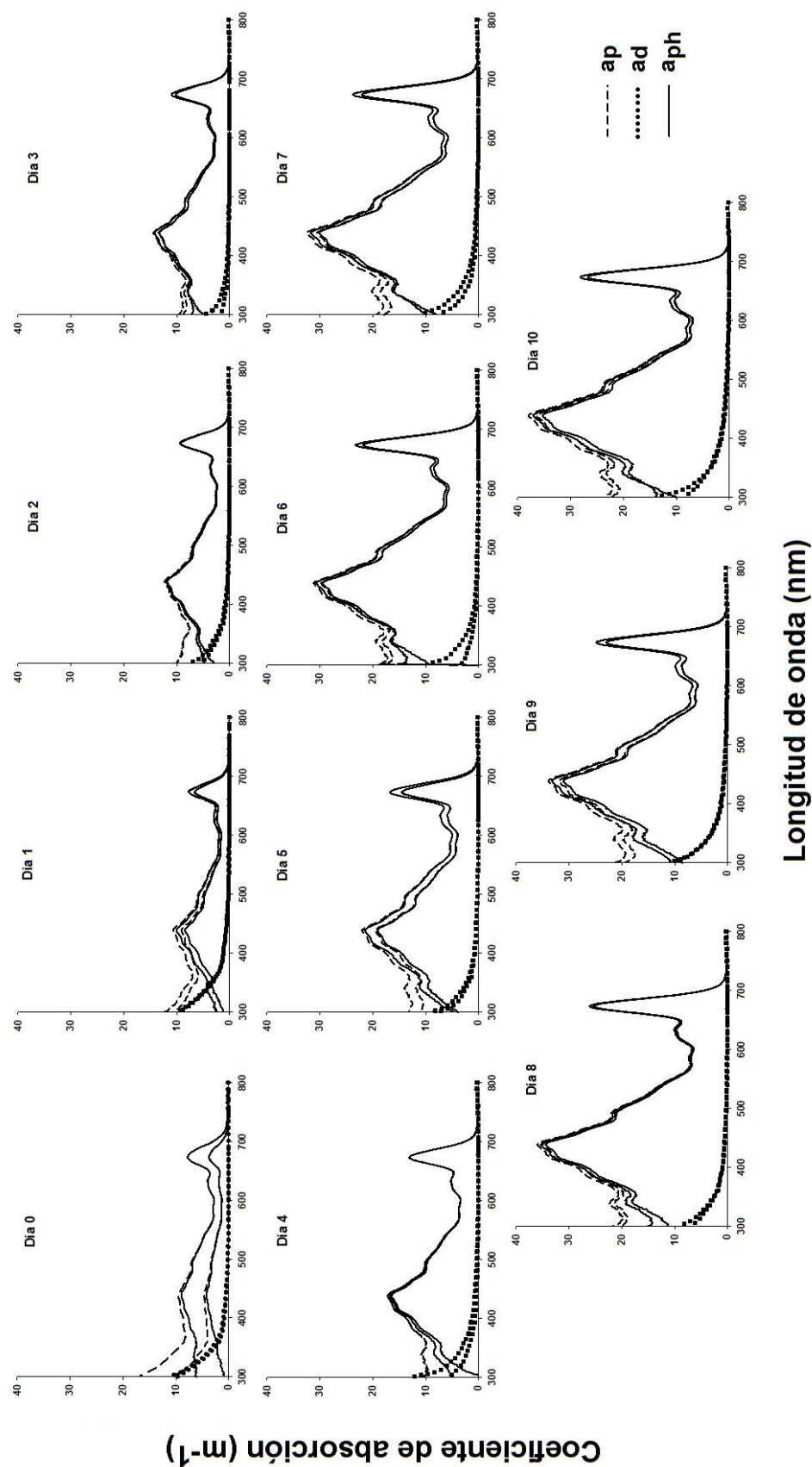


Figura 13. Coeficientes de absorción de *Amphora* sp., cultivada bajo luz blanca (LB, marca Philips catálogo F40T12/DX) a una irradiancia de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Coeficiente de absorción del material particulado (a_p), coeficiente de absorción del detritus (a_d) y coeficiente de absorción del fitoplancton (a_{ph}).

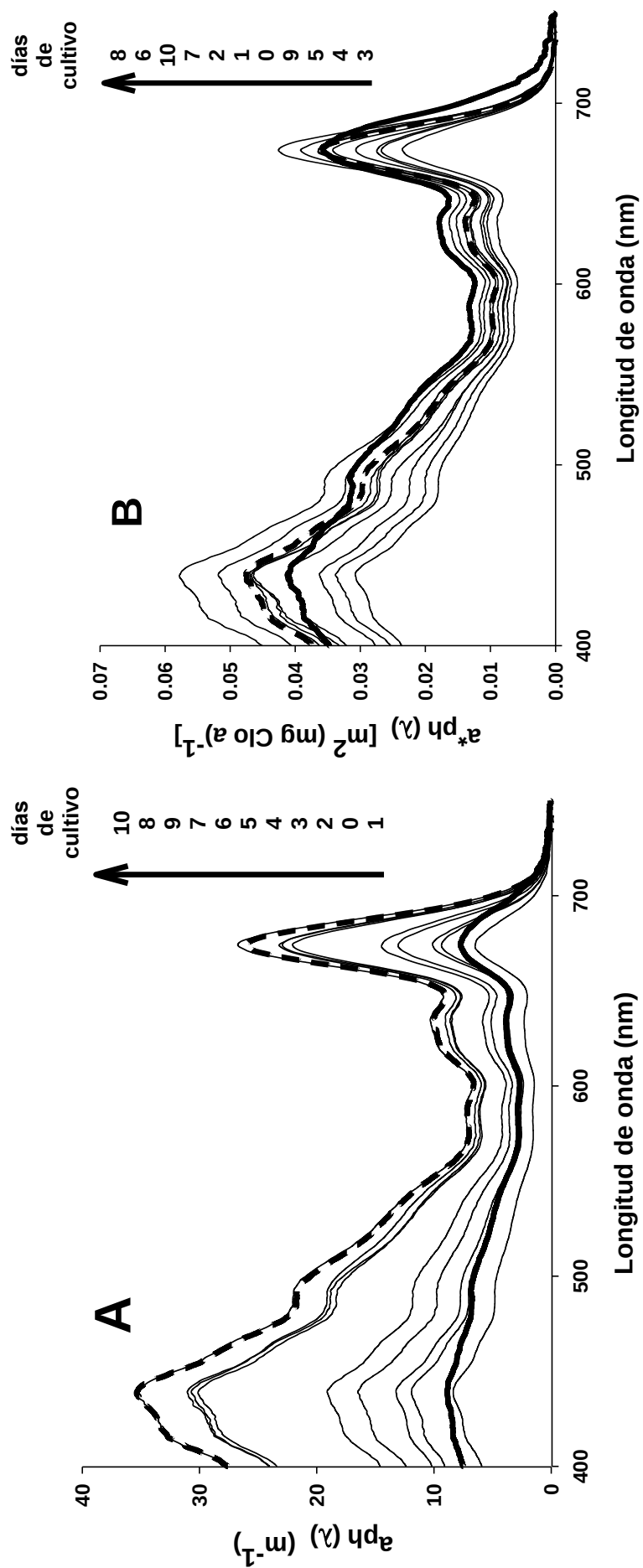


Figura 14. A: Coeficientes de absorción (a_{ph}) y B: coeficientes de absorción específica (a_{ph}^*) de *Amphora* sp., cultivada bajo luz blanca (LB, marca Philips catálogo F40T12/DX) a una irradiancia de $50 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ y por un periodo de 10 días. En donde día 0 de cultivo (—) y día 10 de cultivo (---).

3.4.3. Energía fotosintéticamente utilizable (PUR)

Se obtuvieron los valores de la energía fotosintéticamente utilizable (PUR) para el cultivo de *Amphora* sp. y para cada uno de los días de cultivo; el PUR se encontró entre los 21.114 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y los 27.502 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tabla 4).

Tabla 4. Valores de la radiación fotosintéticamente utilizable (PUR en $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), obtenidos con los valores de los coeficientes específicos de absorción de *Amphora* sp., cultivada bajo una irradiancia de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En donde: a_{ph} es el coeficiente de absorción espectral del fitoplancton, a_{ph}^* es la media del coeficiente específico de absorción y a_{phm}^* es el coeficiente de absorción específica máxima (440 nm) y Clo a (mg m^{-3}) es el contenido de clorofila a.

Día de cultivo	a_{ph} (440 nm)	a_{phm}^* (440 nm)	Clo a	PUR
0	4.139	0.024	169.000	26.880
0	8.856	0.041	216.240	27.502
1	9.965	0.049	204.360	21.580
1	8.352	0.047	177.800	21.114
2	11.709	0.042	279.720	21.719
2	11.893	0.046	256.720	22.131
3	14.105	0.038	366.640	21.975
3	13.230	0.031	430.040	21.732
4	16.719	0.035	477.480	22.096
4	16.432	0.034	487.600	22.181
5	21.433	0.035	614.560	23.374
5	19.084	0.036	526.680	22.325
6	29.417	0.047	628.360	21.785
6	30.659	0.052	592.280	22.098
7	31.640	0.047	666.280	22.209
7	30.047	0.047	644.480	21.581
8	34.292	0.047	728.760	21.521
8	35.258	0.058	611.920	21.648
9	33.154	0.044	754.440	21.997
9	30.979	0.041	746.920	21.341
10	37.009	0.049	755.440	22.309
10	35.268	0.048	741.720	21.950

3.5. Tasa fotosintética

Se obtuvieron las curvas fotosíntesis-irradiancia (P-E) de los cultivos de *Amphora* sp. mantenidos en los distintos tipos de luz utilizados (Figura 15), en donde la curva que alcanza valores mayores es la obtenida con el tratamiento de la luz azul y los menores valores de la curva P-E se presentaron en la luz amarilla. El análisis de varianza de una vía realizado con los valores de fotosíntesis máxima ($P_{\max}$: moles de O_2 mg clorofila a min^{-1}) resultaron con diferencias altamente significativas ($p = 0.0047$) entre los distintos tipos de luz, presentando el mayor valor la luz azul (2.76×10^{-10} moles de O_2 mg clorofila a min^{-1}) y el menor valor de fotosíntesis máxima se obtuvo con la luz amarilla con (1.02×10^{-10} moles de O_2 mg clorofila a min^{-1}).

El ANOVA de una vía mostró que la eficiencia fotosintética [α : moles de O_2 mg clorofila a $\text{min}^{-1}(\mu\text{mol}^{-1} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1})^{-1}$] presenta diferencias significativas ($p = 0.0132$) entre las fuentes de luz, presentándose la mayor eficiencia fotosintética con la luz azul (9×10^{-13} moles de O_2 mg clorofila a $\text{min}^{-1}(\mu\text{mol}^{-1} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1})^{-1}$), mientras que la menor eficiencia se obtuvo en el tratamiento con la luz amarilla (2×10^{-13} moles de O_2 mg clorofila a $\text{min}^{-1}(\mu\text{mol}^{-1} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1})^{-1}$). Los valores de la intensidad de luz de saturación (E_K : $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) mostraron que existen diferencias significativas ($p = 0.0102$) entre los distintos tipos de luz utilizadas, siendo el mayor valor de $514.58 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ presentado por la fuente de luz amarilla y el menor valor se obtuvo bajo la luz verde y fue de $257.43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Tabla 5. Parámetros fotosintéticos de *Amphora* sp. cultivada con distinta composición espectral de la luz durante un periodo de 8 días. Valores promedios y desviación estándar de la tasa fotosintética máxima ($P_{\max}$: moles de O_2 mg clorofila a min^{-1} ; 1×10^{-10}), la pendiente inicial de la fotosíntesis o eficiencia fotosintética [α : moles de O_2 mg clorofila a $\text{min}^{-1}(\mu\text{mol}^{-1} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1})^{-1}$; 1×10^{-13}] y la intensidad de luz de saturación (E_K : $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Tratamiento	$P_{\max}$	Alfa (α)	E_K
Luz blanca	1.88 (0.00) ^{ab}	4.0 (0.00) ^{ab}	474.06 (0.000) ^{ab}
Luz azul	2.73 (0.13) ^a	9.0 (2.12) ^a	334.85 (66.37) ^{abc}
Luz verde	1.76 (0.00) ^b	7.0 (0.00) ^a	257.43 (0.000) ^c
Luz amarilla	1.02 (0.16) ^b	2.0 (0.00) ^b	514.58 (79.26) ^a
GroLux	1.55 (0.43) ^{ab}	5.0 (1.41) ^{ab}	316.03 (0.002) ^{bc}

ANOVA de una vía y prueba a posteriori de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b>c$.

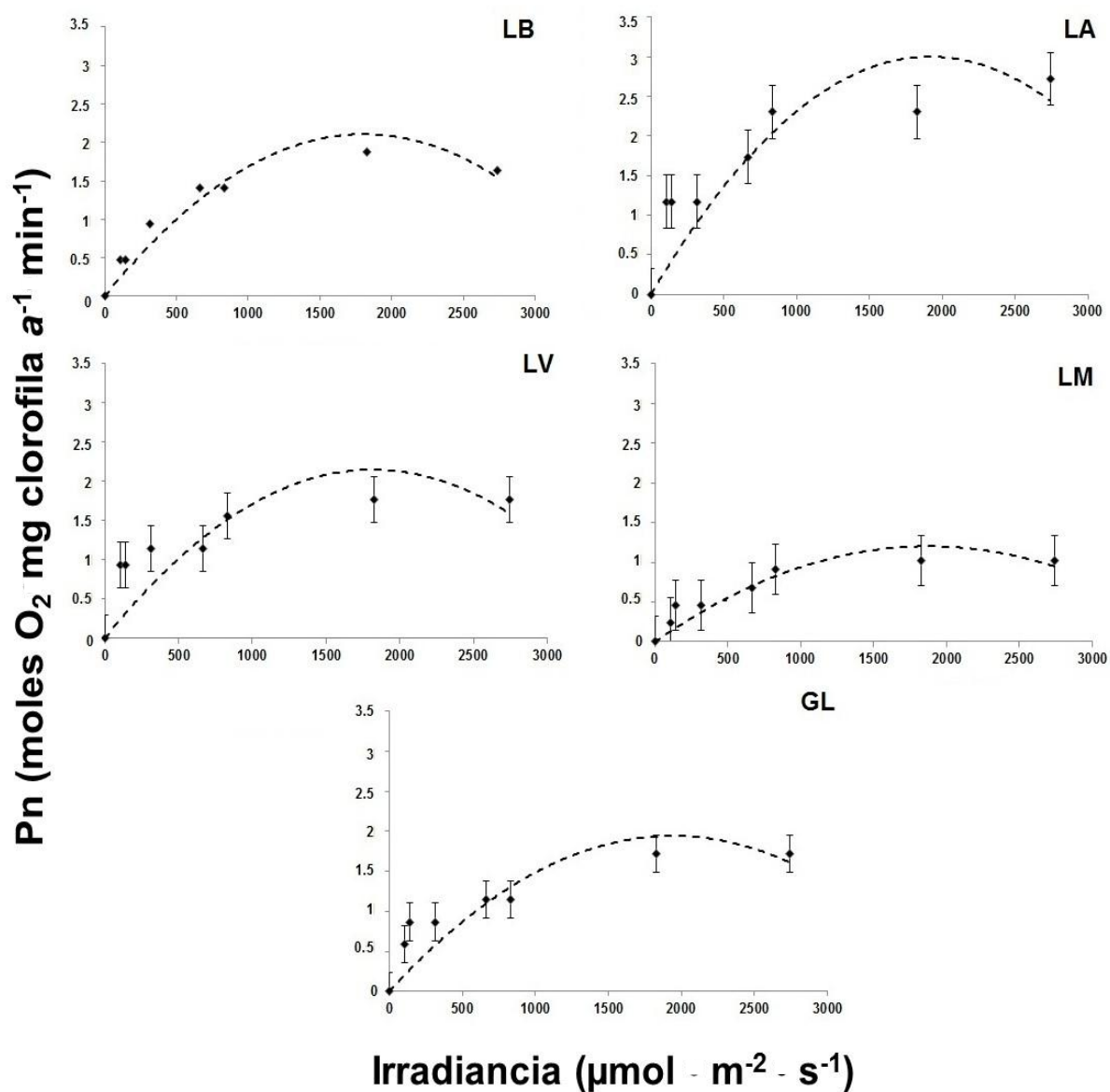


Figura 15. Curvas P-E (fotosíntesis-irradiancia) de *Amphora* sp. cultivada con distinta composición espectral de la luz y a una irradiancia de $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Fotosíntesis neta (P_n : 1×10^{-10}) como respuesta de la irradiancia incidente sobre los cultivos mantenidos con luz blanca (LB), luz azul (LA), luz verde (LV), luz amarilla (LM) y GroLux (GL).

3.6. Preservación en frío y viabilidad

3.6.1 Viabilidad semana 8

Se obtuvo la curva del crecimiento poblacional de *Amphora* sp. posterior a su preservación a 4 °C y en oscuridad por un periodo de ocho semanas (Figura 16). En general, los cultivos presentaron una fase de crecimiento exponencial con duración de 4 días. La mayor densidad celular al día 8 de cultivo se presentó en el tratamiento de luz blanca ($900,000 \pm 119,324$ cél ml⁻¹) y la menor densidad fue de con la luz azul ($784,300 \pm 39,775$ cél ml⁻¹).

El análisis de covarianza realizado con el log₂ de la densidad celular (cél ml⁻¹), mostró diferencias altamente significativas entre los inóculos preservados provenientes de los distintos tipos de luz utilizados ($p = 0.0000$). Los distintos tipos de luz ensayados presentaron relaciones lineales con el tiempo en días de cultivo, y el ajuste a dichas líneas, dado por los coeficientes de determinación (r^2), se encontraron entre el 91% y el 83%. No hay covarianza entre los tipos de luz y el tiempo en días de cultivo ($p = 0.0000$); por lo tanto, existe interacción entre ambos factores dado que las pendientes de las rectas presentaron diferencias altamente significativas ($p = 0.0000$). A lo largo del tiempo de cultivo, el mayor crecimiento poblacional se logró con los inóculos provenientes de la luz GroLux (19.144 ± 0.448) y el menor crecimiento se presentó en la luz blanca (18.975 ± 0.410).

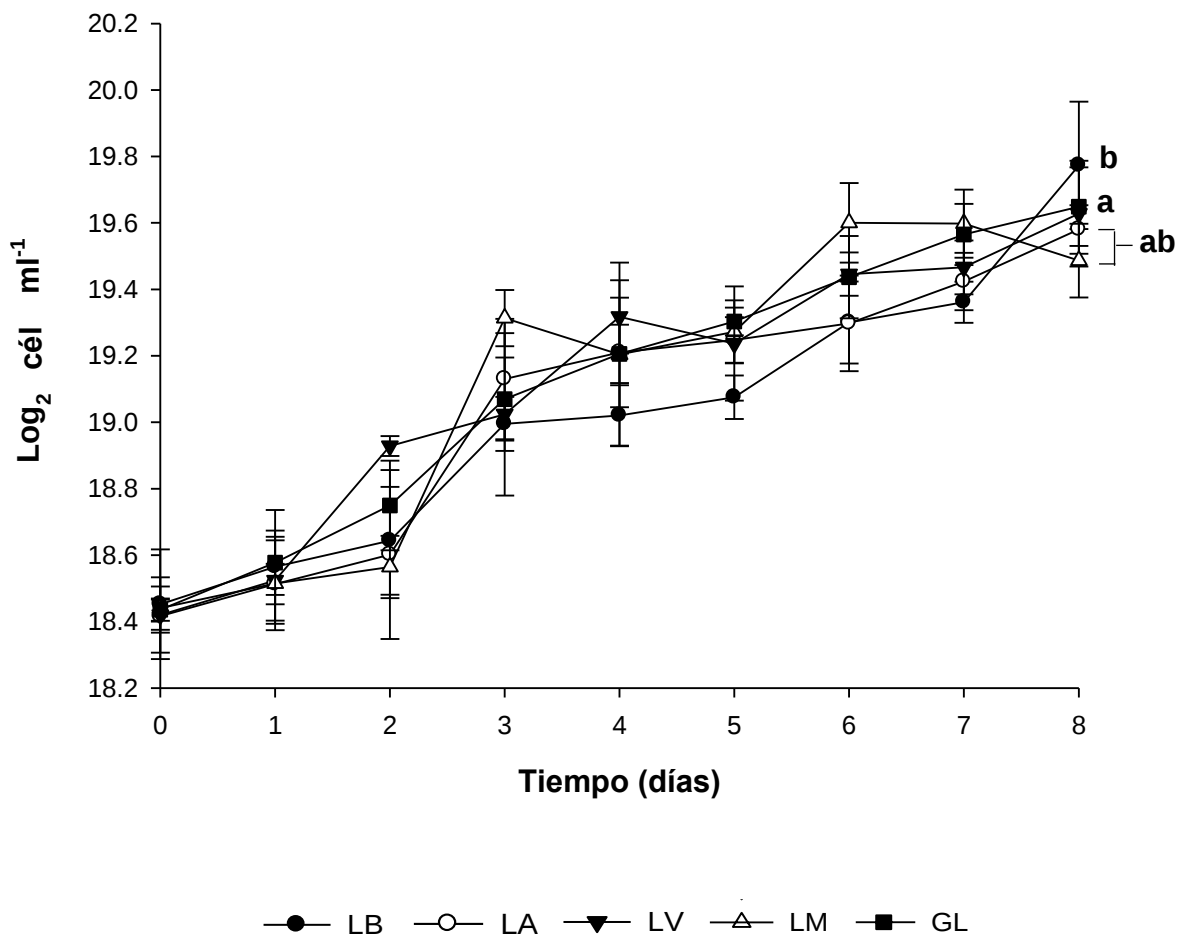


Figura 16. Valores promedio y desviación estándar del Log_2 de la densidad celular (cél ml^{-1}) de *Amphora* sp., cultivada previamente a la preservación con distinta composición espectral de luz blanca (LB), luz azul (LA), luz verde (LV), luz amarilla (LM) y GroLux (GL), a una irradiancia de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y preservada en frío (4°C) por un periodo de 8 semanas. ANCOVA y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b$.

Al comparar los valores de la tasa de crecimiento (μ) de los cultivos preservados por 8 semanas, no se obtuvieron diferencias significativas ($p = 0.1850$) por efecto de los distintos tipos de luz ensayados previamente a su preservación.

En el análisis realizado para evaluar las posibles diferencias entre los valores del tiempo de generación (T_g) se obtuvo que no existían diferencias significativas ($p = 0.2828$) entre los distintos tipos de luz utilizados previamente a la preservación.

Tabla 6. Valores promedio y desviación estándar de la tasa de crecimiento (μ : divisiones día⁻¹), el tiempo de generación (T_g : días) y densidad celular máxima (DCM: cél ml⁻¹; 1×10^5) de *Amphora* sp., cultivada previamente a la preservación con distinta composición espectral de la luz, a una irradiancia de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y preservada en frío (4 °C) por un periodo de 8 semanas.

Tratamiento	μ	T_g	DCM	Prueba de <i>Vibrio</i> sp.
Luz blanca	0.161 (0.083) ^{ns}	7.166 (3.711) ^{ns}	9.000 (0.119) ^a	Negativa
Luz azul	0.247 (0.062) ^{ns}	4.174 (1.053) ^{ns}	7.843 (0.397) ^b	Negativa
Luz verde	0.140 (0.025) ^{ns}	7.235 (1.311) ^{ns}	8.135 (0.921) ^{ab}	Negativa
Luz amarilla	0.295 (0.095) ^{ns}	3.453 (0.669) ^{ns}	7.962 (0.659) ^b	Negativa
GroLux	0.218 (0.046) ^{ns}	4.700 (0.985) ^{ns}	8.239 (0.671) ^{ab}	Negativa

ANOVA de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha=0.05$; a>b; ns (diferencia no significativa).

