

**Universidad Nacional de Costa Rica
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Escuela de Ciencias Biológicas
Licenciatura en Biología con Énfasis en Manejo de Recursos Marinos y
Dulceacuícolas**

Informe Escrito Final

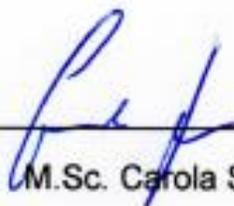
**Bioprospección de la diatomea *Nanofrustulum shiloi* (Bacillariophyceae),
nativa del noroeste de Baja California Sur, México, para su uso como
alimento alternativo en sistemas acuícolas**

**Tesis presentada como requisito parcial para optar al grado de
Licenciatura en Biología con Énfasis en Manejo de Recursos Marinos y
Dulceacuícolas**

Brenda Priscilla Portuguese Solano

**Campus Omar Dengo
Heredia, 2020**

Este trabajo de graduación fue **aprobado** por el Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Manejo de Recursos Marinos y Dulceacuícolas



M.Sc. Carola Scholz
Representante. Decano. quién preside



M.Sc. Hannia Vega Bolaños
Representante, Unidad Académica



Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega
Tutora



Licda. Nancy Villalobos Sandí
Asesora



Dra. Andrea García Rojas
Invitada especial

Agradecimiento

A la Universidad Nacional de Costa Rica, al programa de Intercambio Estudiantil del Departamento de Bienestar Estudiantil, por el apoyo económico brindado para realizar mi tesis en Baja California Sur, México.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR), al Laboratorio de Biotecnología de Microalgas, al Laboratorio de Microalgas y Cepario del CIBNOR, al Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico y al Laboratorio de Microscopía Electrónica, por permitirme hacer uso de sus instalaciones y equipo para realizar mi tesis. Especial agradecimiento al Proyecto CIBNOR 20231 del Laboratorio de Biotecnología de Microalgas.

A mi comité asesor conformado por la Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega, la Licda. Nancy Villalobos Sandí y la M.Sc. Milagro Carvajal Oses. Les extiendo mis más sinceros agradecimientos por el compromiso, profesionalismo y responsabilidad de cada una, por los buenos y sabios consejos, la atención y el gran apoyo que me brindaron. Son grandes investigadoras, personas invaluable y todo un ejemplo para mi persona y demás estudiantes que confían en sus trabajos y orientación.

A los técnicos de los laboratorios en los que trabajé, entre ellos la Dra. Laura Carreón Palau a quién además agradezco enormemente sus consejos, paciencia y apoyo. A la Ing. Biotecnóloga Daniela Bárcenas Pérez por todo su apoyo y asesoramiento en el cultivo y escalamiento de microalgas. Los miembros del Laboratorio de Microalgas, Ing. Bioquímica Adriana Greene Yee, Ing. en Pesquerías Julián Garzón Favela y al Químico Farmacéutico Biólogo Marte Virgen Félix, del Cepario, por el apoyo brindado. Al técnico Ariel Arturo Cruz Villacorta y a la M.C. Norma Ochoa por su atención y permitirme trabajar en sus laboratorios. Al Dr. Francisco Omar López Fuerte de la Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS) por tener la disposición de compartir conmigo sus valiosos conocimientos sobre taxonomía de diatomeas.

A la Dra. Kitty, mis profundos agradecimientos por brindarme su gran apoyo, cálida hospitalidad y amistad durante mi estancia en La Paz. A las que se convirtieron en mis amigas

Daniela Bárcenas, Karla Cota y Karen Rodríguez, con quienes compartí inolvidables momentos. A la Profesora Nancy por su paciencia, amistad y buenos consejos. A la Profesora Carola Scholz quien siempre fue mi consejera y me apoyó en todo momento para realizar mi pasantía en el extranjero. A mis compañeros de licenciatura, especialmente a Noé Chaves y Daniel González por siempre estar dispuestos a ayudarme.

A mi familia, especialmente a mi papá, mamá y hermanos, de quienes recibo el mayor y sincero apoyo en todo momento. A mi ser de luz Ana Betty, quien está muy dentro de mí y me enseñó que con Fe todo se puede lograr.

Dedicatoria

A mis padres Eddy y Elvia, y a mis hermanos Valery, Luis Mario y Ana Betty.

Índice de contenido

Agradecimiento	III
Dedicatoria.....	V
Índice de contenido.....	VI
Índice de cuadros	X
Índice de figuras	XII
Abreviaturas.....	XIII
Resumen	XV
1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Justificación	4
1.3 Planteamiento del problema.....	6
1.4 Objetivos.....	6
1.4.1. Objetivo general	6
1.4.2. Objetivos específicos.....	6
2. Marco teórico.....	7
2.1. Características generales de las microalgas	7
2.2. Generalidades de las diatomeas	9
2.3. Aspectos a considerar en el cultivo de microalgas:	10
2.4. Tipos de sistemas de cultivo para microalgas.....	13
2.5. Ventajas y desventajas del cultivo de microalgas.....	15
2.6. Potencial de las microalgas y su aplicación en diversas industrias	15
2.7. El papel de las microalgas en la acuicultura	16
2.8. Taxonomía, morfología y distribución de <i>Nanofrustulum shiloi</i>	18

3.	Marco Metodológico	20
3.1.	Objeto de estudio	20
3.2.	Sitio de estudio.....	21
3.3.	Caracterización morfológica mediante generación de imágenes de la cepa por microscopia electrónica de barrido y microscopia confocal.....	21
3.4.	Condiciones de cultivo en laboratorio y curva de crecimiento.....	22
3.5.	Escalamiento al exterior.....	23
3.6.	Determinación de la densidad óptica	26
3.7.	Determinación de peso seco y contenido orgánico e inorgánico.....	26
3.8.	Estimación de la concentración de biomasa microalgal.....	28
3.9.	Determinación de la cinética de crecimiento y los parámetros poblacionales...	28
3.10.	Análisis bioquímicos.....	29
3.10.1.	Cuantificación de proteínas totales	29
3.10.2.	Cuantificación de carbohidratos totales	31
3.10.3.	Determinación de pigmentos, lípidos totales y ácidos grasos.....	33
3.10.3.1.	Obtención del extracto clorofórmico para determinación de pigmentos	33
3.10.3.2.	Extracción, identificación y cuantificación de pigmentos	33
3.10.3.3.	Obtención del extracto clorofórmico para determinación de lípidos totales y ácidos grasos.....	35
3.10.3.4.	Extracción y cuantificación de lípidos totales	36
3.10.3.5.	Extracción, identificación y cuantificación de ácidos grasos	37
3.11.	Análisis estadístico	39
3.12.	Evaluación de la conveniencia de cultivo masivo y posible uso en la acuicultura	39
4.	Resultados.....	40
4.1.	Caracterización morfológica de <i>Nanofrustulum shiloi</i>	40
4.2.	Cultivo en condiciones de laboratorio.....	42

4.2.1.	Parámetros poblacionales y de productividad.....	42
4.3.	Desarrollo del cultivo en condiciones al exterior.....	44
4.3.1.	Medidas indirectas de la concentración celular	44
4.3.2.	Parámetros poblacionales.....	46
4.3.3.	Determinación de peso seco total, orgánico e inorgánico (cenizas) y parámetros de productividad	46
4.3.4.	Temperatura e irradiancia fuera y dentro de las columnas de cultivo.....	47
4.3.5.	Parámetros fisicoquímicos dentro del cultivo	49
4.3.6.	Composición bioquímica.....	50
4.4.	Evaluación de la conveniencia de cultivo masivo y posible uso en la acuicultura	55
5.	Discusión	58
5.1.	Caracterización morfológica de <i>Nanofrustulum shiloi</i>	58
5.2.	Cultivo en condiciones de laboratorio	58
5.2.1.	Parámetros poblacionales.....	58
5.3.	Cultivo en condiciones al exterior	60
5.3.1.	Concentración celular.....	60
5.3.2.	Parámetros poblacionales.....	62
5.3.3.	Peso seco total (PST), orgánico (PSO) e inorgánico (PSI) (cenizas) y parámetros de productividad	62
5.3.4.	Parámetros fisicoquímicos fuera de las columnas de cultivo.....	64
5.3.5.	Parámetros fisicoquímicos dentro de las columnas de cultivo.....	65
5.3.6.	Composición bioquímica de <i>Nanofrustulum shiloi</i>	68
5.3.6.1.	Proteínas totales.....	68
5.3.6.2.	Carbohidratos totales.....	69
5.3.6.3.	Cenizas	70

5.3.6.4.	Pigmentos	71
5.3.6.5.	Lípidos totales	73
5.3.6.6.	Ácidos grasos	74
5.4.	Conveniencia de cultivo masivo y posible uso en la acuicultura	77
6.	Conclusiones.....	83
7.	Referencias bibliográficas	85

Índice de cuadros

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de la diatomea empleada.....	19
Cuadro 2. Comparación de la composición del fertilizante agrícola utilizado y la del medio de cultivo F/2 (Guillard, 1975).....	22
Cuadro 3. Condiciones del HPLC empleadas en la identificación y cuantificación de los pigmentos de <i>Nanofrustulum shiloi</i>	34
Cuadro 4. Gradiente de solventes utilizados durante los tiempos de corrida del HPLC. ...	35
Cuadro 5. Parámetros poblacionales de <i>Nanofrustulum shiloi</i> en condiciones de laboratorio: tasa de crecimiento (μ) y tiempo de generación (Tg).....	44
Cuadro 6. Medidas indirectas de la concentración celular de <i>Nanofrustulum shiloi</i>	45
Cuadro 7. Parámetros poblacionales de <i>Nanofrustulum shiloi</i> : tasa de crecimiento (μ) y tiempo de generación (Tg); cultivada en condiciones al exterior.....	46
Cuadro 8. Valores de temperatura e irradiancia medidos con los sensores HOBO Pendant®, a los que estuvieron expuestas las columnas con cultivo de <i>Nanofrustulum shiloi</i> ubicadas en el solarío del CIBNOR.. ..	48
Cuadro 9. Valores de temperatura e irradiancia medidos con los sensores HOBO Pendant®, en el interior de los cultivos de <i>Nanofrustulum shiloi</i> ubicados en el solarío del CIBNOR.. ..	48
Cuadro 10. Valores diarios de oxígeno disuelto máximo (OD max), oxígeno disuelto mínimo (OD min), salinidad y pH antes y después de adicionar CO ₂ al cultivo de <i>Nanofrustulum shiloi</i> establecido en condiciones al exterior.. ..	50
Cuadro 11. Pigmentos identificados para <i>Nanofrustulum shiloi</i> durante los días 0 y 7 de su cultivo en columnas expuestas a las condiciones ambientales.	52
Cuadro 12. Perfil de ácidos grasos de <i>Nanofrustulum shiloi</i> durante los días 0 y 7 de su cultivo en columnas expuestas a las condiciones ambientales.. ..	54
Cuadro 13. Valores de la relación entre ácidos grasos ω 3/ ω 6 y viceversa, de acuerdo al día de cultivo.. ..	55

Cuadro 14. Resultados del cultivo de *Nanofrustulum shiloi* utilizados para la evaluación de la conveniencia de cultivo masivo..... 56

Cuadro 15. Comparación de mayores costos económicos del sistema de cultivo para microalgas empleado.. 57

Índice de figuras

Figura 1. Células vivas de <i>Nanofrustulum shiloi</i> observadas a 40 X en un microscopio óptico Carl Zeiss Primo Star del CIBNOR.....	20
Figura 2. Sistema de cultivo en columnas verticales utilizado en el presente estudio.	25
Figura 3. Curva de calibración de proteínas elaborada con albúmina de suero bovino.	30
Figura 4. Curva de calibración de carbohidratos elaborada con glucosa anhidra..	32
Figura 5. Curva de calibración para la determinación de lípidos totales, elaborada con la diatomea <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	36
Figura 6. Imágenes de MEB de frústulas de la diatomea <i>Nanofrustulum shiloi</i>	41
Figura 7. Imágenes de microscopía confocal de células de <i>Nanofrustulum shiloi</i>	42
Figura 8. Curva de crecimiento de <i>Nanofrustulum shiloi</i> elaborada con los valores de concentración de biomasa (peso seco) en función del tiempo de cultivo.....	43
Figura 9. Curva de crecimiento de <i>Nanofrustulum shiloi</i> elaborada con los valores de densidad óptica en función del tiempo de cultivo..	43
Figura 10. Curva de calibración para estimar la concentración de la biomasa de <i>Nanofrustulum shiloi</i>	45
Figura 11. Valores de peso seco total (PST) (mg L^{-1}) y el porcentaje de éste que representa el peso seco orgánico (PSO) y el peso seco inorgánico (PSI) (cenizas) calculados para los días 0, 3 y 7 del cultivo de <i>Nanofrustulum shiloi</i> en columnas en condiciones al exterior..	47
Figura 12. Irradiancias registradas por los sensores HOBO Pendant® en el exterior e interior de las columnas desde el día 0 y hasta el 7.....	49
Figura 13. Porcentajes del peso seco que representan las diferentes biomoléculas y cenizas de <i>Nanofrustulum shiloi</i> durante los días 0 y 7 de su cultivo en columnas expuestas a las condiciones ambientales.....	51
Figura 14. Contenido de los grupos de ácidos grasos de <i>Nanofrustulum shiloi</i> durante los días 0 y 7 de su cultivo en columnas expuestas a las condiciones ambientales..	53
Figura 15. Porcentaje de ácidos grasos $\omega 3$ y $\omega 6$ de <i>Nanofrustulum shiloi</i> en el día 0 y 7 de su cultivo en columnas expuestas a las condiciones ambientales..	55

Abreviaturas

AGAI	Ácidos grasos altamente insaturados
AGBI	Ácidos grasos biinsaturados
AGMI	Ácidos grasos monoinsaturados
AGPI	Ácidos grasos poliinsaturados
AGS	Ácidos grasos saturados
ANOVA	Análisis de varianza
ARA	Ácido araquidónico
ARESEP	Autoridad Reguladora de los Servicios Públicos
BHT	Butil-hidroxi tolueno
BSA	Albúmina de suero bovino, del inglés Bovine serum albumin
CIBNOR	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
DHA	Ácido docosahexaenoico
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FAME	Ácido graso metil esterificado, del inglés fatty acid methyl esters
GCMS	Cromatografía de gases-Espectrometría de masas, del inglés Gas chromatography and mass spectrometry
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución, del inglés high performance liquid chromatography
kWh	Kilovatio hora
MEB	Microscopía electrónica de barrido
OD	Oxígeno disuelto
psi	Libras por pulgada cuadrada, del inglés pounds per square inch
PSI	Peso seco inorgánico
PSO	Peso seco orgánico
PST	Peso seco total
TR	Tiempo de retención
TAG	Total de ácidos grasos
Tg	Tiempo de generación

UPS	Unidades prácticas de salinidad
UTEX	Universidad de Texas, Austin
$\omega 3$	Ácidos grasos Omega-3
$\omega 6$	Ácidos grasos Omega-6

Resumen

Las microalgas son organismos eficientes fotosintéticamente e importantes en las cadenas tróficas. Las diatomeas son un excelente alimento en la acuicultura debido a su valor nutricional y contenido de ácidos grasos esenciales. Actualmente, existe un interés en encontrar organismos con valor nutricional para la alimentación humana y animal, reduciendo así el impacto sobre los recursos naturales. El objetivo del presente trabajo fue cultivar, escalar y analizar la composición bioquímica de la diatomea marina *Nanofrustulum shiloi*, cultivada al exterior. Esta fue recolectada en Bahía Balandra, Baja California Sur, México. Se generaron imágenes mediante microscopía confocal y electrónica de barrido. Se cultivó durante 7 días en columnas de 80 L. Se utilizó el fertilizante agrícola Fertiplus® junto con silicatos como medio de cultivo y se hicieron adiciones diarias de CO₂. Se midió diariamente la temperatura, irradiancia, pH y oxígeno disuelto. Se registraron temperaturas dentro del cultivo entre 20°C y 30°C e irradiancias desde 6.5 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ hasta un máximo de 358 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Además, se obtuvo una tasa de crecimiento de 0.25 d⁻¹ con un rendimiento de biomasa de peso seco (PS) de 322 mg L⁻¹ y productividad de 46 mg L⁻¹ d⁻¹. Se obtuvo un mayor contenido de proteínas (27 ± 1% PS) y carbohidratos (20 ± 2% PS) en el día 7 en comparación con el tiempo inicial (p <0.05) y no hubo diferencias significativas en cuanto a lípidos (19 ± 3% PS). Los ácidos grasos con mayor porcentaje fueron el palmítico, palmitoleico, eicosapentaenoico y araquidónico. Los principales pigmentos encontrados fueron las clorofilas *a* y *c* y la fucoxantina. *Nanofrustulum shiloi* posee amplia tolerancia ante cambios en las condiciones de cultivo, además por su facilidad de cultivo y valor nutricional, puede considerarse como posible suplemento nutricional en la dieta de organismos acuáticos.

1. Introducción

1.1 Antecedentes

El cultivo de microalgas ha sido utilizado desde hace más de 50 años para la producción de compuestos de interés, los cuales se generan producto de los procesos metabólicos propios de estos organismos. Debido a esto, hoy en día la producción masiva representa una de las actividades comerciales de mayor importancia, principalmente en países como China, Estados Unidos, Japón, Israel, Alemania y Australia, quienes se posicionan como los principales productores a nivel mundial. Estos a su vez, destinan los productos generados para diferentes áreas como la generación de energías renovables y en la industria alimenticia, médica, farmacéutica, acuícola, cosmética y biotecnológica (Trentacoste et al., 2015).

Además, según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), en 2016 se registró un total de 89 000 toneladas de microalgas cultivadas en 11 países, sin embargo, el 99.5% de esta producción se generó en China. Al año 2018, la FAO no contaba con datos exactos sobre la escala real del cultivo de microalgas a nivel mundial, ya que no se encuentran datos disponibles por parte de productores significativos como la India, Malasia y Myanmar. En adición a esto, referente a países tropicales y subtropicales, mucha de la producción de microalgas es destinada a la alimentación de larvas para la acuicultura (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2018; Carranza Espinal et al., 2015)

Por otra parte, debido a este creciente interés a nivel mundial en la producción de microalgas, se han desarrollado múltiples investigaciones en las que se ponen a prueba diferentes condiciones de cultivo. Además, se ha determinado la efectividad de distintos sistemas en el proceso de cultivo y escalamiento de los mismos, tanto en condiciones no controladas y expuestas a la atmósfera (sistemas abiertos), como en condiciones controladas utilizando fotobiorreactores en los que el cultivo se encuentra aislado del medio exterior. Las investigaciones se centran en la búsqueda de las condiciones óptimas en las que cada especie de microalga tiene altas productividades y rendimientos, así como promisorias

concentraciones de biomoléculas de interés como proteínas, carbohidratos, ácidos grasos, pigmentos, entre otros (García-Romeral et al., 2017).

Estos estudios pueden llevarse a cabo en cultivos con grandes volúmenes, o bien, a pequeña escala en el laboratorio. Por ejemplo, la investigación realizada por Hernández Acevedo et al., (2019) en la que se determinó el perfil de ácidos grasos de 54 cepas de microalgas recolectadas en Perú, con el fin de evaluar el contenido nutricional y el eventual uso de ellas en la acuicultura. El estudio se llevó a cabo en cultivos con volúmenes de 50 mL, medio de cultivo F/2 Guillard con silicatos y en condiciones de temperatura, irradiancia, pH y fotoperíodo controlados. Los resultados mostraron que los ácidos grasos funcionan como marcadores químico-taxonómicos. Además, concluyeron que el grupo Bacillariophyta posee altos porcentajes del ácido eicosapentaenoico (EPA) y la capacidad de producir ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, lo que lo hace un grupo promisorio para uso en acuicultura.

En un estudio realizado por Santos-Ballardo et al. (2016) se emplearon distintos tipos de biorreactores ubicados al aire libre para llevar a cabo el cultivo de la diatomea *Phaeodactylum tricornutum*, la cual posee un gran potencial para la producción de biodiesel. Los resultados mostraron que estas microalgas cultivadas al exterior, alcanzaron un mayor contenido de lípidos y ácidos grasos saturados, así como una mayor eficiencia de crecimiento, respecto a aquellas que se cultivan en el laboratorio. Además, los autores afirman que una de las mayores ventajas del desarrollo de cultivos al aire libre, es que permite la reducción de los costos de producción.

Por otra parte, también se lleva a cabo la optimización de nuevas tecnologías para obtener mejores resultados en el cultivo de microalgas, como en la investigación realizada por Carvajal-Oses et al. (2018) con la microalga *Nannochloropsis oculata*, en la que se utilizó un fotobiorreactor tubular helicoidal de 55 L construido entre otros materiales con manguera transparente, un desgasificador para evitar altas concentraciones de oxígeno, un aireador y ocho lámparas de 32 W. Este equipo se comparó con un sistema abierto tradicional conformado por un tanque de fibra de vidrio de 2 m³ y una manguera para aireación. Los autores concluyeron que se obtiene mayor concentración microalgal (7.5 a 134x 10⁶ cel/mL) y permanencia de las células por mayor cantidad de días (20 días) al utilizar el fotobiorreactor

en comparación con el sistema abierto (de 4 a 5 días). Además, reportaron una reducción del 91% en el área requerida para la producción y de los costos económicos en un 18%.

Ahora bien, factores abióticos también han sido estudiados para potenciar rendimientos en cultivos. Por ejemplo, la microalga *Scenedesmus* sp fue utilizada para evaluar el efecto de la temperatura y el pH sobre la concentración celular y la composición nutricional en un cultivo de 20 L bajo condiciones de laboratorio. En este estudio se expuso la microalga a cuatro tratamientos de temperaturas desde 19° C hasta 30° C y distintos pH desde 6 hasta 9.2, así como un tratamiento control. Se determinó una temperatura óptima de crecimiento de 25. 7° C y un pH de 8.39, en los cuales se obtuvo la máxima concentración de células y un 36.14% de proteínas, 8.57% de lípidos 11.43% de cenizas y 89.32% de humedad. La autora propone un protocolo de cultivo específico para esta microalga y recomienda realizar más investigaciones para un mejor aprovechamiento debido a sus características nutricionales, así como estandarizar dicho protocolo para su cultivo en sistemas abiertos (Huancollo Chambi, 2018).

Por otra parte, en la investigación realizada por Banerjee et al. (2011), se comparó el crecimiento y la composición proximal de dos microalgas marinas, *Chaetoceros calcitrans* y *Nannochloropsis oculata*, cultivadas en condiciones al exterior y en el laboratorio. En este estudio se obtuvo una biomasa, una densidad óptica y una tasa de crecimiento significativamente mayor en los cultivos de ambas microalgas situados en el exterior, en comparación con aquellos desarrollados en el laboratorio. Además, el contenido de lípidos en *C. calcitrans* también fue mayor en el exterior, mientras que las proteínas y carbohidratos no mostraron diferencias en ambos cultivos. En cuanto a *N. oculata*, no mostró diferencias en la composición de lípidos y proteínas, sin embargo, se encontró mayor cantidad de carbohidratos en su cultivo al exterior.

Cabe recalcar que, en la mayoría de los estudios mencionados anteriormente, se llevó a cabo en primer lugar el cultivo de la microalga en condiciones controladas y posteriormente el escalamiento respectivo hasta alcanzar los altos volúmenes necesarios para el cultivo en los sistemas ubicados en el exterior.

Finalmente, en cuanto a los estudios realizados específicamente con la diatomea *Nanofrustulum shiloi*, se han publicado diversas investigaciones sobre su taxonomía, morfología, distribución y caracterizaciones a nivel molecular (Round et al., 1999; Sabbe et al., 2003; Sar & Sunesen, 2003; López-Fuerte et al., 2016; Li et al., 2019) . Además, se reporta en estudios de bioprospección (Steinrücken et al., 2017 Steinrücken, 2018) y en evaluaciones de su respuesta a parámetros como la temperatura, niveles de irradiancia y salinidad, así como a distintas concentraciones de nutrientes como hierro y nitrógeno (Woelfel et al., 2014; Sahin et al., 2017; Sahin et al., 2019)

También se ha evaluado el potencial uso de la diatomea como fuente de alimento animal y los efectos de la misma en la sobrevivencia y desarrollo larval de erizos, camarones y peces (Kiron et al., 2012; Ruocco et al., 2018; Zupo et al., 2018) . Sin embargo, todos estos estudios mencionados anteriormente se han llevado a cabo en condiciones controladas dentro del laboratorio, no se han publicado resultados de las respuestas de *Nanofrustulum shiloi* en cultivos expuestos a las condiciones ambientales.

1.2 Justificación

Las microalgas poseen una gran plasticidad metabólica que les permite la adaptación en diversos hábitats y la producción de diferentes compuestos y biomoléculas. Estos productos han sido aprovechados por el ser humano para la generación y obtención de productos de alta calidad y de elevado interés comercial. Estos compuestos se han utilizado en la elaboración de cosméticos, suplementos alimenticios, así como la generación de productos farmacéuticos, acuícolas, biotecnológicos y biomédicos. Además, las microalgas se han empleado en el desarrollo de nuevas tecnologías como la generación de biocombustibles, fabricación de productos nanotecnológicos, implementación de sistemas de biorremediación y como “fábricas celulares” para la expresión de proteínas recombinantes.

Debido a todas estas aplicaciones, existe un creciente interés por encontrar y experimentar con nuevas especies de microalgas, con las que se puedan obtener productos nuevos y de mejor calidad. Además, se llevan a cabo cada vez más estudios para optimizar los procesos involucrados en el cultivo de las mismas a gran escala. Este tipo de estudios son de suma importancia, ya que al utilizar sistemas adecuados y con mayor productividad a

mayor escala, se podrá obtener grandes cantidades de biomasa y por lo tanto del producto de interés para abastecer la creciente demanda.

Por otra parte, las microalgas también constituyen uno de los organismos más importantes en el desarrollo de sistemas acuícolas. Éstas representan el mejor alimento vivo tanto para las primeras etapas larvales de organismos como moluscos, crustáceos y peces, como para el zooplancton del cual posteriormente estos se alimentan. Este importante papel que juegan las microalgas en la acuicultura, ha sido ampliamente estudiado. Sin embargo, hoy en día continúan las investigaciones para encontrar nuevas especies con altos valores nutricionales que permitan aportar mejoras en las dietas ya existentes; así como la experimentación e implementación de nuevos y diferentes sistemas de cultivo que lleven a una optimización de los procesos.

Estas investigaciones son de gran importancia, tomando en cuenta la necesidad que se tiene hoy en día de alimentar a una población humana mundial en crecimiento. La acuicultura puede ayudar a disminuir la presión que se ejerce sobre los mares y, por ende, sobre especies cada vez menos disponibles por causas de contaminación, sobrepesca, explotación y cambio climático.

Esta posibilidad de investigar sobre nuevos sistemas y condiciones de cultivo, amplía las opciones de producir altos volúmenes de biomasa para un suministro constante a los centros e industrias de más demanda. Además, permite buscar la reducción en los costos de producción, procurando altos rendimientos y un crecimiento productivo de las microalgas, las cuales muestren las mejores características morfológicas, nutricionales y bioquímicas del mercado.

Ahora bien, cultivar microalgas a escala de laboratorio, bajo condiciones controladas y con resultados satisfactorios, puede ser un reto posible de alcanzar. Sin embargo, llevar esta producción a mayor escala, hace necesario salirse del laboratorio para obtener una mayor cantidad de biomasa, pero con un mismo rendimiento. Lo anterior comprende un reto aún mayor ya que, como se mencionó anteriormente, es necesario buscar un alto rendimiento de biomasa, pero tratando de que los costos sean bajos.

Es por esta razón, que el propósito de esta investigación fue utilizar una diatomea aislada de la zona de Baja California Sur, para establecer su cultivo en un sistema abierto ubicado en condiciones al exterior en columnas de 80 L, con el fin de determinar la conveniencia de su cultivo y la factibilidad del sistema para el escalamiento. Para esto se cultivó la microalga en un medio de cultivo basado en un fertilizante, ya que éste resulta más barato que el uso de un medio de cultivo de grado analítico. También se evaluó la composición bioquímica de la diatomea en el sistema, así como la productividad de la biomasa, el contenido de proteínas, carbohidratos, lípidos totales, pigmentos y ácidos grasos.

En adición a lo anterior, de acuerdo con los resultados de la investigación, se brindaron recomendaciones para un posible uso de la diatomea como alimento o suplemento en la acuicultura, y para ello se tomó en cuenta aspectos como el tamaño de la célula, valor nutricional, tasas de crecimiento y composición bioquímica.

Además, cabe recalcar la importancia de este tipo de investigaciones para Baja California Sur, ya que es una zona con una alta riqueza en especies de flora y fauna marina, de las cuales se pueden obtener múltiples beneficios en investigaciones biotecnológicas. También, es una región en la que son de gran importancia a nivel económico y social, las actividades de acuicultura y específicamente de maricultura.

1.3 Planteamiento del problema

¿Cuál es la morfología, composición bioquímica y productividad de la diatomea *Nanofrustulum shiloi* cultivada bajo un sistema de producción abierto de 80 L?

1.4 Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Establecer los parámetros de crecimiento, la composición bioquímica y características morfológicas de *Nanofrustulum shiloi*, cultivada bajo un sistema de producción abierto para su posible utilización como alimento en la acuicultura.

1.4.2. Objetivos específicos

1. Determinar la productividad y tasa de crecimiento de la especie cultivada en el sistema abierto de 80 L en condiciones externas, utilizando parámetros físico-químicos definidos.

2. Determinar la composición bioquímica, el contenido de pigmentos y características morfológicas de la cepa.
3. Evaluar la factibilidad técnica y conveniencia de producción masiva de la especie de microalga nativa, para su posible uso como alimento en la acuicultura.

2. Marco teórico

2.1. Características generales de las microalgas

Las microalgas son microorganismos eucariotas que realizan fotosíntesis, es decir, utilizan la energía solar para generar energía química y materia orgánica (carbohidratos) a partir de moléculas inorgánicas como el dióxido de carbono (CO₂), agua y sales solubles. Poseen una alta capacidad fotosintética, lo que les confiere eficiencia para convertir la energía solar en biomasa, es decir, altas tasas de producción. Los procesos evolutivos han permitido a estos organismos distribuirse prácticamente en todo el mundo, adaptándose a variedad de condiciones ambientales, por lo que se les localiza en cualquier medio acuático, marino o dulceacuícola, lagos hipersalinos, alcalinos, ácidos y con altas temperaturas, suelos desérticos, hielos y en general donde exista una fuente de carbono y nutrientes como nitrógeno y fósforo, intensidad luminosa y temperaturas desde muy frías hasta templadas y tropicales (Jiménez Varela, 2016).

Las microalgas cumplen funciones importantes en los ecosistemas acuáticos, ya que forman parte del fitoplancton, primer eslabón en la cadena alimenticia, por lo tanto, representan el inicio del flujo energético en el ecosistema. Además, juegan un papel relevante en el balance del oxígeno y dióxido de carbono a nivel global, debido a su alta eficiencia fotosintética (Hernández Reyes et al., 2012).

El fitoplancton se ubica principalmente en suspensión en la columna de agua, especialmente en la zona fótica. Sin embargo, también pueden encontrarse especies que se desarrollan sobre sedimentos suaves o sobre el fango (epipélicas), sobre rocas (epilíticas), sobre cuerpos de animales (epizoicas) y sobre plantas u otro vegetal (epífitas). Además del fitoplancton, las microalgas también pueden clasificarse en el grupo de fitobentos, el cual incluye a aquellas asociadas al piso o fondo marino. Por otra parte, el fitoplancton puede

clasificarse de acuerdo con su tamaño en picoplancton (0.2-2 μm), nanoplancton (2-20 μm) y microplancton (>20 μm). En los ambientes marinos, principalmente en aguas oceánicas, el nanoplancton representa el productor primario de mayor importancia (Moreno et al., 2012; Navarro-Vargas et al., 2014; Osorio et al., 2014; López-Fuerte et al., 2015; Ruiz, 2016).

La productividad primaria por parte de microalgas se ve afectada por factores como la concentración y fuente de nutrientes, la intensidad, la calidad, la disponibilidad y la orientación de la luz, el pH, la salinidad, la presencia de depredadores, la temperatura y las concentraciones de oxígeno y dióxido de carbono. Sin embargo, el factor limitante es principalmente la luz, por lo que las microalgas deben distribuirse en la zona fótica, la cual posee una profundidad determinada por diferentes condiciones como la absorción atmosférica de la luz, la transparencia del agua, y el ángulo entre el sol y la superficie del mar. Además, se pueden crear complejos patrones de productividad primaria que varían de manera estacional y de acuerdo a la ubicación geográfica, debido a los efectos del pastoreo (predación) y la disponibilidad de luz y nutrientes (Hernández-Pérez & Labbé, 2014).

Los nutrientes necesarios para que se lleven a cabo los procesos vitales en los productores primarios, varía dependiendo de cada especie; sin embargo, estos utilizan la materia orgánica presente en el medio, ya que contiene trazas de vitaminas y elementos como carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O), nitrógeno (N) y fósforo (P). Adicional a estos elementos (macronutrientes), son necesarios también los micronutrientes, dentro de los cuales se encuentran el hierro (Fe), cobre (Cu), zinc (Zn), cobalto (Co) y manganeso (Mn) (Ortiz-Moreno et al., 2012).

En cuanto a la clasificación taxonómica, se han reconocido los siguientes filo de microalgas: Rhodophyta (algas rojas), Cyanophyta (cianobacterias), Pyrrophyta (dinoflagelados), Euglenophyta, Cryptophyta, Xanthophyta, Raphidophyta, Chrysophyta, Chlorophyta (algas verdes), Eustigmatophyta, Tribophyta, Phaeophyta, Prasinophyta, Glaucophyta y Bacillariophyta (diatomeas) (Volkman, 2016).

Aspectos como la forma, el tamaño, color y capacidad mótil, así como las formas, presencia y localización de estructuras celulares como flagelos, pared celular, núcleo y cloroplastos, dependen del grupo taxonómico al que pertenezca la microalga. En general,

puede encontrarse de diferentes colores dependiendo del tipo de pigmento que presenten. Además, se pueden diferenciar según su morfología como microalgas filamentosas o cocoides. Dentro de las cocoides, pueden encontrarse microalgas como células individuales o en agregaciones de células unicelulares, en colonias regulares o irregulares y en condiciones pseudofilamentosas o pseudoparenquimatosas. Por otro lado, las formas filamentosas pueden encontrarse como filamentos simples o ramificados. Además, es posible encontrar células especializadas formando parte de estos filamentos, como los heterocistos y acinetos, los cuales sirven para la fijación de nitrógeno y para la supervivencia, respectivamente (Bux, 2013).

2.2. Generalidades de las diatomeas

Un grupo particularmente importante dentro de las microalgas son las diatomeas, las cuales se encuentran dentro de la clase Bacillariophyceae y comprenden el grupo más común dentro del fitoplancton tanto en ambientes marinos como de agua dulce. Una de las principales características que distinguen a las diatomeas es la presencia de partículas de sílice en su pared celular (frústula), el cual obtienen de su capacidad para metabolizar sílice del ambiente. Esta pared permite que las diatomeas se conserven en buenas condiciones a través del tiempo, por lo que son utilizadas como modelos en la investigación fósil. La evidencia sugiere que las diatomeas se originaron antes o durante el período Jurásico temprano. Se cree que surgieron de la endosimbiosis entre una alga roja y una célula hospedera heterótrofa y eucariota (Seckbach & Kociolek, 2011; Bux, 2013).

Las diatomeas han sido subdivididas en dos grandes grupos de acuerdo a su simetría: las Centrales, que poseen simetría de tipo radial, y las Pennales, con simetría bilateral (Townley, 2011). Además, pueden presentar morfologías unicelulares o pseudofilamentosas agregadas en colonias. En los ambientes acuáticos, las diatomeas vivas se pueden distinguir por el color marrón pardo o café oscuro de las colonias, debido al carotenoide de la familia de las xantofilas (fucoxantina) que contienen (Seckbach & Kociolek, 2011).

Por otra parte, la pared de sílice de las diatomeas o frústula, posee ornamentaciones que cumplen diferentes funciones y son utilizadas como herramienta para la clasificación taxonómica. Esta estructura también provee de rutas para la toma de nutrientes, intercambio gaseoso y la secreción de productos celulares, constituye una protección física para la célula

y ayuda en la captura de la luz. La frústula está formada por dos piezas o valvas llamadas epiteca (la de mayor tamaño) e hipoteca (la de menor tamaño), las cuales pueden tener forma circular, triangular o multiangular; y por las bandas que las unen, llamadas cíngulo. Estas pueden presentar marcas características que se distribuyen a través o sobre ella, como pequeñas elevaciones o depresiones en la superficie que forman estrías. También, poros o cámaras llamadas areolas, así como elongados engrosamientos formados por una mayor deposición de sílice. Algunas diatomeas poseen en sus valvas, una abertura o fisura a lo largo del eje longitudinal llamado rafe, el cual está asociado con la movilidad (Bux, 2013; Cox, 2011; Townley, 2011).

2.3. Aspectos a considerar en el cultivo de microalgas:

Hoy en día, tanto las diatomeas como el resto de microalgas, representan uno de los grupos más productivos y útiles para el ser humano. La ubicuidad característica les ha permitido a las microalgas desarrollar capacidades metabólicas extremadamente diversas con las cuales producen gran cantidad de biomoléculas como proteínas, lípidos, carbohidratos, pigmentos, vitaminas y minerales, así como compuestos de alto valor económico que son de interés para diferentes industrias. Estos compuestos, entre ellos ácidos grasos, enzimas, β -carotenos, flavonoides, ficobilinas, polisacáridos, tocoferol, astaxantina y otros pigmentos; son utilizados en la industria farmacológica, cosmética y alimenticia para consumo humano y animal (Hernández-Pérez & Labbé, 2014; Trentacoste et al., 2015).

Para el establecimiento de un cultivo a gran escala, primero se debe considerar el volumen y la concentración inicial de la suspensión de microalgas (o inóculo) a utilizarse. Este inóculo se debe obtener de un cultivo en pequeña escala preparado previamente, en el que se establecen las condiciones óptimas de crecimiento según la especie. Una vez en el sistema de cultivo de mayor volumen, se deben emplear concentraciones adecuadas del inóculo, que permitan que la microalga comience rápidamente a crecer exponencialmente, ya que concentraciones celulares muy bajas se ven afectadas por procesos como la fotoinhibición (Das et al., 2015).

Posteriormente, se debe considerar la cantidad y rangos adecuados de cada uno de los factores que influyen sobre el crecimiento de las células. Uno de los factores fundamentales es la luz, ya que, si se proporcionan altas intensidades de luz, se puede provocar la

fotoinhibición de las células, y por el contrario bajas intensidades pueden retrasar el crecimiento. Se pueden obtener diferentes rendimientos y tasas de crecimiento, estableciendo y variando ciclos de luz/oscuridad en los sistemas de cultivo, así como iluminación continua e iluminación circadiana, fuentes y espectros de luz (Sánchez-Saavedra & Voltolina, 2006; Hernández-Pérez & Labbé, 2014).

La temperatura es otro factor por considerar, el cual depende de la especie a cultivar. Aquellas microalgas procedentes de zonas templadas, crecerán en un rango de 18 y 21 °C, y las especies tropicales lo harán entre los 25 y 35 °C. Este factor puede influir no solamente en la fotosíntesis, sino que también en la productividad de la biomasa, rutas y actividades metabólicas y por ende en la composición bioquímica de la microalga, principalmente sobre el contenido de lípidos, proteínas y carbohidratos (García-Romeral et al., 2017; Lan et al., 2015).

Por otra parte, otros de los factores a considerar en el cultivo son el pH y la salinidad. El pH determina la disponibilidad de CO₂ y los minerales en el medio e influye en los procesos metabólicos de las microalgas. El valor de pH a establecerse en el cultivo depende de cada especie, sin embargo, la mayoría de las microalgas utilizadas en la acuicultura crecen a un pH menor a 8. Sumado a lo anterior, la salinidad también juega un papel muy importante. Las microalgas marinas presentan rangos de tolerancia amplios, lo que les permite soportar cambios al regular su presión osmótica, acumulando diferentes metabolitos (García Cubero, 2014).

Asimismo, los requerimientos nutricionales de los cultivos de microalgas, comprenden macronutrientes como nitrógeno y fósforo, micronutrientes y vitaminas. Existen formulaciones o recetas para preparar cada uno de los diferentes tipos de medios de cultivo comerciales y su utilización dependerá de los requerimientos de cada especie. Entre estos medios se encuentra el medio Walne (Walne, 1970) y el Guillard F/2 (Guillard, 1975), el cual es uno de los medios más ampliamente utilizados en el cultivo de microalgas, ya que contiene todos los elementos necesarios para el crecimiento de las mismas. En el caso del cultivo de diatomeas, es necesario tener en cuenta que se deben adicionar silicatos en caso de que el medio de cultivo no los contenga, o bien, aumentar la concentración, ya que son

indispensables para la formación de la pared celular (Faé Neto et al., 2018; Malakootian et al., 2015; Mooij et al., 2016).

Sin embargo, para la elaboración de estos medios de cultivo se necesitan reactivos de grado analítico, lo que resulta altamente costoso en el caso de que se desee establecer algún cultivo a gran escala. Una opción más rentable e igualmente eficiente es emplear fertilizantes de tipo acuícola o agrícola en cultivos de grandes volúmenes. Se ha demostrado que el uso de fertilizantes para el aporte de nutrientes permite obtener crecimientos, biomasa y composición bioquímica de igual forma que con medios completos (por ejemplo el Guillard), y a reducidos costos de producción (Fernández-Linares et al., 2017).

Es importante considerar que, una vez establecido el cultivo, se debe suministrar una fuente de aireación que permita una suficiente agitación del medio. Esta agitación permite una exposición más uniforme de las células a la luz y evita la deposición de las mismas en el fondo, también evita la fotooxidación al desplazar el oxígeno (O_2) que se produce (Gupta et al., 2015).

En todo el proceso de un cultivo de microalgas, es indispensable llevar un registro no solamente de las condiciones físicas y químicas que presenta el cultivo a lo largo del tiempo, sino también de la cantidad de biomasa presente. Esta biomasa o concentración de microalgas, es definida como el número de células individuales por unidad de volumen, y es calculado mediante recuentos celulares al microscopio, lo que permite observar cualquier incremento o disminución. Estos cambios en la concentración conllevan a su vez, cambios en el aprovechamiento de los nutrientes y en la síntesis de productos celulares (Barsanti & Gualtieri, 2014).

En cuanto a la concentración celular, en los cultivos discontinuos o cerrados, en los que los nutrientes suministrados son limitados, el crecimiento de las microalgas se divide en cuatro fases: latencia, crecimiento exponencial, fase estacionaria y muerte. En la fase de latencia no existe un importante incremento del número de células, ya que la microalga se está adaptando a las nuevas condiciones del medio. En la fase exponencial, se produce un incremento de la división celular debido a la asimilación de los nutrientes. Durante la parte final de esta fase disminuye la concentración de nutrientes y la edad del cultivo alcanza su

valor máximo. En la fase estacionaria existe un equilibrio entre el factor limitante y la velocidad de crecimiento, y la concentración celular se mantiene constante. En la fase de muerte la concentración celular disminuye producto de la completa limitación de nutrientes en el medio (Tebbani et al., 2014; García-Romeral et al., 2017).

Las diferentes fases son una representación de la respuesta de la microalga a las condiciones que presenta el medio en el que se encuentra. Estas fases son observadas en una curva de crecimiento, la cual representa gráficamente las concentraciones celulares conforme pasa el tiempo. Sin embargo, es posible que en algunos casos no se logre distinguir entre cada una de las fases, dependiendo de las condiciones del cultivo. A partir de estas curvas, es posible calcular la tasa de crecimiento y tiempo de generación de la población de microalgas, el cual es expresado como el número de duplicaciones por unidad de tiempo, cálculos que además permiten determinar la productividad del cultivo (Barsanti & Gualtieri, 2014).

En adición a la medida de la concentración celular para determinar los cambios en la biomasa y en la productividad, se debe medir la composición bioquímica en cada una de las fases del crecimiento de la microalga. La determinación del contenido de proteínas, pigmentos, lípidos y carbohidratos puede llevarse a cabo por métodos espectrofotométricos, colorimétricos, espectrometría de masas, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por su abreviación en inglés) y por métodos tradicionales utilizando reactivos y procedimientos analíticos (Pacheco et al., 2010; Martínez-Córdova et al., 2012).

2.4. Tipos de sistemas de cultivo para microalgas

Existen tres regímenes para establecer cultivos tanto de microalgas como de otros microorganismos: los cultivos discontinuos, semicontinuos y continuos. Los cultivos discontinuos se caracterizan porque durante el proceso de operación, se añade el sustrato al medio inicial y se extraen productos hasta el final del proceso. Son cerrados, con una única entrada para los gases. En él, las células se reproducen hasta que se agota alguno de los nutrientes, por lo que conforme crece el microorganismo, la concentración de nutrientes disminuye. En el cultivo continuo, el sustrato se adiciona de forma continua y de la misma manera se extrae el producto, por lo que el volumen del cultivo, la concentración del sustrato y los microorganismos se mantienen constantes. Por otra parte, el cultivo semicontinuo, a diferencia del continuo es que una parte del cultivo se extrae y se reemplaza por medio fresco,

cada cierto tiempo. De modo que la producción es continua pero la concentración de sustrato y de microorganismos no se muestra constante (Martínez-Macías et al., 2018; Paladino & Neviani, 2020).

Los cultivos pueden establecerse en sistemas abiertos o cerrados. Los abiertos son aquellos en los que las microalgas se encuentran en contacto con la atmósfera. Existen diferentes formatos y tamaños de sistemas abiertos, y pueden tener fuentes de agitación o carecer de ellos. Algunos de estos sistemas son las grandes lagunas abiertas (“open ponds”), las lagunas circulares con brazo rotatorio (“circular ponds”), las lagunas en circuito de alto flujo (“raceways ponds”) y también los tanques semejantes a los utilizados en la crianza de peces. Los sistemas de cultivo abierto tienen algunas desventajas, entre las cuales se incluyen los problemas de contaminación y la baja productividad, la cual generalmente está ligada a las variaciones en los factores físico-químicos debido a las condiciones climáticas del lugar (Niizawa, 2015).

Los sistemas cerrados son aquellos en los que el cultivo se encuentra aislado del medio exterior. Estos no permiten el intercambio de gases o contaminantes entre el cultivo y la atmósfera. En ellos se pueden controlar los parámetros físico-químicos de crecimiento, permitiendo suministrar concentraciones iniciales conocidas y detectar cualquier cambio en el tiempo. Además, evitan procesos de evaporación, disminuyen el uso del agua y permiten obtener altas concentraciones celulares y una elevada productividad (Barsanti & Gualtieri, 2014).

Existen diferentes tipos de biorreactores cerrados que se utilizan en el cultivo de microalgas, variando en formas y tamaños, por ejemplo, paneles en forma aplastada, en serpentinas, cilíndricos o espirales. La elección del tipo más adecuado dependerá, entre muchos otros factores, de la finalidad del cultivo, el volumen que se desee alcanzar, el presupuesto con el que se cuente, las necesidades en cuanto a parámetros de crecimiento que requiera la especie y la productividad por unidad de volumen que se desee (Granata, 2017; Podola et al., 2017).

2.5. Ventajas y desventajas del cultivo de microalgas

En general, el cultivo de microalgas puede presentar diferentes ventajas y desventajas para los productores. Entre las principales ventajas se encuentran los altos rendimientos que poseen las microalgas, lo que permite la generación de grandes cantidades de biomasa de alta calidad y pureza. También, es posible modificar fácilmente la composición bioquímica e incluso establecer ciertas condiciones en el cultivo para que las microalgas acumulen elevadas concentraciones de compuestos de interés comercial. Además, gran cantidad de especies se pueden cultivar en aguas hipersalinas, lo que permite utilizar zonas que no son aprovechadas para otros fines y que reciben alta radiación solar como las zonas semiáridas y oceánicas (Das et al., 2015; Maeda et al., 2018).

Por otra parte, entre las desventajas se encuentra el alto costo de producción que representan algunos sistemas de cultivo a gran escala, principalmente aquellos en los que se utilizan biorreactores. Además, el uso de otros sistemas como las lagunas, también puede presentar desventajas como el requerimiento de grandes áreas de terreno y costosa recuperación del producto. Sin embargo, existen maneras de optimizar la producción, utilizando métodos que procuran un mayor aprovechamiento de los recursos. Uno de ellos es el uso integrado y consecutivo de varios sistemas de cultivo, por ejemplo, el empleo conjunto de lagunas abiertas y fotobiorreactores. Esta combinación se conoce como sistema de cultivo híbrido, y permite en algunas ocasiones obtener mayor productividad tanto en biomasa como en algún compuesto específico de interés (Castellanos et al., 2020; Kamyab et al., 2015; Pires et al., 2017).

2.6. Potencial de las microalgas y su aplicación en diversas industrias

Los cultivos híbridos y demás sistemas son empleados para la generación productiva de biomoléculas y compuestos químicos derivados de las microalgas, los cuales son usados en la producción de biodiesel, biomonitoreo, pigmentos, biofertilizantes, suplementos alimenticios, cosméticos y se pueden utilizar en el tratamiento de aguas residuales. Además, las diatomeas, por su parte, pueden ser utilizadas como organismos bioindicadores de la calidad del agua, ya que tienen la capacidad de responder a los cambios ambientales que se han dado en un corto o largo plazo en un determinado lugar (Seckbach & Kociolek, 2011).

En el caso de la producción de biodiesel, el uso de microalgas provee de mayores beneficios en comparación con otras materias primas. Entre estos beneficios se encuentra la alta producción de aceites, mayores eficiencias fotosintéticas en comparación con las plantas terrestres, mayor producción de biomasa debido a su rápido crecimiento, diversidad de sistemas de cultivo y además se pueden emplear efluentes industriales tanto líquidos como gaseosos para la obtención de nutrientes y CO₂ necesarios para el cultivo (Malakootian et al., 2015).

Por otra parte, en cuanto a la producción de pigmentos, las microalgas han sido utilizadas debido su metabolismo que permite altos rendimientos y producción de pigmentos de alta calidad. Algunos de los más producidos son los carotenoides, entre ellos β -caroteno, luteína y astaxantina. Estos y otros pigmentos se utilizan en la prevención de enfermedades en humanos, también como colorantes, antioxidantes, suplementos alimenticios y en la industria de peces ornamentales (Trentacoste et al., 2015; Varela et al., 2015).

Por otro lado, algunas microalgas presentan actividad antibacteriana, antifúngica, antitumoral e inmunoreguladora. También, son utilizadas para la generación de productos como aminoácidos, enzimas, fitol, polisacáridos, glicerol, ceras, biosurfactantes, fosfolípidos, promotores de crecimiento para procesos de fermentación, prostaglandinas y ácidos grasos esenciales. Además, en cuanto a la industria alimentaria, las microalgas son utilizadas para consumo humano y animal, ya que representan una excelente fuente de proteína, grasas, carbohidratos y vitaminas (Rendón-Castrillón et al., 2013).