Existieron diferencias significativas ($p = 0.0111$) entre los valores del pH de los cultivos mantenidos con los distintos tipos de luz utilizados y posteriormente preservados por 8 semanas. El menor valor de pH fue de 7.42 ± 0.01 y se presentó en el tratamiento de luz blanca. Mientras que los valores de pH al final del periodo de crecimiento de los inóculos preservados, se obtuvieron diferencias altamente significativas ($p = 0.0000$) según el efecto de la procedencia de la composición espectral de la luz. El mayor valor de pH fue obtenido con el tratamiento de GroLux (8.47 ± 0.07) y el menor valor de pH se presentó en el tratamiento con luz verde (8.03 ± 0.02).

Tabla 7. Valores promedios y desviación estándar de los valores de pH de los cultivos de *Amphora* sp. expuestos a distinta composición espectral de la luz y después de 8 semanas de preservación en frío (4 °C: inicial) y al finalizar la curva de crecimiento de evaluación de la viabilidad para el crecimiento después del proceso de preservación (final).

Tratamiento	pH inicial	pH final
Luz blanca	7.42 (0.01) ^b	8.27 (0.03) ^b
Luz azul	7.52 (0.03) ^a	8.16 (0.07) ^{bc}
Luz verde	7.54 (0.02) ^a	8.03 (0.02) ^c
Luz amarilla	7.54 (0.03) ^a	8.22 (0.05) ^b
GroLux	7.54 (0.01) ^a	8.45 (0.07) ^a

ANOVA de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha=0.05$; a>b>c.

Al comparar el tamaño celular (largo y ancho) de *Amphora* sp., antes de su preservación (cosecha) y después de 8 semanas de ser preservada (viabilidad), se encontró que existieron diferencias muy significativas por el factor tiempo ($p = 0.0408$) y no existieron diferencias significativas entre los distintos tipos de luz ensayados ($p = 0.4842$). Resultó que no existe interacción entre ambos factores ($p = 0.2042$). La

tendencia general del tamaño de las células de *Amphora* sp. fue que disminuyó el largo de las células por efecto de la preservación en frío por 8 semanas (Tabla 8).

Al comparar los valores del ancho celular se encontró que existieron diferencias altamente significativas por el factor tiempo ($p = 0.0000$) y no existieron diferencias significativas entre los distintos tipos de luz ensayados ($p = 0.2429$), además existió interacción entre ambos factores ($p = 0.0187$). Las células de *Amphora* sp. son mas delgadas después de su preservación en frío por 8 semanas. Las células más delgadas se presentaron con el tratamiento de luz verde el día de su cosecha ($12.520 \pm 1.372 \mu\text{m}$) (Tabla 8).

Tabla 8. Valores promedios y desviación estándar del tamaño celular de los cultivos de *Amphora* sp., expuestos a distinta composición espectral de la luz (sin preservar) y después de 8 semanas de preservación en frío (4 °C: preservación).

Tratamiento	Sin preservar		Preservación	
	Largo	Ancho	Largo	Ancho
Luz blanca	24.123 (2.965) ^a	12.641 (1.406) ^a	25.301 (2.873) ^b	15.102 (1.930) ^c
Luz azul	24.117 (3.022) ^a	13.551 (1.441) ^{ab}	23.301 (2.873) ^b	14.753 (1.460) ^{bc}
Luz verde	23.185 (3.099) ^a	12.520 (1.372) ^a	24.786 (2.808) ^b	15.074 (1.748) ^c
Luz amarilla	23.776 (3.612) ^a	12.357 (1.196) ^a	25.186 (3.119) ^b	15.437 (1.644) ^c
GroLux	24.093 (3.156) ^a	12.547 (1.757) ^{ab}	23.629 (2.266) ^b	14.400 (1.974) ^c

ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b>c$.

3.6.2 Viabilidad semana 16

Se obtuvo la curva del crecimiento poblacional posterior su preservación a 4 °C y en oscuridad por un periodo de dieciséis semanas (Figura 17). De manera general, los cultivos presentaron una fase de acondicionamiento larga con una duración de 4 días, posteriormente comenzó la fase de crecimiento exponencial, la cual presentó una duración de 3 días, esto para todas los inóculos provenientes de los cultivos mantenidos con los distintos tipos de luz ensayados previo a la preservación en frío. Al octavo día de cultivo se obtuvo la mayor densidad celular y se presentó en el tratamiento de luz azul ($1'291,667 \pm 128,746$ cél ml⁻¹) y la menor densidad fue en los tratamientos de la luz amarilla ($922,917 \pm 60,056$ cél ml⁻¹) y de la GroLux ($922,917 \pm 56,711$ cél ml⁻¹).

El análisis de covarianza realizado con el log₂ de la densidad celular (cél ml⁻¹), mostró que no existían diferencias significativas entre los distintos tipos de luz utilizados ($p = 0.9850$). Los distintos tipos de luz ensayados no presentaron relaciones lineales con el tiempo en días de cultivo, lo que se sustenta con los coeficientes de determinación (r^2) calculados que oscilaron entre el 48% y el 33%. Resultó que no existe covarianza ($p = 0.0000$) entre los distintos tipos de luz ensayados y el tiempo en días de cultivo; por lo tanto, existe interacción entre ambos factores dado que las pendientes de las rectas presentaron diferencias altamente significativas ($p = 0.0000$). A lo largo del tiempo de cultivo, el mayor crecimiento poblacional se obtuvo con los inóculos provenientes del tratamiento de la luz verde (18.787 ± 0.750) y el menor crecimiento se presentó en la luz blanca (18.532 ± 0.7683).

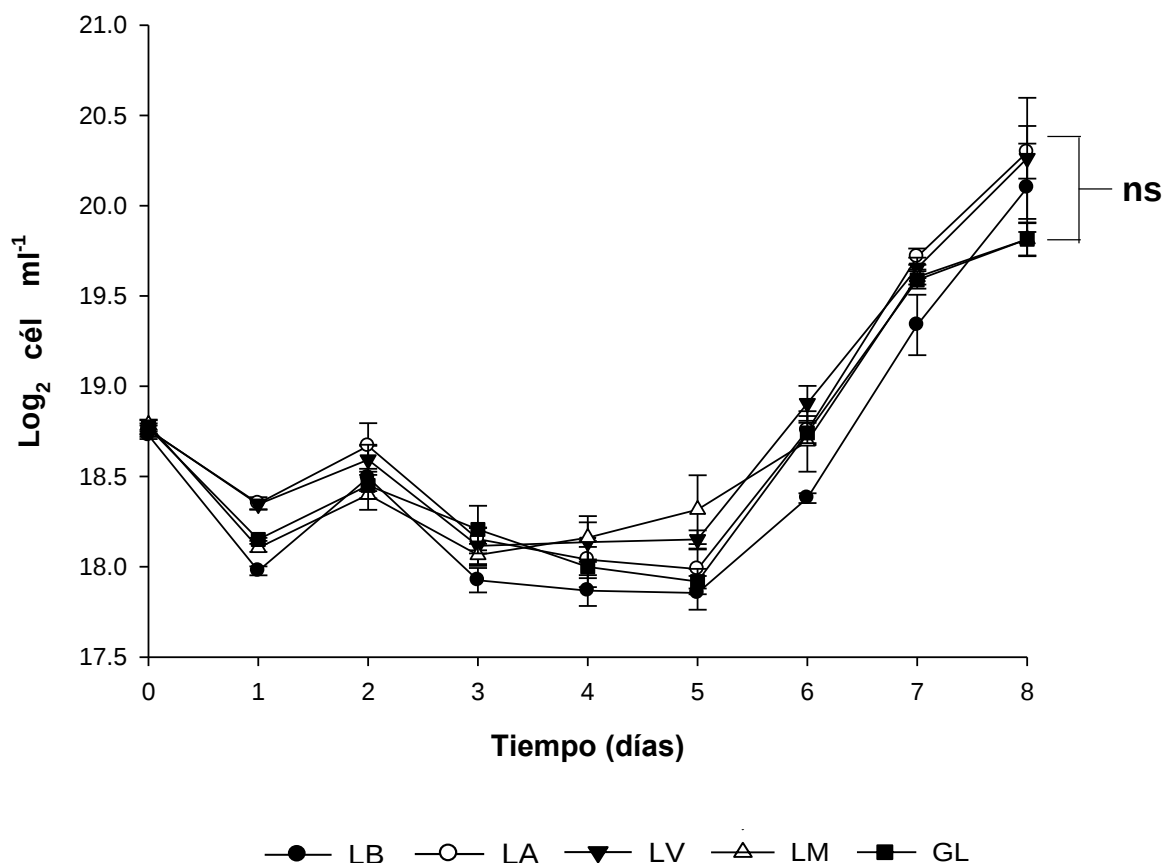


Figura 17. Valores promedio y desviación estándar del Log_2 de la densidad celular (cél ml^{-1}) de *Amphora* sp. cultivada previamente a la preservación bajo distinta composición espectral de luz blanca (LB), luz azul (LA), luz verde (LV), luz amarilla (LM) y GroLux (GL), a una irradiancia de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y preservada en frío (4°C) por un periodo de 16 semanas. ANCOVA y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha=0.05$.

Al comparar los valores de la tasa de crecimiento (μ), se obtuvieron diferencias significativas ($p=0.0149$) entre los distintos tipos de luz ensayados previamente a su preservación. La mayor tasa de crecimiento se presentó con los inóculos provenientes de la luz azul (0.769 ± 0.059 divisiones día^{-1}) y la menor tasa de crecimiento se presentó con la luz amarilla (0.499 ± 0.095 divisiones día^{-1}).

En el análisis realizado para evaluar las posibles diferencias entre los valores del tiempo de generación (T_g) se obtuvo que existían diferencias significativas ($p=0.0105$) entre los distintos tipos de luz ensayados previamente a la preservación. El mayor tiempo de generación se presentó con los inóculos provenientes de la luz amarilla (2.051 ± 0.374 días) y el menor tiempo de generación se presentó en el tratamiento de la luz azul (1.305 ± 0.103 días).

Tabla 9. Valores promedio y desviación estándar de la tasa de crecimiento (μ : divisiones día⁻¹), el tiempo de generación (T_g : días) y densidad celular máxima (DCM: cél ml⁻¹; 1×10^5) de *Amphora* sp., cultivada previamente a la preservación con distinta composición espectral de la luz, a una irradiancia de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y preservada en frío (4 °C) por un periodo de 16 semanas.

Tratamiento	μ	T_g	DCM	Prueba de <i>Vibrio</i> sp.
Luz blanca	0.768 (0.076) ^a	1.310 (0.132) ^b	11.337 (1.825) ^{ns}	Negativa
Luz azul	0.769 (0.059) ^a	1.305 (0.103) ^b	12.916 (1.287) ^{ns}	Negativa
Luz verde	0.704 (0.125) ^{ab}	1.449 (0.236) ^b	12.812 (3.141) ^{ns}	Negativa
Luz amarilla	0.499 (0.095) ^b	2.051 (0.374) ^a	9.229 (0.600) ^{ns}	Negativa
GroLux	0.632 (0.050) ^{ab}	1.589 (0.132) ^{ab}	9.229 (0.567) ^{ns}	Negativa

ANOVA de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha=0.05$; ns (diferencia no significativa).

En el análisis de los valores del pH de los cultivos mantenidos con los distintos tipos de luz utilizados y posteriormente preservados por 16 semanas, mostró que en el pH inicial no existieron diferencias significativas ($p = 0.1695$) entre los distintos tipos de luz ensayados. Mientras que para los valores del pH final, resultó que existieron diferencias altamente significativas ($p = 0.0000$) entre los inóculos provenientes de los distintos tipos de luz. Con el tratamiento de GroLux se obtuvo el valor mayor de pH (8.28 ± 0.06) y el menor valor de pH se presentó en el tratamiento de luz verde (7.68 ± 0.13).

Tabla 10. Valores promedios y desviación estándar de los valores de pH de los cultivos de *Amphora* sp. expuestos a distinta composición espectral de la luz y después de 16 semanas de preservación en frío (4 °C: inicial) y al finalizar la curva de crecimiento de evaluación de la viabilidad para el crecimiento después del proceso de preservación (final).

Tratamiento	pH inicial	pH final
Luz blanca	7.34 (0.02) ^{ns}	8.21 (0.05) ^a
Luz azul	7.31 (0.06) ^{ns}	7.79 (0.05) ^b
Luz verde	7.36 (0.06) ^{ns}	7.68 (0.13) ^b
Luz amarilla	7.37 (0.05) ^{ns}	8.13 (0.08) ^a
GroLux	7.45 (0.04) ^{ns}	8.28 (0.06) ^a

ANOVA de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha=0.05$; a>b, ns (diferencia no significativa).

En la comparación del tamaño celular (largo y ancho) de *Amphora* sp., antes de su preservación (cosecha) y después de 16 semanas de ser preservada (viabilidad), existieron diferencias altamente significativas por el factor tiempo ($p = 0.0087$) y no existieron diferencias significativas entre los distintos tipos de luz ensayados ($p = 0.4143$). Resultó que no existe interacción entre ambos factores ($p = 0.2875$). La mayor longitud celular se presentó con el tratamiento de GroLux después de su preservación en frío por 16 semanas ($25.915 \pm 3.351 \mu\text{m}$) y la menor longitud celular se presentó con la luz verde el día de su cosecha (antes de ser preservado) ($23.185 \pm 3.099 \mu\text{m}$).

Al comparar los valores del ancho celular, resultó que existieron diferencias altamente significativas por el factor tiempo ($p = 0.0000$), así como entre los distintos tipos de luz ensayados ($p = 0.0037$) y no existió interacción entre ambos factores ($p = 0.2955$). En general las células de *Amphora* sp. fueron más delgadas (menos anchas) el día de su cosecha antes de ser preservadas y fueron más anchas después de su preservación a 4 °C por 16 semanas.

Tabla 11. Valores promedios y desviación estándar del tamaño celular de los cultivos de *Amphora* sp., expuestos a distinta composición espectral de la luz (sin preservar) y después de 16 semanas de preservación en frío (4°C: preservación).

Tratamiento	Sin preservar		Preservación	
	Largo	Ancho	Largo	Ancho
Luz blanca	24.123 (2.965) ^{ab}	12.641 (1.406) ^c	23.884 (3.048) ^{ab}	14.545 (1.933) ^{ab}
Luz azul	24.117 (3.022) ^{ab}	13.551 (1.441) ^{bc}	24.597 (3.329) ^{ab}	15.481 (1.356) ^a
Luz verde	23.185 (3.099) ^b	12.520 (1.372) ^c	25.030 (2.588) ^{ab}	15.458 (1.685) ^a
Luz amarilla	23.776 (3.612) ^{ab}	12.357 (1.196) ^c	24.591 (2.477) ^{ab}	14.834 (1.256) ^a
GroLux	24.093 (3.3156) ^{ab}	12.547 (1.757) ^c	25.915 (3.351) ^a	14.967 (1.431) ^a

ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b>c$.

3.7. Criopreservación

3.7.1 Viabilidad, tamaño celular y parámetros poblacionales

Se obtuvo la curva del crecimiento poblacional de *Amphora* sp. posterior a su criopreservación a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ en nitrógeno líquido por un periodo de 24 horas y cultivada por un total de 11 días para evaluar su viabilidad bajo luz blanca a una irradiancia de $50\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ (Figura 18). En general los cultivos criopreservados con Glicerol 10% presentaron una fase de crecimiento exponencial con duración de 8 días para todos los distintos tipos de luz ensayados. La mayor densidad celular al día 11 de cultivo se presentó en el tratamiento de GroLux ($7'568,750 \pm 952,826\text{ cél ml}^{-1}$) y la menor densidad se presentó con la luz blanca ($5'897,500 \pm 346,482\text{ cél ml}^{-1}$) (Figura 18A). En los cultivos criopreservados con DMSO 10% se observa un decaimiento poblacional a partir del sexto día de cultivo para todas las luces analizadas (Figura 18B).

Se realizó un análisis de covarianza con el $\log_2$ de la densidad celular para los cultivos criopreservados con Glicerol 10%, en donde se obtuvo que existían diferencias altamente significativas entre los distintos tipos de luz utilizados ($p = 0.0136$). Los distintos tipos de luz ensayados presentaron relaciones lineales con el tiempo en días de cultivo, y el ajuste a dichas líneas, dado por los coeficientes de determinación (r^2), se encontraron entre el 94% y el 78%. No hay covarianza entre los distintos tipos de luz y el tiempo en días de cultivo ($p = 0.0000$); por lo tanto, existe interacción entre ambos factores dado que las pendientes de las rectas presentaron diferencias altamente significativas ($p = 0.0000$). A lo largo del tiempo de cultivo, el mayor crecimiento poblacional se logró con el control (sin preservar) (22.160 ± 0.635) y el menor crecimiento se presentó en la luz amarilla con un valor de (21.939 ± 0.538). Para los cultivos criopreservados con DMSO 10% estadísticamente no se puede aplicar un ANCOVA por lo que se analizar por ANOVA de una vía.

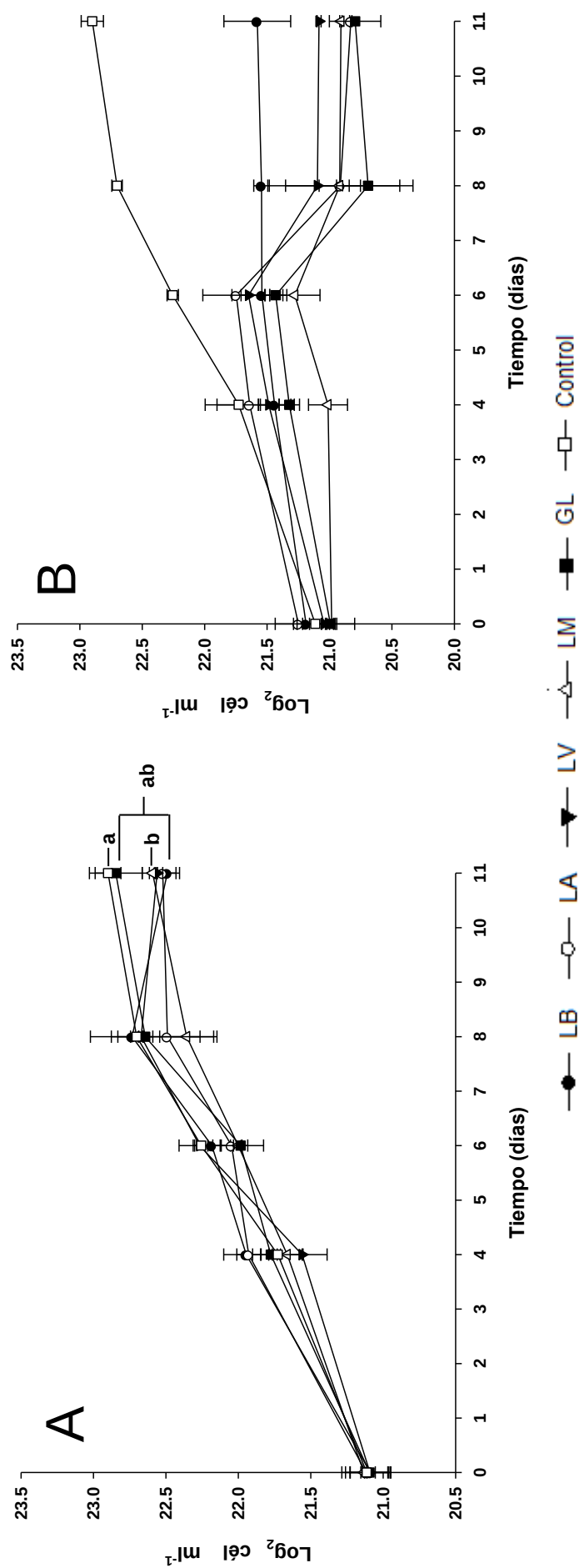


Figura 18. Valores promedio y desviación estándar del Log_2 de la densidad celular (cél ml^{-1}) de *Amphora* sp. cultivada previamente a la criopreservación con distinta composición espectral de luz blanca (LB), luz azul (LA), luz verde (LV), luz amarilla (LM) y GroLux (GL), a una irradiancia de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y criopreservada con: A) Glicerol 10% y B) DMSO a -196°C por un periodo de 24 horas. ANCOVA y prueba a posteriori de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b$.

Al comparar los valores promedios en Log_2 de la densidad celular (cél ml^{-1}) con respecto a cada uno de los días de cultivo, se encontró que el tratamiento control presentó los mayores valores de densidad celular, con una fase de crecimiento exponencial desde el día 0 hasta el día 8 y con su máxima densidad celular el día 11 de cultivo ($7'831,250 \pm 482,600 \text{ cél ml}^{-1}$). En general, se encontró que en los tratamientos cultivados previos a la criopreservación con los distintos tipos de luz tienen una fase de crecimiento exponencial desde el día 0 hasta el día 6 de cultivo, en donde todos los cultivos alcanzan su máxima densidad celular y posteriormente presentan una disminución a partir del día 8. Los cultivos provenientes del tratamiento con luz blanca, son los únicos que no presentaron una disminución de la densidad celular y por el contrario a partir del día 6 de cultivo las células comienzan una fase de crecimiento estacionaria.

Por medio del análisis de varianza de dos vías se encontró que los valores de la tasa de crecimiento (μ) de los cultivos criopreservados con glicerol y DMSO, tuvieron diferencias altamente significativas por efecto del tipo de crioprotector ($p = 0.0000$) y también por efecto de la procedencia de los cultivos mantenidos en los distintos tipos de luz ($p = 0.0016$). La mayor tasa de crecimiento se presentó con los cultivos provenientes de la luz verde y criopreservados con glicerol ($0.197 \pm 0.023 \text{ divisiones día}^{-1}$) y la menor tasa de crecimiento se presentó con los cultivos provenientes de la luz amarilla y criopreservados con DMSO ($0.051 \pm 0.035 \text{ divisiones día}^{-1}$).

Se encontró que el tiempo de generación (T_g) fue altamente significativo por efecto del tipo de crioprotectante ($p=0.0000$) y también por efecto del origen de los cultivos mantenidos en los distintos tipos de luz ($p=0.0000$). El mayor tiempo de generación se presentó con los cultivos provenientes del tratamiento con luz amarilla y criopreservado con DMSO ($33.317 \pm 6.880 \text{ días}^{-1}$). El menor tiempo de generación se obtuvo con los cultivos expuestos a luz verde y criopreservados con glicerol ($4.802 \pm 0.386 \text{ días}^{-1}$).

Tabla 12. Valores promedio y desviación estándar del Log_2 de la densidad celular (cél ml^{-1}) de *Amphora* sp. criopreservadas con dimetilsulfóxido 10% (DMSO) y previamente cultivada bajo distinta composición espectral de la luz.

Tiempo (días)	Tratamiento	Log_2 densidad celular (cél ml^{-1})
0	Luz blanca	21.188 (0.028) ^{ns}
	Luz azul	21.440 (0.186) ^{ns}
	Luz verde	21.044 (0.245) ^{ns}
	Luz amarilla	20.982 (0.040) ^{ns}
	GroLux	20.994 (0.040) ^{ns}
	Control	21.114 (0.146) ^{ns}
4	Luz blanca	21.440 (0.130) ^{ab}
	Luz azul	21.639 (0.357) ^a
	Luz verde	21.486 (0.082) ^{ab}
	Luz amarilla	21.012 (0.156) ^c
	GroLux	21.322 (0.082) ^{ab}
	Control	21.727 (0.174) ^a
6	Luz blanca	21.541 (0.167) ^{bc}
	Luz azul	21.747 (0.268) ^b
	Luz verde	21.648 (0.134) ^{bc}
	Luz amarilla	21.278 (0.202) ^c
	GroLux	21.431 (0.088) ^{bc}
	Control	22.256 (0.045) ^a
8	Luz blanca	21.544 (0.062) ^b
	Luz azul	20.913 (0.581) ^{bc}
	Luz verde	21.097 (0.255) ^{bc}
	Luz amarilla	20.918 (0.166) ^{bc}
	GroLux	20.691 (0.253) ^c
	Control	22.702 (0.042) ^a
11	Luz blanca	21.579 (0.267) ^b
	Luz azul	20.830 (0.010) ^c
	Luz verde	21.084 (0.016) ^{bc}
	Luz amarilla	20.909 (0.009) ^c
	GroLux	20.795 (0.206) ^c
	Control	22.899 (0.089) ^a

ANOVA de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b>c>d$, ns (diferencia no significativa).

Tabla 13. Valores promedio y desviación estándar de la tasa de crecimiento (μ : divisiones día⁻¹) y el tiempo de generación (T_g : días) de *Amphora* sp., cultivada previamente a la criopreservación con distinta composición espectral de la luz, a una irradiancia de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y criopreservada a -196 °C por un periodo de 24 horas.

Criopreservador	Tratamiento	μ	T_g
Glicerol 10%	Luz blanca	0.188 (0.038) ^a	4.818 (0.461) ^b
	Luz azul	0.148 (0.011) ^{abc}	6.575 (0.515) ^b
	Luz verde	0.197 (0.023) ^a	4.802 (0.386) ^b
	Luz amarilla	0.146 (0.028) ^{abc}	6.217 (0.445) ^b
	GroLux	0.154 (0.026) ^{ab}	5.924 (0.042) ^b
Sin criopreservar	Luz blanca	0.185 (0.012) ^a	5.331 (0.427) ^b
DMSO 10%	Luz blanca	0.058 (0.030) ^{bc}	13.345 (0.406) ^b
	Luz azul	0.076 (0.067) ^{bc}	11.247 (6.368) ^b
	Luz verde	0.110 (0.055) ^{abc}	7.035 (0.255) ^b
	Luz amarilla	0.051 (0.035) ^c	33.317 (6.880) ^a
	GroLux	0.071 (0.012) ^{bc}	15.524 (0.693) ^b

ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha=0.005$; $a>b>c$.

El tamaño celular (largo y ancho) de *Amphora* sp. de las células de los cultivos mantenidos con distintos tipos de luz y después de ser criopreservados con glicerol y DMSO mostraron diferencias significativas por efecto del tipo de crioprotector ($p = 0.0495$) y diferencias significativas ($p = 0.0841$) por efecto de los distintos tipos de luz ensayados. Resultó que existió interacción entre ambos factores ($p = 0.0025$). La mayor longitud de las células se presentó con el tratamiento de luz verde sin criopreservación (cosecha) ($28.589 \pm 4.807 \mu\text{m}$), mientras que la menor longitud celular se presentó en el tratamiento con luz blanca y criopreservado con glicerol 10% ($24.186 \pm 3.667 \mu\text{m}$).

Al comparar el ancho de las células de *Amphora* sp. se encontraron diferencias altamente significativas por el efecto del tipo de crioprotector ($p = 0.0000$) así como entre los distintos tipos de luz ensayados ($p = 0.0039$). Existió interacción entre ambos factores ($p = 0.0000$). En general las células de *Amphora* sp. fueron más delgadas después de su criopreservación. El mayor ancho celular se obtuvo en las células sin criopreservar con los cultivos provenientes de luz verde ($17.019 \pm 1.803 \mu\text{m}$), mientras que el menor ancho celular se presentó con el tratamiento de luz blanca y criopreservado con glicerol ($14.014 \pm 2.304 \mu\text{m}$).

Tabla 14. Valores promedio y desviación estándar del tamaño celular (μm) de *Amphora* sp., cultivada con distinta composición espectral previo a su criopreservación (CP) y posterior al uso de crioprotector y $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. En donde: LB (luz blanca), LA (luz azul), LV (luz verde), LM (luz amarilla), GL (GroLux); NP (no preservado).

Tipo de luz	Previo CP		Posterior uso de Glicerol		Posterior uso de DMSO	
	Largo	Ancho	Largo	Ancho	Largo	Ancho
LB	26.479 (3.328) ^{abc}	16.298 (1.957) ^{ab}	24.186 (3.667) ^c	14.014 (2.304) ^c	28.151 (4.415) ^{ab}	16.394 (1.982) ^{ab}
LA	26.014 (3.477) ^{abc}	15.547 (1.676) ^{abcd}	25.845 (2.657) ^{abc}	15.202 (1.215) ^{bc}	25.120 (3.403) ^{bc}	14.475 (2.026) ^{cd}
LV	28.589 (34.807) ^a	17.019 (1.803) ^a	26.468 (3.297) ^{abc}	15.127 (1.761) ^c	25.559 (3.205) ^{abc}	15.931 (1.341) ^{abc}
LM	25.517 (3.405) ^{abc}	15.881 (1.751) ^{abc}	26.00 (3.793) ^{abc}	15.340 (1.668) ^c	24.543 (3.942) ^c	14.823 (1.680) ^{bcd}
GL	26.638 (3.929) ^{abc}	15.638 (1.775) ^{abcd}	25.205 (3.384) ^{bc}	15.506 (1.958) ^{abcd}	25.827 (3.754) ^{abc}	14.793 (2.177) ^{bcd}
NP	26.346 (3.947) ^{abc}	15.071 (1.766) ^{bcd}	26.346 (3.947) ^{abc}	15.071 (1.766) ^{bcd}	26.346 (3.947) ^{abc}	15.071 (1.766) ^{bcd}

ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b>c>d$.

3.7.2 Composición proximal

El contenido de proteína (pg cél^{-1}) de *Amphora* sp. mostró que existían diferencias significativas por efecto del tipo de crioprotector ($p = 0.0280$) y diferencias altamente significativas entre los distintos tipos de luz ensayados ($p = 0.0000$). Existió también una interacción entre ambos factores ($p = 0.0007$). El mayor contenido de proteína se obtuvo con la luz blanca criopreservada con glicerol ($21.169 \pm 1.062\text{ pg cél}^{-1}$), mientras que el menor valor resultó en el tratamiento control sin el uso de crioprotectores ($2.906 \pm 0.141\text{ pg cél}^{-1}$).

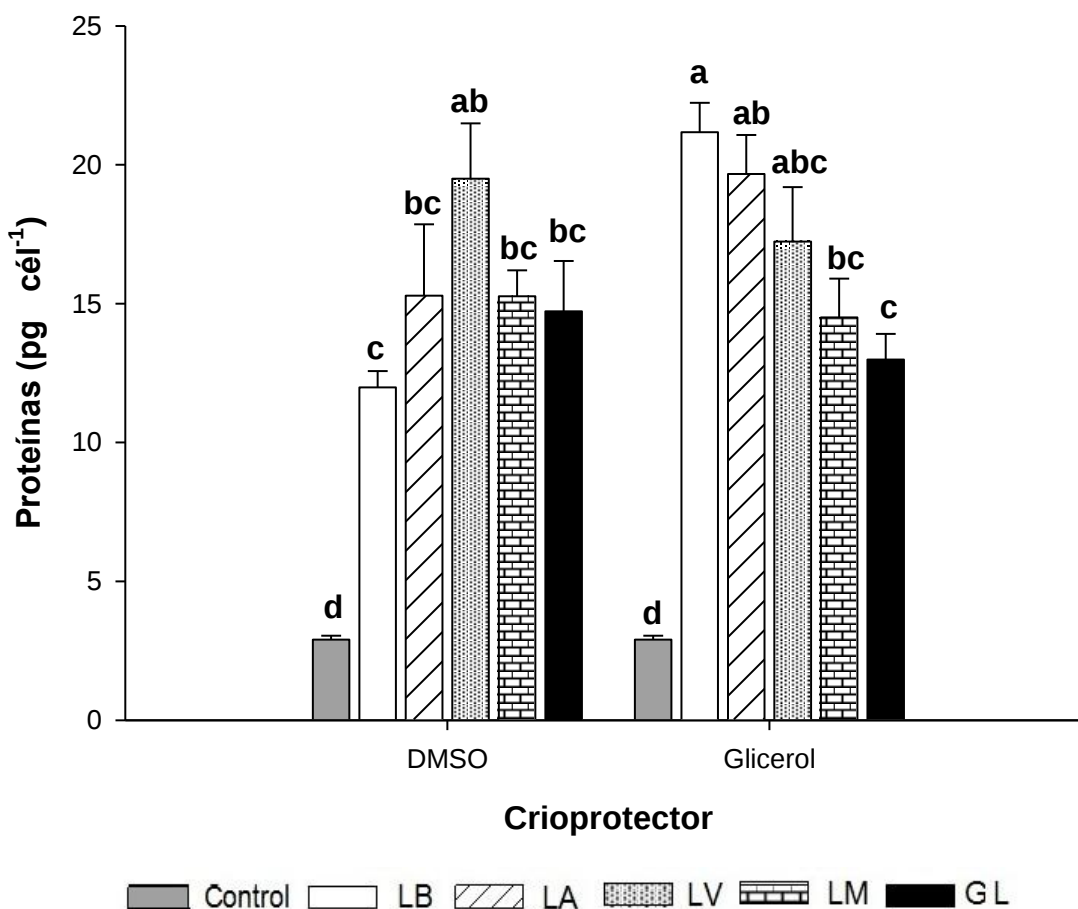


Figura 19. Valores promedio y desviación estándar del contenido de proteínas (pg cél⁻¹) de *Amphora* sp., cultivada con distinta composición espectral de luz blanca (LB), luz azul (LA), luz verde (LV), luz amarilla (LM) y GroLux (GL) y criopreservados con: glicerol y dimetilsulfóxido (DMSO). ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b>c>d$.

El contenido de lípidos resultó con diferencias altamente significativas entre los crioprotectores ($p = 0.0028$) y entre los distintos tipos de luz ensayados ($p = 0.0088$). Existió también una interacción entre ambos factores ($p = 0.0105$) (Figura 20). El mayor contenido de lípidos se presentó con luz blanca y criopreservada con glicerol (9.453 ± 0.200 pg cél⁻¹), mientras que el menor contenido de lípidos resultó en el tratamiento control (2.969 ± 1.204 pg cél⁻¹).

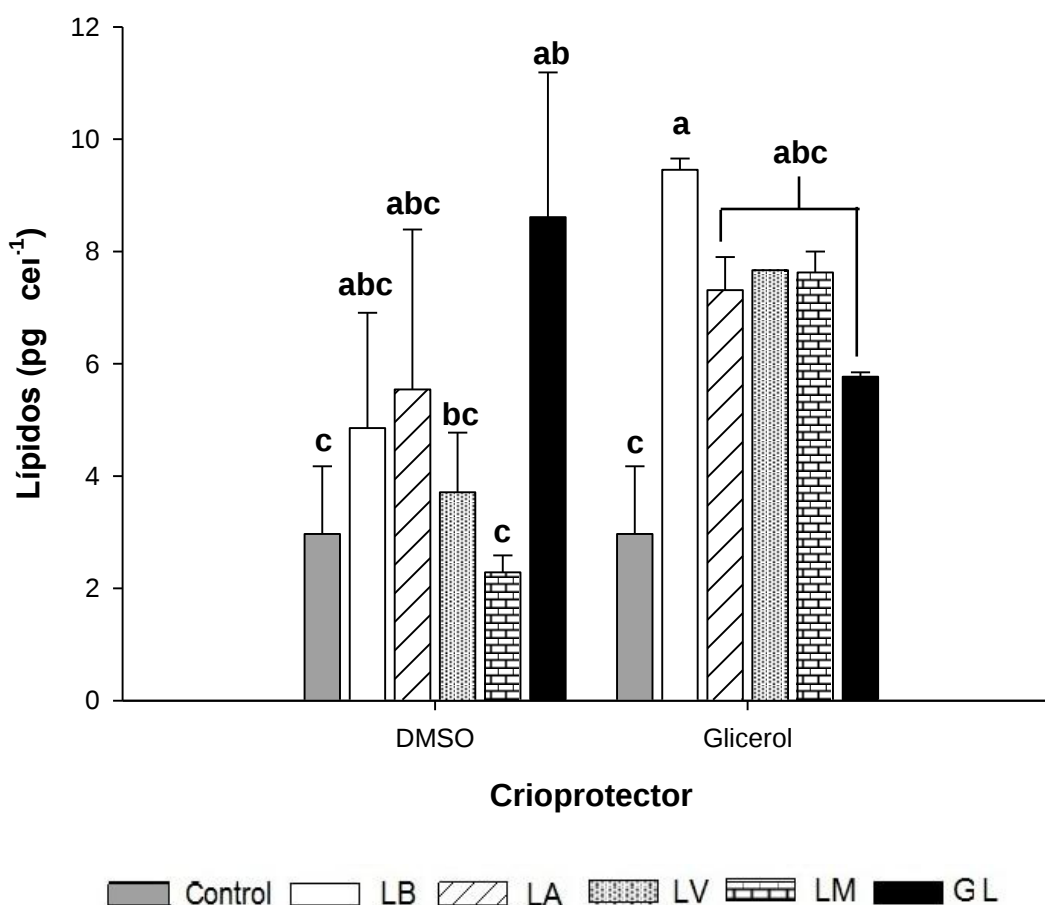


Figura 20. Valores promedio y desviación estándar del contenido de lípidos (pg cel^{-1}) de *Amphora* sp., cultivada con distinta composición espectral de luz blanca (LB), luz azul (LA), luz verde (LV), luz amarilla (LM) y GroLux (GL) y criopreservados con: glicerol y dimetilsulfóxido (DMSO). ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b>c$.

El contenido de clorofila a presentó diferencias altamente significativas entre los crioprotectores ($p = 0.0000$) y entre los distintos tipos de luz ensayados ($p = 0.0000$) y existió también una interacción entre ambos factores ($p = 0.0000$) (Figura 21). El mayor contenido de clorofila a se presentó con la luz verde y criopreservado con DMSO ($0.065 \pm 0.002 \text{ pg cel}^{-1}$), mientras que el menor valor fue con el tratamiento de GroLux y criopreservado con glicerol ($0.012 \pm 0.001 \text{ pg cel}^{-1}$).

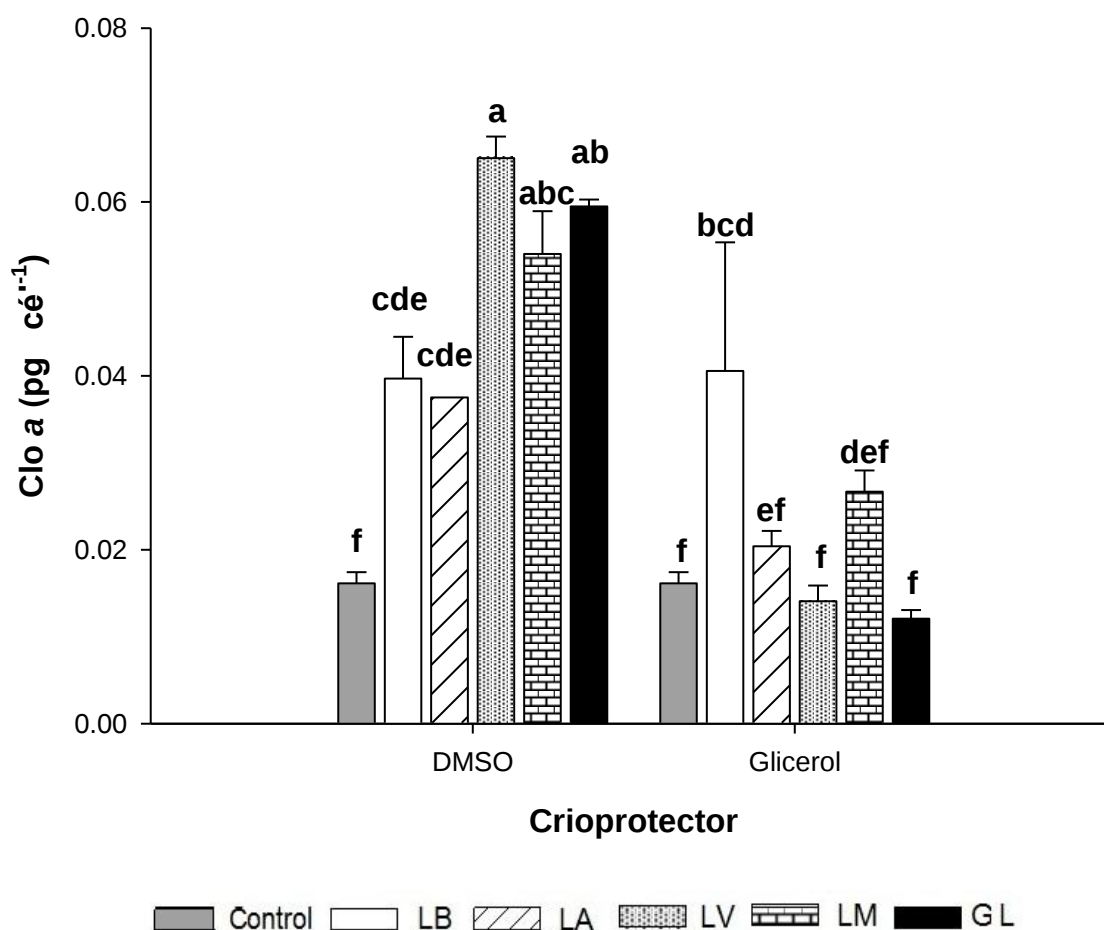


Figura 21. Valores promedio y desviación estándar del contenido de Clorofila a (pg cel^{-1}) de *Amphora* sp., cultivada con distinta composición espectral de luz blanca (LB), luz azul (LA), luz verde (LV), luz amarilla (LM) y GroLux (GL) y criopreservados con: glicerol y dimetilsulfóxido (DMSO). ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b>c>d>e>f$.

El contenido de carotenoides presentó diferencias altamente significativas entre los crioprotectores ($p = 0.0004$) y entre los distintos tipos de luz ensayados ($p = 0.0027$) y existió también una interacción entre ambos factores ($p = 0.0000$), (Figura 22). El mayor contenido de carotenoide resultó de con la luz verde y criopreservado con DMSO ($0.070 \pm 0.006 \text{ pg cel}^{-1}$), mientras que el menor contenido se presentó con la luz verde y criopreservado con glicerol ($0.033 \pm 0.006 \text{ pg cel}^{-1}$).

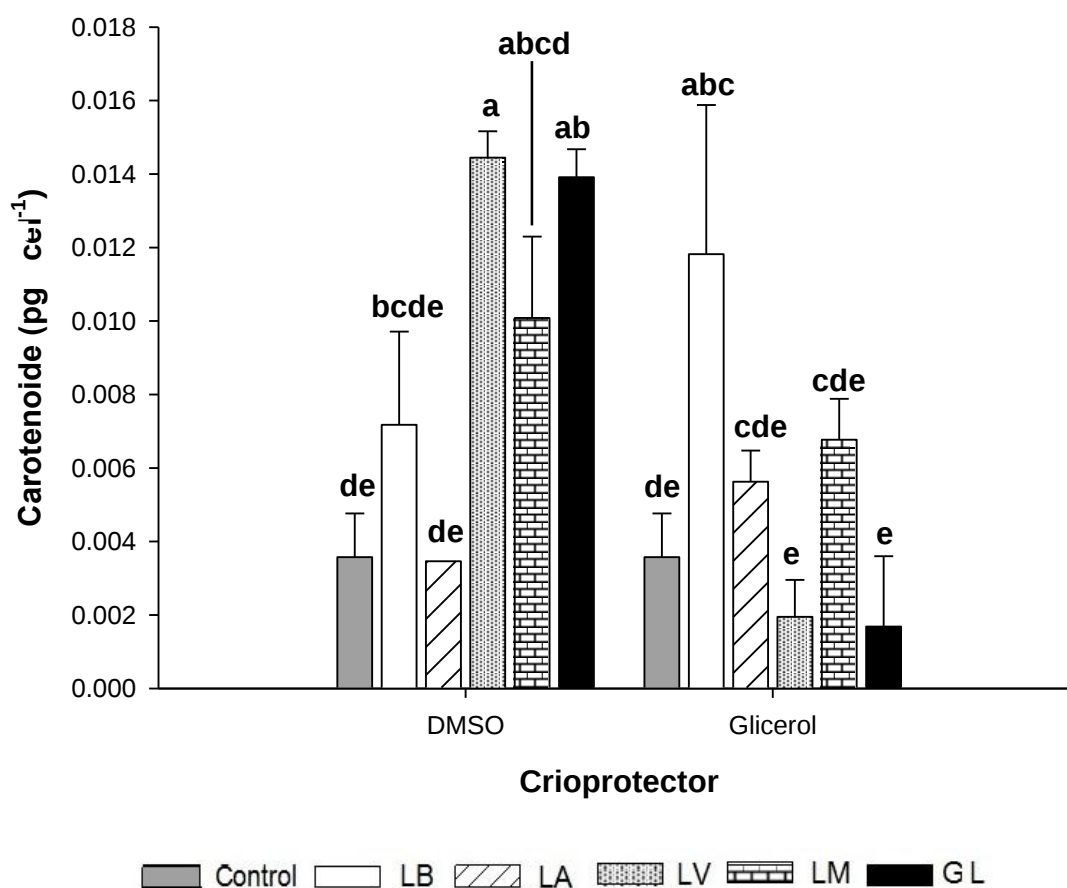


Figura 22. Valores promedio y desviación estándar del contenido de carotenoides (pg cel^{-1}) de *Amphora* sp., cultivada con distinta composición espectral de luz blanca (LB), luz azul (LA), luz verde (LV), luz amarilla (LM) y GroLux (GL) y criopreservados con: glicerol y dimetilsulfóxido (DMSO). ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b>c>d>e$.

En el análisis del peso seco orgánico (PSO) se observaron diferencias altamente significativas entre los crioprotectores ($p = 0.0000$) y los distintos tipos de luz ensayados ($p = 0.0000$) y con una interacción entre ambos factores ($p = 0.0000$). El menor valor obtenido de PSO se presentó con la luz blanca sin criopreservar ($7.375 \pm 0.009 \text{ pg cel}^{-1}$), mientras que el mayor valor se presentó con la luz amarilla y criopreservado con DMSO ($46.060 \pm 0.000 \text{ pg cel}^{-1}$) (Figura 23).