Estos organismos también se utilizan en procesos de biorremediación, principalmente en el tratamiento de aguas residuales. Poseen la capacidad de remover concentraciones altas de nitrógeno y fósforo, así como metales pesados. Además pueden acelerar la inactivación de bacterias patógenas (Fernández-Linares et al., 2017; Paladino & Neviani, 2020).

2.7. El papel de las microalgas en la acuicultura

Una de las industrias con mayor demanda de microalgas es la industria acuícola. A nivel mundial, estos organismos desempeñan un papel sumamente importante ya que se constituyen como parte relevante del alimento vivo que se les suministra a todas las fases del desarrollo de moluscos bivalvos, gasterópodos, etapas larvarias de crustáceos y peces, y a los

cultivos de presas vivas como rotíferos y *Artemia*. Se emplean microalgas pertenecientes a diferentes filo; algunos de los géneros y especies más utilizados son: *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros* sp, *Chaetoceros calcitrans*, *Phaeodactylum* sp, *Thalassiospira* sp, *Nitzschia* sp, *Chlorella* sp, *Chlorella minutissima*, *Nannochloris oculata*, *Rhodomonas baltica*, *Tetraselmis chuii*, *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis* sp, *Nannochloropsis oculata*, *Nannochloropsis gaditana*, *Pavlova* sp, *Cryptomonas* sp, *Spirulina* sp, *Scenedesmus*, *Dunaliella*, *Chlamydomonas* sp. (Ansari et al., 2017; Santos-Ballardo et al., 2015).

Entre las características que las hacen importantes está su tamaño, reproducción, la cual permite rápidas tasas de duplicación de las poblaciones; la capacidad para adaptarse a diferentes hábitats y condiciones, y la plasticidad metabólica, que permite manejar a conveniencia la maquinaria celular para obtener mayor cantidad de compuestos de interés, principalmente lípidos y carbohidratos. En el proceso de elección de microalgas para utilizarlas como alimento de alta calidad, se deben tomar en cuenta aspectos como la digestibilidad de la pared celular, el tamaño, el cual debe oscilar entre 1 y 20 μm , y el valor nutricional (Roy & Pal, 2015; Shah et al., 2018).

En ocasiones, los investigadores contemplan solamente algunos de los aspectos mencionados para seleccionar microalgas con potencial acuícola. Tal es el caso de la investigación realizada por Rodríguez-Núñez et al. (2016), en la cual se aislaron diatomeas pertenecientes a los géneros *Nitzschia* y *Chaetoceros*, del Pacífico de Costa Rica. En ésta se utilizó como único criterio el tamaño celular para escoger aquellas con potencial acuícola, de modo que las que presentaron un tamaño apropiado, similar a los utilizados en los centros de acuicultura del país, así como características morfológicas adecuadas, fueron consideradas como opciones para utilizarse en los centros de cultivo de Centroamérica.

En cuanto a la digestibilidad, esta depende mucho de la composición de la pared celular. Por ejemplo, en la mayoría de las especies de la clase Chlorophyceae, la pared es rígida y está compuesta por celulosa, lo que hace difícil su digestión en animales monogástricos. Este problema se debe solucionar sometiendo a la microalga a un tratamiento previo para la disrupción de su pared, en el que se logre la exposición de las proteínas celulares a la acción de las enzimas proteolíticas, facilitando así la digestibilidad (Ahmad et al., 2020).

Por otra parte, el valor nutricional depende de los porcentajes de las principales biomoléculas como proteínas, carbohidratos y lípidos. En la literatura se pueden encontrar recomendaciones sobre las diferentes proporciones de estas biomoléculas que se deben emplear. Generalmente se admiten valores de proteína de entre un 30 y un 50% del peso seco de la microalga, lípidos entre un 7 y un 23% y los carbohidratos entre 5 y 23%. Además, es importante considerar el perfil lipídico para determinar el valor nutricional, principalmente porque en el cultivo de larvas y el enriquecimiento de sus presas, son necesarios los ácidos grasos poliinsaturados. Entre estos se ha evidenciado la relevancia de los ácidos grasos eicosapentanoico, docosahexanoico y araquidónico (Cruz, 2019; Guedes et al., 2015; Jiménez Varela, 2016; Shah et al., 2018).

Las microalgas se pueden proporcionar de dos maneras a los organismos en cultivo: de manera directa en los tanques de cultivo de cría, donde pueden ser ingeridas directamente por las larvas al inicio de la alimentación y estimular los procesos intestinales; o pueden utilizarse para el cultivo o enriquecimiento de rotíferos y *Artemia*. En relación a lo anterior, cabe recalcar que la producción y composición nutricional de las presas, está relacionada con el alimento que consumen (Kaparapu, 2018; Sirakov et al., 2015).

Además, las microalgas se pueden suministrar en otras formas, entre ellas en suspensiones, en forma de pasta concentrada de células o como polvo liofilizado. Muchas veces la adición de microalgas a los tanques de cultivo, no se realiza con la finalidad de alimentar directamente a las larvas, ya que estas no viven exclusivamente de esta dieta. Este suministro puede realizarse con el objetivo de mejorar la supervivencia y crecimiento de las especies, mejorar la calidad del agua, la distribución de la iluminación, así como aumentar la calidad y cantidad de presas vivas. También estimula procesos fisiológicos relacionados con la ingestión de las presas y actúa como agente antibacteriano, regulando el crecimiento bacteriano de tipo oportunista (Falaise et al., 2016; Han et al., 2019).

2.8. Taxonomía, morfología y distribución de *Nanofrustulum shiloi*

Nanofrustulum shiloi es una diatomea bentónica perteneciente a la familia Staurosiraceae. Inicialmente fue clasificada por Lee et al., (1980) como *Fragilaria shiloi*, sin embargo, posteriormente Round et al. (1999) describieron un nuevo género que reunía

características de los géneros *Fragilaria* y *Pseudostaurosira*, situando a ésta diatomea dentro del género *Nanofrustulum* (Cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de la diatomea empleada.

Dominio: Eukaryota
Phylum: Bacillariophyta
Subphylum: Bacillariophytina
Clase: Bacillariophyceae
Subclase: Fragilariophycidae
Orden: Fragilariales
Familia: Staurosiraceae
Género: <i>Nanofrustulum</i>
Especie: <i>shiloi</i>

Fuente: AlgaeBase (Guiry, 2018).

En cuanto a las características morfológicas, *Nanofrustulum shiloi* posee células de entre 2 y 6 μm , con frústulas rectangulares las cuales forman cadenas unidas mediante espinas marginales entrecruzadas (Figura 1). Sus valvas pueden ser circulares o subcirculares y planas o ligeramente curvadas. Posee estrías formadas por areolas dispuestas de manera radial y espinas marginales colocadas a lo largo de la unión entre la valva y el manto, las cuales pueden ser de forma, grosor y longitud variable. Además, se han encontrado diversas variaciones morfológicas en un mismo cultivo de *Nanofrustulum shiloi*, por lo que se ha catalogado como una especie polimórfica (Sar & Sunesen, 2003).



Figura 1. Células vivas de *Nanofrustulum shiloi* observadas a 40 X en el microscopio óptico Carl Zeiss Primo Star del CIBNOR (para tomar la fotografía se realizó zoom manual).

En cuanto a la distribución, esta diatomea ha sido aislada de múltiples lugares de zonas templadas, tropicales y subtropicales, en aguas saladas y salobres, por lo que se considera como una especie cosmopolita. Además, se ha catalogado como especie eurioica y eurihalina. También, se ha encontrado en muestras de sedimentos, formando asociaciones simbióticas con foraminíferos y en la columna de agua, ya que debido a su pequeño tamaño puede permanecer en suspensión por largos periodos (Sabbe et al., 2003; Lee, 2011; López-Fuerte et al., 2016).

3. Marco Metodológico

3.1. Objeto de estudio

Se trabajó con una cepa de la diatomea *Nanofrustulum shiloi* (Lee, Reimer & McEnery) Round, Hallsteinsen & Paasche (Cuadro 1), proveniente de la Colección de Microalgas del CIBNOR (clave: CIB 24), la cual se mantenía en medio de cultivo F/2 (Guillard, 1975) suplementado con silicatos. Esta diatomea fue colectada en octubre de 2009 en Bahía Balandra, ubicada en el Golfo de California, en la Bahía de la Paz, Baja California Sur (24°19'8.86"N, 110°19'41.30"O).

3.2. Sitio de estudio

La investigación se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) (24° 8'5.65" N, 110°25'36.78" O), ubicado en La Paz, Baja California Sur, México; durante los meses de febrero a julio de 2018.

Baja California Sur se ubica abarcando la mitad Sur de la Península de Baja California, limitando al Norte con el estado de Baja California, al Este con el Mar de Cortés y al Sur y Oeste con el Océano Pacífico (Gobierno del Estado de Baja California Sur, 2015). La zona presenta un clima seco desértico en las partes bajas, con una temperatura máxima que sobrepasa los 40 °C en verano y una mínima menor a 0°C en invierno (Troyo Diéguez et al., 2008).

3.3. Caracterización morfológica mediante generación de imágenes de la cepa por microscopia electrónica de barrido y microscopia confocal

Con el fin de oxidar la materia orgánica presente dentro y fuera de las frústulas, se realizó un tratamiento a las muestras previo a la generación de imágenes mediante microscopia electrónica de barrido. Para esto, se colocó en un tubo de cristal 1 mL del cultivo de *Nanofrustulum shiloi*, 0.5 mL de etanol (CH₃CH₂OH) y 1.5 mL de ácido nítrico (HNO₃), luego se agitó y se le puso una tapa semiajustada. El tubo se mantuvo en una gradilla y al sol por aproximadamente 15 min para calentar la muestra. Posteriormente se centrifugó a 2500 rpm por 10 min, se decantó el sobrenadante, se agregó agua destilada y se midió el pH. Estos lavados se realizaron aproximadamente 4 veces hasta que se obtuvo un pH de 6.

De esta muestra ya tratada, se tomó una gota, se colocó en un cubreobjetos, y se secó en una plantilla calentadora. Posteriormente, la muestra se recubrió con iones de oro, utilizando el evaporador de metales Sputter Coater, modelo Desk II. Las imágenes se realizaron en un Microscopio Electrónico de Barrido modelo Hitachi S-3000N, con un detector de electrones secundarios. Por otro lado, también se generaron imágenes en microscopia confocal, mediante un Microscopio Confocal Leica DMi8, para lo cual no se realizó ninguna preparación previa de la muestra.

3.4. Condiciones de cultivo en laboratorio y curva de crecimiento

El establecimiento del cultivo en condiciones controladas se llevó a cabo en las Cámaras de cultivo N° 1 y 2 del Laboratorio de Microalgas, ubicado en el edificio Z del CIBNOR. Se partió de un cultivo unialgal de la cepa, el cual se sembró previamente en un medio de cultivo elaborado con el fertilizante agrícola Fertiplus® y silicatos. El fertilizante fue diluido para igualar su concentración de nitrógeno a la del medio F/2 (Guillard, 1975), la cual fue de 882.35 μM (Cuadro 2). Los silicatos se prepararon con 30 g L^{-1} de metasilicato de sodio pentahidratado ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$). Se agregó 1 mL L^{-1} tanto del fertilizante como de los silicatos al cultivo.

Cuadro 2. Comparación de la composición del fertilizante agrícola utilizado y la del medio de cultivo F/2 (Guillard, 1975).

Compuesto	Fertiplus® (μM)	F/2 (μM)
Nitrógeno T	882.35	882.35
P2O5	98.15	36.23
K2O	253.45	-
B	0.31	-
Cu	0.03	40.08
Fe	0.18	1164.51
Zn	0.05	76.66
S	69.33	40.08
Ca	8.05	-
Mn	2.32	50.51
Mg	6.01	-
Vitaminas, Mo, Co	-	✓

Fuente: Laboratorio de Biotecnología de Microalgas, CIBNOR.

Posteriormente, este cultivo se resembró en dos matraces erlenmeyers de 1 L, utilizando un 25% de inóculo y un volumen final de 0.8 L, por lo tanto, se agregó 0.2 L de cultivo y 0.6 L de agua de mar estéril con una salinidad de 35 unidades prácticas de salinidad (UPS). Además, se les adicionó 1 mL L^{-1} del fertilizante y los silicatos. Estos matraces erlenmeyers se colocaron en condiciones controladas por 7 días a una temperatura de 25 ± 2 °C, aireación continua, fotoperiodo luz:oscuridad 12:12h, a una irradiancia incidente de $41.84 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la cual fue medida con un luxómetro marca Steren modelo HER-410.

Se determinó un tiempo de cultivo de 7 días, tomando como referencia la investigación realizada por el estudiante Diego Zapata en el Laboratorio de Biotecnología de

Microalgas del CIBNOR. En dicha investigación se trabajó con *Nanofrustulum shiloi* en condiciones controladas y se observó el inicio de la fase estacionaria en el día 7 (Arredondo-Vega, comunicación personal, 2018).

Luego, cumplidos los 7 días, cada uno de los dos cultivos fue resembrado por duplicado, para un total de 4 matraces erlenmeyers de 1L, los cuales se colocaron en las mismas condiciones anteriormente mencionadas, pero con una irradiancia incidente de $39.25 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Estos cultivos fueron empleados para elaborar la curva de crecimiento de la diatomea, para esto se tomó, en condiciones de esterilidad, una alícuota diaria de 30 mL del cultivo, de los cuales 25 mL se utilizaron para determinar el peso seco total y 5 mL para medir la densidad óptica (Arredondo-Vega et al., 2017a). A partir de los resultados de peso seco se determinaron los parámetros poblacionales, el rendimiento y la productividad del cultivo en condiciones de laboratorio.

3.5. Escalamiento al exterior

Se colocaron 2 matraces erlenmeyers de 2 L con un volumen de 1.2 L de agua de mar estéril a 35 UPS y 0.4 L de inóculo (25%), adicionado con 1 mL L^{-1} del fertilizante y silicatos. Estos cultivos se mantuvieron por 7 días en las siguientes condiciones: temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, aireación continua, fotoperiodo luz:oscuridad 12:12h, irradiancia incidente de $43.74 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Posteriormente, estos 2 matraces erlenmeyers se resembraron cada uno por duplicado y se colocaron en las mismas condiciones anteriormente mencionadas. Se colocaron dos sensores de temperatura e irradiancia marca HOBO Pendant® al exterior de los cultivos, para registrar dichas variables en esta y en las siguientes etapas del escalamiento.

Pasados los 7 días se llevó a cabo la resiembra de los cultivos en garrafones de plástico de 20 L. Este proceso se llevó a cabo en dos pasos, primero se utilizó un volumen inicial de 6.4 L de agua de mar, la cual se esterilizó con 1 mL L^{-1} de cloro comercial durante 24 h antes de su inoculación. Posteriormente, 30 min antes de la resiembra, el cloro fue neutralizado con 1 g de tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) por cada 20 mL de cloro añadido al agua de mar. Una vez neutralizado el cloro, se comprobó su ausencia en el agua mediante una prueba con el método colorimétrico con el reactivo ortotolidina. Luego se agregó al agua de mar 1 mL L^{-1} del fertilizante, así como de silicatos. Se utilizó el volumen total de cada uno de los 4 matraces erlenmeyers (1.6 L) para inocular los respectivos garrafones (11.42% respecto al

volumen final), los cuales se colocaron en las mismas condiciones ya mencionadas. El segundo paso de la etapa se realizó dos días después de la inoculación. En este se agregó a cada garrafón 6 L de agua de mar de igual manera esterilizada, adicionada con fertilizante y silicatos; para un volumen final de 14 L. Una vez alcanzado este volumen, los cultivos en garrafones se mantuvieron por 7 días.

Seguidamente, se estableció el cultivo en columnas (Figura 2), las cuales se colocaron también por 7 días expuestas a las condiciones ambientales en el Solario, ubicado en el edificio Z del CIBNOR. Para esto se utilizaron 4 columnas de policarbonato de 132 cm de alto, 30.5 cm de diámetro, 0.2 cm de espesor y con una capacidad de aproximadamente 100 L. Por cada columna se utilizaron 66 L de agua de mar, previamente esterilizada con cloro y neutralizada como se mencionó anteriormente, adicionada con 1 mL L⁻¹ del fertilizante y de silicatos. Además, los 14 L de cultivo de cada garrafón se utilizaron como inóculo para cada una de las columnas (17.5%), para un volumen total de 80 L. Cada columna se mantuvo con aireación constante y sus aberturas al exterior se cubrieron con una malla de tela.

Por otra parte, se colocó un sensor de temperatura e irradiancia HOBO Pendant® debidamente esterilizado en su exterior con etanol, en el interior de cada columna y dos al exterior de las mismas. Estos sensores se programaron para registrar datos cada hora durante los 7 días de cultivo. Además, se realizaron dos inyecciones diarias de CO₂ durante 40 segundos, a una presión interna de 49.78 libras por pulgada cuadrada (PSI por sus abreviaciones en inglés) y un flujo de 78.65 mL s⁻¹. Estas inyecciones se llevaron a cabo hasta el día 6, el día 7 se realizó la cosecha final. En adición a esto, antes y después de cada inyección, se registraron valores de pH, salinidad y oxígeno disuelto con el equipo de campo multiparámetros marca HANNA®, modelo HI9828.

La toma de muestras para los análisis bioquímicos se realizó en el día 0 y 7 del cultivo en columnas. En estos días, se tomó de cada columna 2.5 L, de los cuales 0.8 L se centrifugaron por 20 min a 1666 revoluciones por minuto (rpm) y a 5°C. La biomasa fresca obtenida se pesó y se guardó en tubos de cristal a -80°C para su posterior uso en la extracción y cuantificación de pigmentos. Además, 0.4 L fueron destinados para el análisis de proteínas, 0.4 L para el de carbohidratos y 0.8 L para lípidos totales y ácidos grasos. Estos volúmenes se centrifugaron en tubos de plástico de 50 mL por 5 min a 4000 rpm, a 10°C. La biomasa

fresca obtenida se lavó con 10 mL de formato de amonio (NH_4HCO_2) 0.5 M. Esta biomasa se pesó y se congeló a -20°C y se colocó en una liofilizadora marca Labconco® FreeZone 1 L. Una vez liofilizada, la biomasa se pesó y se guardó a -20°C hasta su análisis.

Por otra parte, de los 2.5 L de muestra, se tomaron 100 mL para la determinación del peso seco total (PST), orgánico (PSO) e inorgánico (PSI) (cenizas), y 15 mL para la densidad óptica. Estos volúmenes también se tomaron en el día 3 del cultivo en columna. Tanto el peso seco como la densidad óptica se emplearon para la determinación de parámetros poblacionales y para la elaboración de una curva de calibración para la estimación de la concentración de la biomasa microalgal.

En el día 7, además de tomar los 2.5 L de muestra para los análisis bioquímicos, se realizó también la cosecha final de las columnas. Para esto se quitó la aireación de los cultivos y se dejaron sedimentar. Seguidamente se separó la biomasa sedimentada del medio de cultivo por medio de sifoneos. Esta biomasa se centrifugó, se lavó con formato de amonio 0.5 M, se pesó, liofilizó y se guardó en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Además, a partir de los pesos de la biomasa liofilizada por columna en el día 0 y 7, se calculó el rendimiento del cultivo, el cual se expresó en mg L^{-1} ; y la productividad del mismo, calculado en $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$.



Figura 2. Sistema de cultivo en columnas verticales utilizado en el presente estudio.

3.6. Determinación de la densidad óptica

El volumen de cultivo seleccionado en matraces erlenmeyers y en columnas para esta medición, se agitó durante 1 minuto con un vórtex y se colocó en una celda de cuarzo de 10 mm. Posteriormente, se realizó un barrido espectral entre los 400-750 nm con un espectrofotómetro marca Hach®, modelo DR5000. Se utilizó agua de mar adicionada con el fertilizante y silicatos como blanco de reactivo. Se seleccionó una longitud de onda de 748 nm para elaborar la gráfica de las respectivas absorbancias vs el tiempo de cultivo.

3.7. Determinación de peso seco y contenido orgánico e inorgánico

Se utilizó el protocolo de Sorokin (1973) descrito en Arredondo-Vega et al., (2017c), en el cual se mencionan todas las fórmulas para los cálculos realizados en esta sección. Para llevar a cabo este procedimiento, se utilizaron filtros de fibra de vidrio Whatman® GF/F de 1.2 µm, los cuales previamente se lavaron con agua destilada, se pre-quemaron a 490 °C por 6 h, luego se colocaron en la estufa a 65°C por 1 h y posteriormente en el desecador cerrado al vacío durante 1.5 h. Seguidamente se pesaron en una balanza analítica y se repitió el procedimiento (estufa-desecador-pesar en balanza analítica) hasta verificar que tuvieran un peso constante.

Por otra parte, los volúmenes de muestra tomados para este análisis, tanto en matraces erlenmeyers como en columnas, se homogenizaron y se filtraron al vacío. Las muestras filtradas se lavaron con formato de amonio 0.5 M (20 mL para las muestras de columnas y 10 mL para las de matraces erlenmeyers) para eliminar el exceso de sales y se filtraron nuevamente. Estos filtros se guardaron en sobres de papel aluminio y se colocaron en una estufa a una temperatura de 65°C por al menos 12 h.

Posteriormente los filtros se colocaron en un desecador cerrado al vacío durante 1.5 h, luego se pesaron, se colocaron de nuevo en la estufa y se repitió el proceso hasta que se obtuvo un peso constante de cada uno. Para calcular el peso seco total se utilizó la siguiente fórmula:

$$PST = (PSFM - PSF) / VF$$

Donde:

PST: peso seco total (mg L⁻¹)

PSFM: peso del filtro con muestra (mg)

PSF: peso seco del filtro sin muestra (mg)

VF: volumen de muestra filtrado (L)

Luego, los filtros con la biomasa seca y pesada se incineraron durante al menos 6 h, a 490°C en una mufla marca Terlab®, modelo TE-M120. Luego se colocaron en la estufa a 65°C por 1 h, en el desecador por 1.5 h y se pesaron. Se repitió este proceso hasta que se obtuvieron pesos constantes. Para obtener el peso inorgánico se utilizó la siguiente fórmula:

$$PSI = (PSC - PSF) / VF$$

Donde:

PSI: peso seco inorgánico (cenizas) (mg L⁻¹)

PSC: peso del filtro con la muestra incinerada (mg)

PSF: peso seco del filtro sin muestra (mg)

VF: volumen de muestra filtrado (L)

Además, se aplicó la siguiente fórmula para obtener el peso orgánico:

$$PSO = PST - PSI$$

Donde:

PSO: peso orgánico (mg L⁻¹)

PST: peso seco total (mg L⁻¹)

PSI: peso seco inorgánico (mg L⁻¹)

La determinación del PSI y el PSO se realizó únicamente a las muestras de las columnas de los días 0, 3 y 7.

Además, el porcentaje de cenizas se determinó de la siguiente manera:

$$\text{Cenizas (\%)} = ((PST - PSO) / PST) * 100$$

Donde:

PST: peso seco total (mg L⁻¹)

PSO: peso orgánico (mg L⁻¹)

3.8. Estimación de la concentración de biomasa microalgal

Se elaboró una gráfica y una correlación entre la densidad óptica (medida como absorbancia a 748 nm), y la concentración celular calculada mediante el peso seco, ambas mediciones realizadas en el cultivo en columnas. A partir de dicha correlación, se obtuvo la ecuación de la recta ($y = a + bx$), en donde:

$$y = \text{absorbancia a 748nm}$$

$$x = \text{concentración en mg L}^{-1}$$

Este método es útil ya que, al sustituir los valores de “a” y “b” y despejar el valor de “x”, es posible inferir el valor de la concentración celular a determinada densidad óptica, es decir:

$$\text{Concentración (mg L}^{-1}\text{)} = (A_{748} / b) - a$$

Por lo tanto, la densidad óptica se convierte en una medida indirecta de la concentración celular y el peso seco de la biomasa, de modo que, en investigaciones posteriores, se evitaría la toma diaria de muestras para determinar el peso seco.

3.9. Determinación de la cinética de crecimiento y los parámetros poblacionales

Se siguió el procedimiento restablecido por Arredondo-Vega et al, (2017a), así como las fórmulas recomendadas por los mismos autores. La curva de crecimiento de la diatomea se realizó utilizando los datos de peso seco y densidad óptica, ya que no fue posible hacer recuentos celulares debido a la forma en la que se aglomeraban las células.

De modo que se graficó tanto la concentración (mg L^{-1}), como la absorbancia a 748 nm obtenida cada día. Además, ambos datos se utilizaron para calcular la tasa de crecimiento (μ) y tiempo de generación (t_g) con las siguientes fórmulas:

$$\mu = (\ln X_2 - \ln X_1) / (T_2 - T_1)$$

Donde:

μ : tasa de crecimiento (d^{-1})

X: concentración de la biomasa (mg L^{-1}) o absorbancia a 748 nm en dos tiempos de la fase exponencial de crecimiento.

In: logaritmo natural de X.

T: tiempo en días

$$T_g = \ln 2 / \mu$$

Donde:

T_g : tiempo de generación (d)

$\ln 2$: 0.6931

μ : tasa de crecimiento (d^{-1})

3.10. Análisis bioquímicos

La determinación de la composición bioquímica se realizó a partir de las muestras obtenidas del día 0 y 7, del cultivo desarrollado fuera del laboratorio. A continuación, se detallan los procedimientos.