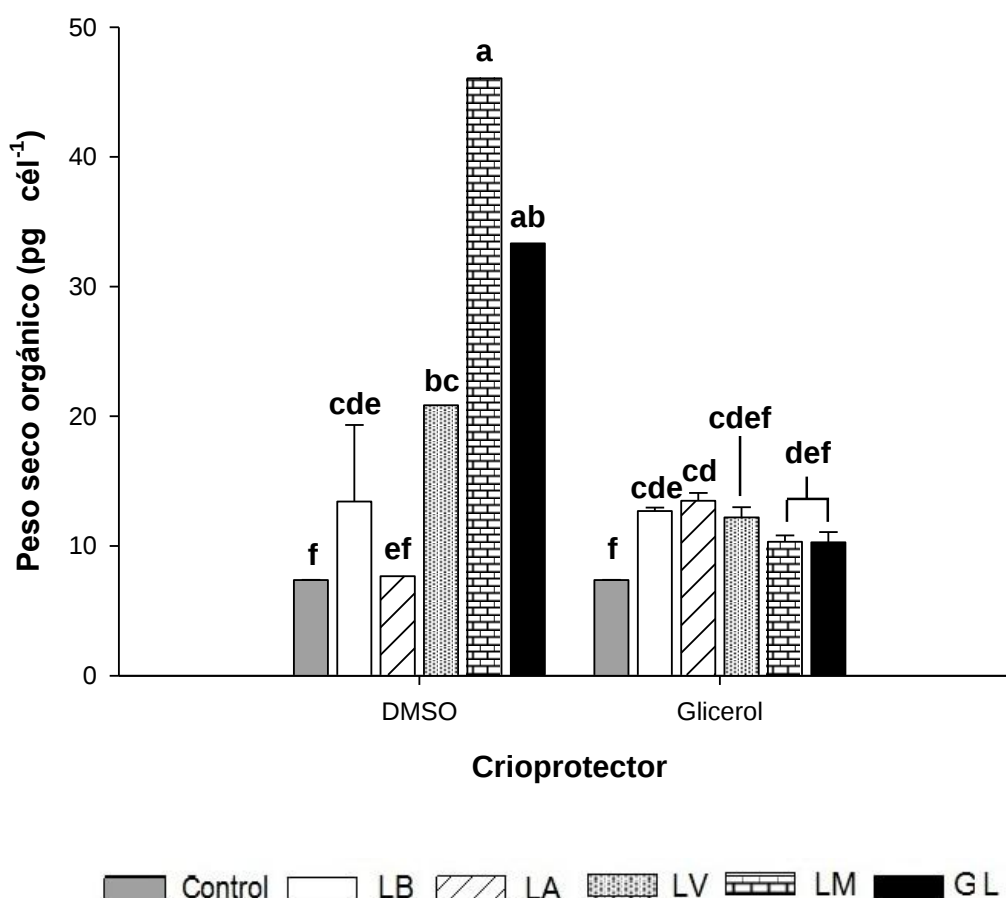


Figura 23. Valores promedio y desviación estándar del peso orgánico (pg cél⁻¹) de *Amphora* sp., cultivada con distinta composición espectral de luz blanca (LB), luz azul (LA), luz verde (LV), luz amarilla (LM) y GroLux (GL) y criopreservados con: glicerol y dimetilsulfóxido (DMSO). ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b>c>d>e>f$.

El peso de cenizas fueron presentó diferencias altamente significativas entre los crioprotectores ($p = 0.0000$) y entre los distintos tipos de luz ensayados ($p = 0.0000$) y existió una interacción entre ambos factores ($p = 0.0000$). El valor mayor se presentó con la luz verde y criopreservado con glicerol (84.519 ± 0.000 pg cél⁻¹) y el menor valor se presentó con la luz blanca sin criopreservar (12.691 ± 0.061 pg cél⁻¹) (Figura 24).

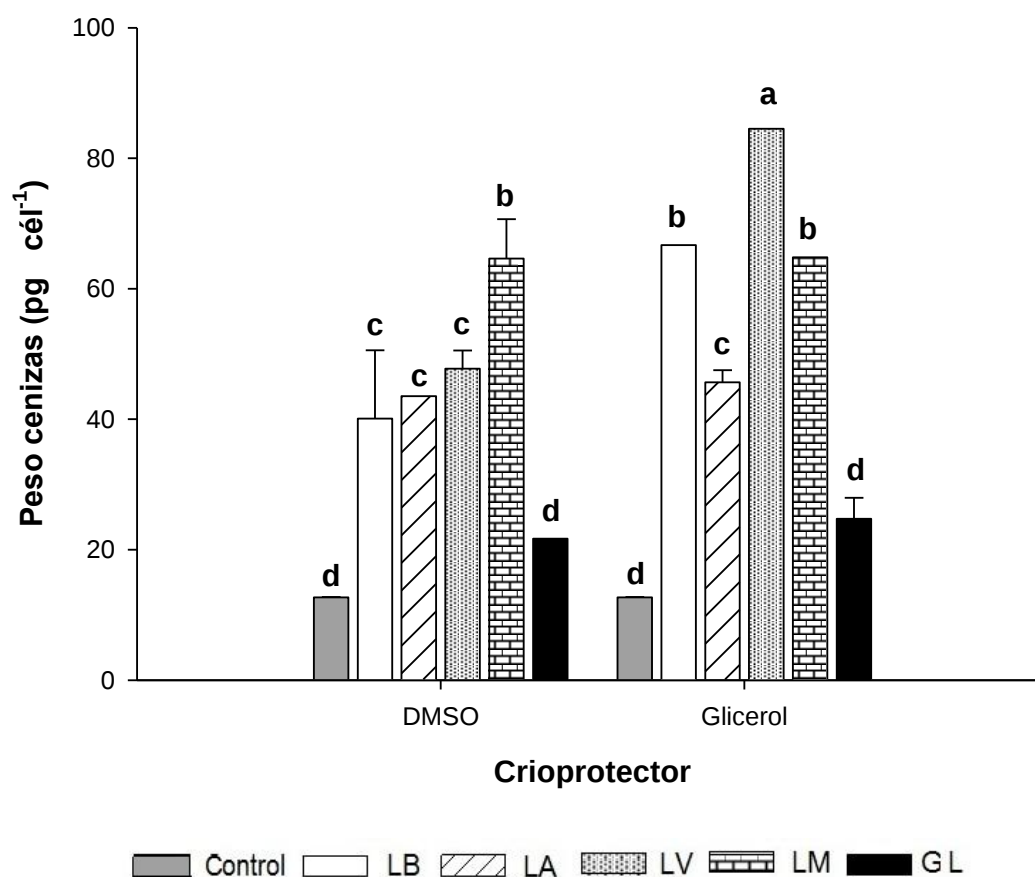


Figura 24. Valores promedio y desviación estándar del contenido del peso de cenizas (pg cél^{-1}) de *Amphora* sp., cultivada con distinta composición espectral de luz blanca (LB), luz azul (LA), luz verde (LV), luz amarilla (LM) y GroLux (GL) y criopreservados con: glicerol y dimetilsulfóxido (DMSO). ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha=0.05$; $a>b>c>d$.

Capítulo 4. Discusión

Crecimiento

En las diatomeas la composición espectral de la luz utilizada para su cultivo produce diferencias tanto en la tasa de crecimiento como en la producción de biomasa total (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 1996; Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2002; Mercado *et al.*, 2004). La eficiencia del crecimiento es un término que se refiere al crecimiento de un organismo que es logrado con la incorporación de los nutrientes al tejido celular y ésta eficiencia declina con la edad del cultivo. La eficiencia del crecimiento de las microalgas se ve afectada por la fotosíntesis que incluye la fijación del dióxido de carbono y la utilización de fotones provenientes de la energía luminosa; teniendo así que la eficiencia del crecimiento se incrementa con la eficiente utilización de la luz (Hill *et al.*, 2006; Kim, 2015; McNichol y McGinn, 2012).

En el presente estudio la mayor densidad celular de *Amphora* sp. se presentó al octavo día (fase estacionaria) de cultivo con la luz azul. Estos resultados coinciden con el estudio de Sánchez-Saavedra y Voltolina (2002), en donde encontraron variación en las densidades celulares de distintas especies ocasionada por el efecto del espectro de la luz, reportando que la calidad de luz azul-verde incrementa el crecimiento en el cultivo de *Chaetoceros* sp. y *Skeletonema costatum*. En el cultivo de *Scenedesmus obliquus* la mayor densidad celular se encontró con la luz azul con respecto a lo obtenido con la luz roja, verde y blanca (Fernández-Robledo, 2013). Resultados similares a los obtenidos en la presente investigación con *Amphora* sp. respecto a la mayor densidad celular evaluada con la luz azul, corresponden a lo encontrado para *Tisochrysis lutea* (anteriormente *Isochrysis affinis galbana* o T-Iso: Bendif *et al.*, 2013) (Yoshioka *et al.*, 2012; Gorai *et al.*, 2014), *Nannochloropsis* sp. (Vadiveloo *et al.*, 2015), *Dunaliella salina*, *Chaetoceros gracilis*, y *Heterocapsa circularisquama* (Gorai *et al.*, 2014). Por efecto de la luz azul en organismos fotosintéticos, usualmente se produce un cambio en la regulación de los procesos metabólicos de las microalgas, ya que incrementa la actividad de las enzimas caboxilasas y aumenta la producción de oxaloacetato, lo que produce una continua regeneración del ciclo de Krebs y por lo tanto se incrementa la producción de precursores de aminoácidos. En consecuencia por el efecto de la luz azul, se ocasiona una reducción

del contenido de carbohidratos debido a la mayor utilización de la glucosa para la formación del piruvato (Voskresenkaya, 1972).

En general se tiene que la longitud de onda correspondiente a la luz azul produce los siguientes efectos en las microalgas: incrementa en la síntesis de ADN y ARN (Wallen y Geen, 1971), produce la modificación de las características fotosintéticas (Mercado *et al.*, 2004), incrementa la asimilación de nitrógeno debido al aumento en la síntesis de la nitrato reductasa y la glutamina sintetasa (Figueroa, 1996), causa el incremento en la respiración con la subsecuente degradación de los carbohidratos de reserva (Kowallik, 1982), produce un aumento en la síntesis de clorofila *a* y *c* (Wallen y Geen, 1971), ocasiona modificaciones en la morfología superficial y en el grosor de la pared celular (Talarico, 1996), incrementa la carboxilación del PEP (fosfoenolpiruvato) y como consecuencia se aumenta la producción de oxalacetato (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 1996), controla las principales rutas de osmorregulación en microalgas (Taiz y Zeiger, 2006). La radiación emitida por la luz amarilla resultó en una menor densidad celular en *Amphora* sp. con respecto a las fuentes de luz con distintas características espectrales utilizadas en la presente investigación. Resultados similares son observados para las diatomeas *Haslea ostrearia* (Mouget *et al.*, 2005) y *Coscinodiscus granii* (Su *et al.*, 2015), las cuales fueron cultivadas con luz blanca, azul, verde, amarilla y roja, encontrando que que la luz azul generó el mayor crecimiento celular y la luz amarilla resultó en la menor densidad celular para ambas especies. El efecto de la luz amarilla sobre la baja densidad celular de *Amphora* sp. se puede deber a que produjo un incremento en el almacenamiento de carbohidratos, lo cual ocasionó que la energía no se utilizara para el crecimiento.

En este estudio no se llevó a cabo la evaluación del efecto de la irradiancia sobre la densidad poblacional de *Amphora* sp., sin embargo, de la Peña (2007) y Courtois de Viçose *et al.* (2012) mencionan que en cultivos de *Amphora* sp. mantenidos con un gradiente de luz blanca, la densidad celular no se ve afectada, pero sí se modifica la tasa de crecimiento y que es mayor a bajas irradiancias, lo cual puede deberse a que se reporta que las diatomeas bentónicas como *Amphora* sp. son eficientes asimilando los nutrientes con la utilización de bajas irradiancias (Stevenson *et al.*, 1996; Seckbach, 2007). Se tiene que las densidades celulares reportadas en el cultivo de *Amphora* sp.

realizado por de la Peña, (2007) son mayores que las obtenidas en el presente estudio para todas los distintos tipos de luz utilizados, lo cual puede estar relacionado a la utilización de distintos medios de cultivo no comparables con el medio “f” que fue utilizado en la presente investigación, ya que de la Peña (2007) utiliza el medio “f/2” mas la adición de fertilizantes comerciales. Las diferencias obtenidas son debidas a los distintos tamaños de las células de *Amphora* sp., ya que en el trabajo de de la Peña (2007) se encontró que las células son de menor tamaño (largo 10.8 x 12.87 μm y ancho 2.97 x 3.44 μm) que las evaluadas en la presente investigación (largo 22.95 μm y ancho 12.87 μm).

Silva-Aciares y Riquelme (2008) comparan el crecimiento de dos especies de *Amphora* sp. cultivadas con luz blanca a 20 °C en medio “f/2”, a una irradiancia de 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y con un fotoperiodo de 12:12h (12 horas luz, 12 horas oscuridad), encontrando que las máximas densidades celulares se alcanzaron al día 7 de cultivo y son densidades celulares menores a los que se encontraron en la presente investigación con la luz blanca, lo cual puede deberse a que los autores anteriores analizaron el efecto de distintas configuraciones de biorreactores y por las diferencias en los valores de la irradiancia y el fotoperiodo, de manera que las adaptaciones del aparato fotosintético difieren con las de la cepa de *Amphora* sp. utilizada en el presente estudio.

Jiménez-Valera (2015) realizó el aislamiento de la especie *Amphora* sp. utilizada en el presente estudio, el cultivo se llevó a cabo con luz blanca, temperatura y medio de cultivo iguales a los utilizados en la presente investigación, pero distinta irradiancia (100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), este autor obtuvo densidades celulares menores que las evaluadas en esta investigación, estas diferencias se deben a las distintas densidades del inóculo utilizados y a los niveles de irradiancia.

La tasa de crecimiento (μ) y el tiempo de generación (T_g) resultaron afectados por la composición espectral de la luz. La mayor tasa de crecimiento y el menor tiempo de generación de *Amphora* sp. se produjeron con la luz verde, mientras que la menor tasa de crecimiento y el mayor tiempo de generación se presentó en los cultivos expuestos a la luz amarilla. Las diferencias entre la mayor tasa de crecimiento producida por la luz verde y la mayor densidad de células producida por la luz azul en el cultivo de *Amphora* sp., se pueden deber a que la tasa de crecimiento (μ) fue evaluada en la fase de

crecimiento exponencial, mientras que los valores de mayor densidad celular se evaluaron en la fase de crecimiento estacionaria (día 8). En la clorofita *Scenedesmus obliquus* la mayor tasa de crecimiento se obtuvo al tener los cultivos con luz azul y luz verde respecto a lo obtenido en los cultivos expuestos a luz roja y blanca (Fernández-Robledo, 2013). Este efecto que produjo la luz verde sobre la tasa de crecimiento se asocia al hábitat natural del cual provienen las especies a estudiar, así como a la composición de los pigmentos, la cual es el resultado de la fotoaclimatación. Otro factor que interviene en los resultados obtenidos en el tiempo de generación en el cultivo de *Amphora* sp. en la presente investigación, es que de acuerdo con Arbones *et al.* (1996), la absorción de los carotenoides de las diatomeas se da en la región verde-amarilla del espectro de la luz visible, pero al analizar los espectros de absorción de la luz de *Amphora* sp. (Figura 13 y 14A) se encuentra que la mayor absorción de luz por la célula se presenta en la región de los azules y en la región de los rojos del espectro de luz visible, lo cual podría estar relacionado con la composición de la pared celular.

El menor tiempo de generación se presentó con la luz verde mientras que el mayor tiempo de generación se obtuvo con la luz amarilla, estas discrepancias en los resultados solo pueden adjudicarse al hecho de que *Amphora* sp. posee respuestas especie-específicas a los efectos producidos por la energía radiante emitida por los distintos tipos de luz. Los resultados sobre el tiempo de generación en el presente trabajo, no coinciden con lo reportado para otras especies como *Scenedesmus obliquus*, que al ser cultivadas bajo la luz roja y la luz blanca crecen más rápido y su ciclo celular es más corto que en aquellas cultivadas bajo la luz azul y la luz verde (Cepák *et al.*, 2006), esta diferencia puede atribuirse a las respuestas fisiológicas de cada especie, a la cantidad y la composición de los pigmentos fotosintéticos (Fogg y Thake, 1983; Becker, 1994), a las propiedades de absorción de la luz y a la formación de biopelículas en el cultivo de *Amphora* sp. de manera que la conjunción de todos estos factores definen la capacidad de absorción de la luz por parte de la célula para la realización de sus procesos metabólicos.

Los resultados obtenidos en esta investigación para *Amphora* sp. muestran que la fase de crecimiento exponencial tuvo una duración de 4 días para los cultivos mantenidos con los distintos tipos de luz, con excepción de la luz azul, que presentó una duración de

5 días. En la diatomea planctónica *Chaetoceros* sp. se encontró que la fase exponencial tuvo una duración de 4 días y posteriormente las células comenzaron la fase estacionaria, la cual se presentó hasta el día 8 de cultivo con luz blanca y dos tipos de GroLux (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2006). La duración de la fase exponencial se asocia con un rápido crecimiento y sin la presencia de factores limitantes, los cuales ocasionan que el cultivo entre en la fase de crecimiento estacionario, entre dichos factores que causan un decremento en el crecimiento, se encuentra el agotamiento de los nutrientes disponibles en el medio de cultivo, la ausencia de dióxido de carbono (CO₂), el cambio de pH en el medio de cultivo debido a las reacciones químicas de la fotosíntesis, el efecto de autosombreado causado por el aumento en la densidad celular (Fogg y Thake, 1983; Dawes, 1991).

La tendencia general de los valores del pH en los cultivos expuestos a distintos tipos de luz, fue de aumentar conforme incrementó el crecimiento poblacional, sin embargo existieron diferencias generadas por efecto de los distintos tipos de luz, en donde los menores valores de pH se obtuvieron al tener los cultivos con luz blanca y los mayores valor de pH con los otros tipos de luz ensayados (azul, verde, amarilla y GroLux), ya que no presentaron diferencias significativas entre ellas. Estas diferencias pueden deberse a la alcalinización del medio de cultivo debido principalmente a las reacciones del proceso de la fotosíntesis utiliza el dióxido de carbón disuelto en el medio de cultivo y por lo tanto se produce un incremento en el pH (Beer *et al.*, 2014). En otras investigaciones realizadas con cultivos de dos especies de *Amphora* sp., cultivadas con luz blanca y con condiciones de temperatura (20 °C), tipo de medio de cultivo (f/2), a una irradiancia de 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y con un fotoperiodo de 12:12h (12 horas luz, 12 horas oscuridad), se encontraron valores de pH menores (7.3 a 7.9) (Silva-Aciares y Riquelme, 2008) a los resultantes en la presente investigación. A pesar de que en el presente estudio se utilizaron condiciones similares de temperatura y medio de cultivo, la diferencia en los resultados obtenidos, puede deberse a la utilización de una irradiancia menor en esta investigación respecto a la utilizada por Silva-Aciares y Riquelme (2008).

Los cambios en el pH en el cultivos de *Amphora* sp. causados por los distintos tipos de luz, pueden ser debidos a distintos factores, tales como: los procesos metabólicos, el intercambio de carbono inorgánico, la fotosíntesis, la excreción de ácidos

orgánicos, el crecimiento de la población y la asimilación de nitrógeno, entre otros (Geider y Osborne, 1991; Lafarga-de la Cruz *et al.*, 2006; Beer *et al.*, 2014). El pH más bajo fue encontrado con los cultivos mantenidos con luz blanca, en otras investigaciones se ha encontrado una tendencia similar y se atribuye a una mayor asimilación del nitrógeno produciendo un descenso en el pH (Geider y Osborne, 1991), lo que se ve reflejado en un mayor contenido de proteínas; sin embargo esto no se observó en el presente estudio. Otros factores que pudieron influir en tener menores valores de pH en los cultivos mantenidos con luz blanca, son la excreción de ácidos orgánicos y un alto flujo de cationes (calcio, potasio, sodio) (Geider y Osborne, 1991).

El tamaño celular de *Amphora* sp. no se vio afectado por la composición espectral de la luz, pero sí por la fase de crecimiento, resultando en células más largas durante la fase de crecimiento exponencial y estacionaria, por lo que las células más delgadas se presentaron en la fase inicial de crecimiento, y las células más anchas fueron obtenidas con los cultivos mantenidos con GroLux durante la fase de crecimiento estacionaria. Éstos resultados no concuerdan con los obtenidos por Jiménez-Valera (2015) para el cultivo de *Amphora* sp. a pesar de que es la misma cepa que la utilizada en la presente investigación y mantenida en cultivo con luz blanca, ya que el tamaño celular reportado por este autor es menor ($14.36 \times 5.56 \mu\text{m}$) que los obtenidos en el presente estudio ($22.95 \mu\text{m} \times 12.87 \mu\text{m}$). Estas diferencias posiblemente sean debidas a las distintas irradiancias, ya que en ésta investigación se utilizó un 50% menos de irradiancia que el autor antes mencionado, también se puede deber al cambio de estrategia reproductiva, lo cual es muy común en las diatomeas ya que la división celular produce un decremento en el tamaño de las valvas lo que es compensado con el cambio de reproducción de asexual a reproducción sexual para recuperar el máximo tamaño celular (Seckbach y Kociolek, 2011).

En investigaciones realizadas con diatomeas se reportan cambios en el tamaño celular ocasionado por el efecto de distintos espectros de luz, sin embargo esto no concuerda con los resultados obtenidos en esta investigación con *Amphora* sp. En el cultivo de cinco especies de diatomeas bentónicas (*Nitzschia thermalis*, tres cepas de *Nitzschia laevis* y *Navicula incerta*) se encontró que por efecto de la luz azul se producen cambios en el tamaño celular, pero la respuesta fue especie específica, inclusive entre

las tres cepas de *N. laevis* algunas resultaron en menor tamaño al cultivarlas con luz azul (cepa 1), mientras que otras aumentaron de tamaño (cepa 3) o no tuvieron modificaciones respecto a lo obtenido con luz blanca (cepa 2) (Mercado *et al.*, 2004). Para *Coscinodiscus granii* se tiene que bajo distintos tipos de luz (blanca, azul, verde, amarilla y roja) se producen cambios en el tamaño celular, presentando una disminución en el diámetro de la frústula con luz blanca respecto a lo obtenido con luz verde (Su *et al.*, 2015). Se considera que las diferencias en el tamaño celular causadas por efecto de la composición espectral de la luz, son debidas a una respuesta especie-específica que está relacionada con la capacidad de las células para captar la energía de la luz, el tipo de pigmentos sintetizados y como afecta la síntesis enzimática (Voskresenskaya 1972; Flaak y Epifanio, 1978; Sánchez-Saavedra *et al.*, 1996; Figueroa, 1996; Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2002; Sánchez-Saavedra *et al.*, 2015; Su *et al.*, 2015).

Composición proximal

Proteínas

Uno de los factores que modifican el metabolismo de las microalgas es la composición espectral de luz en los cultivos, lo que resulta en variaciones en la composición proximal de la especie y en el contenido de pigmentos (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2002; Sánchez-Saavedra y Voltolina, 1996). Así mismo, se tiene las concentraciones relativas de los componentes orgánicos e inorgánicos de las células cultivadas son dependientes de la calidad de la luz (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 1996) y la composición proximal de las células se ve influenciada también por la fase de crecimiento del cultivo (Sánchez-Saavedra *et al.*, 2015).

La composición proximal de *Amphora* sp. se vió afectada tanto por la composición espectral de la luz como por la fase de crecimiento del cultivo. El mayor contenido de proteína se presentó con el espectro de la luz blanca en la fase exponencial y para la luz amarilla en ambas fases de crecimiento, el menor contenido de proteínas se obtuvo con la luz verde en la fase de crecimiento exponencial. Los resultados obtenidos con *Amphora* sp. en la presente investigación, son similares a los reportados por Courtois de Viçose *et al.* (2012) para *Amphora* sp. en donde se encontró el mayor contenido de proteína con

luz blanca durante la fase de crecimiento exponencial. Se encontró además que el contenido de proteínas fue mayor al reportado por Jiménez-Valera (2015) al mantener cultivos de la misma especie y en similares condiciones de cultivo con luz blanca.

En ciertas especies de microalgas la composición espectral no produce cambios en el contenido de proteínas (Vadiveloo *et al.*, 2015). Sin embargo, de acuerdo con Sánchez-Saavedra y Voltolina (1996), Sánchez-Saavedra y Voltolina (2006), Marchetti *et al.* (2012) y Sánchez-Saavedra *et al.* (2015), el contenido de proteína se incrementa con la luz azul y la luz verde-azul; éstas conclusiones no concuerdan con los resultados obtenidos en el presente trabajo con el cultivo de *Amphora* sp. Los resultados de esta investigación son distintos a los observados por Sánchez-Saavedra y Voltolina (2006) para el cultivo de *Chaetoceros* sp. y Fernández-Robledo (2013) para el cultivo de *Scenedesmus obliquus*, ya que la GroLux incrementa el contenido de proteínas en *Chaetoceros* sp. y la luz roja incrementa el contenido de proteínas en *Scenedesmus obliquus*.

A pesar de que se ha demostrado que la luz azul favorece la síntesis de aminoácidos y por lo tanto el contenido de proteína (Voskresenskaya, 1972; Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2006), en este trabajo el mayor contenido de proteínas fue obtenido con la luz blanca en el cultivo de *Amphora* sp., lo cual se atribuye a respuestas específicas (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 1996; Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2002), por lo tanto en esta investigación realizada con los cultivos de *Amphora* sp. mantenidos con la luz blanca aparentemente utilizan los carbohidratos para producir un alto contenido de proteínas. Se sabe también que el aumento en el contenido de proteínas produce un descenso en el contenido de lípidos (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 1996), pese a esto en el cultivo de *Amphora* sp. no se observó este efecto. Además, el contenido de proteínas fue mayor en la fase de crecimiento exponencial, lo cual se puede deber a la mayor disponibilidad de nitrógeno durante la fase exponencial de crecimiento y que es necesario para la síntesis de aminoácidos y formación de las proteínas (Simental-Trinidad *et al.*, 2001; Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2006; Lafarga-de la Cruz *et al.*, 2006; Fernández-Robledo, 2013).

Carbohidratos

El contenido de carbohidratos aumentó con el tiempo de cultivo, el mayor contenido resultó en el tratamiento de GroLux en la fase estacionaria de crecimiento, mientras que los menores valores se obtuvieron con la luz azul en la fase exponencial. Para la misma cepa de *Amphora* sp. cultivada bajo luz blanca, se reportan contenidos de carbohidratos menores (Jiménez-Valera, 2015) a los de ésta investigación. En el cultivo de *Amphora* sp. realizado por Courtois de Viçose *et al.* (2012) con luz blanca, se encuentran resultados similares a los obtenidos en ésta investigación, debido a que el mayor contenido de carbohidrato se generó en la fase estacionaria de crecimiento con el mismo espectro de luz utilizada en esta investigación (GroLux). Los resultados obtenidos con *Amphora* sp. concuerdan con lo descrito por Sánchez-Saavedra y Voltolina (2006) para *Chaetoceros* sp., dado que el espectro que produjo el mayor contenido de carbohidratos fue el que se produjo al mantener los cultivos con GroLux.

Los menores contenidos de carbohidratos evaluados para *Amphora* sp. en la presente investigación son similares a los obtenidos por Sánchez-Saavedra y Voltolina (1996) para *Chaetoceros* sp. y Vadiveloo *et al.* (2015) para *Nannochloropsis* sp., ya que la luz azul y la luz verde producen un decremento en el contenido de carbohidratos, mientras que la luz roja produce un incremento en la síntesis de carbohidratos en cultivos de *Scenedesmus obliquus* (Fernández-Robledo, 2013). Sin embargo, estas respuesta a la producción de carbohidratos por efecto de la composición espectral de la luz, pueden ser distintas en otras especies, como lo evaluado por Simental-Trinidad *et al.* (2001), Sánchez-Saavedra y Voltolina (2006) y Marchetti *et al.* (2012), quienes encuentran que la luz azul y la luz blanca incrementan el contenido de carbohidratos, esta distinta respuesta en el metabolismo puede estar influenciada por las características de la especie, así como por la magnitud de la irradiancia utilizada con los distintos tipos de luz.

El mayor contenido de carbohidratos obtenido en *Amphora* sp. al cultivarla con GroLux, puede explicarse por el efecto de una mayor asimilación de carbono que se favoreció con este espectro de luz, así como a una respuestas especie-específica. Por lo anterior, se presentó una baja carboxilación del PEP (fosfoenolpiruvato) y ocasionó un incremento en los productos de reserva. Por otro lado, el menor contenido de carbohidratos en el cultivo de *Amphora* sp. fue obtenido con la luz azul, lo cual se debe

al incremento de la carboxilación del PEP ocasionando un decremento en la síntesis de carbohidratos como previamente ha sido descrito por otros autores (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 1996; Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2006; Marchetti *et al.*, 2012; Vadiveloo *et al.*, 2015). Además, el contenido de carbohidratos fue mayor durante la fase de crecimiento estacionaria, lo cual es ocasionado por el almacenamiento como productos de reserva.

Lípidos

De manera general el contenido de lípido disminuyó con el tiempo, resultando en un mayor contenido de lípidos en la fase de crecimiento exponencial, al mantener los cultivos expuestos con GroLux, mientras que el menor contenido de lípidos se obtuvo bajo la misma composición espectral pero durante la fase de crecimiento estacionaria. Éstos resultados son similares a los obtenidos por Courtois de Viçose *et al.* (2012) en el cultivo de *Amphora* sp. mantenida con la luz blanca y encontraron que el mayor contenido de lípidos se presentó en la fase de crecimiento exponencial. Sin embargo, los resultados no coinciden con los reportados por Jiménez-Valera (2015) para la misma cepa de *Amphora* sp., debido a que en esa investigación encontraron que el contenido de lípidos es mayor durante la fase estacionaria de crecimiento. Para el cultivo de *Chlorella vulgaris* se evaluó que la luz roja lejana de 740 nm a alta irradiancia ($400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) produce los mayores contenidos de lípidos (Kula *et al.*, 2014a), lo que se resulta similar a lo obtenido al mantener a *Amphora* sp. con GroLux en la presente investigación, a pesar de las diferencias en la irradiancia, lo cual puede deberse a la diferencia de especies y respuestas especie-específicas.

Por efecto de la luz azul se encontró un decremento en el contenido de lípidos en *Amphora* sp. en este estudio, mientras que para *Isochrysis galbana* se incrementó el contenido de total de lípidos al cultivarla con luz azul intermitente en la fase estacionaria (Yoshioka *et al.*, 2012). El mayor contenido de lípidos en *Amphora* sp. se presentó durante la fase de crecimiento estacionaria, lo que concuerda con los resultados descritos para las diatomeas bentónicas (Simental-Trinidad *et al.*, 2001; Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2006); este aumento de lípidos se puede deber a la acumulación de productos

de reserva en la célula, así como a una mayor incorporación de fosfatos en la fase estacionaria (Lafarga-de la Cruz *et al.*, 2006), los cuales son componentes importantes de los fosfolípidos que se encuentran en la membrana celular.

Pigmentos

La concentración de clorofila *a* encontrada en los cultivos de *Amphora* sp. fue mayor en los cultivos mantenidos con luz amarilla durante la fase exponencial, mientras que fue menor en la luz azul en las dos fases de crecimiento. En otros estudios realizados con diversos cultivos de microalgas, se ha encontrado que el contenido de clorofila *a* es mayor durante la fase de crecimiento exponencial debido al rápido crecimiento de las células (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2002; Lafarga-de la Cruz *et al.*, 2006; Fernández-Robledo, 2013; Sánchez-Saavedra *et al.*, 2015). Se considera que en este trabajo los altos contenidos de clorofila *a* en *Amphora* sp. se deben a una necesidad por captar mayor energía radiante para incrementar la fotosíntesis.

En diversas investigaciones se ha encontrado que por efecto de la luz blanca se produce un incremento en el contenido de clorofila *a* comparativamente con el uso de otras fuentes de iluminación y esto se ha visto en especies como: *Chaetoceros* sp., *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira costatum*, *Rhodomonas* sp., *Isochrysis* sp. (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2002; Lafarga-de la Cruz *et al.*, 2006; Marchetti *et al.*, 2012; Vadiveloo *et al.*, 2015), lo cual diverge con lo observado en este trabajo. Se menciona que la luz azul y la luz verde también pueden producir un aumento en el contenido de clorofila *a* en diversas especies de microalgas (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 1996; Mercado *et al.*, 2004; Fernández-Robledo, 2013; Godínez-Ortega *et al.*, 2008). Sin embargo, en otros estudios como los realizados por Gorai *et al.* (2014), señalan un decremento en el contenido de clorofila *a* por efecto de la composición espectral de la luz, lo que es comparable con los resultados de los cultivos de *Amphora* sp. realizados en esta investigación. La haptofita *Tisochrysis lutea* puede generar altos contenidos de clorofila *a* con la utilización de la luz roja (Sánchez-Saavedra *et al.*, 2015) la energía emitida por este tipo de luz es cercana a la cantidad de energía radiante emitida

por la luz amarilla y que produjo el mayor contenido de clorofila *a* en el cultivo de células de *Amphora* sp. del presente estudio.

En cuanto al contenido de carotenoides, se obtuvo la misma tendencia que la descrita previamente para la clorofila *a*, en donde el mayor contenido se presentó en la luz amarilla en la fase exponencial de crecimiento, mientras que el menor valor se obtuvo con la luz azul durante la fase exponencial. En otras investigaciones se ha descrito que el contenido de carotenoides se ve incrementado durante la fase de crecimiento exponencial debido a que las células necesitan protegerse de la irradiancia debido a las bajas densidades celulares y usualmente en esta fase no se da un efecto de autosombreado (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2002; Fernández-Robledo, 2013). La tendencia antes descrita resultó similar a los resultados obtenidos en el presente trabajo. No obstante, en determinadas especies tales como *Chaetoceros* sp. (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 1996) y *Scenedesmus obliquus* (Fernández-Robledo, 2013), el contenido de carotenoides no se ve afectado por la fase de crecimiento del cultivo. Posiblemente el tipo de respuesta a la síntesis de los carotenoides, este influenciada por el nivel de irradiancia usado en los cultivos descritos en la literatura del área y por eso se encuentran diferentes respuestas que también estarán asociadas al contenido de pigmentos del grupo taxonómico algal.

Diversas investigaciones han mostrado que el contenido de carotenoides se ve afectado principalmente por la composición espectral de la luz y por el nivel de la irradiancia utilizado, produciendo el espectro de la luz azul y la luz verde los mayores contenidos de carotenoides y conforme aumenta el nivel de la irradiancia usualmente se incrementa el contenido de carotenoides (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2002; Godínez-Ortega, 2008; Fernández-Robledo, 2013). La tendencia previamente descrita para los carotenoides resulta contraria a lo encontrado en el cultivo de *Amphora* sp. ya que el mayor contenido de carotenoides se obtuvo con la luz amarilla en ésta investigación.

Peso seco y contenido de cenizas

En diversos estudios relacionados con el cultivo de algas en condiciones controladas, se ha visto que la magnitud del peso celular es una característica que es modificada por efecto de la composición espectral de la luz, por la irradiancia y por efecto de las fases de crecimiento (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 1996; Fernández-Robledo, 2014; Sánchez-Saavedra *et al.*, 2015).

El menor valor de peso seco orgánico se presentó con la luz verde en la fase de crecimiento exponencial, mientras que el mayor peso seco se obtuvo con la luz amarilla durante la fase exponencial. En cultivos de *Amphora* sp. mantenidos con similares condiciones de cultivo y con luz blanca (Jiménez-Valera, 2015), se evaluaron contenidos menores de peso seco que los observados en esta investigación para todos los tipos de luz utilizados. Estas diferencias son debidas al mayor tamaño celular evaluado en esta investigación para *Amphora* sp. Además, Simental-Trinidad *et al.* (2001) mencionan que en cultivos de diatomeas cultivadas con luz blanca se produce un incremento en el peso seco proporcional al incremento en la edad del cultivo. Fernández-Robledo (2014) encontró que *Scenedesmus obliquus* durante la fase de crecimiento exponencial produce el mayor peso seco orgánico, esta tendencia resulta similar a lo encontrado en esta investigación en los cultivos de *Amphora* sp.

Se obtuvo que el menor peso de las cenizas fue al mantener los cultivos con luz verde en la fase estacionaria crecimiento, mientras que el mayor peso de las cenizas se encontró con los cultivos expuestos a la luz amarilla en la fase exponencial de crecimiento. Jiménez-Valera (2015) encuentra para cultivos de *Amphora* sp. que fueron mantenidos en similares condiciones de cultivo y con igual irradiancia de luz blanca, los valores de cenizas fueron menores a los evaluados en este trabajo y estas diferencias son debidas al mayor tamaño celular obtenido en esta investigación con *Amphora* sp. Courtois de Viçose *et al.* (2012) señalan que en los cultivos de *Amphora* sp. expuestos a luz blanca, el contenido de cenizas resultó en valores mayores para la fase de crecimiento estacionaria respecto a lo evaluado en la exponencial. Estos últimos resultados descritos, difieren de los encontrados en el presente estudio con *Amphora* sp., ya que se encontró una tendencia inversa a la previamente descrita. Sin embargo, en otras especies de diatomeas el espectro de la luz blanca no genera diferencias en el contenido de cenizas

(Simental-Trinidad *et al.*, 2001), por lo que altos valores del contenido de cenizas son atribuidos a la incorporación de sílice para la formación de la frústula y por el diferente grado de silificación entre los distintos grupos de diatomeas.

En resumen se encontró que los mayores pesos celulares, que incluyen el peso seco orgánico y el peso de cenizas de *Amphora* sp. se obtuvieron con la luz amarilla durante la fase de crecimiento exponencial. Se conoce que el contenido del peso seco total y del peso seco orgánico tienden a aumentar con el tiempo de cultivo en diatomeas bentónicas (Simental-Trinidad *et al.*, 2001; Yoshioka *et al.*, 2012), sin embargo, esta tendencia no se observó en los cultivos de *Amphora* sp. en ésta investigación. Los altos contenidos de cenizas, posiblemente se obtuvieron por una alta demanda de sílice y su incorporación a la frústula de las diatomea estudiada como previamente ha sido descrito por otros autores (Simental-Trinidad *et al.*, 2001), y que coincide con lo observado al mantener los cultivos de *Amphora* sp. con luz amarilla.

Coeficiente específico de absorción

El coeficiente de absorción del fitoplancton (a_{ph}) presentó dos picos de absorción máxima, el primero de ellos entre los 400 y los 480 nm de longitud de onda que corresponde a la banda del color azul (440 nm) y el segundo se encuentra entre los 650-700 nm y que corresponde a la banda del color rojo (674 nm). De acuerdo con Tamburic *et al.* (2014) el espectro de absorción del fitoplancton está determinado por la composición pigmentaria de las células. La diatomea *Amphora* sp. contiene clorofila *a*, *c* y *c*₂, así como fucoxantina, diatoxantina, diadinoxantina, β - β caroteno (Siqueiros-Beltrones, 2002; Jeffrey *et al.*, 2011). El espectro de absorción de *Amphora* sp. es típico para diatomeas en cultivo (Kirk, 1994).

La absorción se incrementó asociada al aumento de la abundancia poblacional. El coeficiente de absorción del fitoplancton ($a_{ph(440)}$) resultante en el cultivo de *Amphora* sp. es mayor a los reportados por Arbones *et al.* (1996), Millán-Núñez (1999) y Jiménez-Estrada (2013), lo que puede deberse a que en dichas investigaciones se analizan poblaciones naturales de fitoplancton, con una gran variedad de especies, baja densidad

celular y bajo contenido de clorofila *a*, esto en contraste con el cultivo unicelular de *Amphora* sp. en condiciones controladas.

Al comparar los resultados del coeficiente de absorción del material particulado (a_p) se tiene que los valores son similares a los obtenidos por Mitchell (1990) en un cultivo unicelular de *Thalassiosira fluviatilis*. Pero al cotejar los mismos resultados con los obtenidos por Millán-Núñez (1999) para poblaciones de fitoplancton del Golfo de California, muestran que los datos de la presente investigación tienen valores mayores, lo que corresponde principalmente a que se trata de un cultivo unicelular respecto a datos de poblaciones naturales. Sin embargo, el espectro generado por el material particulado en la investigación de Millán-Núñez (1999), tiene una tendencia similar al del material particulado en el cultivo de *Amphora* sp. en cuanto a forma pero difieren en magnitud, ambos espectros muestran dos picos máximos: uno en la banda del color azul y otro en la banda del color rojo; ambos picos son el resultado de la combinación de los pigmentos contenidos en las células de *Amphora* sp. Se tiene que el coeficiente de absorción del detritus (a_d) presentó una tendencia exponencial negativa o descendente hacia la banda del color rojo (674 nm), lo que es comparable con los resultados presentados por Millán-Núñez (1999) para el mismo coeficiente.

El coeficiente específico de absorción de *Amphora* sp. disminuyó conforme el contenido de clorofila *a* se incrementó y los valores de $a_{ph(440)}$ resultantes son ligeramente mayores a los encontrados por Yamamoto *et al.* (2014) en donde se analizan distintas especies de fitoplancton en la columna de agua e incluyendo una variedad de *Amphora* spp. De acuerdo con los resultados obtenidos del coeficiente específico de absorción para tres especies de fitoplancton en cultivo (*Skeletonema costatum*, *Dunaliella tartiolecta* y *Anacystis marina*) obtenidos por Kishino *et al.* (1985), se encontró que éstos resultados son similares a los valores obtenidos para *Amphora* sp. en el presente trabajo. Lo anterior es contrario a los coeficientes específicos de absorción obtenidos por Millán-Núñez y Millán-Núñez (2010) para poblaciones naturales en donde predominan diatomeas (*Nitzschia* spp., *Chaetoceros* spp., *Thalassionema* sp. y *Coscinodiscus* spp.), ya que los valores son hasta 50% mayores que los obtenidos en este trabajo. Se tiene entonces que los valores obtenidos del coeficiente específico de absorción de *Amphora* sp. son similares a los valores reportados para fitoplancton en cultivo (Kishino *et al.*,

1985), lo cual puede deberse a que se trata de cultivos monoalgales mantenidos en condiciones controladas lo que incluye una menor carga bacteriana así como material particulado, esto en comparación con el análisis de poblaciones naturales, en las que no se trata de solo una especie de microalga y la carga tanto bacteriana como de material particulado son mayores que en un cultivo.

Bricaud *et al.* (1995) y Millán-Núñez *et al.* (2004) mencionan que el coeficiente específico de absorción exhibe una correlación inversa con respecto al contenido de clorofila *a* y la biomasa, lo cual concuerda con los resultados de *Amphora* sp. obtenidos en este trabajo, ya que el coeficiente específico de absorción disminuyó cuando el contenido de clorofila *a* se incrementó. También se conoce que el coeficiente específico de absorción varía con respecto a la especie (Mercado *et al.*, 2004) como lo demuestran para distintas especies de diatomeas (*Navicula incerta*, *Nitzschia laevis* y *Nitzschia thermalis* var. *minor*) y aun entre tres cepas de una misma especie (*Nitzschia laevis*). La magnitud del coeficiente específico de absorción se ve afectado directamente por la composición espectral de la luz pero éste no afecta la forma del espectro (Mercado *et al.*, 2004; Gorai *et al.*, 2014). En diatomeas se tiene que la luz azul reduce el coeficiente específico de absorción con respecto a la luz blanca en tres variedades de *Nitzschia laevis*, mientras que en la especie *Nitzschia thermalis* la luz blanca incrementa los valores del coeficiente (Mercado *et al.*, 2004) y *Chaetoceros gracilis* no muestra cambios en el coeficiente específico de absorción relacionados con la composición espectral de la luz (Gorai *et al.*, 2014). Las diferencias observadas en cuanto a magnitudes en todos los coeficientes de absorción analizados en los diferentes días del cultivo de *Amphora* sp. pueden ser explicados por el efecto de empaquetamiento (Geider y Osborne, 1991; Gorai *et al.*, 2014) y por el efecto de sombra que resulta del aumento en la densidad celular.

La energía fotosintéticamente utilizable (PUR) es la fracción de la energía radiante que puede ser absorbida por la microalga y es dependiente tanto de la composición espectral de la energía radiante como del contenido de pigmentos (Morel, 1978; Parsons *et al.*, 2013). No existe mucha información sobre la utilización eficiente de la energía radiante por parte de las microalgas en cultivo, las indagaciones realizadas sobre el tema generalmente tratan sobre poblaciones naturales en donde es considerada la profundidad de hábitat del fitoplancton, como son los trabajos de Morel (1978) y Dunstan (1982). Se

conoce que no toda la energía absorbida por PUR (energía fotosintéticamente utilizable) es necesariamente utilizada de forma activa en el proceso fotosintético, también se desconoce cuanta energía es transformada a energía química (Morel, 1978; Dustan, 1982; Cosgrove y Borowitzka, 2011) y definitivamente la PUR no puede ser medido de manera directa en los cultivos, por lo que para su cálculo es necesario tener información sobre la irradiancia espectral y el coeficiente de absorción del fitoplancton (Morel, 1978).

De acuerdo con Dustan (1982) el concepto del PUR es importante biológicamente para el campo de la fotoecología y puede utilizarse para estudios de fotoadaptación. En este trabajo se calculó una PUR entre los $21.1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y los $27.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, lo que corresponde aproximadamente a la mitad de la PAR total que fue de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz blanca fluorescente.

Fotosíntesis

Las diatomeas son organismos capaces de absorber la energía de igual manera a través del espectro de la energía fotosintéticamente activa (PAR), se tiene además que la tasa fotosintética en diatomeas puede verse incrementada debido a su contenido del pigmento accesorio fucoxantina (Steemman-Nielsen, 1975).

Un factor que puede intervenir en la respuesta de las curvas P-E (fotosíntesis-irradiancia) es la aclimatación del aparato fotosintético durante el tiempo de cultivo y la intensidad de luz o irradiancia (Falkowski y Owens, 1978; Sakshaug *et al.*, 1997). El aumento en la irradiancia causa un rápido incremento en la tasa de producción de oxígeno (Falkowski y Owens, 1978) y los parámetros fotosintéticos son afectados por la variación de la composición espectral de la luz, la fase de crecimiento y por el pH (Mercado *et al.*, 2002; Fernández-Robledo, 2013).

Se obtuvieron curvas de fotosíntesis-irradiancia (P-E) para los cultivos de *Amphora* sp. mantenidos con las distintos tipos de luz ensayados, en donde el mayor valor promedio de fotosíntesis máxima (P_{max} ; moles de O_2 mg clorofila a min^{-1}) se presentó con la luz azul y el menor valor de fotosíntesis máxima se obtuvo bajo la luz amarilla. Se ha encontrado que la fase de crecimiento del cultivo, así como la composición espectral de

la luz no producen variaciones en la fotosíntesis máxima en *Scenedesmus obliquus* (Fernández-Robledo, 2013), por lo tanto esto es contrario a lo obtenido para *Amphora* sp. en el presente estudio, debido a que la composición espectral de la luz produjo cambios en la fotosíntesis máxima. Jeon *et al.* (2005) midieron la actividad fotosintética de la clorofita *Haematococcus pluvialis* cultivada con distinta composición espectral de la luz (blanca, roja, amarilla y verde) resultando los mayores valores de fotosíntesis máxima con luz roja, esta tendencia fue atribuida a la composición de pigmentos de la especie estudiada. Esta última tendencia descrita resulta diferente a lo evaluado en esta investigación en los cultivos de *Amphora* sp. y que tiene una composición pigmentaria diferente a la de la clorofita antes descrita en líneas atrás. Los altos valores de fotosíntesis máxima evaluados para *Amphora* sp. se presentaron con la luz azul, lo cual muestra una alta eficiencia en la absorción de la luz, lo que se ve reflejado por los bajos contenidos de pigmentos (clorofila a y carotenoides).