3.10.1. Cuantificación de proteínas totales

La determinación de proteínas se hizo mediante el método de Lowry (Lowry et al., 1951). Para llevar a cabo el procedimiento se tomaron entre 5 y 10 mg de la biomasa liofilizada y se depositaron en tubos de vidrio con tapones de rosca, limpios, previamente lavados con detergente libre de fosfatos (Micro 90), enjuagados con agua destilada y secados. Luego, para realizar la hidrólisis alcalina, se les añadió 5 mL de hidróxido de sodio (NaOH) 0.1N, se tapó la boca de los tubos con papel aluminio para evitar la evaporación y se colocaron en un termo-baño durante 1 h a 100 °C. Posteriormente se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se separó el extracto alcalino de la pastilla celular, el cual se depositó en otro tubo de vidrio limpio.

Por otra parte, se determinó el volumen del extracto alcalino a utilizar en la determinación de proteínas. Para su cálculo, se consideraron los siguientes aspectos: el contenido aproximado de proteínas de la diatomea en estudio (se utilizó un 20% según trabajos anteriores realizados por estudiantes en el mismo laboratorio), los mg exactos de biomasa en cada tubo y el punto medio de la concentración de la curva de calibración elaborada con albúmina de suero bovino (BSA, por sus abreviaciones en inglés), el cual fue de 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Se utilizó la curva de calibración elaborada previamente en el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas, empleando una solución concentrada de 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de BSA,

a partir de la cual se preparó un gradiente de concentración de 0 a 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 3) (Arredondo-Vega et al., 2017d).

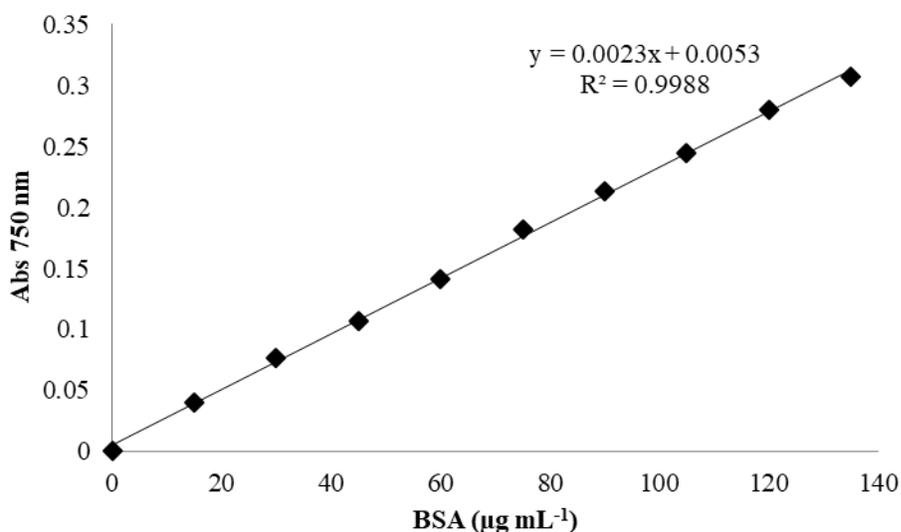


Figura 3. Curva de calibración de proteínas elaborada con albúmina de suero bovino. Tomada de Arredondo-Vega et al. (2017d).

Una vez calculada la alícuota, se colocó en otro tubo y se le añadió el volumen necesario de NaOH 0.1 N para completar 1 mL. Luego se mezcló con un vortex y se le agregaron 5 mL de una solución de carbonato de sodio (NaCO_3) al 2% en NaOH 0.1 N (solución A) + sulfato de cobre (II) pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) al 0.5 % y tartrato de potasio ($\text{KC}_4\text{H}_5\text{O}_6$) al 1% (solución B) en una proporción de 50:1 A:B. Posteriormente se mezcló con vortex y se dejó reposar 15 min. Se añadieron 500 μL de la solución de 1:1 Folin: agua destilada y se dejó reposar en oscuridad por 40 min. Luego se midió la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro marca Hach®, modelo DR5000. Se utilizó un blanco preparado usando el mismo tratamiento que el de las muestras, pero utilizando 1 mL de NaOH 0.1 N en lugar de muestra.

Posteriormente, el porcentaje de proteínas se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Proteínas (\%)} = (((A_{750}/m) * V_e) / V_m) / P_s * 100$$

Donde:

A_{750} : absorbancia a 750nm

m: pendiente de la curva de calibración

Ve: volumen del extracto alcalino (mL)

Vm: volumen de la alícuota calculada (mL)

Ps: peso de la muestra liofilizada (mg)

3.10.2. Cuantificación de carbohidratos totales

En este caso se siguió el método de Dubois (Dubois et al., 1956). Se pesaron alrededor de 5 mg de biomasa liofilizada y se colocaron en tubos de vidrio con tapones de rosca, limpios, previamente lavados con detergente libre de fosfatos (Micro 90), enjuagados con agua destilada y secados. Luego, para realizar la hidrólisis ácida, se añadió 1 mL de H₂SO₄ 1 M a cada tubo, se sonicaron por 5 min y se agregaron 4 mL de H₂SO₄ 1 M. Los tubos se taparon con papel aluminio y se colocaron en un termo-baño a 100°C por 1 hora. Luego se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se transfirió el extracto ácido a otros tubos limpios, con cuidado de no resuspender la pastilla celular.

Seguidamente, se determinó el volumen del extracto ácido a utilizar en la determinación de carbohidratos. Para su cálculo, se consideraron los siguientes aspectos: el contenido aproximado de carbohidratos de la diatomea en estudio (se utilizó un 20% según trabajos anteriores realizados por estudiantes en el mismo laboratorio) y el punto medio de la concentración de la curva de calibración elaborada con glucosa anhidra el cual fue de 60 µg mL⁻¹. Se utilizó la curva de calibración elaborada previamente en el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas, empleando una solución concentrada de 120 µg mL⁻¹ de glucosa anhidra, a partir de la cual se preparó un gradiente de concentración de 0 a 120.40 µg mL⁻¹ (Figura 4) (Arredondo-Vega et al., 2017b).

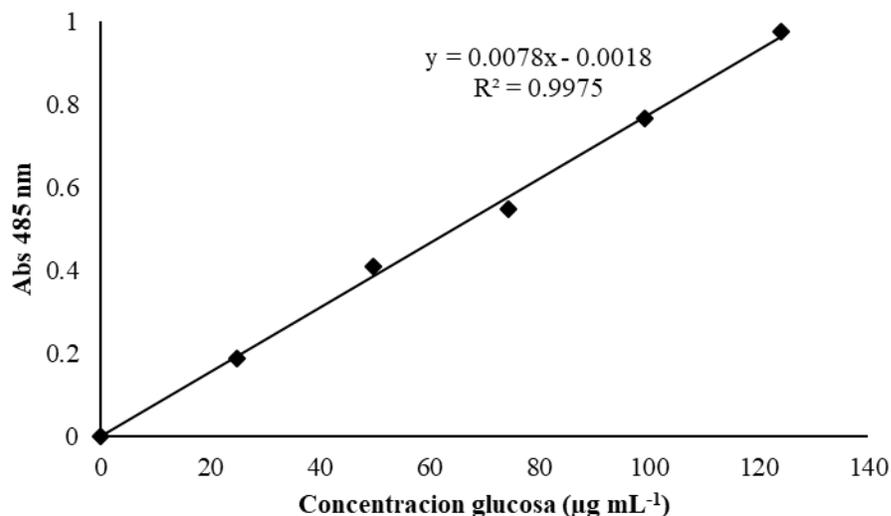


Figura 4. Curva de calibración de carbohidratos elaborada con glucosa anhidra. Tomada de Arredondo-Vega et al. (2017b).

La alícuota calculada se colocó en otro tubo, se añadió un volumen necesario de H₂SO₄ 1 M para completar 1 mL. Se agregó 1 mL de fenol 5% y se mezcló con vortex, se dejó reposar por 40 minutos y luego se añadió lentamente y con el tubo inclinado, 5 mL de H₂SO₄ concentrado. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y finalmente se midió la absorbancia de las muestras a 485 nm en un espectrofotómetro marca Spectronic® modelo 4001/4. Se utilizó un blanco preparado de la misma manera, pero sustituyendo el extracto ácido de la muestra por 1 mL de H₂SO₄ 1 M. El porcentaje de carbohidratos se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Carbohidratos (\%)} = \left(\frac{(A_{485}/m) * V_e}{V_m} / P_s \right) * 100$$

Donde:

A₄₈₅: absorbancia a 485 nm

m: pendiente de la curva de calibración

V_e: volumen del extracto ácido (mL)

V_m: volumen de la alícuota calculada (mL)

P_s: peso de la muestra liofilizada (mg)

3.10.3. Determinación de pigmentos, lípidos totales y ácidos grasos

3.10.3.1. Obtención del extracto clorofórmico para determinación de pigmentos

Se utilizó la técnica de Lamers et al. (2010), la cual consiste en agregar a la pastilla de biomasa fresca obtenida anteriormente y guardada en tubos de cristal a -80°C , 4 mL de la mezcla cloroformo: metanol (2:2.5 v/v) y 5 μL del antioxidante butil-hidroxi tolueno (BHT). Posteriormente, se homogenizó en vortex por 1 minuto, se sonicó en baño de hielo por 20 min y se incubó a -20°C toda la noche. Al día siguiente se sonicó nuevamente por 20 min y se centrifugó por 20 min a 1666 rpm a 5°C para obtener la separación de las fases acuosa y orgánica.

La separación de la fase inferior (donde se disuelven los lípidos y pigmentos con el cloroformo) se recuperó con una pipeta Pasteur mediante burbujeo y se colocó en un tubo de vidrio con tapa de rosca limpio. Los tubos en los que esta separación no fue exitosa, se les agregó 2 mL de H_2O destilada, se mezcló con vortex y se volvió a centrifugar con las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Una vez separadas las fases inferiores de todos los tubos, se procedió a calcular una alícuota, suponiendo que cada mg de biomasa seca contenía un 1 % de pigmentos totales. Para esto se tomó en cuenta el rendimiento de la biomasa (mg mL^{-1}) de cada columna.

3.10.3.2. Extracción, identificación y cuantificación de pigmentos

Se siguió el procedimiento de extracción de pigmentos según Lamers et al. (2010). Una vez calculada la alícuota del extracto clorofórmico mencionada en el apartado anterior, esta se colocó en un tubo limpio y se agregaron 3.4 mL de acetona al 99.9 % grado HPLC.

Posteriormente, a cada muestra se le realizó un barrido espectral de 400 a 750 nm utilizando el espectrofotómetro marca Hach®, modelo DR5000. Luego, a partir de las absorbancias obtenidas, se calculó la concentración de clorofila *a*, *c* y carotenoides, mediante las siguientes fórmulas (Arredondo-Vega & Voltolina, 2017):

$$\text{Chl } a = 11.47 * A_{664} - 0.4 * A_{630}$$

$$\text{Chl } c = 24.36 * A_{630} - 3.73 * A_{664}$$

$$\text{Carotenoides totales} = 10 \cdot A_{480}$$

Las concentraciones ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de cada pigmento se utilizaron para calcular el volumen de inyección de muestra en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus abreviaciones en inglés). Para esto se sumaron los valores obtenidos de los tres pigmentos y se realizó una regla de tres para calcular los μL de muestra que tuvieran una concentración de 25 ng de pigmentos totales (equivalente a 5 ng de al menos 5 pigmentos presentes en las muestras).

Los valores calculados se inyectaron en el HPLC 1260 Infinity de Agilent Technologies. Las condiciones de operación del equipo son basados en el método de Vidussi et al., (1996) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Condiciones del HPLC empleadas en la identificación y cuantificación de los pigmentos de *Nanofrustulum shiloi*.

Columna	Zorbax C8 SB (5 μm x 150 nm x 4.6 nm)
Tiempo de corrida	18.5 min
Tiempo de parado	1.5 min
Flujo	1 mL min ⁻¹
Presión de bomba	300 bares
Longitud de onda del detector	DAD 440 nm

Fuente: Carreón-Palau et al., (2017).

Se emplearon los siguientes solventes:

Solvente A: mezcla de metanol / acetato de amonio (1N), (70:30, v/v).

Solvente B: metanol 100% grado HPLC.

Cuadro 4. Gradiente de solventes utilizados durante los tiempos de corrida del HPLC.

Gradiente	Solvente A	Solvente B
Minuto 0	75%	25%
Minuto 1	50%	50%
Minuto 15	0%	100%
Minuto 18	0%	100%
Minuto 18.5	75%	25%

Fuente: Carreón-Palau et al., (2017).

Posteriormente, para identificar los pigmentos presentes en las muestras, se compararon los tiempos de retención observados con los tiempos de retención de los estándares de los pigmentos, así como con los espectros de absorción característicos de cada pigmento (Carreón-Palau et al., 2017). Además, para cuantificar cada pigmento se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Pigmento} = ((A_m/FC) * (VE/VI)) / P_s$$

Donde:

Am: área del pico de la muestra (mAU·s⁻¹)

FC: factor de corrección de cada estándar (Tasa de aumento del área en función de la cantidad de pigmento)

VE: volumen del final (μL) (volumen del extracto*(volumen de acetona + alícuota/volumen de la alícuota))

VI: volumen de muestra inyectado (μL)

Ps: peso de la muestra liofilizada (mg)

3.10.3.3. Obtención del extracto clorofórmico para determinación de lípidos totales y ácidos grasos

Para la obtención de este extracto se utilizó biomasa liofilizada. Se pesaron entre 5 y 10 mg de biomasa y se colocaron en tubos de cristal lavados con detergente libre de fosfatos (Micro 90), metanol y cloroformo.

Posteriormente, a cada tubo se le agregaron 4 mL de la mezcla cloroformo:metanol:agua en una proporción 1:2:0.6. Luego se sonicaron durante 20 min en frío y se incubaron por 24 h a -20°C y protegidos de la luz. Pasada la incubación, se sonicaron de nuevo por 20 min en frío. Luego se les agregó 1 mL de cloroformo más 2 mL de agua destilada y se centrifugaron durante 15 min a 1666 rpm y a 5°C . Mediante burbujeo se tomó la fase orgánica y se separó de la acuosa, colocándola en otro tubo de cristal. Al tubo original se le agregó 1 mL más de cloroformo para extraer los lípidos que quedaran remanentes. El volumen de extracto clorofórmico total fue de 3.1 mL, de los cuales una alícuota se utilizó para la determinación de lípidos totales y el volumen restante se empleó para la inyección en el cromatógrafo de gases espectrómetro de masas (GCMS por sus abreviaciones en inglés) para la determinación de ácidos grasos.

3.10.3.4. Extracción y cuantificación de lípidos totales

Se empleó el método de Bligh y Dyer, (1959). Se calculó una alícuota del extracto clorofórmico, la cual contuviera $90\ \mu\text{g}$ de lípidos totales. Para esto se tomó en cuenta los mg de biomasa liofilizada que se colocaron en cada tubo, el porcentaje de lípidos totales reportado en trabajos anteriormente realizados en el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas (CIBNOR), el cual fue de 30% y el punto medio de una curva de calibración elaborada previamente en el mismo laboratorio, el cual fue de $90\ \mu\text{g}$ (Figura 5).

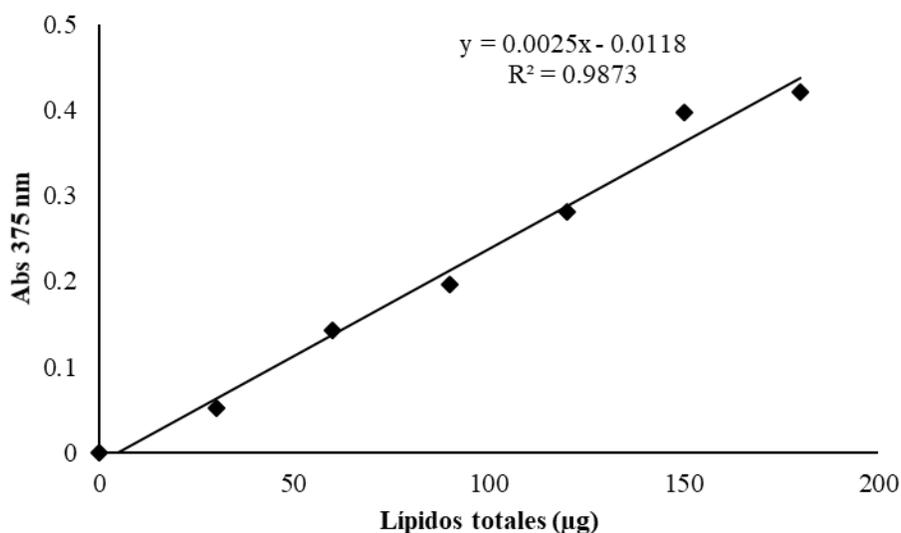


Figura 5. Curva de calibración para la determinación de lípidos totales, elaborada con la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* (Carreón-Palau et al., 2017).

Una vez calculada la alícuota, esta se colocó en el fondo de otro tubo de cristal, evitando tocar las paredes del mismo. Luego se concentró a sequedad con nitrógeno gaseoso (N₂) y se agregaron 2 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄). A los tubos se les colocó papel aluminio aparte de la tapa de rosca y se calentaron en la estufa a 200°C por 15 min. Luego se enfriaron en una bandeja con agua y se les agregó lentamente y con el tubo inclinado 3 mL de agua destilada.

Posteriormente, se leyó la absorbancia de cada muestra a 375 nm utilizando un espectrofotómetro marca Spectronic® modelo 4001/4. Se empleó un blanco de H₂SO₄ preparado de igual manera que las muestras. El porcentaje de lípidos totales en las muestras se calcularon con la siguiente fórmula:

$$\text{Lípidos (\%)} = (((A_{375} / m) * VE) / VA) / Ps) / 10$$

Donde:

A₃₇₅: absorbancia a 375 nm

m: pendiente de la curva de calibración

VE: volumen del extracto (μL)

VA: volumen de la alícuota (μL)

Ps: peso de la muestra liofilizada (mg)

3.10.3.5. Extracción, identificación y cuantificación de ácidos grasos

Se utilizó el método de Sato y Murata, (1988) por medio del cual se trans-esterifican los lípidos que quedaron en el extracto, para obtener los metil-ésteres de ácidos grasos y poder inyectarlos en el GCMS.

Se colocó el sobrante del extracto total de cloroformo en tubos de vidrio limpios y se concentró a sequedad con N₂, se agregaron 2.5 mL de la mezcla ácido clorhídrico: metanol (HCl:CH₃OH) en una proporción 5:95 v/v. Luego se selló con cinta teflón por dentro y fuera de la tapa de los tubos (para evitar la evaporación de la muestra) y los mismos se colocaron en un termo baño a 85°C por 2.5 h. Posterior a esto, se agregaron 1.5 mL de hexano grado

HPLC, se mezcló con vortex y se separó la fase superior en otro tubo. Se repitió este paso y de nuevo se colocó la fase superior producto de la segunda extracción, en el mismo tubo. A las muestras se les agregó sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) para eliminar residuos de humedad y se almacenaron a -20°C hasta su posterior inyección en el GCMS. Se inyectaron entre 4 y 5 μL de muestra.

La columna utilizada en el GCMS fue Omegawax SUPELCO (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) y se emplearon las siguientes condiciones: Volumen de inyección manual: 4-5 μL , gas portador: Helio (He) de alta pureza 99.97%, flujo del gas portador: 0.9 mL min^{-1} , inyección de la muestra: sin división (splitless), temperatura del inyector: 250°C , temperatura del detector: 260°C . En cuanto al programa del cromatógrafo, las condiciones fueron las siguientes: temperatura inicial del horno: 110°C 3 min con un incremento de $30^\circ\text{C min}^{-1}$ hasta 165°C , se mantuvo la temperatura por 2 min y posteriormente se incrementó en $2.2^\circ\text{C min}^{-1}$ hasta 209°C , esta temperatura se mantuvo por 18 min. Además, el método de adquisición de espectros de masas fue: retardo del solvente: 3.3 min, rango de masas: 45-450 uma, tiempo entre barridos: 0.5 min (Carreón-Palau et al., 2017).

La identificación de los ácidos grasos se llevó a cabo con la ayuda del software WSearch32. También se compararon los tiempos de retención (TR) de los picos de las muestras con los de la curva de calibración previamente inyectada (37 estándares comerciales metilados -FAME- marca SIGMAE), y se confirmó mediante los iones característicos del espectro de masas de cada ácido graso, los cuales se generan al ingresar en la cámara de ionización electrónica.

La cuantificación se realizó aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Ácido graso } (\mu\text{g mg}^{-1}) = (((((A/FC) * (V_H/V_I)) * V_E) / V_A) / P_s)$$

Donde:

A: área del pico

FC: factor de corrección

V_H : volumen de hexano (μL)

VI: volumen de inyección (μL)

VE: volumen del extracto (μL)

V_A: volumen de la alícuota (μL)

Ps: peso de la muestra liofilizada (mg)

3.11. Análisis estadístico

Todos los métodos anteriormente mencionados se llevaron a cabo para cada matraz erlenmeyer o columna, por lo tanto, los análisis se realizaron por cuadruplicado para el tiempo cero y siete de cultivo. A los resultados obtenidos se les aplicó una prueba de normalidad de Kolmogórov-Smirnov. Posteriormente, a los datos que cumplieron el supuesto de normalidad se les realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y una prueba Post Hoc de Tukey. Por el contrario, los datos que no cumplieron el supuesto de normalidad se les aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Se evaluaron las diferencias significativas entre los parámetros poblacionales de la diatomea según el método utilizado para su cálculo, mediante peso seco o densidad óptica, esto en los cultivos tanto en matraces erlenmeyers como en columnas. Además, se compararon los valores de peso seco total, orgánico e inorgánico resultantes entre los días cero, tres y siete de cultivo. También se comparó el contenido de proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos grasos, pigmentos y cenizas únicamente entre los días cero y siete de cultivo. Se utilizó el software estadístico MiniTab® 18 para realizar todo el análisis estadístico de los resultados. En todos los casos se utilizó un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

3.12. Evaluación de la conveniencia de cultivo masivo y posible uso en la acuicultura

Se realizó un análisis de los parámetros poblacionales, cinética de crecimiento, productividad y rendimiento que presentó la microalga en el cultivo desarrollado en el exterior, así como las variaciones en su composición bioquímica. Los resultados obtenidos mediante los análisis estadísticos fueron insumo para esta sección.

Además, se realizó una revisión bibliográfica exhaustiva del tema, de tal manera que fue posible dar un resultado sobre el uso en la acuicultura de la cepa. Se tomó en cuenta sus características morfológicas, el valor nutricional en términos de composición bioquímica y la capacidad para crecer en un cultivo a mayor escala.

Por otra parte, se realizó una comparación de los consumibles que generan más gastos en el cultivo de microalgas tanto en el laboratorio como en el sistema utilizado al aire libre. Se tomó en cuenta el consumo aproximado de electricidad, columnas de cultivo, sensores de parámetros físicos y, además, ventajas respecto al medio de cultivo, uso de agua marina, métodos de esterilización y obtención de la biomasa. Lo anterior partiendo del hecho de que el sistema se implemente en un centro de investigación o institución en donde se cuente ya con sistema de bombeo de agua marina y equipo de laboratorio general básico para cultivo de microalgas como por ejemplo microscopios, autoclave, aire acondicionado y cámaras de cultivo de microalgas.

En cuanto a los costos, la tarifa eléctrica fue consultada en el sitio web de la Autoridad reguladora de servicios públicos (ARESEP) (ARESEP, 2020). El consumo eléctrico por equipo fue calculado por como parte de un análisis de costos realizado para el presente trabajo (Carvajal Oses, comunicación personal, 2018). El costo de las columnas de policarbonato y fertilizante fueron suministrados mediante comunicación personal por la Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega. Además, se consultaron precios de medios de cultivo en el sitio web de la Universidad de Texas, Austin (UTEX, 2020), así como precios de reactivos químicos necesarios para elaborar el medio F/2 en Tecno Diagnostica S.A. y Genesys Costa Rica. Los precios de los sensores de temperatura e irradiancia fueron consultados en el sitio web de Onset Computer Corporation (ONSET, 2020).

4. Resultados

4.1. Caracterización morfológica de *Nanofrustulum shiloi*

Se logró generar diferentes imágenes por MEB desde distintos ángulos de la frústula de la diatomea. Gracias al proceso previo que se le dio a la muestra, fue posible eliminar gran parte de la materia orgánica que se encontraba tanto en el interior, como recubriendo la frústula. Se estimó un tamaño celular de entre 2 y 6 μm de longitud y entre 3 y 4 μm de ancho. Además, se observó desde el plano valvar de la frústula sus ornamentaciones, entre ellas las espinas, que sobrepasan el margen de la valva, y las perforaciones o areolas formando estrías en las valvas. No fue posible generar imágenes nítidas de frústulas con ambas valvas unidas (Figura 6).