Yamamoto *et al.* (2014) investigaron las características fotosintéticas de comunidades naturales, entre las cuales se encuentran varias especies de *Amphora* spp., y encuentran una tasa fotosintética mayor a la obtenida en el cultivo unicelular de *Amphora* sp. en el presente trabajo. Según Falkowski y Owens (1974) así como por Mercado *et al.* (2004), en algunas especies de diatomeas en cultivo la luz blanca produce altos valores de fotosíntesis máxima, sin embargo los valores reportados en la literatura fueron mayores a los obtenidos por *Amphora* sp. con el mismo espectro de luz, posiblemente esta diferencia es debida a la distinta irradiancia de luz utilizada en los cultivos, ya que en este trabajo fue entre 50 y 60% inferior a la utilizada en los cultivos antes descritos en este párrafo. Se conoce que la adaptación previa a la irradiancia tiene un efecto en la magnitud de la fotosíntesis máxima (Dubinsky *et al.*, 1995; Sakshaug *et al.*, 1997; Wilhelm *et al.*, 2014).

El mayor valor promedio de la eficiencia fotosintética [α : moles de O₂ mg clorofila a min⁻¹(μ mol⁻¹ m⁻² s⁻¹)⁻¹] resultó con la luz azul, mientras que la menor eficiencia se obtuvo en el tratamiento con luz amarilla. En algunas especies de microalgas, tales como: *Isochrysis galbana*, *Dunaliella salina*, *Chaetoceros gracilis* y *Heterocapsa circularisquama* no se reportan diferencias en la eficiencia fotosintética máxima ocasionadas por la utilización de diferentes espectros de la luz azul y la luz blanca (Gorai *et al.*, 2014), esta

respuesta resulta diferente a lo encontrado en este trabajo para los cultivos de *Amphora* sp. que fueron mantenidos con diferente composición espectral de la luz, ya que en este trabajo se obtuvieron cambios importes por efecto del tipo de luz en la eficiencia fotosintética. Estas diferencias se atribuyen a una distinta capacidad de las células para utilizar la luz de distinta longitud de onda, por lo cual se encontró diferente eficiencia fotosintética. En la diatomea *Nitzschia thermalis* el espectro de la luz blanca produce la mayor eficiencia fotosintética (α) (Mercado *et al.*, 2004). No obstante, Fernández-Robledo (2013) menciona que en la clorofita *Scenedesmus obliquus*, la eficiencia fotosintética es mayor con la luz azul durante la fase de crecimiento estacionaria, pero este tipo de luz no produce diferencias en la eficiencia fotosintética durante la fase de crecimiento exponencial; la tendencia antes descrita para la clorofita *Scenedesmus obliquus* concuerda con lo obtenido en este trabajo para los cultivos de *Amphora* sp., dado que la luz azul ocasionó la mayor eficiencia fotosintética. En estudios con poblaciones naturales de diatomeas, entre las que se incluyeron varias especies de *Amphora* spp. se encontró una eficiencia fotosintética mayor (Yamamoto *et al.*, 2014), respecto a la obtenida para el cultivo de *Amphora* sp. en el presente trabajo.

La mayor intensidad de luz de saturación (E_k : $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) se midió con los cultivos expuestos con luz amarilla, mientras que el menor valor se dio con el uso de la luz verde. La mayor intensidad de luz de saturación de la fotosíntesis (E_k) encontrada en *Amphora* sp. es similar a la reportada por Mercado *et al.* (2004) en el cultivo de diatomeas bentónicas, pero la mayor intensidad de luz de saturación (E_k) en ese estudio se obtuvo con el uso de la luz blanca en una cepa de *Nitzschia laevis*, esta tendencia resulta distinta a lo obtenido en este trabajo. Yamamoto *et al.* (2014) en un estudio realizado con poblaciones naturales y entre las cuales evaluó distintas especies de *Amphora* spp., encontró valores menores de la intensidad de luz de saturación (E_k) que los obtenidos en el cultivo unicelular de *Amphora* sp. estudiada en el presente trabajo. Sin embargo, en cultivos de diferentes especies de diatomeas cultivadas con luz blanca Falkowski y Owens (1974) registraron valores mayores de intensidad de luz de saturación (E_k) a los evaluados en este trabajo con los distintos tipos de la luz usadas en los cultivos de *Amphora* sp. y que posiblemente sean debidas a las diferencias en la fotoaclimatación del aparato fotosintético, ya que en el estudio de Falkowski y Owens (1974) utilizan para los cultivos un fotoperiodo de 14h:10h (luz:oscuridad) y una irradiancia mayor (250 μmol

$\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) que en el cultivo de *Amphora* sp. del presente estudio. Las diatomeas bentónicas en el medio natural presentan un valor de intensidad de luz de saturación (E_k) mayor en comparación con especies de microalgas planctónicas.

En resumen se encontró que en el cultivo de *Amphora* sp. existieron diferencias en la eficiencia fotosintética y los parámetros fotosintéticos ocasionadas por la composición espectral de la luz, estas diferencias pueden ser explicadas por la influencia de la longitud de onda en el transporte de electrones en el proceso de fotosíntesis (Gorai *et al.*, 2014); ya que la energía radiante emitida por la luz azul es mayor que la energía emitida por la luz amarilla (Falkowski y Owens, 1978; Kirk, 1994; Audesirk *et al.*, 2003; Beer *et al.*, 2014) y por lo tanto la luz azul favorece la actividad fotosintética (Gorai *et al.*, 2014) y genera mayores valores de fotosíntesis máxima (Marchetti *et al.*, 2012), lo que concuerda con lo obtenido en este trabajo ya que la fotosíntesis máxima y la mayor eficiencia fotosintética fueron obtenidas con el espectro de la luz azul y los menores valores se midieron con la luz amarilla. La mayor intensidad de luz de saturación se dio con el uso de la luz amarilla, mientras que la menor intensidad de saturación de luz se presentó en la luz verde, estas diferencias pueden estar relacionadas a la concentración celular y la composición de pigmentos del complejo fotosintético de las células como fue descrito previamente para otras especies de fitoplancton (Gorai *et al.*, 2014). Los valores de la fotosíntesis máxima y de la eficiencia fotosintética indican la capacidad de asimilación de carbono, es decir, a mayores valores de ambos parámetros, es mayor la asimilación y la intensidad de luz de saturación es un indicador de la fotoaclimatación (Mercado *et al.*, 2004).

Preservación en frío

Los trabajos realizados sobre el tema de preservación en microalgas son numerosos, sin embargo hasta donde se conoce de la literatura especializada en este tema ninguno de los trabajos incluyen la investigación del efecto de la composición espectral de la luz sobre la preservación en frío a 4 °C en oscuridad, el tiempo de almacenamiento y la viabilidad. De acuerdo con Yamamoto *et al.* (2014) las diatomeas marinas (*Nitzschia stellate*, *Nitzschia frigida* y *Navicula* sp.) que habitan en temperaturas

bajo cero grados Celsius e inclusive en capas de hielo, pueden aumentar lentamente su densidad poblacional ya que han desarrollado mecanismos para adaptarse a vivir en bajas y ultra bajas temperaturas.

Los procesos metabólicos de las diatomeas bentónicas *Navicula incerta* y *Amphiprora paludosa* var. *hyalina* son minimizados al mantenerse en frío a una temperatura de 4 °C en obscuridad y la viabilidad de éstas células se mantiene debido a la utilización de sus productos de reserva (Sánchez-Saavedra, 2006). Altas supervivencias al proceso de preservación en frío de las células del fitoplancton, pueden ser atribuidos a altos contenidos de productos de reserva, los cuales mantienen el metabolismo de supervivencia y la integridad de la célula (Montaini *et al.*, 1995).

La densidad celular del cultivo preservado en frío es muy importante de considerar, dado que altas densidades celulares pueden generar un agotamiento de los nutrientes disponibles en el medio de cultivo, de la misma manera es importante considerar también el tamaño celular debido a la relación superficie-volumen; es decir una célula pequeña tendrá una mayor relación superficie-volumen (Antia, 1976; Montaini *et al.*, 1995; Cañavate y Lubián, 1997b). En otros estudios se ha encontrado que la viabilidad de las células de microalgas se correlaciona con la concentración celular; y que a menor concentración celular preservada resulta en una mayor viabilidad de las células preservadas por largos periodos de tiempo (Montaini *et al.*, 1995). También se ha visto que la viabilidad celular se ve influenciada por el espacio del vial usado para la preservación, ya que un vial totalmente cerrado disminuye la disponibilidad de oxígeno o genera acumulación de dióxido de carbono, cualquiera de ambos pueden ocasionar la muerte de las células (Montaini *et al.*, 1995). De acuerdo con la observaciones realizadas por Araújo *et al.* (2008), en la preservación de diatomeas, se tiene que conforme el tiempo de almacenamiento incrementa se necesita utilizar un mayor número de células como inóculo para reiniciar el cultivo posterior a la preservación; mencionan también que si el inóculo inicial es denso aumenta la densidad poblacional final.

Preservación en frío por 8 semanas

En la evaluación del crecimiento poblacional del cultivo de *Amphora* sp. con distinta composición espectral de luz y posterior a su preservación en frío a 4 °C y en obscuridad por un periodo de 8 semanas. La mayor densidad celular al final del periodo de cultivo, se presentó con los cultivos provenientes de luz blanca, mientras que la menor densidad celular se alcanzó con los cultivos previamente mantenidos con luz azul, sin embargo a lo largo del tiempo de cultivo el mayor crecimiento poblacional se presentó con el uso de GroLux y el menor crecimiento poblacional fue con el uso de luz blanca. Las diferencias ocasionadas por el efecto de la composición espectral de la luz se pueden deber a alteraciones en la actividad fotosintética y en el metabolismo como fue previamente descrito para cultivos de cuatro especies de diatomeas bentónicas (*Nitzschia thermalis* var. *minor*, *Nitzschia laevis* (cepa 1), *Navicula incerta* y *Navicula* sp.) que fueron preservadas en frío a 4 °C y en obscuridad por un periodo de 16 semanas (Sánchez-Saavedra y Núñez-Zarco, 2012).

Preservación en frío por 16 semanas

Al analizar la densidad celular de los cultivos realizados para evaluar la viabilidad de las células posterior a su preservación en frío a 4 °C, en obscuridad y por un periodo de 16 semanas, se encontró una fase exponencial de crecimiento a partir del día 5 de cultivo. Se encontró que conforme aumentó del tiempo de preservación en frío de 8 a 16 semanas, las células requirieron de un tiempo de acondicionamiento y se produjo una fase de retardo del crecimiento. No se encontraron diferencias en la densidad celular de los cultivos por efecto de la proveniencia de los cultivos en distinta composición espectral de la luz. Los cultivos preservados por un lapso de 16 semanas presentaron una fase de aclimatación mayor (5 días), respecto a lo obtenido en los cultivos preservados por 8 semanas, los cuales no presentaron una fase de aclimatación, este mayor periodo de acondicionamiento en los cultivos preservados por 16 semanas en frío se atribuye a que por efecto del tiempo de almacenamiento se produce una disminución en el metabolismo y las células requirieron la readaptación del aparato fotosintético con la luz. En estudios realizados con diatomeas preservadas en frío y en obscuridad, se ha encontrado que las

células son capaces de realizar actividad metabólica baja sin la presencia de luz, sellan la membrana celular, aumentan la densidad del citoplasma y reducen la respiración a bajos niveles (Hargraves y French, 1983; Sánchez-Saavedra y Núñez-Zarco, 2012).

Los valores de densidad celular final fueron mayores en los cultivos preservados por 16 semanas respecto de los valores obtenidos después de preservar los cultivos por 8 semanas en frío. Esto se debe a que las células preservadas por menor tiempo no presentan daños en el aparato fotosintético y por lo tanto son células más saludables y viables para iniciar de nuevo un cultivo. En los resultados obtenidos en la preservación del cultivo de *Amphora* sp. no se observó algún efecto negativo por efecto de la concentración celular utilizada ($250,000 \text{ cél ml}^{-1}$) y tampoco por el espacio utilizado para almacenar los cultivos durante el periodo de preservación en frío (tubos de vidrio transparentes de 15 ml de capacidad con tapa con rosca y 10 ml de cultivo concentrado de diatomeas y medio) como previamente ha sido descrito por otros autores (Sánchez-Saavedra, 2006; Montaini *et al.*, 1995).

En el análisis sobre el efecto de la preservación en frío por 4 semanas en dos especies de microalgas (*Navicula incerta* y *Amphiprora paludosa* var. *hyalina*) cultivadas previamente bajo el espectro de luz blanca, no se tuvieron diferencias en la densidad celular entre los cultivos frescos y los cultivos preservados (Sánchez-Saavedra, 2006); lo anterior no resultó similar a lo obtenido en este trabajo, dado que existen diferencias importantes entre las densidades alcanzadas en los cultivos frescos y las evaluadas en los cultivos preservados que provenían de cultivos mantenidos con los distintos tipos de luz; las mayores densidades celulares se presentaron en los cultivos en fresco, seguidos por los cultivos preservados por 16 semanas en frío y por último por los cultivos preservados por 8 semanas en frío. En la preservación en frío realizada por Núñez-Zarco y Sánchez-Saavedra (2011) en 6 especies de diatomeas bentónicas (*Navicula incerta*, *Amphiprora paludosa* var. *hyalina*, *Nitzschia laevis*, *Nitzschia thermalis* var. *minor*, *Navicula* sp. y *Amphora tenerrima*), se presentaron diferencias en la densidad celular entre especies y en la viabilidad, y resultó para todos los casos menor viabilidad que la obtenida en el cultivo de *Amphora* sp. en esta investigación. Sin embargo, las densidades celulares obtenidas en los cultivos de *Amphora* sp. en los cultivos realizados posterior a la preservación, para todos los casos fueron mayores que las reportadas por Núñez-

Zarco y Sánchez-Saavedra (2011), con excepción de las evaluadas por estos autores para *Amphora tenerrima*, que resultaron en densidades celulares similar a las obtenidas en los cultivos de *Amphora* sp. preservadas en frío por 8 y 16 semanas.

De acuerdo con Sánchez-Saavedra y Núñez-Zarco (2012) en la investigación realizadas acerca del efecto de la preservación en frío en 4 especies de diatomeas (*Nitzschia thermalis* var. *minor*, *Nitzschia laevis*, *Navicula incerta* y *Navicula* sp.), se encontró que estas especies presentan viabilidad celular después de ser almacenadas por 16 semanas a 4 °C, estos resultados son similares a lo obtenido en esta investigación con la preservación en frío de *Amphora* sp. En cuanto a las densidades celulares alcanzadas en los cultivos preservados por 16 semanas de *Amphora* sp. para todos los distintos tipos de luz de luz, se tiene que son menores valores en comparación a las reportadas para las 4 especies de diatomeas durante la preservación en frío por 16 semanas reportadas por Sánchez-Saavedra y Núñez-Zarco (2012). En el trabajo antes mencionado los cultivos de *Nitzschia laevis* y *Navicula* sp. presentaron una fase de aclimatación con una duración de 4 días después de su preservación por 16 semanas, estos resultados concuerdan con la duración de la fase de aclimatación presentada por *Amphora* sp. posterior a ser preservada por 16 semanas en todos los tipos de luz ensayados. Estos autores mencionan que las células preservadas en frío de *N. incerta* no presentan una fase de aclimatación; es decir que, el cultivo al ser reiniciado entró directamente en la fase de crecimiento exponencial, lo cual es congruente con lo obtenido en este trabajo para el tiempo de preservación de 8 semanas en los cultivos de *Amphora* sp. Posterior a la preservación de la diatomea *Cylindrotheca closterium* (antes *Nitzschia closterium*) bajo condiciones de obscuridad y baja temperatura (4 °C) se encontró una larga fase de aclimatación de 4 a 11 días dependiendo del tiempo de almacenamiento (Aráujo *et al.*, 2008), lo cual coincide con el aumento en la duración de la fase de aclimatación encontrada en *Amphora* sp. posterior a 16 semanas de preservación en frío.

En los cultivos de *Amphora* sp. preservados por un periodo de 8 semanas en frío se encontró que no existe diferencia en la tasa de crecimiento producida por los distintos tipos de luz ensayados. En tanto que los cultivos preservados por 16 semanas mostraron una mayor tasa de crecimiento con el uso de la luz amarilla y la menor tasa de crecimiento se presentó en la luz azul. Las mayores tasas de crecimiento se consiguieron en los

cultivos preservados por 16 semanas. Estos resultados son distintos a lo presentado por dos especies de diatomeas (*Navicula incerta* y *Amphiprora paludosa* var. *hyalina*) cultivadas con luz blanca, debido a que no se obtuvieron diferencias en la tasa de crecimiento entre los cultivos frescos y los cultivos preservados (Sánchez-Saavedra, 2006); en la preservación de *Amphora* sp. las menores tasas de crecimiento se presentaron en los cultivos preservados y almacenados por 8 semanas en frío respecto a lo obtenido a las 16 semanas de preservación en frío.

Núñez-Zarco y Sánchez-Saavedra (2011) investigan el efecto de la preservación en frío en 6 especies de diatomeas bentónicas en las que la tasa de crecimiento se vio modificada por el tiempo de preservación, lo que coincide con lo obtenido en el cultivo de *Amphora* sp., ya que la tasa de crecimiento fue distinta entre la semana 8 y la semana 16 de preservación, siendo mayor la tasa de crecimiento con el mayor tiempo de preservación. Sánchez-Saavedra y Núñez-Zarco (2012) preservan en frío a cultivos concentrados de 4 especies de diatomeas bentónicas y observaron que las tasas de crecimiento posterior a la preservación por 16 semanas, son distintas entre especies y estas son menores a las tasas de crecimiento obtenidas en los cultivos de viabilidad obtenidos a partir de los cultivos provenientes de los distintos tipos de luz ensayados de luz para *Amphora* sp. después de su preservación en frío.

El tamaño celular de *Amphora* sp. (largo y ancho) que se obtuvo en los cultivos antes y después de ser preservados por 8 semanas, resultando en células más anchas y largas respecto a los valores obtenidos para los cultivos antes de ser preservados. En los cultivos preservados por un tiempo de 16 semanas se obtuvo lo contrario a lo previamente descrito para el tamaño celular obtenido a las 8 semanas de preservación; es decir, que las células más anchas y largas se presentaron después de su preservación por 16 semanas. Los tamaños celulares resultantes para la semana 8 de preservación concuerdan con lo observado por Sánchez-Saavedra (2006) en *Navicula incerta* y *Amphiprora paludosa* var. *hyalina*, ambas especies presentaron células más largas y anchas antes de su preservación, a pesar de ser células más pequeñas que *Amphora* sp.

Núñez-Zarco y Sánchez-Saavedra (2011) encontraron que los cambios ocasionados por el efecto de la preservación en frío sobre el tamaño celular son especie-específicos y dichos cambios los atribuyen al almacenamiento y metabolismo de los

productos de reserva de la célula; reportan tamaños mayores antes de la preservación de las células de la especie *Amphora tenerrima*, lo cual es similar a lo encontrado en el presente trabajo. Sin embargo, en la preservación de la diatomea *Cylindrotheca closterium* no se presentaron cambios en el tamaño celular antes y después de ser preservada (Araújo *et al.*, 2008), lo que es distinto a lo encontrado en la preservación en frío de *Amphora* sp.

Los resultados obtenidos por el efecto de la preservación en frío y por el efecto de la procedencia de los cultivos mantenidos en las distintos tipos de luz y su efecto en la viabilidad, la tasa de crecimiento y el tamaño celular se pueden deber al cambio en el metabolismo y el almacenamiento de nutrientes descritos previamente para las diatomeas (Yamamoto *et al.*, 2014; Sánchez-Saavedra, 2006; Sánchez-Saavedra y Núñez-Zarco, 2012; Montaini *et al.*, 1995). Sin embargo, las diferencias encontradas en los distintos tiempos de almacenamiento para *Amphora* sp. pueden atribuirse a la modificación en la estrategia de almacenamiento de reservas y su utilización por la células (Sánchez-Saavedra y Núñez-Zarco, 2012).

Criopreservación

La velocidad de congelamiento en la criopreservación de microalgas marinas es un aspecto de suma importancia a considerar, debido a que un congelamiento rápido produce una pérdida total de la viabilidad así como un incremento en la formación de hielo en el núcleo celular (Montaini *et al.*, 1995; Cañavate y Lubián, 1997). Por lo que se sugiere la utilización del sistema de congelamiento en dos pasos (Montaini *et al.*, 1995; Cañavate y Lubián, 1995; Guerhazi *et al.*, 2010 Tanniou *et al.*, 2012). De igual manera es necesario tomar en cuenta la velocidad de descongelamiento de las células criopreservadas ya que la viabilidad en microalgas marinas se ve mayormente afectada por la velocidad de descongelamiento que por la velocidad de congelamiento, lo que se atribuye al proceso de recristalización, ya que altas velocidades de descongelamiento provocan que los cristales de hielo se unan generando un daño mayor en las células (Cañavate y Lubián, 1997).

La viabilidad posterior a la criopreservación es especie-específica (Tzovenis *et al.*, 2004; Cañavate y Lubián, 1995) y es inversamente proporcional a la cantidad de crioprotector adicionado a los cultivos (Piasecki *et al.*, 2009). Para llevar a cabo una criopreservación exitosa se recomienda la utilización de cultivos en fase de crecimiento estacionario debido a que estas células poseen membranas más resistentes (Montaini *et al.*, 1995). En la criopreservación también interviene la densidad celular ya que, interfiere en la viabilidad posterior al descongelamiento de los cultivos y se tiene que altas densidades celulares reducen la viabilidad en la criopreservación; se confirma también que la viabilidad no se ve influenciada por la proximidad de células muertas ni por la liberación de sustancias de la desnaturalización de las células por calentamiento en la descongelación (Piasecki *et al.*, 2009). Se sabe que los cultivos criopreservados con glicerol son más propensos a contaminarse con bacterias que los criopreservados con DMSO, ya que el glicerol puede ser usado por las bacterias como sustrato para su proliferación (Cordero y Voltolina, 1997; Tanniou *et al.*, 2012).

En general los cultivos de *Amphora* sp. criopreservados con glicerol al 10% presentaron una fase de crecimiento exponencial con duración de 8 días para los cultivos realizados con células provenientes de los distintos tipos de luz ensayados. La mayor densidad celular se presentó en el tratamiento proveniente de GroLux, mientras que la menor densidad fue obtenida con los cultivos provenientes de luz blanca. En los cultivos criopreservados con DMSO al 10% se observa un decaimiento poblacional a partir del día 8 de cultivo para los casos de los cultivos provenientes de los distintos tipos de luz, pero con excepción de la luz blanca en donde este tratamiento mostro un rápido inicio de la fase de crecimiento estacionario. A lo largo del tiempo de cultivo en los ensayos de viabilidad para el tratamiento con glicerol al 10%, se encontró que el mayor crecimiento se logró en el tratamiento control (sin criopreservar), mientras que el menor crecimiento de los cultivos de viabilidad se presentó para las células provenientes de cultivos con luz amarilla. Los cultivos criopreservados con DMSO al 10% alcanzaron su máxima densidad poblacional al día 6 de cultivo y posteriormente entraron en una fase de decaimiento a excepción de los cultivos provenientes de luz blanca. El efecto negativo en el crecimiento causado por el uso del DMSO, puede deberse al efecto tóxico que posee el DMSO en las células.