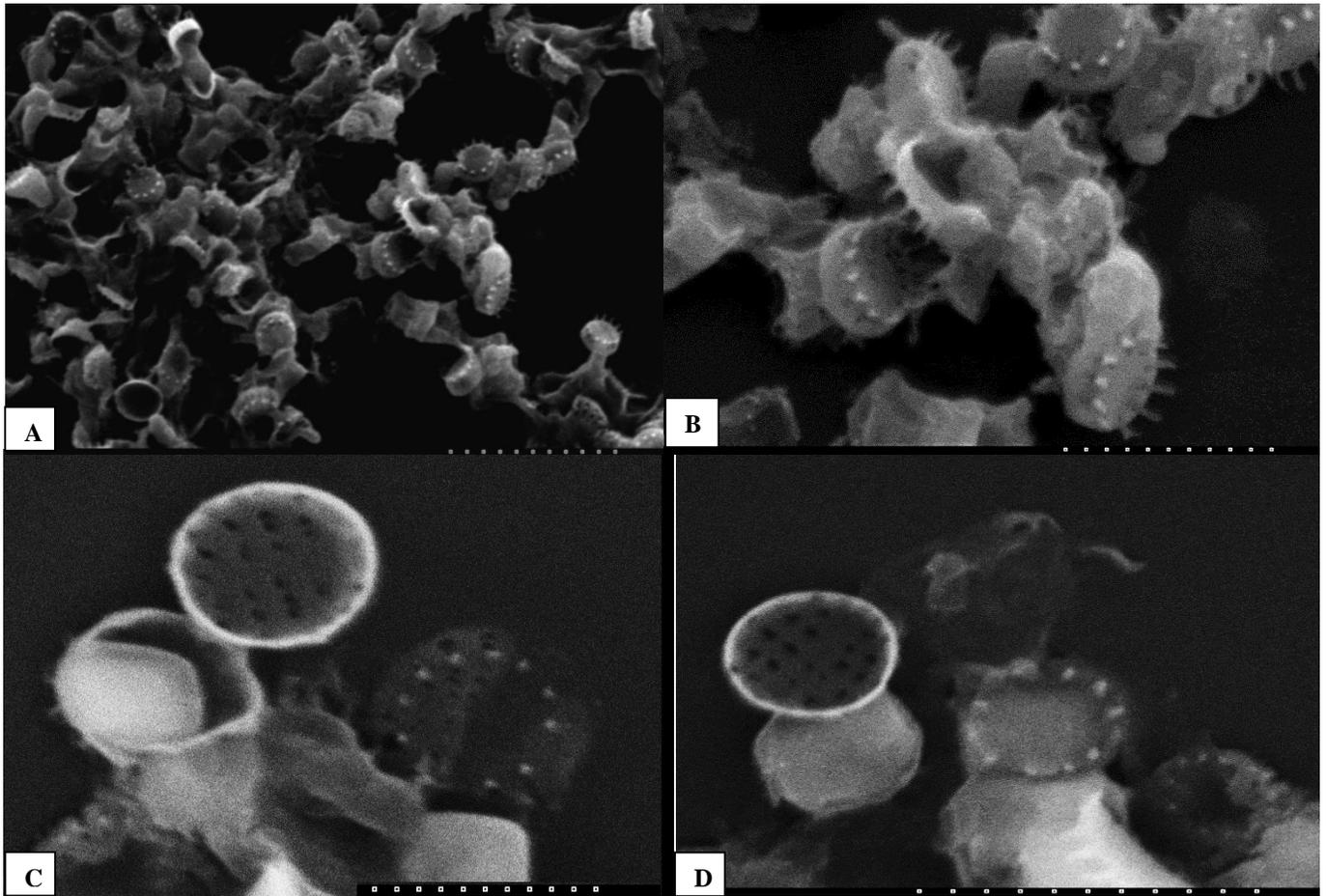


Figura 6. Imágenes de MEB de frústulas de la diatomea *Nanofrustulum shiloi*. **A:** conjunto de frústulas en diferentes ángulos, escala= 10µm; **B:** vista externa de valvas en la que se observan sus espinas, escala= 5µm; **C y D:** vista interna y externa de valvas, se pueden apreciar las areolas y espinas, escala= 3µm y 5µm, respectivamente. Imágenes tomadas por Ariel Arturo Cruz Villacorta. Microscopio Hitachi S-3000N. Laboratorio de Microscopia Electrónica. CIBNOR 2018.

Por otra parte, en la Figura 7 se pueden observar imágenes de *Nanofrustulum shiloi*, obtenidas por microscopía confocal, en las que se aprecian las células unidas por las espinas marginales entrecruzadas formando múltiples cadenas. Las manchas de color anaranjado posiblemente correspondan a la fluorescencia natural emitida por el pigmento carotenoides de mayor concentración, la fucoxantina.

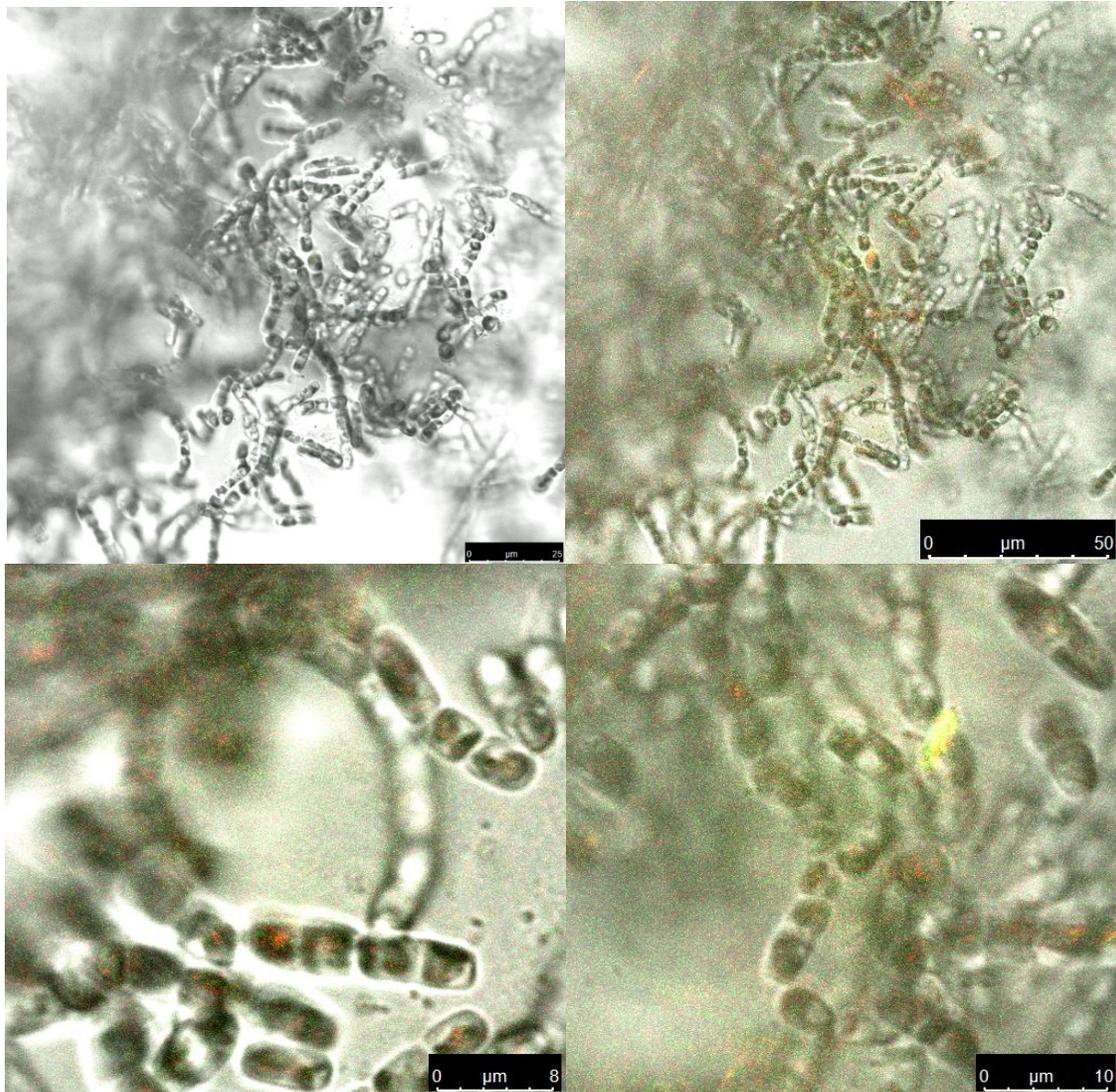


Figura 7. Imágenes de microscopía confocal de células de Nanofrustulum shiloi. Imagen tomada por Ariel Arturo Cruz Villacorta. Microscopio confocal Leica DMi8. CIBNOR 2018. Escala de la imagen superior izquierda= 25 µm.

4.2. Cultivo en condiciones de laboratorio

4.2.1. Parámetros poblacionales y de productividad

Se elaboraron curvas de crecimiento para *Nanofrustulum shiloi* en condiciones de laboratorio durante 7 de días de cultivo, utilizando datos de peso seco de la biomasa y densidad óptica (Figuras 8 y 9). No fue posible utilizar el método de recuento celular, ya que las células formaban aglomeraciones entre sí, las cuales no se pudieron separar por medios físicos ni químicos.

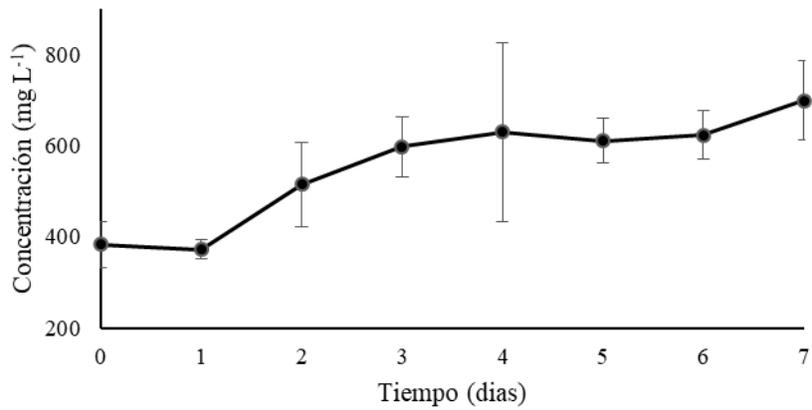


Figura 8. Curva de crecimiento de *Nanofrustulum shiloi* elaborada con los valores de concentración de biomasa (peso seco) en función del tiempo de cultivo. Las barras de error representan los intervalos de confianza ($\alpha=0.05$).

En la figura 8 se puede observar un aumento en la concentración de biomasa a partir del día 1 y hasta el día 7, con un leve descenso en el día 5. Debido al tiempo de cultivo seleccionado, no es posible visualizar la fase de muerte de la diatomea.

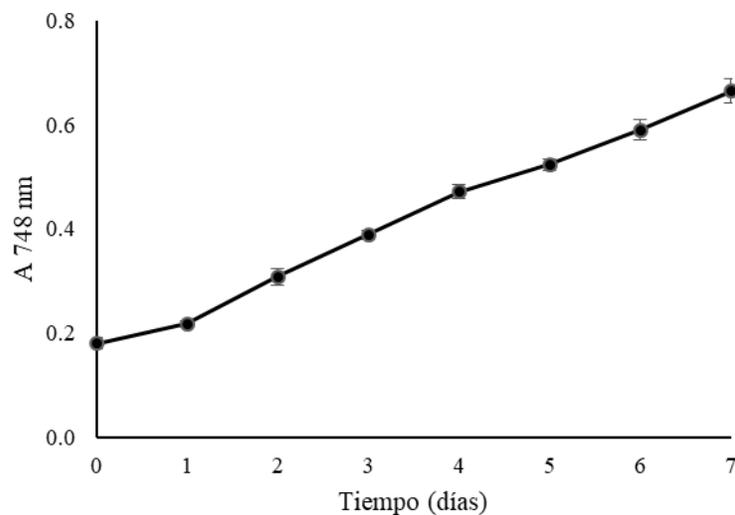


Figura 9. Curva de crecimiento de *Nanofrustulum shiloi* elaborada con los valores de densidad óptica en función del tiempo de cultivo. Las barras de error representan los intervalos de confianza ($\alpha=0.05$).

De igual manera, la curva de crecimiento utilizando la densidad óptica del cultivo muestra un continuo crecimiento desde el día 0 y hasta el día 7 sin ningún descenso (Figura 9).

Por otra parte, en el cuadro 5 se pueden observar los parámetros poblacionales de la diatomea, calculados mediante el peso seco y la densidad óptica. Según el análisis estadístico (ANOVA), no hay diferencias significativas en los parámetros según el método que se utilice para calcularlos.

Cuadro 5. Parámetros poblacionales de *Nanofrustulum shiloi* en condiciones de laboratorio: tasa de crecimiento (μ) y tiempo de generación (T_g). (Promedios \pm el intervalo de confianza. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$)).

Método	(μ) (d^{-1})	T_g (d)
Peso seco	0.27 \pm 0.21 ^a	4 \pm 3 ^a
Densidad óptica	0.19 \pm 0.01 ^a	3.7 \pm 0.2 ^a
<i>p</i>	0.454	0.772

En cuanto a los parámetros de productividad del cultivo en el laboratorio, se obtuvo un rendimiento total de la biomasa en el día 7 de 699 \pm 87 mg L⁻¹ y una productividad de 100 \pm 12 mg L⁻¹ d⁻¹.

4.3. Desarrollo del cultivo en condiciones al exterior

4.3.1. Medidas indirectas de la concentración celular

Se tomaron muestras del cultivo de *Nanofrustulum shiloi* en los días 0, 3 y 7 del cultivo establecido en columnas en condiciones al exterior, para evaluar los cambios en la concentración celular de acuerdo a los días. Los datos de concentración de la biomasa calculada con el peso seco y la determinación de la densidad óptica obtenida con la medida de la absorbancia a 748 nm, se muestran en el cuadro 6. En dicho cuadro, se puede observar un aumento en los valores conforme avanzan los días de cultivo.

Cuadro 6. Medidas indirectas de la concentración celular de *Nanofrustulum shiloi*. Los valores representan promedios \pm el intervalo de confianza.

Tiempo (días)	Concentración (mg L ⁻¹)	Densidad óptica (A _{748 nm})
0	90.36 \pm 8.99	0.0197 \pm 0.004
3	150.55 \pm 11.20	0.047 \pm 0.02
7	297.92 \pm 15.79	0.111 \pm 0.01

Por otra parte, con los datos mostrados en el Cuadro 6, se elaboró una gráfica para la determinación indirecta de la concentración de la biomasa (Figura 10), como se detalla en la sección 3.8 del marco metodológico. Además, se muestra la ecuación de la recta y el valor de R² resultante de la correlación realizada.

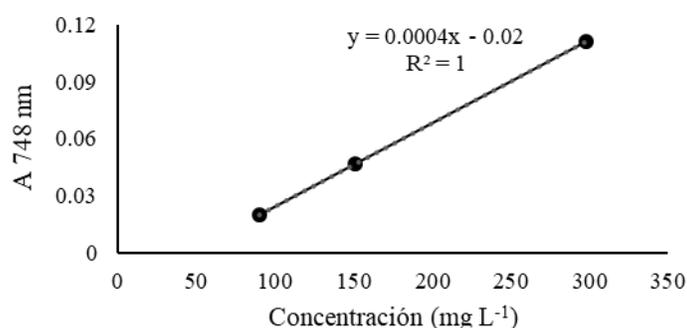


Figura 10. Curva de calibración para estimar la concentración de la biomasa de *Nanofrustulum shiloi*.

Al utilizar los valores de “a” y “b” proporcionados en la ecuación de la recta, reemplazar “y” por el valor de la absorbancia a 748 nm para un día de cultivo determinado, es posible despejar el valor de “x”, el cual representa el valor estimado de la concentración en mg L⁻¹. A continuación se muestran los cálculos para estimar la concentración de la biomasa en el día 7:

$$\text{Concentración (mg L}^{-1}\text{)} = (A_{748\text{nm}} / b) - a$$

$$\text{Concentración (mg L}^{-1}\text{)} = (0.111 / 0.0004) - 0.02$$

$$\text{Concentración (mg L}^{-1}\text{)} = 277.48.$$

De modo que es posible comparar este resultado, con el valor de concentración en mg L⁻¹ obtenido utilizando el peso seco, el cual fue de 297.92 (Cuadro 6).

4.3.2. Parámetros poblacionales

En el cuadro 7 se muestran los parámetros poblacionales de la diatomea cultivada en columnas en condiciones al exterior. Según el análisis estadístico realizado, sí existen diferencias significativas en los parámetros según el método que se utilice para calcularlos.

Cuadro 7. Parámetros poblacionales de Nanofrustulum shiloi: tasa de crecimiento (μ) y tiempo de generación (Tg); cultivada en condiciones al exterior. Los valores representan promedios \pm el intervalo de confianza. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Método	(μ) (d ⁻¹)	Tg (d)
Peso seco	0.17 \pm 0.01 ^a	4.1 \pm 0.3 ^a
Densidad óptica	0.25 \pm 0.02 ^b	2.8 \pm 0.2 ^b
<i>p</i>	<0.001	<0.001

4.3.3. Determinación de peso seco total, orgánico e inorgánico (cenizas) y parámetros de productividad

En la figura 11 se puede observar un incremento en el peso seco total de la biomasa conforme avanzan los días, pasando de un 92 \pm 7 mg L⁻¹ en el día 0 a 151 \pm 11 mg L⁻¹ en el día 3 y hasta un 298 \pm 16 mg L⁻¹ en el día 7 de cultivo. Además, el porcentaje de peso seco inorgánico (contenido de cenizas) respecto al peso seco total, disminuyó con los días de cultivo.

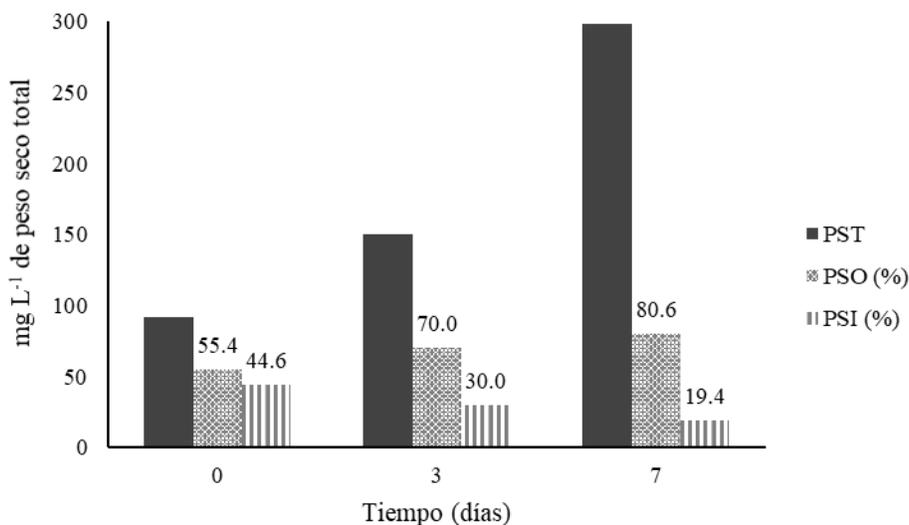


Figura 11. Valores de peso seco total (PST) (mg L⁻¹) y el porcentaje de este que representa el peso seco orgánico (PSO) y el peso seco inorgánico (PSI) (cenizas) calculados para los días 0, 3 y 7 del cultivo de Nanofrustulum shiloi en columnas en condiciones al exterior.

Por otra parte, a diferencia del peso seco total, el rendimiento y productividad del cultivo establecido en columnas fueron calculados con el peso de la biomasa resultante ya liofilizada de los días 0 y 7. El rendimiento en el día 0 fue de 68±15 mg L⁻¹ y de 322±24 mg L⁻¹ en el día 7. Además, la productividad calculada para el día 7 fue de 46±3 mg L⁻¹ d⁻¹.

4.3.4. Temperatura e irradiancia fuera y dentro de las columnas de cultivo

Durante el cultivo en condiciones al exterior, se utilizaron sensores para registrar la irradiancia y la temperatura a la que estuvieron expuestas las columnas durante los 7 días de cultivo. En el cuadro 8 se muestra los valores de temperatura e irradiancia diaria en el exterior de las columnas.

Cuadro 8. Valores de temperatura e irradiancia medidos con los sensores HOBO Pendant®, a los que estuvieron expuestas las columnas con cultivo de *Nanofrustulum shiloi* ubicadas en el solarío del CIBNOR. Tmax: temperatura máxima. Tmin: temperatura mínima. Imax: irradiancia máxima. Imin: irradiancia mínima. Se muestran los promedios \pm intervalo de confianza.

Parámetro	Tiempo (días)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Tmax (°C)	33 \pm 2	35 \pm 2	31.6 \pm 0.8	29 \pm 1	31 \pm 1	34 \pm 1	28 \pm 1	27 \pm 2
Tmin (°C)	19.7 \pm 0.2	16.8 \pm 0	18.3 \pm 0.1	17.9 \pm 0.1	17.5 \pm 0	18.5 \pm 0.1	16.4 \pm 0	20.04 \pm 0,22
Imax (μ mol fotón m ⁻² s ⁻¹)	252 \pm 171	1556 \pm 1304	1497 \pm 1252	1224 \pm 206	1484 \pm 1149	1393 \pm 1252	1536 \pm 972	1302 \pm 1120
Imin (μ mol fotón m ⁻² s ⁻¹)	22.6 \pm 0	24 \pm 2	24 \pm 0	26 \pm 2	25 \pm 3	31 \pm 2	33 \pm 4	182 \pm 29

Durante el cultivo se alcanzó una temperatura máxima de 35 \pm 2°C en el día 1 y una mínima de 16.4 \pm 0°C en el día 6. La irradiancia máxima se registró en el día 1 con 1556 \pm 1304 μ mol fotón m⁻² s⁻¹ y la mínima el día 0 con 22.6 \pm 0 μ mol fotón m⁻² s⁻¹.

Por otra parte, se registraron valores de temperatura e irradiancia en el interior de las columnas al instalar sensores sumergidos en el cultivo. En el cuadro 9 se pueden observar las temperaturas e irradiancias registradas cada día. La temperatura máxima alcanzada fue de 29.9 \pm 0.3°C en el día 1 y la mínima fue de 20.3°C en los días 1 y 4. Además, la irradiancia máxima dentro de los cultivos fue de 358 \pm 176 μ mol fotón m⁻² s⁻¹ en el día 1 y la mínima de 6.5 \pm 0.3 μ mol fotón m⁻² s⁻¹ en el día 5.

Cuadro 9. Valores de temperatura e irradiancia medidos con los sensores HOBO Pendant®, en el interior de los cultivos de *Nanofrustulum shiloi* ubicados en el solarío del CIBNOR. Tmax: temperatura máxima. Tmin: temperatura mínima. Imax: irradiancia máxima. Imin: irradiancia mínima. Se muestran los promedios \pm intervalo de confianza.

Parámetro	Tiempo (días)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Tmax (°C)	29.1 \pm 0.4	29.9 \pm 0.3	26.9 \pm 0.3	26.6 \pm 0.3	28.01 \pm 0.09	29.5 \pm 0.2	26.4 \pm 0.2	23.9 \pm 0.2
Tmin (°C)	24.18 \pm 0.05	20.3 \pm 0.2	21.1 \pm 0.1	20.9 \pm 0.1	20.3 \pm 0.1	21.04 \pm 0.12	20.5 \pm 0.2	21.7 \pm 0.2
Imax (μ mol fotón m ⁻² s ⁻¹)	142 \pm 49	358 \pm 176	129 \pm 63	146 \pm 60	107 \pm 46	87 \pm 50	142 \pm 87	45 \pm 10
Imin (μ mol fotón m ⁻² s ⁻¹)	13 \pm 5	12 \pm 4	9 \pm 2	9 \pm 2	7 \pm 3	6.5 \pm 0.3	7 \pm 3	28 \pm 6

Además, como parte de una comparación de las condiciones fuera y dentro de las columnas, en la Figura 12 se pueden observar las diferencias entre la irradiancia que incidió en estos dos lugares. En la figura es posible apreciar las altas irradiancias en el exterior y también la reducción progresiva de este parámetro en el interior de cada columna, debido al incremento en la concentración celular conforme pasaron los días.

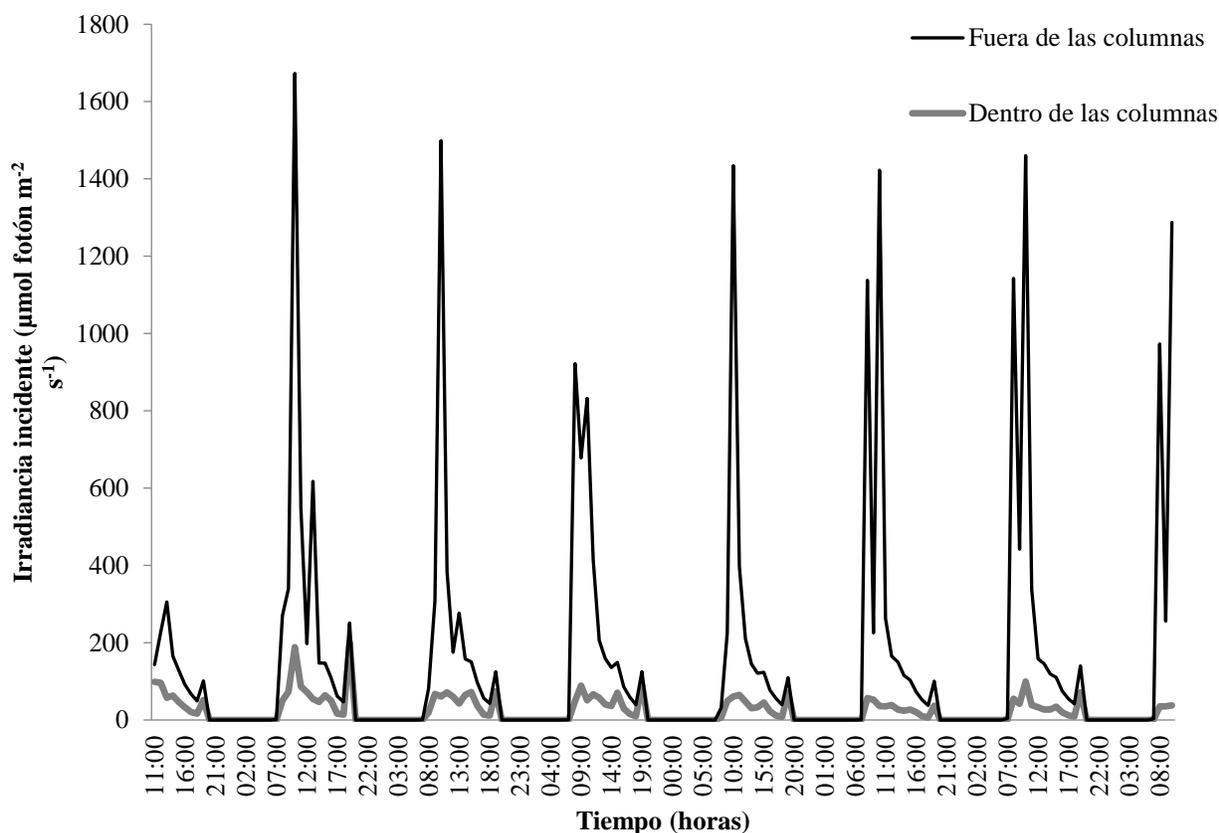


Figura 12. Irradiancias registradas por los sensores HOB0 Pendant® en el exterior e interior de las columnas desde el día 0 y hasta el 7.

4.3.5. Parámetros fisicoquímicos dentro del cultivo

En el cuadro 10 se pueden observar los valores de oxígeno disuelto y salinidad para cada día. La mayor concentración de oxígeno se registró desde el día 3 y hasta el 6 con 30 mg L^{-1} , el valor mínimo de oxígeno se registró el día 0 con 14 mg L^{-1} y la salinidad se mantuvo alrededor de 37 UPS todos los días de cultivo. El día 7 solo se realizó una única medida de estos parámetros antes de iniciar con la cosecha final, como se menciona en la sección 3.5, por lo que el oxígeno disuelto registrado fue de $21 \pm 1 \text{ mg L}^{-1}$. En cuanto al pH,

éste se logró mantener en un rango de entre 8 y 9 gracias a las adiciones diarias de CO₂. El valor de pH más bajo fue de 8.24±0.08 después de adicionar el CO₂ en el día 1, y el más alto fue de 9.11±0.05 en el día 7.

Cuadro 10. Valores diarios de oxígeno disuelto máximo (OD max), oxígeno disuelto mínimo (OD min), salinidad y pH antes y después de adicionar CO₂ al cultivo de *Nanofrustulum shiloi* establecido en condiciones al exterior. Parámetros medidos con el sensor marca HANNA®, modelo HI9828. Se muestran los promedios ± intervalo de confianza.

Parámetro	Tiempo (días)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
OD max (mg L ⁻¹)	18±3	20±3	23±3	30±1	29±3	30±4	30±3	-
OD min (mg L ⁻¹)	14±3	18±3	16±3	23±2	22±3	19±2	18±1	-
Salinidad (UPS)	37.3±0.1	37.4±0.2	36±4	37.6±0.1	37.7±0.1	37.8±0.1	37.9±0.1	37.9±0.1
pH antes CO ₂	8.86±0.03	8.93±0.04	8.89±0.18	8.96±0.17	8.93±0.23	9.04±0.23	8.99±0.22	9.11±0.05
pH después CO ₂	8.50±0.08	8.24±0.08	8.30±0.27	8.46±0.34	8.64±0.28	8.64±0.29	8.79±0.32	-

4.3.6. Composición bioquímica

Los análisis de la composición bioquímica de la biomasa se realizaron en el día 0 y 7, con el fin de observar el efecto de las condiciones ambientales en el cultivo. En la figura 13, se muestran los porcentajes del peso seco total que representan las principales biomoléculas, así como el contenido de cenizas. En cuanto a las proteínas, existen diferencias significativas entre los porcentajes obtenidos ambos días ($p = 0.006$), pasando de un 24±1% en el día 0 a un 27±1% en el día 7.

Además, el contenido de carbohidratos también fue significativamente diferente en ambos días ($p = 0.003$), aumentando de un 13±2% a un 20±3%. Por otra parte, los lípidos totales no presentaron diferencias significativas ($p = 0.299$), ya que en el día 0 se obtuvo un 17±2% y en el día 7 un 19±3%. El contenido de cenizas disminuyó de manera significativa ($p = <0.001$), pasando de un 44±4% a un 19±4%.

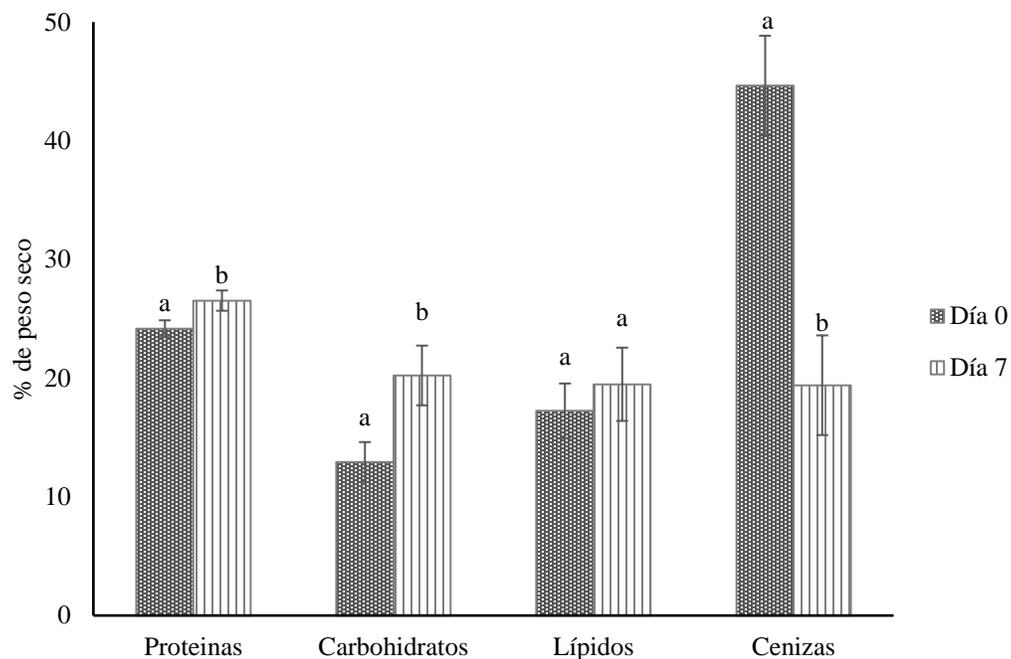


Figura 13. Porcentajes del peso seco que representan las diferentes biomoléculas y cenizas de *Nanofrustulum shiloi* durante los días 0 y 7 de su cultivo en columnas expuestas a las condiciones ambientales. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Por otra parte, en el análisis y cuantificación de pigmentos utilizando los cromatogramas obtenidos mediante HPLC, se identificaron 12 picos. Se cuantificaron pigmentos y sus formas degradadas o modificadas. Los pigmentos que obtuvieron mayor porcentaje relativo respecto al total de pigmentos fueron la clorofila *c*, fucoxantina y clorofila *a*. En cuanto a la clorofila *c*, hubo un mínimo aumento sin diferencias significativas entre los días 0 y 7. La fucoxantina disminuyó de manera significativa, contrario a la clorofila *a*, la cual mostró una disminución no significativa entre los días de cultivo (Cuadro 11).

Cuadro 11. Pigmentos identificados para *Nanofrustulum shiloi* durante los días 0 y 7 de su cultivo en columnas expuestas a las condiciones ambientales. Los valores representan el porcentaje relativo de los pigmentos totales \pm el intervalo de confianza. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los días.

Pigmento	Día 0	Día 7	p
Feofórbido I	2.7 \pm 0.1 ^a	0 ^b	0.014
Feofórbido II	7 \pm 5 ^a	15 \pm 2 ^b	0.021
Clorofila c	38 \pm 4 ^a	39 \pm 4 ^a	0.386
Feofórbido III	3 \pm 3 ^a	5 \pm 2 ^a	0.379
Feofórbido IV	1.7 \pm 0.6 ^a	3.4 \pm 0.8 ^b	0.014
Fucoxantina	17 \pm 3 ^a	13 \pm 1 ^b	0.043
Isómero de Fucoxantina	2.4 \pm 0.4 ^a	1.8 \pm 0.1 ^b	0.021
Isómero de Fucoxantina	0.8 \pm 0.4 ^a	0.5 \pm 0.1 ^a	0.248
Anteraxantina	3 \pm 1 ^a	4.2 \pm 0.3 ^b	0.009
Diadinocromo I	0.7 \pm 0.5 ^a	0.7 \pm 0.1 ^a	0.921
Diadinocromo II	1 \pm 1 ^a	0.4 \pm 0.1 ^a	1
Clorofila a	24 \pm 7 ^a	17 \pm 2 ^a	0.111
Pigmentos totales (mg L ⁻¹)	1.1 \pm 0.4 ^a	2.2 \pm 0.6 ^b	0.024

En la figura 14 se muestra el contenido de ácidos grasos según el grado de insaturaciones, para el día 0 y el día 7. Estos datos se muestran como porcentaje de cada grupo respecto al total de ácidos grasos, el cuál fue de 1.0 \pm 0.3 en el día 0 y 2 \pm 1 en el día 7 (% del peso seco). Según el análisis estadístico, sí hubo diferencias significativas entre el total de ácidos grasos del día 0 y el día 7 ($p = 0.031$).

Los ácidos grasos saturados mostraron un aumento significativo desde el día 0 al día 7, pasando de 19 \pm 1% a un 26 \pm 2% ($p = 0.002$). Además, los ácidos grasos monoinsaturados pasaron de 30 \pm 2% a un 36 \pm 2%, resultando en un incremento significativamente diferente ($p = 0.008$). En cuanto a los ácidos grasos biinsaturados, estos aumentaron de manera no significativa desde un 4.7 \pm 0.5% a un 6 \pm 1% ($p = 0.070$).

Los ácidos grasos de 16 a 18 carbonos y con 3 o 4 insaturaciones se clasificaron como poliinsaturados, estos presentaron una disminución en el porcentaje de manera no significativa, pasando de un 12 \pm 2% a un 10 \pm 1% ($p = 0.192$). Los ácidos grasos de 20 a 22

carbonos con 3 o más insaturaciones se clasificaron como altamente insaturados, los cuales disminuyeron de manera significativa desde un $34\pm 3\%$ a un $22\pm 2\%$ ($p = 0.002$).

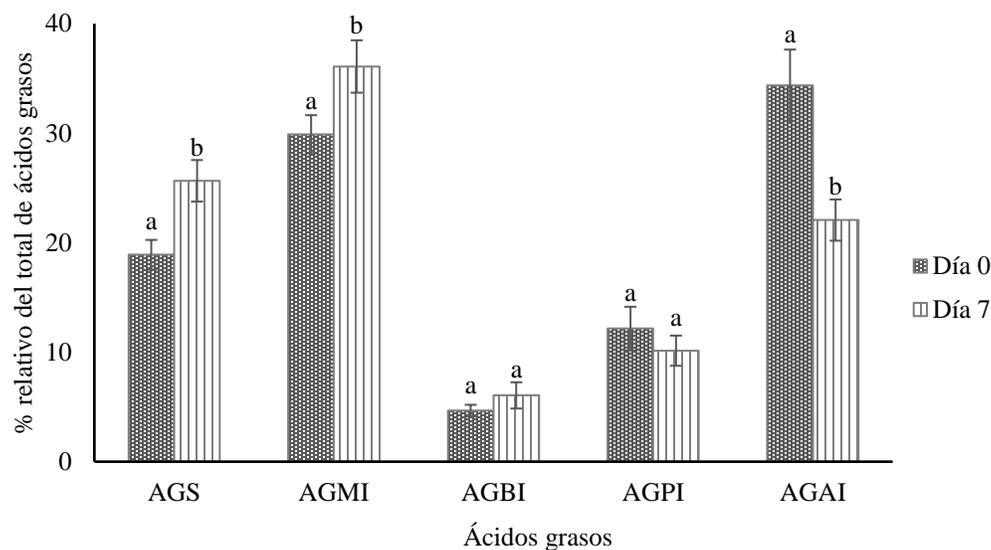


Figura 14. Contenido de los grupos de ácidos grasos de *Nanofrustulum shiloi* durante los días 0 y 7 de su cultivo en columnas expuestas a las condiciones ambientales. AGS: ácidos grasos saturados; AGMI: ácidos grasos monoinsaturados; AGBI: ácidos grasos biinsaturados; AGPI: ácidos grasos poliinsaturados; AGAI: ácidos grasos altamente insaturados. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Por otra parte, en el cuadro 12 se muestra el perfil de ácidos grasos obtenido para *Nanofrustulum shiloi* y los porcentajes relativos de estos en el día 0 y 7 de cultivo. En total, se identificaron 20 ácidos grasos, de los cuáles 4 obtuvieron las mayores concentraciones: ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido araquidónico y ácido eicosapentaenoico. Además, se encontró trazas en una única muestra del ácido eicosadienoico (20:2 ω6).

Cuadro 12. Perfil de ácidos grasos de *Nanofrustulum shiloi* durante los días 0 y 7 de su cultivo en columnas expuestas a las condiciones ambientales. Los valores representan el porcentaje relativo del total de ácidos grasos (AGT, representado como % de peso seco) \pm el intervalo de confianza. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los días. FAME: siglas en inglés de ácido graso metil esterificado.

Nombre común	FAME	Día 0	Día 7	<i>p</i>
Ácido mirístico	14:0	3.04 \pm 0.03 ^a	3.8 \pm 0.5 ^b	0.038
-	15:0	0.19 \pm 0.03 ^a	0.4 \pm 0.1 ^b	0.009
Ácido palmítico	16:0	15 \pm 1 ^a	21 \pm 1 ^b	0.001
Ácido esteárico	18:00	0.3 \pm 0.1 ^a	0.4 \pm 0.1 ^a	0.259
Ácido palmitoleico	16:1 ω 7	25 \pm 2 ^a	32 \pm 3 ^b	0.013
-	16:1 ω 6	0.14 \pm 0.06 ^a	0.2 \pm 0.1 ^a	0.473
-	16:1 ω 5	1.01 \pm 0.04 ^a	0.4 \pm 0.1 ^b	<0.001
-	18:1 ω 11	0.6 \pm 0.1 ^a	1.2 \pm 0.2 ^b	0.003
Ácido oleico	18:1 ω 9	3.1 \pm 0.4 ^a	2.5 \pm 0.2 ^a	0.119
-	16:2 ω 6	0.9 \pm 0.1 ^a	0.3 \pm 0.1 ^b	0.001
-	16:2 ω 4	3.0 \pm 0.5 ^a	1.6 \pm 0.1 ^b	0.007
Ácido linoleico	18:2 ω 6	0.7 \pm 0.1 ^a	4 \pm 1 ^b	0.001
-	16:3 ω 6	0.6 \pm 0.3 ^a	0.5 \pm 0.2 ^a	0.640
-	16:3 ω 3	9 \pm 2 ^a	4.6 \pm 0.8 ^b	0.043
-	16:4 ω 3	0.2 \pm 0.1 ^a	0.3 \pm 0.1 ^a	0.150
Ácido gamma linolénico	18:3 ω 6	0.4 \pm 0.1 ^a	0.9 \pm 0.3 ^b	0.012
Ácido estearidónico	18:4 ω 3	2.2 \pm 0.1 ^a	3.8 \pm 0.5 ^b	0.001
Ácido dihomo-gama-linolénico	20:3 ω 6	0.7 \pm 0.3 ^a	1.0 \pm 0.3 ^a	0.151
Ácido araquidónico	20:4 ω 6	8 \pm 1 ^a	4.2 \pm 0.4 ^b	0.003
Ácido eicosapentanoico	20:5 ω 3	26 \pm 2 ^a	17 \pm 2 ^b	0.001
AGT (%ps)		1.0 \pm 0.3 ^a	2 \pm 1 ^b	0.031

Además, en la figura 15 se puede observar de manera gráfica el porcentaje relativo de los ácidos grasos ω 3 y ω 6 identificados para *Nanofrustulum shiloi*. En cuanto a los ω 3, se observó una disminución en su contenido desde el inicio y hasta el final del cultivo, lo que reflejó diferencias significativas entre los porcentajes. En el día 0 se obtuvo un 37 \pm 2 % y el día 7 un 26 \pm 3 % ($p = 0.001$).

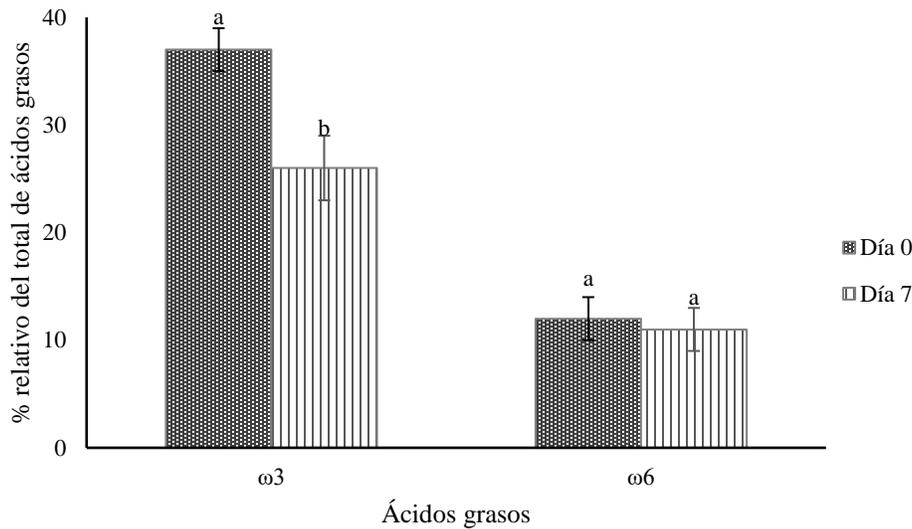


Figura 15. Porcentaje de ácidos grasos $\omega 3$ y $\omega 6$ de *Nanofrustulum shiloi* en el día 0 y 7 de su cultivo en columnas expuestas a las condiciones ambientales. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Por el contrario, no hubo diferencias significativas en el contenido de ácidos grasos $\omega 6$, ya que en el día 0 se obtuvo un 12 ± 2 % y en el día 7 un 11 ± 2 % ($p = 0.798$). También se calculó la relación entre el contenido de ácidos grasos $\omega 3$ y $\omega 6$ (Cuadro 13).

Cuadro 13. Valores de la relación entre ácidos grasos $\omega 3/\omega 6$ y viceversa, de acuerdo al día de cultivo. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los días.

Relación	Día 0	Día 7	p
$\omega 3/\omega 6$	3.2 ± 0.7^a	2.3 ± 0.3^b	0.034
$\omega 6/\omega 3$	0.3 ± 0.1^a	0.4 ± 0.1^b	0.032

4.4. Evaluación de la conveniencia de cultivo masivo y posible uso en la acuicultura

En cuanto a la evaluación y discusión de la conveniencia para cultivar de forma masiva esta diatomea, se tomó en cuenta valores mostrados en el Cuadro 14, todos estos al día de la cosecha final.

Cuadro 14. Resultados del cultivo de *Nanofrustulum shiloi* utilizados para la evaluación de la conveniencia de cultivo masivo. Se muestran los respectivos valores \pm el intervalo de confianza.

	Tasa de crecimiento (d ⁻¹)	Rendimiento (mg L ⁻¹)	Productividad (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	Contenido orgánico (% peso seco)		
				Proteínas	Carbohidratos	Lípidos
Solario	0.25 \pm 0.02	322 \pm 24	46 \pm 3	27 \pm 1	20 \pm 3	19 \pm 3
Laboratorio	0.27 \pm 0.21	699 \pm 87	100 \pm 12	-	-	-

Como parte de búsqueda de literatura, se encontraron aproximadamente 3 estudios publicados en los que se investigó el uso de *Nanofrustulum shiloi* en el alimento para animales. Los resultados más relevantes de estas investigaciones señalan que es posible emplear la diatomea con éxito como alimento en conjunto con otros ingredientes, por ejemplo, en sustitución de la harina de pescado, en especies como salmón, carpa y camarón, sin embargo, en los estudios con erizo de mar los resultados mostraron efectos toxicológicos de la diatomea y desventajas en la sobrevivencia y desarrollo post larval de dichos organismos.

Además, en el Cuadro 15 se muestran los resultados de la evaluación de las ventajas a nivel económico del tipo de cultivo empleado. En cuanto al consumo aproximado de energía eléctrica, se tomó en cuenta algunos equipos indispensables en el cultivo de microalgas en el laboratorio comparado con los utilizados en el solario. Además, se muestra el costo de otros productos utilizados como las columnas, sensores, compuestos para la esterilización del agua y la comparación entre los costos del fertilizante agrícola empleado, el medio de cultivo F/2 ya preparado y el costo de solamente 3 de los diferentes reactivos químicos que se deben adquirir si se desea preparar este mismo medio de cultivo por aparte.

También, se consideró la importancia de ciertas ventajas que provee el sistema de cultivo, por ejemplo, el uso de agua marina, aprovechamiento de luz natural y de la temperatura ambiental, obtención de biomasa por sedimentación y sifoneo y empleo de garrafones reutilizados.

Cuadro 15. Comparación de mayores costos económicos del sistema de cultivo para microalgas empleado.
Los costos se muestran en dólares estadounidenses.

Gasto de energía eléctrica mensual		Costo de kWh: \$ 0.24*	
Laboratorio			
	Ejemplos de equipos utilizados	Consumo de energía eléctrica (kWh)**	Costo (\$)
	Autoclave	172	41.28
	Lámparas de luz blanca	99	23.76
	Aire acondicionado	61	14.64
	Bomba de agua marina	8.4	2.016
	Sistema de aireación	79	18.96
		Total	100.65
Solario			
	Sistema de aireación	79	18.96
	Bomba de agua marina	8.4	2.016
		Total	20.97
Otros gastos		Producto	Costo (\$)
		Columnas de policarbonato	600
Medios de cultivo			
		Medio F/2 1 L listo para usar	55
		Reactivos químicos para F/2	171.57
		Fertilizante agrícola 1 L	10
Esterilización			
		Cloro comercial	1.05
		Tiosulfato de sodio	30.43
Sensores irradiancia y temperatura			
		HOBO Pendant®	70.04

5. Discusión

5.1. Caracterización morfológica de *Nanofrustulum shiloi*

Las medidas de la diatomea estimadas en este estudio son similares a las reportadas por Woelfel et al. (2014), quienes mencionan para *Nanofrustulum shiloi* una longitud de las valvas de 5-7 μm , un ancho de 2-4 μm y un número de 20 estrías por cada 10 μm . Además, Sabbe et al. (2003) mencionan en su estudio unas dimensiones de 4.2-5.6 μm de longitud y 3.8-5.1 μm de ancho, con un aproximado de 19 estrías por cada 10 μm . En adición a la información anterior, López-Fuerte et al. (2016) realizaron una comparación de las dimensiones publicadas por otros autores con las que obtuvieron en su estudio. Reportaron una longitud de aproximadamente 2 μm y un número de 30 estrías de igual manera por cada 10 μm .

Además, Sahin et al. (2019) detectaron cambios en la morfología de *Nanofrustulum shiloi* de acuerdo a las concentraciones de hierro y nitrógeno del medio de cultivo, al evaluar las imágenes de MEB. Los investigadores caracterizaron a las células de esta diatomea como rectangulares, con valvas circulares con un diámetro de 3.1-3.7 μm , las cuales forman cadenas mediante la unión de espinas marginales entrecruzadas. Asimismo, mencionan que las células cultivadas en altas concentraciones de hierro y nitrógeno mostraron uniones débiles entre las espinas marginales, mientras que en deficiencia de dichos nutrientes se observaron uniones fuertes y asociaciones estrechas entre las espinas de una célula y otra.

5.2. Cultivo en condiciones de laboratorio

5.2.1. Parámetros poblacionales

Durante el tiempo de cultivo, se observó un aumento en la concentración de biomasa desde el día 1 y hasta el día 7, por lo que no fue posible determinar en qué día se presenta la fase de declive o muerte para esta diatomea. De esta manera, se podría observar de forma más clara las diferentes fases de crecimiento bajo las condiciones en las que se mantuvo el cultivo.

Además, la curva de crecimiento realizada con los datos de densidad óptica (Figura 9), permite confirmar la información anterior, ya que muestra una relación prácticamente lineal entre la absorbancia del cultivo y el tiempo en días. Esta tendencia es comúnmente relacionada con la fase exponencial del cultivo microalgal, en la cual aumenta progresivamente la concentración celular y con ella la densidad óptica hasta alcanzar la fase estacionaria.

Los parámetros poblacionales obtenidos (tasa de crecimiento entre 0.19 y 0.27 d⁻¹ y tiempo de generación entre 3 y 4 d) son similares a los reportados por Steinrücken et al. (2017), quienes calcularon una tasa de crecimiento de 0.3 d⁻¹ para una cepa de *Nanofrustulum shiloi* aislada de zonas del Atlántico Norte pero cultivada utilizando una temperatura de 15 °C y el medio de cultivo de Walne, lo que indica que posiblemente la tasa de crecimiento no se vea afectada por cambios en la temperatura ni con medios de cultivo de composición similar al utilizado. Los autores mencionaron también que en dichas condiciones la fase exponencial inicia en el día 4 y la fase estacionaria en el día 18 de cultivo, lo que puede explicar la tendencia al crecimiento que se obtuvo en el día 7 en el presente estudio.

Además, estos parámetros también coinciden con los obtenidos por Demirel et al., (2016), quienes reportaron una tasa de crecimiento de 0.29 d⁻¹ y un tiempo de generación de 2.3 d para cepas de *Nanofrustulum shiloi* aisladas del Mar Egeo, perteneciente al Mar Mediterráneo, utilizando medio de cultivo F/2 y una temperatura de 22 °C durante un tiempo de 15 días. También, obtuvieron un rendimiento de 366 mg L⁻¹ y una productividad de 24 mg L⁻¹ d⁻¹, parámetros que resultaron ser menores al compararlos con los obtenidos en el presente trabajo (Rendimiento: 699±87 mg L⁻¹, productividad: 100±12 mg L⁻¹ d⁻¹ en condiciones de laboratorio).