La preservación de *Synechocystis* sp., *Dunaliella* sp. y *Phaeodactylum tricornutum* con la adición de crioprotectores (DMSO y glicerol al 10%) resulta en una reducción de pérdida celular. Se ha encontrado que el crioprotector más adecuado para la preservación es el glicerol y combinado con una velocidad lenta de congelamiento (Lepesteur *et al.*, 1993). Esta respuesta previamente descrita, es similar a lo que se obtuvo en la criopreservación de *Amphora* sp. ya que los mayores valores de viabilidad se presentaron en el uso de glicerol al 10% como crioprotector. La viabilidad de *Tetraselmis suecica* se vió incrementada con la adición de crioprotectores (DMSO o glicerol al 10%) al ser criopreservada a una velocidad lenta de congelamiento, esto genera también un aumento de la motilidad y de la actividad fotosintética, estos autores no mencionan diferencias en la viabilidad causada por el tipo de crioprotector utilizado (Montaini *et al.*, 1995); esta tendencia antes descrita es distinta a la obtenida en esta investigación, ya que en la criopreservación de *Amphora* sp. los crioprotectores si generaron diferencias en la viabilidad celular.

Cañavate y Lubián (1995) investigaron el efecto del DMSO (15%) en la criopreservación de seis especies de microalgas, los resultados muestran viabilidad solamente en tres especies (*Tetraselmis chui*, *Nannochloropsis atomus* y *Nannochloropsis gaditana*) y mencionan que las microalgas marinas presenta en general una buena tolerancia a temperaturas de congelamiento al ser expuestas por periodos cortos de tiempo, lo que concuerda con lo encontrado para *Amphora* sp. en el presente estudio. Cordero y Voltolina (1997) realizan la preservación a bajas temperaturas (-20 °C y -60 °C) con dos especies de diatomeas plantónicas (*Chaetoceros* sp. y *Phaeodactylum tricornutum*) con la adición de crioprotectores (glicerol al 10% y DMSO al 10%), estos autores indican que ambos crioprotectores muestran un efecto positivo en la viabilidad inicial de ambas especies, sin embargo ésta disminuye con el tiempo del cultivo. Estos resultados pueden atribuirse a la utilización de bajas temperaturas para la preservación de la biomasa microalgal, ya que bajas temperaturas pueden ocasionar cambios en el aparato fotosintético, así como disminución en el contenido de pigmentos fotosintéticos. Resultados similares a los reportados por Cordero y Voltolina (1997) fueron observados en los cultivos de *Amphora* sp. criopreservados con DMSO al 10% para todos los casos de los cultivos provenientes de los distintos tipos de luz en este trabajo, esto puede indicar

que el DMSO produce mayor daño celular que el glicerol en *Amphora* sp. al ser utilizado como crioprotector a -196 °C.

Mitbavkar y Anil (2006) analizaron el efecto de la criopreservación con la adición de DMSO en diatomeas pennadas (*Amphora coffeaeformis* y *Navicula transitans* var. *derasa* f. *delicatula*), en donde se encontró que en *A. coffeaeformis* los cloroplastos se contraen ubicándose en el centro de la célula y se mantienen de la misma forma inclusive después de ser descongeladas. Se encontró que al inocularse estas células en medio de cultivo nuevo, los cloroplastos se expanden y vuelven a su forma y tamaño normales; describen que esta especie puede sobrevivir al proceso de criopreservación sin la adición del crioprotector. Estos resultados son similares a los encontrados en la criopreservación de *Amphora* sp., ya que se observó viabilidad de los cultivos en el tratamiento con DMSO, sin embargo en el presente estudio no se ensayó el uso de la criopreservación de las células sin la adición de crioprotector.

En otras especies de diatomeas tales como *Chaetoceros calcitrans*, *Chaetoceros muelleri*, *Chaetoceros* sp. y *Nitzschia ovalis* la adición del crioprotector DMSO al 10% y al 15% produce una criopreservación exitosa así como células viables después de su descongelamiento (Rhodes *et al.*, 2006). Tanniou *et al.* (2012) analiza el efecto de la criopreservación en la diatomea *Haslea ostrearia* y no reportan efectos tóxicos por efecto del crioprotector al ser criopreservada con DMSO y glicerol; presentando la mayor viabilidad en los cultivos criopreservados con glicerol, lo que concuerda con lo encontrado en la criopreservación de *Amphora* sp. proveniente de cultivos mantenidos en los distintos tipos de luz.

El tamaño celular de *Amphora* sp. se vio modificado por el efecto de los crioprotectores y del origen de los cultivos provenientes de distinta composición espectral de la luz, en general se observaron células más delgadas después de su criopreservación. Las células más largas y anchas se presentaron en el tratamiento de luz verde sin criopreservar, mientras que las células más delgadas y pequeñas se tuvieron con los cultivos provenientes de la luz blanca con la adición de glicerol como crioprotector. La disminución en el tamaño celular puede deberse a la utilización de los productos de reserva ante los efectos adversos de los crioprotector y el mismo proceso de criopreservación.

La composición proximal de *Amphora* sp. es modificada tanto por la composición espectral de la luz, así como por el tipo de crioprotector utilizado para su criopreservación. Se tiene que los mayores contenidos de proteínas y lípidos se obtuvieron con el uso de glicerol como crioprotector y para los cultivos provenientes de la luz blanca, mientras que los menores contenidos de proteínas se produjeron en los cultivos sin criopreservar (control). Los mayores contenidos de clorofila a y carotenoides se presentaron en el tratamiento con el uso de DMSO y para los cultivos provenientes de la luz verde, mientras que los menores contenidos de ambos tipos de pigmentos se presentaron en el tratamiento con el uso de glicerol como crioprotector. Los menores valores de peso seco orgánico (PSO) y peso de cenizas (PC) se obtuvieron en el cultivo sin criopreservar (control). El mayor PSO se presentó con los cultivos provenientes de la luz amarilla con el uso de DMSO como crioprotector DMSO, mientras que el mayor PC se evaluó con el uso de glicerol como crioprotector y los cultivos provenientes del tratamiento con luz verde. Montaini y colaboradores (1995) mencionan que el proceso de criopreservación de *Tetraselmis suecica* no modifica la composición bioquímica de la biomasa microalgal, lo que es contrario a lo obtenido en la criopreservación de *Amphora* sp. debido a que la composición proximal se vio modificada por efecto del proceso y según el tipo de crioprotector utilizado. La criopreservación con DMSO de *Chlorella vulgaris*, *Isochrysis galbana* y *Dunaliella salina* produjo que el contenido de ácidos grasos disminuyera después de ser criopreservadas (Guermaz et al., 2010), lo que resulta inverso a lo encontrado en la criopreservación de *Amphora* sp., ya que el contenido de lípidos se incrementó después de la criopreservación, esta respuesta puede ser debida a la acumulación de lípidos en la membrana celular como estrategia de protección a las bajas temperaturas.

Vibrio sp.

Uno de los principales agentes causantes de episodios de mortalidad en los moluscos (abulón, almeja, ostión), crustáceos (camarones, nauplio de *Artemia*, rotíferos) y peces, son las patologías bacterianas, las cuales son causadas principalmente por las bacterias tipo *Vibrio* (Skjermo y Vadstein, 1993; Verdonck et al., 1994; Anguiano-Beltrán et al., 1998; Soto-Rodríguez et al., 2003; Beaz-Hidalgo, 2008; Jadhav, 2009). El género

Vibrio está formado por bacterias gram negativas pequeñas y curvadas (con una forma típica de coma) y poseen un flagelo polar que le proporciona motilidad (Chart, 2012), las bacterias pertenecientes a este género son capaces de producir sustancias poliméricas extracelulares (EPS) a las que se asocia la virulencia y la capacidad para causar mortalidades (Beaz-Hidalgo, 2008). Es por esto que existe la problemática de disminuir o erradicar la contaminación por bacterias del género *Vibrio* en los cultivos de organismos acuáticos ocasionada por la utilización de microalgas como alimento (Rico-Mora *et al.*, 1998). Algunas de las medidas que se deben de tomar para el control de la microflora de los cultivos acuáticos es la higiene, la utilización de probióticos y el empleo mínimo de antibióticos (Lavens y Sorgeloos, 2000).

Algunas especies de microalgas han sido cultivadas para evaluar su potencial como inhibidor de bacterias del género *Vibrio* y como control biológico, dado que son capaces de producir sustancias poliméricas extracelulares (EPS) las cuales pueden inhibir el crecimiento de algunas bacterias del género *Vibrio* (Rico-Mora *et al.*, 1998; González-Davis *et al.*, 2012; Molina-Cárdenas *et al.*, 2014). En el cultivo de *Skeletonema costatum* se han encontrado una especie de bacteria perteneciente al género *Aeromona* asociada a la flora común de dicha diatomea, la cual es capaz de inhibir el crecimiento de *Vibrio alginolyticus*, lo que se atribuye al efecto de la competencia exclusiva, ya que la bacteria del género *Aeromona* consume de manera continua los productos orgánicos que produce *S. costatum* afectando el crecimiento y establecimiento de *V. alginolyticus* (Rico-Mora *et al.*, 1998). La haptofita *Tisochrysis lutea* (anteriormente *Isochrysis affinis galbana* o T-Iso: Bendif *et al.*, 2013), mostró poseer un efecto inhibitorio para ciertas especies de bacterias del género *Vibrio* (*V. alginolyticus*, *V. harveyi* y *V. campbellii*), este efecto se atribuye a las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) producidas por *T. lutea*, las cuales se componen principalmente de ácidos grasos (Molina-Cárdenas *et al.*, 2014).

Los extractos obtenidos de *S. costatum* y *Dunaliella tertiolecta* mostraron efectos inhibitorios sobre el crecimiento de *Vibrio campbellii*, no obstante no se observó una actividad anti-*Vibrio* en ninguno de los extractos mencionados, motivo por el que dichas especies de microalgas fueron seleccionadas para proporcionarlas como alimento al nauplio de *Artemia franciscana* utilizada en la camaronicultura. El efecto inhibitorio de *S.*

costatum y *D. tertiolecta* sobre el crecimiento de *V. campbellii* se puede deber al amplio espectro antimicrobiano propio de dichas especies de microalgas o a la producción de las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) y productos de desecho microalgal (González-Davis *et al.*, 2012). Algunos agentes químicos han mostrado también su eficacia como control de bacterias y hongos en cultivos de organismos acuáticos, tal es el caso del formaldehído que en bajas concentraciones posee una alta efectividad en la eliminación de bacterias (Hameed y Balasubramanian, 2000). Así mismo, los efectos antibacterianos del glicerol y los efectos antimicrobianos dimetilsulfóxido (DMSO) son ampliamente conocidos (Marshall y Bullerman, 1994; Kabara y Marsall, 2005; Rietschel y Fowler, 2008; Lim, 2012).

En el presente estudio los cultivos de *Amphora* sp. preservados a 4 °C en obscuridad y almacenados por un periodo de 8 y 16 semanas resultaron libres de bacterias del género *Vibrio*, lo cual se puede deber a la composición de las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) producidas por *Amphora* sp. De la misma manera, los cultivos de *Amphora* sp. criopreservados a -196 °C resultaron sin la presencia de bacterias del género *Vibrio*, este resultado se puede deber al efecto antibacteriano que posee el glicerol y el efecto antimicrobiano del dimetilsulfóxido (Marshall y Bullerman, 1994; Kabara y Marsall, 2005; Rietschel y Fowler, 2008; Lim, 2012), los cuales fueron utilizados como crioprotectores en el presente estudio.

Capítulo 5. Conclusiones

La composición espectral de la luz utilizada causó cambios en el crecimiento de los cultivos de *Amphora* sp., los mayores valores se obtuvieron con el uso de la luz azul y la luz verde. El tamaño celular de *Amphora* sp. no es influenciado por la composición espectral de la luz utilizada, pero se modificó el tamaño celular por efecto de la fase de crecimiento resultando células más anchas en la fase de crecimiento estacionaria.

La composición proximal de *Amphora* sp. es influenciada por la composición espectral de la luz y por la fase de crecimiento del cultivo. Los mayores contenidos de proteína se obtuvieron con los espectros de la luz blanca en fase exponencial. El mayor contenido de carbohidratos se obtuvo al mantener los cultivos con la GroLux en la fase estacionaria. El contenido de lípidos disminuyó con el tiempo de cultivo, presentando los mayores valores en la fase exponencial de crecimiento y al utilizar la GroLux. Los mayores contenidos de clorofila *a* y carotenoides se encontraron durante la fase de crecimiento exponencial con el espectro de la luz amarilla. El mayor peso seco orgánico y contenido de cenizas fueron obtenidos con la luz amarilla durante la fase exponencial.

El coeficiente específico de absorción de *Amphora* sp. disminuyó conforme el contenido de clorofila *a* se incrementó y la PUR (energía fotosintéticamente utilizable) utilizada en este trabajo se encontró entre los $21.1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y los $27.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz blanca fluorescente. Las respuestas de las curvas fotosíntesis-irradiancia (P-E) fueron influenciadas por los distintos tipos de luz utilizados. La fotosíntesis máxima (P_{max}) y la mayor eficiencia fotosintética (α), se presentaron al mantener los cultivos de *Amphora* sp. con la luz azul, mientras que los menores valores de intensidad de luz de saturación (E_K) se obtuvieron con el uso de la luz amarilla.

Por efecto de la preservación en frío a 4 °C de los cultivos de *Amphora* sp. cultivada previamente bajo distinta composición espectral, se encontró que las células mantienen su viabilidad para el crecimiento hasta por un periodo de almacenamiento de 16 semanas en todas las condiciones experimentales ensayadas. El mayor crecimiento se presentó en el tratamiento con el uso de los cultivos provenientes de luz GroLux a las 8 semanas de preservación, sin embargo, a las 16 semanas de preservación la composición espectral no causó diferencias en el crecimiento de los cultivos usados para medir la

viabilidad. Durante los distintos tiempos de evaluación de la viabilidad de los cultivos preservados y para todas las condiciones experimentales utilizadas, se encontró que los cultivos estaban libres de bacterias del género *Vibrio*, por lo que éstos se podrían utilizar como inóculo para otros cultivos o bien como alimento de organismos en cultivo. Por efecto del proceso de preservación en frío (4 °C) se modificó el tamaño celular (largo y ancho), resultando en células más delgadas y menos largas (cortas) después de la preservación.

En la criopreservación (-196 °C) de los cultivos de *Amphora* sp. con la adición de crioprotectores (glicerol 10% y DMSO 10%) y cultivada previamente bajo distinta composición espectral, se presentó viabilidad para todos los tratamientos. Sin embargo, el mayor crecimiento durante los ensayos de viabilidad se encontró con el uso de glicerol como crioprotector, ya que el DMSO generó un decremento de la densidad de células respecto al tiempo de cultivo. En ambos tratamientos se observó la influencia en la viabilidad de la composición espectral de la luz, presentándose las mayores densidades poblacionales con la luz blanca. El tamaño celular de *Amphora* sp. se modificó por efecto de la criopreservación de las células así como por la procedencia de los cultivos expuestos a los distintos tipos de luz. En general se obtuvieron células más delgadas después de la criopreservación con adición de ambos crioprotectores (glicerol y DMSO).

La composición proximal de las células de *Amphora* sp. criopreservadas se modifica por efecto del origen de los cultivos mantenidos con distinta composición espectral de la luz, así como por efecto del tipo de crioprotector utilizado. El mayor contenido de proteínas y lípidos se obtuvo con el uso de glicerol como crioprotector para los cultivos previamente mantenidos con luz blanca. Los mayores contenidos de clorofila *a* y carotenoides se presentaron en el tratamiento con DMSO para los cultivos previamente mantenidos con luz verde.

Capítulo 6. Recomendaciones

Evaluar el efecto de distintos fotoperiodos en el cultivo de *Amphora* sp. con el fin de reducir costos en energía durante su producción.

Analizar los perfiles de ácidos grasos y aminoácidos de *Amphora* sp. para evaluar su uso potencial como alimento en la acuicultura.

Evaluar el coeficiente específico de absorción y la PUR para cultivos de *Amphora* sp. mantenidos con distinta composición espectral.

Valorar la composición proximal de los cultivos preservados en frío y evaluar su capacidad fotosintética.

Preservar cultivos de *Amphora* sp. por un mayor tiempo de anaquel con el fin de producir pastas para ser utilizadas como alimento para organismos en cultivo.

Analizar el efecto de otros crioprotectores sobre la viabilidad de *Amphora* sp. y evaluar la capacidad fotosintética de estos cultivos.

Realizar ensayos de alimentación utilizando los cultivos de *Amphora* sp. obtenidos con la distinta composición espectral de luz utilizada en esta investigación.

Lista de referencia bibliográficas

- Anguiano-Beltrán, C., Searcy-Bernal, R. y Lizárraga-Partida, M.L. (1998). Pathogenic effects of *Vibrio alginolyticus* on larvae and postlarvae of the red abalone *Haliotis rufescens*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 33: 119-122.
- Antia, N.J. (1976). Effects of temperature on the darkness survival of marine microplaktonic algae. *Microbial Ecology*, 3(1): 42-54.
- Arbones, A., Figueira, F. G. y Zapata, M. (1996). Determination of phytoplankton absorption coefficient in natural seawater samples: evidence of a unique equation to correct the pathlength amplification on glass-fiber filters. *Marine Ecology Progress Series*, 137: 293 – 304.
- Audesirk, T., Audesirk, G., Byers, B.E. (2003). *Biología: la vida en la tierra*. Pearson Educación. Barcelona, España. 889 pp.
- Beaz-Hidalgo, R. (2008). Identificación de bacterias del género *Vibrio* asociadas al cultivo de la almeja. Caracterización y patogenogénesis. Tesis de doctorado. Universidad de Santiago de Compostela. Facultad de Biología. Chile. 375 pp.
- Becker, E. W. (1994). *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press. Reino Unido. 293 pp.
- Beer, S., Björk, M., y Beardall, J. (2014). *Photosynthesis in the marine environment*. Wiley Blackwell. Reino Unido. 208 pp.
- Bendif E.M., Probert I., Schroeder D.C., de Vargas C. (2013). On the description of *Tisochrysis lutea* gen. nov. sp. nov. and *Isochrysis nuda* sp. nov. in the Isochrysidales, and the transfer of Dicrateria to the Prymnesiales (Haptophyta). *Journal of Applied Phycology*, 25(6): 1763-1776.
- Bricaud, A., Babin, M., Morel, A. y Claustre, H. (1995). Variability in the chlorophyll-specific absorption coefficients of natural phytoplankton: Analysis and parameterization. *Journal of Geophysical Research*, 100: 13-321.
- Buhmann, M.T., Day, J.G. y Kroth, P.G. (2013). Post-cryopreservation viability of the benthic freshwater diatom *Planothidium frequentissimum* depends on light levels. *Cryobiology*, 67(1): 23-29.
- Cañavate, J.P. y Lubián. L.M. (1995). Some aspects on the cryopreservation of microalgae used as food for marine species. *Aquaculture*, 136(3): 277-290.
- Cañavate, J.P. y Lubián. L.M. (1997a). Effects of slow and rapid warming on the cryopreservation of marine microalgae. *Cryobiology*, 35(2): 143-149.
- Cañavate, J.P. y Lubián. L.M. (1997b). Effects of the culture age on the cryopreservation of marine microalgae. *European Journal of Phycology*, 32(1): 87-90.

- Cepák, V., Příbyl, P. y Vítová, M. (2006). The effect of light color on the nucleocytoplasmic and chloroplast cycle of the green chlorococcal alga *Snedesmus obliquus*. *Folia Microbiologica*, 51(4):342-348.
- Cequier-Sánchez, E., Rodríguez, A., Ravelo, R., Zarate, R. (2008). Dichloromethane as solvent for lipid extraction, lipid classes and fatty acid assessment from samples of different nature. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 56(12): 4297-4303.
- Chart, H. (2012). *Vibrio, mobiluncus, gardnerella and spirillum*. En: Greenwood, D., Barer, M., Slack, R. e Irving, W. (Eds.) *Medical Microbiology: A guide to microbial infections: pathogenesis, immunity, laboratory investigation and control*. (pp.314-323). Elsevier.
- Cordero, B. y Voltolina, D. (1997). Viability of mass algal cultures preserved by freezing and freeze-drying. *Aquacultural Engineering*, 16(4): 205-211.
- Correa-Reyes, J.G. (2001). Selección de especies de diatomeas bentónicas para el cultivo de abulón. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 142 pp.
- Correa-Reyes, J.G., Sánchez-Saavedra, M.P., Viana, M.P., Flores-Acevedo, N. y Vásquez-Peláez, C. (2009). Effect of eight benthic diatoms as feed on the growth of red abalone (*Haliotis rufescens*) postlarvae. *Journal of Applied Phycology*, 21(4):387-393.
- Cosgrove, J. y Borowitzka, M.A. (2011). Chlorophyll fluorescence terminology: An introduction. En: Suger, D.J., Prášil, O. y Borowitzka, M.A. (Eds.) *Chlorophyll a fluorescence in aquatic sciences*. (pp.1-17). Springer.
- Courtois de Viçose, G., Porta, A., Viera, M.P., Fernández-Palacios, H. e 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.
- Dawes, C.J. (1991). *Botánica marina*. Limusa. México. 673 pp.
- 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(6):647-655.
- Del Pozo-Pérez, A. (2010). Producción y valorización de biomasa de microalgas: un enfoque de biorrefinería. En *el Hombre y el Medio Ambiente: XIV Jornadas ambientales*. Universidad de Salamanca. España. 261 pp.
- Demirbas, A. y M. F. Demirbas. (2010). *Green energy and technology. Algae energy. Algae as new source of Biodiesel*. Springer. Londres. 210 pp.
- Descolas-Gros, C. y de Billy, G. (1987). Temperature adaptation of RuBP carboxylase: kinetic properties in marine Antarctic diatoms. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 108(2):147-158.

- Dubinsky, Z. y Stambler, N. (2009). Photoacclimation processes in phytoplankton mechanism, consequences, and applications. *Aquatic Microbial Ecology*, 56(2-3):163-176.
- Dustan, P. (1982). Depth-Dependent photoadaptation by Zooxanthellae of reef coral *Montastrea annularis*. *Marine Biology*, 68(3):253-264.
- Everroad, C., Six, C., Partensky, F., Thomas, J.C., Holtzendorff, J. y Wood, M. (2006). Biochemical bases of type IV chromatic adaptation in marine *Synechococcus* spp. *Journal of Bacteriology*, 188(9):3345-3356.
- Falkowski, P.G. y Owens, T.G. (1978). Effects of light intensity on photosynthesis and dark respiration in six species of marine phytoplankton. *Marine Biology*, 45(4):289-295.
- Falkowski, P.G. y Raven, J.A. (2007). *Aquatic photosynthesis*. Princeton University Press. (2ª ed.). 484 pp.
- Fernández-Robledo, A. (2013). Efecto de la composición espectral de la luz en el crecimiento y en la composición proximal de *Scenedesmus obliquus*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Marinas. 48 pp.
- Figuerola, F. L. (1996). Effects of light quality on nitrate reductasa and glutamine synthetase activities in the red alga *Porphyra leucosticta* Thur. in Le Jol. and other macroalgae. *Scientia Marina*, 60 (Supl. 1): 163-170.
- Flaak, A.R. y Epifanio, C.E. (1978). Dietary protein levels and growth of the oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Biology*, 45(2): 157-163.
- Fogg, G.E. y Thake, B. (1983). *Algal culture and phytoplankton ecology*. University of Wisconsin Press. Londres. (3ª ed.). 267 pp.
- Flores-Vergara, C. (1998). Crecimiento y composición bioquímica de microalgas bentónicas cultivadas bajo diferentes condiciones de temperatura e intensidad de luz. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 101 pp.
- Folch, J., Lees, M., Stanley, G. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1): 497-509.
- Geider, R. J. y Osborne, B. A. (1991). *Algal Photosynthesis: The measurement of algal gas Exchange*. Chapman and Hall. Gran Bretaña. 256 pp.
- Godínez-Ortega, J.L., Snoeijs, P., Robledo, D., Freile-Peregrín, Y. y Pedersén, M. (2008). Growth and pigment composition in the red alga *Halymenia floresii* cultured under different light qualities. *Journal of Applied Phycology*, 20(3):253-260.