En adición a estos estudios, Woelfel et al. en el 2014 obtuvieron tasas de crecimiento para *Nanofrustulum shiloi* aún más altas a las mencionadas anteriormente y las calculadas en esta investigación, con más de 1.5 d⁻¹ al utilizar agua salobre (salinidad 15), una temperatura de 24 °C y 150 μmol fotón m⁻² s⁻¹ como condiciones de cultivo. En este estudio la cepa fue aislada de sedimentos arenosos en la costa sur del Mar Báltico, y fue cultivada expuesta a diferentes temperaturas, irradiancias y salinidades con el fin de evaluar su rendimiento fisiológico en condiciones extremas. De este modo, debido al buen crecimiento de la

diatomea en todas las condiciones en las que fue cultivada, los autores la caracterizaron como eurihalina y euriterma, lo que puede explicar la sobrevivencia y buen crecimiento de *Nanofrustulum shiloi* en este estudio al exponerla a condiciones ambientales.

Las investigaciones mencionadas anteriormente, muestran información clave para estudios posteriores sobre las características y respuestas fisiológicas de *Nanofrustulum shiloi* a diferentes condiciones de cultivo, las cuales son de gran utilidad en el campo de la bioprospección. El desarrollo de cultivos a nivel de laboratorio permite evaluar y determinar cuáles condiciones son las ideales para obtener mayores rendimientos y mejor calidad de la biomasa, lo cual es de importancia para escalar el cultivo a grandes cantidades.

5.3.Cultivo en condiciones al exterior

5.3.1. Concentración celular

Según los resultados obtenidos, la concentración celular aumentó poco menos del doble al día 3 y luego al día 7, alcanzando alrededor de 300 mg L^{-1} en el día de su cosecha. Este resultado no es posible compararlo con otro estudio similar, ya que existe poca información publicada acerca del cultivo de *Nanofrustulum shiloi* expuesto a condiciones ambientales. Sin embargo, es importante mencionar que se han realizado estudios en los que parten de cantidades de la diatomea de hasta 1000 kg como en el caso del estudio realizado por Kiron et al. (2012). Sin embargo, no mencionan datos de concentración celular o peso seco al momento de la cosecha, solamente se indica que esta se realizó en el momento de máxima producción. Además, mencionan que anteriormente ha sido cultivada en escala comercial como fuente de biocombustibles.

Por otra parte, datos similares de concentración de la biomasa fueron reportados para otra diatomea, *Fistulifera* sp. al cultivarla masivamente en el exterior y utilizando una columna similar a la empleada en el presente estudio, pero con capacidad para 200 L. Se obtuvo concentraciones de biomasa de entre 200 y 400 mg L^{-1} como resultado de las diferentes repeticiones del estudio en las estaciones de primavera, verano y otoño (Sato et al., 2014). Este tipo de investigaciones permiten comparar las ventajas de estos tipos de biorreactores para emplearse en cultivos masivos independientemente de la microalga que se estudie.

Por otra parte, se utilizaron los datos de peso seco y de densidad óptica para elaborar una gráfica y observar la relación entre ambas variables. Este procedimiento representa un método utilizado en varios estudios para calcular de manera indirecta la concentración celular. En teoría, debido a la relación directamente proporcional entre la cantidad de clorofila y su absorbancia medida a específicas longitudes de onda, se espera que la concentración de este pigmento, sea proporcional a la concentración celular del cultivo. Según diversos autores, una fuerte relación lineal entre la densidad óptica y la concentración celular, con un nivel de correlación mayor a $R^2 = 0.95$, es óptima a nivel estadístico (Salomón Pérez, 2015).

Para lograr una correlación igual o mayor a la mencionada anteriormente, los investigadores suelen realizar curvas de calibración con alícuotas de diferentes diluciones de cultivo madre de determinada microalga. A estas diluciones, con diferente concentración, se les realiza conteo celular en cámara de Neubauer, y se determina el peso seco y la densidad óptica. Luego se relacionan la densidad óptica con las otras dos variables y se elaboran las curvas de calibración. Por lo tanto, si la curva elaborada muestra una evidente tendencia y una buena bondad de ajuste, se puede inferir el valor de una variable (concentración de la biomasa) conociendo la otra (densidad óptica). De esta manera, la densidad óptica se convierte en una medida indirecta de la concentración celular y el peso seco de la biomasa, lo que permite evitar el recuento diario de las células o la medida del peso seco. Lo anterior es aún más ventajoso en cultivos que se desarrollan en el exterior y en numerosos volúmenes de producción (Fernández Ángel, 2013; Leyva García, 2013; Nevarez Alvarez et al., 2017).

En el presente estudio se obtuvo un valor de correlación óptimo de $R^2 = 1$, lo que significa una estrecha relación entre la densidad óptica medida como la absorbancia a 748 nm y la concentración de la biomasa en mg L^{-1} . Este resultado permitió corroborar la posibilidad de usar este método para estimar la concentración de la biomasa en cualquier día de cultivo, utilizando solamente la medida de la densidad óptica. Sin embargo, para posteriores estudios, cabe recalcar la importancia de realizar previamente una curva de calibración de la cepa a utilizar, de manera que se cuente con más información y así obtener resultados más exactos.

5.3.2. Parámetros poblacionales

En el caso de los parámetros poblacionales del cultivo en condiciones de laboratorio, no hubo diferencias significativas entre los valores según los datos que se utilizaron para su cálculo, ya fuese peso seco o densidad óptica. Sin embargo, sí hubo diferencias significativas entre los parámetros del cultivo en condiciones al exterior. Esto puede deberse a que, en este último escenario, solamente se realizaron medidas de peso seco y densidad óptica en los días 0, 3 y 7 del cultivo, a diferencia del cultivo en el laboratorio, en el que se hicieron medidas de estos parámetros todos los 7 días, por lo tanto, se contaba con mayor cantidad de información, lo cual robustece los datos a nivel estadístico.

Además, se debe tener en cuenta el error humano que se introduce al momento de manipular los filtros de fibra de vidrio en el caso de la medida del peso seco, o bien, al manejar la muestra y las celdas de cuarzo en el proceso de medir la absorbancia. Esto pudo influir en gran medida para que los datos de tasa de crecimiento y tiempo de generación no coincidieran, a pesar de proceder de un mismo cultivo.

Por otra parte, cuando se desarrolla un cultivo de microalgas expuesto a las condiciones del ambiente, la tasa de crecimiento puede ser afectada, entre otros factores, por la inestabilidad de la temperatura y la irradiancia incidente, así como su vulnerabilidad a la contaminación con otros microorganismos. En el presente estudio la tasa de crecimiento no resultó afectada por las condiciones ambientales, ya que siempre se mantuvo entre 0.17 y 0.25 d⁻¹, valores dentro del rango determinado también en el laboratorio. Resultados similares reporta Banerjee et al. (2011) con la diatomea *Chaetoceros calcitrans*, cuya tasa de crecimiento no fue afectada debido a que las temperaturas ambientales correspondieron a las óptimas para su especie, según datos reportados anteriormente. Por esta razón, se deben elegir microalgas de crecimiento robusto y con amplios rangos de tolerancia que les permita soportar las fluctuaciones que se presentan en los cultivos desarrollados a gran escala y en el exterior (Huntley et al., 2015).

5.3.3. Peso seco total (PST), orgánico (PSO) e inorgánico (PSI) (cenizas) y parámetros de productividad

Según la determinación del PST, se pudo observar que este aumentó conforme el tiempo de cultivo, como se discutió en el apartado anterior (5.3.1. Concentración celular).

Además, conforme pasaron los días de cultivo, aumentó el contenido orgánico de la diatomea y disminuyó el contenido de cenizas.

Respecto al peso orgánico, aumenta conforme los días de cultivo debido al crecimiento de la población y a la utilización de nutrientes del medio para sintetizar biomoléculas. Este puede variar dependiendo de las condiciones a las que se exponga el cultivo, es decir, si algún o algunos factores están provocando disminuciones en la tasa de crecimiento, el peso orgánico también resultará más bajo. Por ejemplo, algunos autores reportan cambios dependiendo de la irradiancia y temperatura a la que esté expuesto el cultivo, así como a la concentración de nutrientes como los nitratos (Leyva García, 2013; Voltolina et al., 2008).

Por otra parte, el contenido inorgánico de las células, o bien, las cenizas, es alto en el caso de las diatomeas, debido al sílice depositado en las frústulas. Sin embargo, en algunas ocasiones otros factores pueden influir en el contenido de cenizas de las microalgas, entre ellos la acumulación de algunos minerales debido a los requerimientos específicos y las sales del medio de cultivo que no fueron removidas en el momento de realizar la determinación de peso inorgánico, en este caso por el formato de amonio con el que se hicieron lavados (Kiron et al., 2012; Jiménez Valera & Sánchez Saavedra, 2016).

En el presente estudio, la disminución en el porcentaje de cenizas pudo deberse a la limitante de sílice que se presentaba conforme avanzaban los días de cultivo, característico de un cultivo de tipo discontinuo o “batch”. Los silicatos agregados en el día 0 de cultivo, fueron utilizados por las células en crecimiento a través del tiempo, por lo que su concentración en el medio fue disminuyendo. En otras investigaciones, esta limitante es solventada al determinar anteriormente durante el diseño experimental, los requerimientos de silicatos de la diatomea en estudio, ya que es de suma importancia para el buen desarrollo de las células (Steinrücken, 2018).

En cuanto a los parámetros de productividad y rendimiento, estos fueron calculados utilizando el peso de la biomasa liofilizada del cultivo. El rendimiento y la productividad resultantes de cultivos a escala piloto, son valores de gran importancia, ya que permiten

evaluar qué tan eficiente es el sistema de cultivo y qué tan promisorio es la especie en estudio en cuanto a la cantidad de biomasa que puede generar.

Asimismo, como se mencionó anteriormente, es escasa la información sobre cultivos al exterior de *Nanofrustulum shiloi*, sin embargo, existe evidencia de que es posible obtener grandes cantidades de biomasa seca. Tal es el caso de Kiron et al. (2012), quienes utilizaron 1000 kg de biomasa seca obtenida a partir del cultivo en fotobiorreactores y tanques de 25000 y 60000 L, respectivamente, para estudios con peces y camarones, lo que evidencia la posibilidad de obtener rendimientos más altos de la diatomea. Para esto, es de suma importancia determinar las condiciones a las que el cultivo de *Nanofrustulum shiloi* alcanza la máxima productividad sin perder la calidad de la biomasa, por ejemplo bajo distintas concentraciones de nutrientes, irradiancia, temperatura, diseño del sistema de cultivo, concentración de oxígeno, regulación del pH, entre otros (Hernández-Pérez & Labbé, 2014; Cota, 2019).

5.3.4. Parámetros fisicoquímicos fuera de las columnas de cultivo

Según los datos registrados por los sensores fuera de las columnas, estas estuvieron expuestas a grandes fluctuaciones de temperatura, la cual varió más de 15°C y de irradiancia, que llegó a ser de más de 1000 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A pesar de estas grandes variaciones, el cultivo se mantuvo en crecimiento y la biomasa en aumento hasta el día de la cosecha final, lo que demuestra el amplio rango de tolerancia de *Nanofrustulum shiloi*.

Esta tolerancia también fue registrada por otros autores, como en el estudio de Woelfel et al. (2014), quienes mencionaron que *Nanofrustulum shiloi* está bien adaptada a las fluctuaciones de los factores ambientales. Además, concluyeron que estas variaciones no afectan sustancialmente al crecimiento ni la fotosíntesis de la diatomea, sino que se adaptará a nivel fisiológico según las condiciones.

Por otra parte, en el estudio de bioprospección anteriormente mencionado de los autores Steinrücken et al. (2017), se aisló la cepa de *Nanofrustulum shiloi* de la zona de Noruega Occidental. Los autores plantearon la hipótesis de que las microalgas que de allí se aislaban, eran de rápido y robusto crecimiento, ya que este lugar presenta amplias variaciones y fluctuaciones estacionales de salinidad, temperatura e irradiancia. Por esta razón, las

especies aisladas podrían tolerar las fluctuaciones en las condiciones de crecimiento que se presentan en cultivos comerciales a gran escala. Además, en el estudio se menciona que los cultivos de especies aisladas de aguas del Ártico, se expusieron a condiciones de 10°C más que las que las mismas experimentan en su hábitat natural, esto para aclimatarlas a temperaturas ligeramente más altas. Lo anterior, considerando el uso de las microalgas para su producción al exterior, en la que las mismas deben tener un buen crecimiento a altas y bajas temperaturas.

5.3.5. Parámetros fisicoquímicos dentro de las columnas de cultivo

Las temperaturas e irradiancias que se registraron en el interior de las columnas fueron menores en comparación con las del exterior. En cuanto a la temperatura, la variación fue de 10°C, y la irradiancia, el máximo valor fue de 358 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Este último valor fue disminuyendo conforme avanzaban los días de cultivo, debido al aumento en la concentración celular, lo que evitaba el ingreso de luz hasta el centro de la columna e implicó un incremento en la reflexión y refracción de la luz (Cuadro 9 y Figura 12).

Según López-Fuerte et al. (2016), *Nanofrustulum shiloi* es una diatomea bentónica, sin embargo, debido a su pequeño tamaño puede permanecer suspendida en la columna de agua por largos períodos. En el presente estudio fue de gran importancia utilizar el sistema de aireación constante para permitir la mezcla del cultivo y asegurar el acceso de luz a toda la columna. Esto porque las células tendían a formar agregados en la superficie (lo que podía provocar autosombreado) y a sedimentarse en el fondo de las columnas.

En este estudio no fue posible determinar si existió afectación a las células por la exposición a altas irradiancias, ya que, en ciertos casos, cuando las células se encuentran en estas condiciones se produce la fotoinhibición, que provoca pérdidas en la eficiencia fotosintética y en la productividad, situación que suele ocurrir en las principales horas del día en cultivos en exteriores. Para evitar que se llegue a este punto es importante que el cultivo posea alta concentración celular, para que se utilice con mayor eficiencia la luz incidente. Además, emplear sistemas de mezcla óptimos para permitir un acceso periódico a todas las células (Hernández-Pérez & Labbé, 2014).

Por otra parte, las altas temperaturas que se alcanzan en los cultivos en exteriores, pueden causar estrés térmico, llevando a un aumento de la respiración celular y por ende inhibición del crecimiento. Por lo que en algunos casos, para mantener la temperatura óptima de crecimiento, se deben emplear termoreguladores, o bien realizar acciones como cubrir los estanques o cualquier tipo de sistema de cultivo con plásticos transparentes (Silva Benavides et al., 2013; Hernández-Pérez & Labbé, 2014). En este estudio, al colocar las columnas en el solarío, estaban protegidas por un zarán o malla que evitaba la radiación directa.

Por otro lado, se registraron los valores diarios máximos y mínimos de oxígeno disuelto del cultivo. Estos valores son bastante elevados, siendo el máximo de 30 mg L^{-1} y el mínimo de 14 mg L^{-1} , los cuales representan una sobresaturación de oxígeno disuelto de más del 350% y 150%, respectivamente (considerando una temperatura de 27°C para el cálculo de los porcentajes). En los cultivos microalgales con alta concentración de células fotosintéticamente activas, se suele producir una acumulación de oxígeno generalmente en las principales horas del día, llevando a una sobre saturación del mismo inclusive por encima de 400% (Hernández Reyes et al., 2012). Por consecuente, una ineficiente remoción de este puede causar inhibición de la fotosíntesis, aumento de la fotorrespiración, disminución del crecimiento y productividad, e incluso la muerte por daño oxidativo. Hernández-Pérez y Labbé (2014), afirman que a una saturación de oxígeno del 300% se da una reducción del 25% en la productividad microalgal.

Según Montes González (2014), diferentes autores afirman que concentraciones de oxígeno superiores al 100% de saturación inhiben el proceso fotosintético. Sin embargo, también menciona que, según otros investigadores, existen especies de microalgas en las que la fotosíntesis se inhibe con concentraciones de 120% y hasta de 200%, por lo que concluye que la tolerancia al oxígeno es especie específica.

En cultivos microalgales en exteriores, la remoción del oxígeno producido es un proceso de gran importancia para evitar pérdidas en la productividad de la biomasa. La estrategia para realizarlo depende del sistema de cultivo o el biorreactor que se vaya a utilizar. El diseño de este último debe contemplar un flujo idóneo, un adecuado intercambio gaseoso y en el caso de los biorreactores tubulares, como el utilizado en este estudio, el diámetro debe ser de aproximadamente 10 cm. Además, otra opción para eliminar el exceso de oxígeno es

emplear etapas de aireación tipo *airlift*, el cual proporciona un flujo de aire que mantiene en movimiento al cultivo y permite un muy buen intercambio gaseoso (García Cubero, 2014; Paladino & Neviani, 2020).

En este estudio, por las altas concentraciones de oxígeno obtenidas, se podría suponer que las células realizaban fotorrespiración en lugar de fotosíntesis. Sin embargo, no es posible afirmar esta información, ya que no se cuenta con datos que respalden el punto de saturación de oxígeno máximo que *Nanofrustulum shiloi* puede tolerar. Por lo que sería necesario realizar estudios comparativos con diferentes niveles de saturación de oxígeno disuelto, así como mediciones con indicadores de estrés y daño oxidativo en las células. Sin embargo, en caso de que estas concentraciones obtenidas sí dañasen a nivel celular, se podrían hacer mejoras en el proceso productivo como una reducción en el diámetro de las columnas y un sistema de aireación que generase mayor turbulencia (Guerrero Cazorla, 2017; Marín Camacho, 2018).

Por otra parte, el pH del cultivo se logró mantener entre 8.2 y 9.1 debido a las adiciones diarias de CO₂. Según Montes González (2014), el pH óptimo al que deben mantenerse los cultivos microalgales es de entre 7 y 8.5. Valores fuera del rango óptimo de cada especie pueden generar inconvenientes en el transporte de nutrientes a través de la membrana celular, causando cambios en la composición bioquímica y el descenso en la productividad (Hernández-Pérez & Labbé, 2014; Pérez et al., 2017). Además, aparte de controlar el pH, el adicionar el CO₂ como gas puro o mezclado con una corriente de aire, genera cambios en la productividad de los cultivos masivos de microalgas, ya que suministra carbono inorgánico para la fotosíntesis (Hernández Reyes et al., 2012).

El suministro de CO₂ para el cultivo de microalgas es primordial ya que es uno de los factores necesarios para iniciar el proceso fotosintético. Sin embargo, no todas ellas responden igual, un ejemplo es la diatomea *Chaetoceros gracilis* la cual también se ha cultivado exitosamente en condiciones al exterior, sin embargo, las concentraciones de biomasa fueron de 224 mg L⁻¹ cuando se le suministró aire y 208 mg L⁻¹ al agregar aire más CO₂. Estos datos, aunque similares a los encontrados para *Nanofrustulum shiloi* en esta investigación (300 mg L⁻¹), reflejan que es necesario emplear métodos de monitoreo de CO₂

más precisos, ya que determinadas concentraciones pueden desencadenar un proceso inhibitorio del crecimiento (Pérez et al., 2017).

En cuanto a la salinidad del cultivo, se registraron valores alrededor de 37 UPS todos los días. Según Woelfel et al. (2014), quienes cultivaron a *Nanofrustulum shiloi* a diferentes salinidades, esta diatomea posee un amplio rango de tolerancia a la salinidad, por lo que fue clasificada como eurihalina. Dicha característica es de suma importancia en especies que se cultivan en exteriores, ya que pueden presentarse fluctuaciones en la salinidad del medio de cultivo debido a la evaporación o la lluvia. Además, el uso de agua salada reduce el riesgo de contaminación por otras especies (Fon-Sing & Borowitzka, 2016).

5.3.6. Composición bioquímica de *Nanofrustulum shiloi*

La mayor parte del contenido orgánico de la diatomea estuvo representada por las proteínas, tanto en el día 0 como en el 7. Además, hubo más cantidad de lípidos que carbohidratos en el día 0, aunque, en el día 7 estos dos componentes obtuvieron valores muy similares. Estas biomoléculas pueden variar a nivel celular como respuesta a los cambios en las condiciones ambientales y de cultivo, debido a la capacidad de las microalgas para llevar a cabo cambios programáticos en el uso del carbono fotosintético (Wang et al., 2012).

5.3.6.1. Proteínas totales

El análisis del contenido de proteínas como porcentaje de peso seco mostró un ligero aumento, pasando de un 24% a un 27%. Lo anterior demuestra que el desarrollo del cultivo en condiciones no controladas no afectó la síntesis proteica, sin embargo, si se desea obtener biomasa con mayores porcentajes, pueden realizarse mejoras en el sistema y metodología de cultivo, por ejemplo evaluar distintas concentraciones de nitrógeno y tiempos de cosecha (Wang et al., 2012).

La producción de proteínas en microalgas está determinada principalmente por la cantidad de nitrógeno disponible en el medio de cultivo. Generalmente, el aporte nitrogenado que más se utiliza es el de amonio (NH_4^+), ya que su incorporación y utilización requiere de un menor gasto metabólico al no tener que reducir la molécula para realizar la biosíntesis de aminoácidos (Jiménez Varela, 2016). En el presente estudio se utilizó el fertilizante agrícola Fertiplus® de la casa comercial AGROformuladora Delta' S. A. de C. V., como medio de

cultivo, el cual es una fuente de macro y micronutrientes. Sin embargo, en la etiqueta del producto no se da información sobre la forma en la que se encuentra el nitrógeno que contiene (AGROformuladora Delta', 2020).

En adición a lo anterior, algunos autores mencionan que aparte de suficientes concentraciones de nitrógeno en el medio, altos niveles de irradiancia y largos fotoperiodos ayudan a incrementar el contenido de proteína en algunas microalgas (Wang et al., 2014).

El consumo y partición de los nutrientes varía con la especie, en algunos casos el cultivo de microalgas en condiciones al exterior no produce ningún efecto sobre el contenido de proteínas. Tal es el caso del estudio realizado con la diatomea *Phaeodactylum tricornutum*, la cual se cultivó tanto dentro como fuera del laboratorio y en diferentes tipos de biorreactores. En el mismo no se encontraron diferencias significativas en el contenido de proteínas, hecho que los autores mencionan pudo haber ocurrido porque los roles estructurales y el uso de la energía rápida en las células de esta diatomea, no son afectados por las condiciones del cultivo (Santos-Ballardo et al., 2016).

Por otra parte, a pesar del aumento en el contenido de proteínas en *Nanofrustulum shiloi*, los porcentajes son bajos respecto a otras microalgas que son utilizadas en cultivos a gran escala. Algunas de ellas son capaces de producir hasta 30-60% del peso seco solamente de proteínas, lo que las hace excelentes candidatas para fertilizantes orgánicos, alimento animal y nutrición humana. Sin embargo, en ciertas ocasiones se pueden realizar modificaciones en el proceso productivo dependiendo de los fines para los que se cultive la microalga. Por ejemplo, si se desea obtener biomasa con más proteína, la cosecha del cultivo se debe realizar en la fase exponencial del crecimiento, antes de que el nitrógeno empiece a acabarse (Wang et al., 2012).

5.3.6.2. Carbohidratos totales

El sistema de cultivo y las condiciones favorecieron la síntesis de carbohidratos, ya que se presentó un aumento significativo en el contenido de estos, pasando de 13% en el día 0 a 20% en el día 7.

Generalmente, en un cultivo microalgal el aumento en el porcentaje de carbohidratos se relaciona con condiciones de estrés como altas irradiancias o deficiencia de nutrientes

como el nitrógeno. En estos casos se acumulan carbohidratos o lípidos de reserva, ya que las vías anabólicas tienden a producir en mayor parte estas biomoléculas antes que proteínas (Wang et al., 2012). Sin embargo, el aumento en los carbohidratos reportado en este estudio pudo estar más relacionado con la adición constante de CO₂, ya que no hubo disminución en las proteínas que demostrara la limitación de nitrógeno. El CO₂ suministrado para controlar el pH, es además una fuente de carbono inorgánico, fundamental para el crecimiento, fotosíntesis y por ende para la formación de carbohidratos (Cota, 2019).

Según García Cubero (2014), cuando la finalidad de un cultivo en exteriores es obtener biomasa microalgal con mayor contenido de carbohidratos, lo ideal es emplear una microalga con altas tasas de fijación de CO₂ y que además, las condiciones fluctuantes de irradiancia y temperatura ambiental no afecten dicha tasa. De esta forma, las microalgas con esta capacidad son mejores candidatas para la producción de carbohidratos tanto de reserva como estructurales, importantes en el campo de la alimentación humana y animal, así como materia prima para la generación de etanol y combustibles.

5.3.6.3. Cenizas

El porcentaje de cenizas disminuyó de un 44% en el día 0 a un 19% en el día 7, valores altos característicos de las diatomeas, como se discutió anteriormente en el apartado: 5.3.3. Peso seco total (PST), orgánico (PSO) e inorgánico (PSI) (cenizas) y parámetros de productividad.

Las altas concentraciones de cenizas en cultivos representan algunas desventajas del uso de diatomeas como materia prima para producción comercial. La constante adición de sílice eleva los costos de producción, genera impactos ambientales y la ceniza resultante reduce la calidad de la biomasa final, lo que afecta la composición de los coproductos que se elaboren (Silva Benavides et al., 2013; Huntley et al., 2015) . Además, al utilizarlas como alimento, pueden incrementar el contenido inorgánico en el organismo receptor, como en el caso del estudio realizado por Kiron et al. (2012). En el mismo se reporta un incremento significativo de cenizas en camarones alimentados con harina de microalga, específicamente de *Nanofrustulum shiloi*.