- González-Davis, O., Ponce-Rivas, E., Sánchez-Saavedra, M.P., Muñoz-Márquez, M.E. y Gerwick, W.H. (2012). Bioprospection of microalgae and cyanobacteria as biocontrol agents against *Vibrio campbellii* and their use in white shrimp *Litopenaeus vannamei* culture. *Journal of World Aquaculture Society*, 43(3): 387-399.
- Gorai, T., Katayama, T., Obata, M. y Taguchi, M. (2014). Low blue light enhances growth rate, light absorption and photosynthetic characteristics of four marine phytoplankton species. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 459:87-95.
- Guermazi, W., Sellami-Kammoun, A., Elloumi, J., Drira, Z., Aleya, L. Marangoni, R., Ayadi, H. y Maalej, S. (2010). Microalgal cryo-preservation using dimethyl sulfoxide (Me₂SO) coupled with two freezing protocols: Influence on the fatty acid profile. *Journal of Thermal Biology*, 35(4): 175-181.
- Guillard, R.L.L y Ryther, J.H. (1962). Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal Microbiology*, 8(2):229-239.
- Hahn, K.O. (1989). Handbook of culture of abalone and other marine gastropods. CRC Press, Boca Raton, Florida. 69 pp.
- Hameed, A.S.S. y Balasubramanian, G. (2000). Antibiotic resistance in bacteria isolated from *Artemia* nauplii and efficacy of formaldehyde to control bacteria load. *Aquaculture*, 183(3): 195-205.
- Hargraves, P. E. y F. W. French. (1983). Diatom resting spores significance and strategies. En: G. A. Fryxell. (Ed.) *Survival strategies of the algae*. (pp. 49-68). Cambridge University.
- Heasman, M., Diemar, J., O'Connor, W., Sushames, T. y Foulkes L. (2000). Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve molluscs. *Aquatic Research*, 31(8-9): 637-659.
- Hill, R.W., Wyse, G.A. y Anderson, M. (2006). Fisiología animal. Médica Panamericana. España. 1038 pp.
- Hudon, C. y Bourget, E. (1983). The effect of light on the vertical structure of epibenthic diatom communities. *Botánica Marina* 26(7): 317-330.
- Jadhav, U. (2009). *Aquaculture technology and environment*. PHI Learning Private Learning. Nueva Deli. 352 pp.
- Jeffrey, S.W., Wright, S.W. y Zapata, M. (2011). Microalgal classes and their signature pigments. En: Roy, S., Llewellyn, C.A., Egeland, E.S. y Johnsen, G. (Eds.). *Phytoplankton pigments. Characterization, chemotaxonomy and applications in oceanography*. (pp.3-77). Cambridge University Press.
- Jeon, Y.C., Cho, C.W. y Yun, Y.S. (2005). Measurement of microalgal photosynthetic activity depending on light intensity and quality. *Biochemical Engineering Journal*, 27(2):127-131.

- Jiménez-Estrada, M.Y. (2013). Caracterización de las relaciones bio-ópticas del fitoplancton frente al sistema lagunar Navachiste Sinaloa, México. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. 66 pp.
- Jiménez-Valera, S. (2015). Aislamiento y caracterización bioquímica de microalgas de Baja California como alternativas para la producción de lípidos. Tesis de Doctorado Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 158 pp. (Tesis en Proceso).
- Johnsen, G. y E. Sakshaug. (1996). Light harvesting in Bloom-forming marine phytoplankton: species-specificity and photoacclimation. *Scientia Marina*, 60 (Supl.1):47-56.
- Kabara, J.J. y Mashall, D.L. (2005). Medium chain fatty acids and esters. En: Davidson, P.M, Sofos, J.N. y Branen, A.L. (Eds.) *Antimicrobials in food*. (pp.327-360). CRC Press Taylor & Francis Group.
- Kawamura, T., Saido, T., Takami H. y Yamashita, Y. (1995). Dietary value of benthic diatoms for the growth of post-larval abalone *Haliotis discus hannai*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 194(2): 189-199.
- Kenawy, E.R. (2014). Electrospun polymer nanofibres with antimicrobial activities. En: Muñoz-Bonilla, A., Cerrada, M.L. y Fernández-García, M. (Eds.). *Polymeric materials with antimicrobial activity from synthesis to applications*. (pp. 208-223). The Royal Society of Chemistry.
- Kim, S.K. (2015). *Handbook of marine microalgae: Biotechnology advances*. Elsevier. Estados Unidos. 604 pp.
- Kirk, J.T.O. (1994). *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems*. Cambridge University Press. Gran Bretaña. 401 pp.
- Kishino, M., Takahashi, M., Okami, N. e Ichimura, S. (1985). Estimation of the spectral absorption coefficients of phytoplankton in the sea. *Bulletin of Marine Science*, 37(2): 634-642.
- Kowallik, W. (1982). Blue light effects on respiration. *Annual Review of Plant Physiology* 33(1): 51-72.
- Kula, M., Rys, M. y Skoczowski, A. (2014 a). Far-red light (720 of 740 nm) improves growth and changes the chemical composition of *Chlorella vulgaris*. *Engineering in Life Sciences*, 14(6): 651-657.
- Kula, M., Rys, M, Mozdzeń, K. y Skoczowski, A. (2014 b). Metabolic activity, the chemical composition of biomass and photosynthetic activity of *Chlorella vulgaris* under different light spectra in photobioreactors. *Engineering in Life Sciences*, 14(1): 57-67.

- 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 carbon fixation by *Rhodomonas* sp. (Cryptophyceae) cultured at different irradiance and nutrient concentrations. *Aquacultural Engineering*, 35(1):51-60.
- Larkum, A. W. D., Koch, E. M. W., y Kuhl, M. (2003). Diffusive boundary layers and photosynthesis of the epilithic algal community of coral reefs. *Marine Biology*, 142(6): 1073–1082.
- Lavens, P. y Sorgeloos, P. (2000). Experiences on importance of diet for shrimp postlarval quality. *Aquaculture*, 191(1): 169-176.
- Lee, S.H., Karawita, R., Affan, A., Lee, J. B., Lee, K. W., Lee, B. J., Kim, D. W. y Jeon, Y. J. (2009). Potential of benthic diatoms *Achnanthes longipes*, *Amphora coffeaeformis* and *Navicula* sp. (Baccilariophyceae) as Antioxidant Sources. *Algae*, 24(1): 47-55.
- Lepesteur, M., Martin, J.M. y Fleury, A. (1993). A comparative study of different preservation methods for phytoplankton cell analysis by flow cytometry. *Marine Ecology Progress Series*, 93(1-2): 55-63.
- Lim, T.K. (2012). Edible medicinal and non-medicinal plant. (Vol. 1). Springer. Londres. 1023 pp.
- López-Figueroa, F. y Viñegla, B. (2009). Effect of solar and artificial UV radiation on photosynthetic performance and carbonic anhydrase activity in intertidal macroalgae from southern Spain. *Ciencias Marinas*, 35(1): 59-74.
- Lorenz, M., Friedl, T. y Day, J. G. (2005). Perpetual Maintenance of Actively Metabolizing Microalgal Cultures. En: Andersen R. A. (Ed.). *Algal Culturing Techniques*. Phycological Society of America. (pp. 145-156) Academic Press.
- Los, D. A. y Murata, N. (2004). Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochimica et Biophysica Acta* 1666(1): 142–157.
- Lowry, O.H., Rosebrought, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biology Chemistry*, 193(1): 265-275.
- Lüning, K. (1981). Light. En: Lobban C.S. y Wynne M.J. (Eds.). *The biology of seaweeds*. Botanical Monographs. Vol. 17. (pp.326-49). University of California Press, Blackwell Scientific Publications.
- Malara, G. y Charra, R. (1972). Dosages des proteines particulaires selon la méthode de Lowry. Université de París. Sation Zoologique. Villefrenche-Sur-Mer. Notes de Travail (6):11 pp.
- Marchetti, J., Bougaran, G., Jauffrais, T., Lefebvre, S., Rouxel, C., Saint-Jean, B., Lukomska, E., Robert, R. y Cadoret, J.P. (2012). Effects of blue light on the biochemical composition and photosynthetic activity of *Isochrysis* sp. (T-iso). *Journal of Applied Phycology*, 25(1):109-119.

- Margalef, R. (1993). Teoría de los sistemas ecológicos. Universidad de Barcelona. 200 pp.
- Marshall, D.L. y Bullerman, L.B. (1994). Antimicrobial properties of sucrose fatty acid and esters. En: Akoh, C.C. y Swanson, B.G. (Eds.). Carbohydrates polyesters as fat substitutes. (pp.149-168). Marcel Dekker Inc.
- McNichol, J.C y McGinn, P.J. (2012). Adapting mass algaculture for northern climate. En: Gordon, R. y Sechback, J. (Eds.). The science of algal fuels: phycology, geology, biophotonics, genomics and nanotechnology. (pp. 131-146). Springer.
- Mercado, J. M., Sánchez-Saavedra, M.P., Carmona, R. y Niell, F.X. (2002). Limited acclimation of photosynthesis to blue light in the seaweed *Gracilaria tenuistipitata*. *Physiologia Plantarum*, 114(3): 491-498.
- Mercado, J. M., Sánchez-Saavedra, M. del P., Correa-Reyes, G., Lubián, L., Montero, O. y Figueroa, F.L. (2004). Blue light effect on growth, light absorption characteristics and photosynthesis of five benthic diatom strains. *Aquatic Botany*, 78(3):265-277.
- 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(1): 393-404.
- Metcalf, L., Schmitz, A., Pelka, J. (1966). Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Analytical Chemistry*, 38(3): 514-515.
- Millán-Núñez, E. (1999). Variabilidad del coeficiente específico de absorción de luz por fitoplancton en el Golfo de California. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Baja California, México. 109 pp.
- Millán-Núñez, E., Michael, E.S., Millán-Núñez, R., Lara-Lara, J.R., Gaxiola-Castro, G. y Trees, C.C. (2004). Specific absorption coefficient and phytoplankton biomass in the southern region of California Current. *Deep-Sea Research II: Topical Studies in Oceanography*, 51(6): 827-826.
- Millán-Núñez, E. y Millán-Núñez, R. (2010). Specific absorption coefficient and phytoplankton community structure in the southern region of the California Current during January 2002. *Journal of Oceanography*, 66(5): 719-730.
- Miranda-Saucedo, C. M. (2011). Crecimiento y supervivencia de poslarvas de abulón (*Haliotis rufescens*) alimentadas con dietas monoespecíficas de diatomeas bentónicas conservadas en frío. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Baja California, México. 86 pp.
- Mitbavkar, S. y Anil, A.C. (2006). Cell damage and recovery in cryopreserved microphytobenthic diatoms. *Cryobiology*, 53(1): 143-147.
- Mitchell, B.G. (1990). Algorithms for determining the absorption coefficient of aquatic particulates using the quantitative filter technique (QFT). *Ocean Optics X. International Society for Optics and Photonics*.137-148.

- Mitchell, B. G., Kahru, M., Wieland, J. y Stramska, M. (2002). Determination of spectral absorption coefficients of particles, dissolved material and phytoplankton for discrete water samples. Cap. 4: 39-64p. En: Mueller, J. L., Fargion, G. S. y McClain, C. R. (Eds.). Ocean Optics Protocols for Satellite Ocean Color Sensor Validation, National Aeronautical and Space Administration (NASA). Rev.4. (IV): 76 pp.
- Molina-Cárdenas, C.A., Sánchez-Saavedra, M.P. y Lizárraga-Partida, M.L. (2014). Inhibition of pathogenic *Vibrio* by the microalgae *Isochrysis galbana*. Journal of Applied Phycology, 26(6): 2347-2355.
- Montaini, E., Chini Zittelli, G., Tredici, M.R., Molina-Grima, E., Fernández-Sevilla, J.M., y Sánchez-Pérez, J.A. (1995). Long-term preservation of *Tetraselmis suecica*: influence of storage on viability and fatty acid profile. Aquaculture, 134(1): 81-90.
- Morel, A. (1978). Available, usable and stored radiant energy in relation to marine photosynthesis. Deep-Sea Research, 25(8): 673-688.
- Morris, I. (1981). Photosynthetic products, physiological state and phytoplankton growth. Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Sciences, 83-102.
- Muller-Feuga, A., Moaly, J. y Kaas, R. (2007). The microalgae of aquaculture. En: Støttrup J.G. y McEvoy L. A. (Eds.). Live feeds in marine aquaculture. (pp. 207-252). Blackwell Science, Oxford.
- Mouget, J.L., Rosa, P., Vachoux, C. y Tremblin, T. (2005). Enhancement of marennine production by blue light in the diatom *Haslea ostrearia*. Journal of Applied Phycology, 17(5): 437-445.
- Núñez-Zarco, E. y Sánchez-Saavedra, M.P. (2011). Cold storage of six marine benthic diatoms native to the México Pacific Coast. Journal of the World Aquaculture Society, 42(4): 530-538.
- Papich, M.G. (2011). Saunder Handbook of veterinary drugs. Small and large animal. (3^a ed.). Elsevier Inc. Estados Unidos. 896 pp.
- Parkinson, J. y Gordon, R. (1999). Beyond micromachining: the potential of diatoms. Nanotechnology TIBTECH. 17: 190-196.
- Parsons, T.R., Maita, Y. y Lalli, C.M. (1984). A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis. Pergamon Press, Oxford. Inglaterra. 193 pp.
- Parsons, T.R., Takahashi, M. y Hargrave, B. (2013). Biological Oceanographic Processes. Pergamon Press. Gran Bretaña. 344 pp.
- Piasecki, B.P., Diller, K.R. y Brand, J.J. (2009). Cryopreservation of *Chlamydomonas reinhardtii*: A cause of low viability at high cell density. Cryobiology, 58: 103-109.
- Rico-Mora, R., Voltolina, D. y Villaescisa-Celaya, J.A. (1998). Biological control of *Vibrio alginolyticus* in *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) cultures. Aquacultural Engineering, 19(1): 1-6.

- Roberts, R., Kawamura, T. y Takami, H. (2000). Diatoms for abalone culture: a workshop for abalone farmer. Prepared for 4th International Abalone Symposium. Cawthron Report No. 547. Cawthron Institute, Nueva Zelanda. 28 pp.
- Rodríguez-García J. y Virgós-Rovira, J.M. (1998). Fundamentos de óptica ondulatoria. (Ed.) Universidad de Oviedo, España. 260 pp.
- Rhodes, L., Smith, J., Tervit, R., Roberts, R., Adamson, J., Adams, S. y Decker, M. (2006). Cryopreservation of economically valuable marine micro-algae in the classes Bacillariophyceae, Chlorophyceae, Cyanophyceae, Dinophyceae, Haptophyceae, Prasinophyceae and Rhodophyceae. *Cryobiology*, 52(1): 152-156.
- Rietschel, R.L. y Fowler, J.J.F. (2008). Fisher's contact dermatitis 6. B.C. Dekker Inc. India. 863 pp.
- Sakshaug, E., Bricaud, A., Dandonneau, Y., Falkowski, P.G., Kiefer, D.A., Legendre, L., Morel, A., Parslow, J. y Takahashi, M. (1997). Parameters of photosynthesis: definitions, theory and interpretation of results. *Journal of Plankton Research*, 19(11): 1637-1670
- Sánchez-Saavedra, M.P. y Voltolina, D. (1994). The chemical composition of *Chaetoceros* sp. (Bacillariophyceae) under different light conditions. *Comparative Biochemistry Physiology. Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 107(1): 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 Acquacoltura* 30, 135-138.
- Sánchez-Saavedra, M.P., Jiménez, C., López-Figueroa, F. (1996). Variable fluorescence of chlorophyll *a* in *Dunaliella bardawil* with different β -carotene content. *Scientia Marina*, 60 (Supl. 1): 227-231.
- Sánchez-Saavedra, M.P. y Voltolina, D. (1996). 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 (Supl. 1): 267-272.
- Sánchez-Saavedra, M.P. y Voltolina, D. (2002). Effect of photon fluence rates of white and blue-green light on growth efficiency and pigment content of three diatom species in batch cultures. *Ciencias Marinas*, 28(3):273-279.
- Sánchez-Saavedra, M.P. y Voltolina, D. (2006). The growth rate, biomass production and composition of *Chaetoceros* sp. grow with different light sources. *Aquacultural Engineering*, 35(2): 161-165.
- Sánchez-Saavedra, M.P. (2006). The effect of cold storage on cell viability and composition of two benthic diatoms. *Aquacultural Engineering*, 34(2):131-136.
- Sánchez-Saavedra, M.P. (2007). Uso de diatomeas refrigeradas como alimento para abulón. *Boletín Informativo trimestral de la Sociedad Mexicana de Abulón*, IV(9): 1-2.

- Sánchez-Saavedra, M.P. (2013). El uso de las diatomeas bentónicas en la acuicultura. En: Martínez-Córdova, L.R. y Martínez-Porchas, M. (Eds.). Alimento natural en acuicultura. (pp. 57-93). AGT.
- Sánchez-Saavedra, M.P., Maeda-Martínez, A.N. y Acosta-Galindo, S. (2015). Effect of different light spectra on the growth and biochemical composition of *Tisochrysis lutea*. Journal of Applied Phycology, DOI 10.1007/s10811-015-0656-8.
- Seckbach, J. (2007). Algae and cyanobacteria in extreme environments. Springer Science & Business Media. Londres. 814 pp.
- Seckbach, J. y Kociolek, J.P. (2007). The diatom world. Springer Science & Business Media. Londres. 534 pp.
- Skjermo, J. y Vadstein, O. (1993). Characterization of the bacterial flora of mass cultivated *Brachionus plicatilis*. En: Rotifer Symposium VI (pp. 185-191). Springer.
- Silva-Aciades, F.R. y Riquelme, C.E. (2008). Comparisons of the growth of six diatom species between two configurations of photobioreactors. Aquacultural Engineering, 38(1):26-35.
- Simental-Trinidad, J.A., Sánchez-Saavedra, M.P. y Correa-Reyes, J.G. (2001). Biochemical composition of benthic marine diatoms using as culture médium a common agricultural fertilizer. Journal of Shellfish Research, 20(2): 611-617.
- Siqueiros-Beltrones, D. A. (2002). Diatomeas de la Península de Baja California: Diversidad y Potencial ecológico. CICIMAR (Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas) – IPN (Instituto Politécnico Nacional). La Paz, Baja California Sur, México. 102 pp.
- Siqueiros-Beltrones, D.A. y Argumedo-Hernández, U. (2015). Diatomeas epifitas consumidas por adultos de abulón (*Halotis* spp.) en Baja California Sur, México. Revista Mexicana de Biodiversidad, 86(1): 111-122.
- Sokal, R. R. y Rohlf, F. J. (1995). Biometry: The principles and practice of statistics in biological research. W. H. Freeman and Company. San Francisco. 887 pp.
- Sorokin, C. (1973). Dry weight, packed cell volume and optical density. 321-344. En: Stein, J. (Ed.) Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods. Cambridge University Press, London. 448 pp.
- Soto-Rodríguez, S.A., Roque, A., Lizárraga-Partida, M.L., Guerra-Flores, A.L. y Gómez-Gil, B. (2003). Virulence of luminous vibrios to *Artemia fanciscana* nauplii. Diseases of Aquatic Organisms, 53(3): 231-240.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. Journal of Bioscience and Bioengineering, 101(2): 87–96.
- StatSoft Inc. (2014). Estadística Decisioning Platform®. Recuperado de www.statsoft.com.

- Steeman-Nielsen, E. (1975). The pigment found in the various taxonomic groups of plants and their importance for photosynthesis. En: Steeman-Nielsen, E. (ed.). Marine photosynthesis with special emphasis on the ecological aspects. (pp. 33-42). Elsevier.
- Stevenson, J. R., Bothwell, M. y Lowe, R. (1996). Algal ecology. Freshwater benthic ecosystems. Academic Press. San Diego, California. 1-30 pp.
- Su, Y., Lundholm, N., Friis, S.M.M. y Ellegaard, M. (2015). Implications for photonic applications of diatom growth and frustule nanostructure changes in response to different light wavelengths. Nano Research, 7(8): 2363-2372.
- Talarico, L. (1996). Phycobiliproteins and phycobilisomes in red algae: adaptive responses to light. Scientia Marina, 60 (Suppl. 1): 205-222.
- Tanniou, A., Turpin, V. y Lebeau, T. (2012). Comparison of cryopreservation methods for the long term storage of the marine diatom *Haslea ostrearia* (simonsen). Cryobiology, 65: 45-50.
- Taiz, L. y Zeiger, E. (2006). Las respuestas a la luz del azul: movimientos estomáticos y morfogénesis. En: Fisiología vegetal. (Vol. 10.) Universitat Jaume Publicacions. España. 1160 pp.
- Tzovenis, E., Triantaphyllidis, G., Naihong, X., Chatzinikolaou, E., Papadopoulou, K., Xouri, G. y Tafas, T. (2004). Cryopreservation of marine microalgae and potential toxicity of cryoprotectants to the primary steps of the Aquacultural food chain. Aquaculture, 230(1): 457-473.
- Upatham, E. S., Sawatpeera, J., Kruatrachue, M., Y., Chitramong, P., Singhagraiwan, T., Pumthong, T., y Jarayabhand, P. (1998). Food utilization by *Halotis asinine* Linnaeus. Journal Shellfish Research, 17(3): 771-776.
- Vadiveloo, A., Moheimani, N.R., Cosgrove, J.J., Bahri, P.A. y Parlevliet, D. (2015). Effect of different light spectra on the growth and productivity of acclimated *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). Algal Research, 8:121-127.
- Verdonck, L., Swings, J., Kersters, K., Dehasque, M., Soergelos, P. y Léger, P. (1994). Variability of the microbial environment of rotifer *Brachionis plicatilis* and *Artemia* production systems. Journal of Aquaculture Society, 25(1): 55-59.
- Voskresenskaya, N.P. (1972). Blue-light and carbon metabolism. Annual Review of Plant Physiology, 23(1): 219-234.
- Wallen, D.G. y Geen, G. H. (1971). Light quality on concentration of proteins, RNA, DNA and photosynthetic pigments in two species of marine plankton algae. Marine Biology, 10(1): 44-51.
- Welladsen, H., Kent, M., Mangott, A. y Li, Y. (2014). Shelf-life assessment of microalgae concentrates: Effect of cold preservation on microalgal nutrition profiles. Aquaculture 430: 241-247.

- Yamamoto, S., Michel, C., Gosselin, M., Demers, S., Fukuchi, M. y Taguchi, S. (2014). Photosynthetic characteristics of sinking microalgae under the sea ice. *Polar Science*, 8(4): 385-396.
- Yoshioka, M., Yago, T., Yoshie-Stark, Y., Arakawa, H. y Morinaga, T. (2012). Effect of high frequency of intermittent light on growth and fatty acid profiles of *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*, (338-341): 111-117.
- Zar J. H. (1984). *Biostatistical Analysis*. (3^a ed.). Prentice-hall, Inc. Englewood Cliffs, N. 662 pp.
- Zhang, S., Xu, C. y Santschi, P. H. (2008). Chemical composition and ²³⁴Th (IV) binding of extracellular polymeric substances (EPS) produced by the marine diatom *Amphora* sp. *Marine Chemistry* 112(1): 81–9.