Sin embargo, a pesar de estas desventajas, se ha estudiado en algunas diatomeas la capacidad de la frústula para adaptarse a condiciones de alta irradiancia, ya que funciona como protección contra la radiación ultravioleta. Esto las hace candidatas prometedoras para cultivos en exteriores. Además, se ha demostrado que los requerimientos de sílice varían de acuerdo a la especie, por lo que lo ideal sería elegir diatomeas que no requieran grandes cantidades de sílice en el cultivo y así disminuir los efectos negativos mencionados anteriormente (Ellegaard et al., 2016; Steinrücken, 2018).

5.3.6.4. Pigmentos

El aumento en la concentración total de pigmentos pasando de 1.1 a 2.2 mg L⁻¹ puede deberse a la respuesta de la diatomea a las altas irradiancias y temperaturas a las que estuvo expuesta. En condiciones de estrés por irradiancia, temperatura, salinidad, pH, longitud de onda de luz y disponibilidad de nutrientes, las células son más susceptibles a la fotooxidación, por lo que se activan ciclos de fotoprotección en los que varía el contenido de pigmentos accesorios para evitar el daño oxidativo al aparato fotosintético. Además, pueden variar tanto los pigmentos fotoprotectores como los fotosintéticos (Begum et al., 2016).

Entre los pigmentos encontrados, los que obtuvieron un mayor porcentaje respecto al total fueron la clorofila *c*, la clorofila *a* y la fucoxantina, la cual tuvo una disminución significativa entre los días de cultivo. Los investigadores Sahin et al. (2017), mencionan que las diatomeas poseen un gran número de genes para la producción de proteínas asociadas a la fucoxantina, clorofila *a* y *c* en condiciones de estrés por altas irradiancias. Los mismos autores mencionan que la proporción de fucoxantina es un indicador del nivel de estrés lumínico, por lo que puede ser usado para determinar en qué condiciones la diatomea está bajo saturación de luz. Esto puede explicar la disminución en el porcentaje de fucoxantina en el presente estudio, como resultado de la aclimatación a la alta irradiancia.

Estos cambios en la concentración de pigmentos, específicamente de fucoxantina, se reportaron para *Nanofrustulum shiloi* en la investigación realizada por Sahin et al. (2019). En la misma se obtuvo una concentración máxima del pigmento al cultivar la diatomea en un medio rico en hierro y nitrógeno, y una mínima en limitación de dichos nutrientes. Por lo que los autores mencionan que estas condiciones del medio favorecen mayormente la producción de pigmentos fotosintéticos en comparación con los fotoprotectores.

En la investigación realizada por Sahin et al. (2017), se cultivó a *Nanofrustulum shiloi* en condiciones controladas y se evaluó el efecto de diferentes irradiancias (30 y 300 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en la concentración de fucoxantina. Se encontró una concentración máxima de este pigmento a una irradiancia de 30 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Lo que reafirma la información anterior sobre la relación inversa entre la concentración de fucoxantina y el nivel de irradiancia.

En el caso de cultivos desarrollados en exteriores, las microalgas deben enfrentar las condiciones fluctuantes del ambiente, en especial los cambios en la irradiancia durante el día. Los mecanismos fotoprotectores les permiten aclimatarse dependiendo de la concentración de la biomasa, la velocidad de mezcla del cultivo y la profundidad que provea el sistema de cultivo. Torzillo et al. (2012) evaluaron esta aclimatación con la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* en fotobiorreactores cerrados y en estanques, ambos expuestos a las condiciones ambientales. Se observó una mayor activación de ciclos de fotoprotección en los cultivos en fotobiorreactores y con menor concentración celular, en comparación con los estanques. En estos hubo mejor aclimatación, debido a una menor presión de excitación lumínica, en parte por una mayor profundidad y capacidad de captación de luz en condiciones de baja iluminación.

Por otra parte, en el presente estudio se encontraron moléculas resultantes de procesos oxidativos de pigmentos, como los diadinocromos. Estos son epoxicarotenoides derivados de la diadinoxantina, producida como mecanismo fotoprotector durante uno de los ciclos de las xantofilas llamado ciclo de la diadinoxantina. Pueden generarse en la microalga de manera natural, o bien durante el proceso de extracción de los pigmentos. Se ha demostrado que los diadinocromos poseen actividad citotóxica sobre células de cáncer cervical y líneas celulares de tumor de ratón, y apoptótica sobre células de cáncer de colon (Gagez et al., 2012; Haguét et al., 2017; Kilimnik et al., 2016).

También se identificaron numerosos picos correspondientes a productos resultantes de la degradación de la clorofila, como lo son los feoforbidos. Estos se generan debido a la oxidación acelerada de la molécula de clorofila *a* por exposición a ácidos, oxígeno y luz (Begum et al., 2016). Los hallados en este caso en *Nanofrustulum shiloi* pudieron ser resultado de las condiciones de alta irradiancia en el exterior, o bien del proceso de extracción

y cuantificación de pigmentos de la muestra en el laboratorio. Los feofórbidos en ciertas concentraciones son tóxicos para los seres humanos y animales, sin embargo se han realizado estudios en los que se demuestra también la actividad anticancerígena en líneas celulares de diferentes tipos de cáncer (Bui-Xuan et al., 2010; Myounglae et al., 2014; Singh et al., 2017).

Además, se registró la presencia y aumento del pigmento anteraxantina, intermediario en otro ciclo de las xantofilas llamado ciclo de la violaxantina. Este ciclo, en el cual la violaxantina es de-epoxidada a anteraxantina y esta a zaexantina, no se lleva a cabo comúnmente en diatomeas. Sin embargo, se ha demostrado que períodos prolongados de alta irradiancia inducen a este ciclo en microalgas que poseen también el ciclo de la diadinoxantina. Además, en las diatomeas los pigmentos del ciclo de la violaxantina son intermediarios en la síntesis de carotenoides de novo, especialmente la violaxantina como precursor de diadinoxantina y fucoxantina. Algunos estudios demuestran que la anteraxantina produce efectos en el funcionamiento de células de cáncer de seno, colon y linfoma (Goss et al., 2006; Gagez et al., 2012; Ocampo Álvarez, 2013).

5.3.6.5. Lípidos totales

A pesar de las altas irradiancias y temperaturas a las que estuvo expuesto el cultivo, no se registró un aumento significativo en el contenido de lípidos, ya que el porcentaje pasó de 17% en el día 0 a 19% en el día 7. Estos porcentajes son menores en comparación con los reportados por Demirel et al. (2016) para *Nanofrustulum shiloi*, los cuales fueron de 23 y 24%. Sin embargo, estos son producto de un cultivo desarrollado por 15 días, en condiciones controladas y utilizando el medio de cultivo F/2.

Por otra parte, Sahin et al. (2019), sometieron a diferentes concentraciones de hierro y nitrógeno a *Nanofrustulum shiloi*, para evaluar las variaciones producidas. Como resultado obtuvieron que el mayor contenido de lípidos, el cual fue de 37%, se produce en cultivos con medio BG11 y rico en hierro. Además, reportaron un 28% de lípidos en los cultivos desarrollados en medio BG11 con deficiencia de nitrógeno. Según los autores, aunque la limitación de nitrógeno es una de las estrategias más empleadas para estimular las altas concentraciones de lípidos en cultivos microalgales, en *Nanofrustulum shiloi* tiene menor impacto que suplir altas concentraciones de hierro. Esto se debe a que el estrés provocado

por metales traza como el hierro, puede provocar la formación de compuestos oxidantes, lo que induce a una mayor síntesis de lípidos para contrarrestar el daño causado.

El bajo contenido de lípidos obtenido en este estudio, respecto a lo reportado anteriormente para *Nanofrustulum shiloi*, aunque en condiciones controladas, pudo deberse a que, según el tiempo de cultivo empleado, en el día 7 la diatomea iniciaba apenas su fase estacionaria. En adición a esto, según Wang et al. (2012) la mayor cantidad de lípidos se produce en la fase estacionaria, cuando el nitrógeno comienza a agotarse y el flujo de carbono es redirigido a la producción de lípidos en lugar de sintetizar proteínas.

Los cambios en el contenido lipídico de las microalgas, generalmente son asociados a condiciones de estrés. Las altas irradiancias, temperaturas extremas y deficiencia o altas concentraciones de determinados nutrientes, pueden inducir a un intenso incremento en la producción de lípidos en las células. Estos actúan como reservas de energía para la escasez de nutrientes y los cambios de temperatura no controlados, muy comunes por ejemplo en cultivos en exteriores (Sato et al., 2014; Santos-Ballardo et al., 2016).

5.3.6.6. Ácidos grasos

El total de ácidos grasos (TAG) aumentó significativamente desde el día 0 con un 1% a un 2% en el día 7. Estos porcentajes estuvieron compuestos en su mayoría por ácidos grasos altamente insaturados (AGAI) en el día 0 y por ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) en el día 7 (Figura 14). En cultivos microalgales desarrollados en exteriores, el aumento de AGS y AGMI se presenta generalmente como respuesta celular a los altos niveles de irradiancia y a las altas temperaturas, como las reportadas en el presente trabajo. En estas condiciones, las microalgas incrementan la síntesis de AGS para mantener la rigidez de la membrana plasmática. Además, este grupo de ácidos grasos son menos susceptibles a la degradación y a la oxidación, procesos que pueden ocurrir también por estrés de limitación o altas concentraciones de nutrientes (Hernández, 2016; Jiménez Varela, 2016; Steinrücken et al., 2017).

En un estudio realizado por Sahin et al. (2019) se desarrolló el cultivo de *Nanofrustulum shiloi* en condiciones controladas y utilizando el medio BG11. En este se reportó un mayor porcentaje de AGS (64%) y un porcentaje bajo de AGPI (5%) en

comparación con los obtenidos en el presente estudio. Además, reportaron también una acumulación de AGS y AGMI, así como una disminución en los AGPI, como resultado de su cultivo bajo altas irradiancias. Los autores mencionan que más del 90% del total de ácidos grasos de esta diatomea está representado por los AGS y los AGMI, tanto en su cultivo en condiciones estándar, como en condiciones de estrés por nutrientes como el hierro y el nitrógeno. También, se menciona en este mismo estudio un incremento del porcentaje de AGPI al cultivar a *Nanofrustulum shiloi* en deficiencia de hierro.

Las condiciones de cultivo que se empleen, o la latitud de las que se aíslen y a las que se cultiven determinadas especies, dependerán de los fines para los que se desee utilizar los subproductos de las mismas. Por ejemplo, si se desea obtener biomasa para la producción de biodiesel, las microalgas con alto porcentaje de AGS y AGMI son las más promisorias (Sahin et al., 2019). Además, si el objetivo es la búsqueda de nuevas especies para uso en alimentación animal o humana, las microalgas con alto contenido de AGPI y AGAI representan las mejores opciones (Zupo et al., 2018).

Por otra parte, en el perfil de ácidos grasos de *Nanofrustulum shiloi* se identificaron 20 diferentes, de los cuales cuatro resultaron representar los mayores porcentajes relativos del total de ácidos grasos (ácidos palmítico, palmitoleico, araquidónico y eicosapentaenoico) tanto en el día 0 como en el día 7 (Cuadro 12). En comparación con estos resultados, Sahin et al. (2019) reportan un total de 14 ácidos grasos para *Nanofrustulum shiloi*, algunos de ellos no detectados en cultivos ricos o deficientes de nitrógeno o hierro. Los ácidos grasos con los porcentajes más altos fueron el palmítico, esteárico, oleico, palmitoleico, linoleico y linolénico; todos encontrados también en el presente estudio. Además, en cuanto a los AGAI, no reportaron la presencia del ácido araquidónico (ARA) y cuantificaron porcentajes bastante bajos del ácido eicosapentaenoico (EPA) (2-6%) en comparación con calculados en esta investigación.

Por otra parte, Steinrücken et al. (2017), como parte de un estudio para la búsqueda de microalgas como fuente de AGAI, publicaron la presencia de aproximadamente 12 ácidos grasos que representan más del 2% del TAG para *Nanofrustulum shiloi*. Además, un alto porcentaje de los ácidos palmítico y palmitoleico, y la ausencia del ácido docosahexaenoico (DHA), al igual que en este estudio. También encontraron un porcentaje de EPA de 8% del

TAG en la fase exponencial del cultivo y un 5% en la fase estacionaria, así como un aumento del ARA entre estas dos fases.

Además, se ha reportado para otra microalga del género *Nanofrustulum* también la presencia de los ácidos grasos palmítico, palmitoleico, ARA y EPA. En este sentido, los investigadores elaboraron una harina de la diatomea como potencial suplemento alimenticio animal. Esta harina como producto final contenía los ácidos grasos mencionados anteriormente y otros 4 en mayor cantidad (Kiron et al., 2012).

Los resultados encontrados en este estudio y según la información de otras investigaciones, *Nanofrustulum shiloi* podría ser una posible candidata para la producción de biodiesel. Los altos porcentajes de ácidos grasos de 14-18 carbonos, permiten obtener biodiesel de alta calidad (Sato et al., 2014; Gil, 2015; Pérez et al., 2017) . Además, podría considerarse como opción para uso en suplementos alimenticios, debido a la capacidad para producir alto contenido de los ácidos grasos esenciales ARA y EPA. Estos son importantes en muchos procesos, entre ellos la prevención de enfermedades cardíacas y respuestas inmunológicas y hormonales (Rivera & Botero, 2009; Gil, 2015; Steinrücken et al., 2017).

Por otro lado, un reciente estudio reveló la presencia de compuestos como aldehídos poliinsaturados y derivados oxigenados de ácidos grasos (llamados oxilipinas) en *Nanofrustulum shiloi*. Estos compuestos afectan el crecimiento de diatomeas, el desarrollo y reproducción de varios invertebrados marinos, e inclusive activan la muerte en líneas celulares de cáncer humano. Tales hallazgos son de gran importancia debido a las aplicaciones que pueden tener estos metabolitos y a los pocos estudios publicados para esta diatomea (Ruocco et al., 2018).

En cuanto a la suma de los ácidos grasos $\omega 3$ y $\omega 6$ de *Nanofrustulum shiloi*, resultaron con mayor porcentaje relativo los $\omega 3$, mismos que disminuyeron significativamente entre los días de cultivo, debido principalmente a la reducción de EPA. Las microalgas con altos contenidos de ácidos grasos $\omega 3$ son foco de interés en el área de la biotecnología, ya que representan una fuente alternativa de estos metabolitos, en comparación con los comúnmente utilizados aceites de pescado. Estos ácidos grasos presentan una alta demanda debido a los múltiples beneficios que proveen tanto para la salud humana como animal. Sus efectos

positivos se reflejan en la función cerebral, sistema nervioso y cardiovascular, crecimiento y desarrollo en bebés, afecciones inflamatorias, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, lupus, asma, entre otros (Adarme-Vega et al., 2012).

Por otra parte, se obtuvo una mayor relación de ácidos grasos $\omega 3/\omega 6$, la cual disminuyó entre los días de cultivo pasando de 3.2 a 2.3. Además, la relación $\omega 6/\omega 3$ pasó de 0.3 a 0.4. Estas relaciones son de importancia en cuanto al valor nutricional de la diatomea. Diversas investigaciones mencionan que debe existir un equilibrio en la proporción de ambos grupos de ácidos grasos en la dieta. Por lo general, altas cantidades de AGAI $\omega 6$ y altas proporciones $\omega 6/\omega 3$ promueven la patogénesis de diferentes enfermedades, mientras que el incremento de AGAI $\omega 3$ ejerce efectos supresores sobre las mismas. Es conveniente que exista una mayor relación $\omega 3/\omega 6$, por lo que generalmente se recomienda que esta no sea mayor a 1-2 (Simopoulos, 2002; Valenzuela et al., 2011).

5.4. Conveniencia de cultivo masivo y posible uso en la acuicultura

En cuanto al análisis de la tasa de crecimiento, no se obtuvieron resultados tan promisorios. Según Steinrücken et al. (2017), una tasa de crecimiento alta es $\geq 0.7 \text{ d}^{-1}$, valor lejano a los obtenidos en esta ocasión para *Nanofrustulum shiloi*, los cuales no superaron los 0.27 d^{-1} . Sin embargo, existen diferentes investigaciones en las que se recomienda el uso en cultivos a gran escala de otras microalgas con tasas de crecimiento similares a la de este estudio (Gil, 2015; Pérez et al., 2017; Santos-Ballardo et al., 2016).

Por otra parte, un alto rendimiento y una mayor productividad resultan en una mayor obtención de biomasa por unidad de volumen de cultivo, aspecto que representa uno de los principales objetivos de la producción en masa de microalgas. En este estudio, ambos parámetros resultaron bajos si se les compara con especies comúnmente utilizadas a gran escala. Se obtuvo un rendimiento de 322 mg L^{-1} y una productividad de $46 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Sin embargo, otros investigadores han obtenido valores similares a estos, como en el caso de Pérez et al. (2017), quienes cultivaron y escalaron las diatomeas *Chaetoceros gracilis* y *Skeletonema costatum* con el fin de evaluar su potencial para la obtención de biomasa. Los mismos utilizaron también un sistema de columnas de 80 L, expuesto a condiciones ambientales y obtuvieron rendimientos de aproximadamente $208\text{-}224 \text{ mg L}^{-1}$ y

productividades de 23-26 mg L⁻¹ d⁻¹ y concluyeron que ambas microalgas son factibles para la producción en masa.

En adición a la información anterior, es importante considerar la experimentación con diferentes condiciones de cultivo que permitan obtener mejores rendimientos y mayor productividad en exteriores. En este sentido, en el presente estudio se han discutido anteriormente diferentes acciones que se podrían llevar a cabo, entre ellas la modificación del diámetro y material de las columnas de cultivo, emplear un mejor sistema de agitación, evaluar distintas concentraciones de nutrientes como hierro y nitrógeno, emplear otras opciones de fertilizantes agrícolas como medio de cultivo y evaluar distintos tiempos de cosecha.

Según Pérsico et al. (2011), una vez hechas las investigaciones, se debe establecer un protocolo, rutina o metodología estandarizada, la cual debe ser cumplida rigurosamente, de manera que los resultados puedan reproducirse y llevar a cabo un escalamiento exitoso. De esta manera, se podrán encontrar patrones de respuesta a los factores ambientales, determinar las causas de eventuales variaciones e implementar nuevas operaciones.

Por otra parte, el desarrollo del cultivo de *Nanofrustulum shiloi* en el exterior fue exitoso en cuanto a su composición bioquímica, la cual no reflejó grandes afectaciones por el estrés de las condiciones ambientales fluctuantes. El cultivo permaneció en constante crecimiento, mostrando además una constante coloración fuerte producto de su contenido de fucoxantina, inclusive hasta el día de su cosecha. Además, se demostró la capacidad de *Nanofrustulum shiloi* para adaptarse a grandes cambios de irradiancia, temperatura y altas concentraciones de oxígeno. Gracias a estos resultados, es posible mencionar que esta diatomea es de fácil cultivo y posee un amplio rango de tolerancia, lo que coincide con la información publicada por diferentes autores, entre ellos López-Fuerte et al. (2016) y Woelfel et al. (2014).

Por otra parte, existen diferentes factores de importancia que se consideran en la elección de una o varias cepas de microalgas para ser utilizadas en la acuicultura. Entre estos factores se encuentra un tamaño celular apropiado, alta tasa de crecimiento, buen valor nutricional, alta digestibilidad, ausencia de sustancias tóxicas, así como tolerancia a

condiciones de cultivo bajo techo y al exterior (Sánchez-Estudillo, 2011; Carrera et al., 2018). En este caso, la evaluación de un posible uso de *Nanofrustulum shiloi* en la acuicultura se realizó únicamente de manera teórica, comparando con información publicada, por lo que para posteriores investigaciones es de vital importancia realizar las respectivas pruebas con animales.

En cuanto al tamaño celular, según Rodríguez-Núñez et al. (2016) depende del organismo al que se le dará el alimento, para que sea ingerido y digerido adecuadamente. Además, mencionan que, de manera general, un tamaño celular óptimo es de 5-20 μm , por lo que, en el caso de este estudio, el tamaño de *Nanofrustulum shiloi* entra en este rango, ya que se estimó un tamaño de entre 2 y 6 μm . Además, en un estudio realizado por Carrera et al. (2018) se evaluó el potencial de diferentes microalgas para ser usadas en maricultura. En el mismo se menciona que aquellas microalgas que poseen un tamaño intermedio de alrededor de 10 μm , pueden emplearse para la alimentación de larvas de gasterópodos, camarones y peces.

Por otra parte, en cuanto a las principales biomoléculas, *Nanofrustulum shiloi* resultó con un 27% de proteínas, 20% de carbohidratos y un 19% de lípidos. Además, los ácidos grasos EPA y ARA representaron los mayores porcentajes relativos. Estos porcentajes rondan los reportados por Vivanco et al. (2014) para *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros calcitrans*, dos de las microalgas más utilizadas para la alimentación en acuicultura. Estos mencionan un contenido de 32% y 31% de proteínas, 15% y 10% de lípidos y un 25% y 10% de carbohidratos, respectivamente. Además, pusieron a prueba dietas formuladas con estas microalgas y dietas artificiales en el crecimiento y supervivencia de larvas de la almeja *Mulinia edulis*. Concluyeron que obtuvieron los mejores resultados con dietas basadas en microalgas y particularmente con un tratamiento mixto compuesto por ambas microalgas.

Por otra parte, Carrera et al. (2018) reportan y recomiendan en su estudio de bioprospección, otras diatomeas como posibles candidatas para uso en acuicultura. Entre ellas se encuentra *Entomoneis alata* con un porcentaje de proteínas de 27%, 2.2% de carbohidratos y 50% de lípidos. Además, *Plagiotropis lepidoptera* con 26% de proteína, 4% de carbohidratos y 45% de lípidos.

En adición a la información anterior, hoy en día se emplean como alimento microalgas con una composición bioquímica más elevada en comparación con *Nanofrustulum shiloi*. Sin embargo, sus porcentajes son aceptables y es posible realizar más investigaciones con el fin de evaluar incrementos en el valor nutricional al someter los cultivos a diferentes condiciones, como por ejemplo variar las concentraciones de nutrientes como el nitrógeno para obtener más porcentaje de proteínas o lípidos. Además, *Nanofrustulum shiloi* podría utilizarse como alimento proporcionado en dietas mixtas, formulado en conjunto con otras microalgas para complementar el aporte nutricional.

Por otra parte, *Nanofrustulum shiloi* ya ha sido evaluada en diferentes investigaciones como alimento para organismos acuáticos. Tal es el caso del estudio realizado por Kiron et al. (2012) en el que se experimentó con una harina elaborada con *Nanofrustulum shiloi* como sustituto de la proteína de la harina de pescado. El estudio se llevó a cabo en salmones, carpas y camarones, y los objetivos principales fueron determinar si la harina de microalga producía algún efecto sobre el crecimiento de los organismos o bien, cambios en la composición de sus cuerpos en comparación con el tratamiento control. Los resultados mostraron que las tres especies aceptaron exitosamente las dietas elaboradas con harina de *Nanofrustulum shiloi*, no hubo diferencias significativas en el crecimiento ni rendimiento de las tres especies en comparación con el tratamiento control.

En otro estudio, Zupo et al. (2018) evaluaron el efecto de *Nanofrustulum shiloi* y otras diatomeas bentónicas en el desempeño postlarval, correcto desarrollo, asentamiento de las larvas y supervivencia del erizo de mar *Paracentrotus lividus*. Se utilizaron recipientes con agua marina, inoculados con cultivos de la diatomea para que estas formaran biopelículas que luego serían cosechadas por las postlarvas. El objetivo fue evaluar si las biopelículas formadas por cada diatomea podían inducir la metamorfosis y posteriormente servir como una dieta natural para las postlarvas. Los resultados para *Nanofrustulum shiloi* no fueron promisorios en este caso, ya que mostró una tasa significativamente baja de asentamiento de las postlarvas de erizo.

Ruocco et al. (2018) realizaron hallazgos en cuanto al efecto de la alimentación con *Nanofrustulum shiloi* en la misma especie mencionada en el estudio anterior, el erizo de mar *P. lividus*. En el estudio se alimentaron adultos de la especie con dietas de la microalga

durante un mes. Posteriormente, se evaluó el desarrollo de embriones producidos después de la dieta y se analizaron los tejidos gonadales de los adultos. Finalmente, mediante técnicas enfocadas en la morfología, metabolómica y transcriptómica, los autores demostraron un efecto toxigénico en los embriones producidos por las hembras alimentadas con *Nanofrustulum shiloi*.

Por otra parte, en cuanto a los costos de cultivo, cabe recalcar las ventajas que se obtuvieron con la metodología utilizada para realizar el escalamiento. El uso de energía eléctrica genera uno de los mayores costos de producción en cultivos en los que se deben mantener las condiciones controladas, ya que debe existir un suministro constante e ininterrumpido de irradiancia mediante lámparas de luz blanca, determinada temperatura mediante aires acondicionados, flujo específico de aire mediante bombas eléctricas y se requiere el uso de autoclaves para esterilizar todo el material a utilizar. En el presente estudio, estos costos se lograron reducir durante la etapa de escalamiento en aproximadamente un 80% (Cuadro 15), ya que al cultivar bajo condiciones ambientales se dependía de la electricidad únicamente para el bombeo del agua marina y para el sistema de aireación. Además, el cultivo se expuso a la temperatura ambiental y con la óptima ubicación de las columnas en el solarío, se logró aprovechar la luz natural (Figura 2).

Por otra parte, se logró una reducción de los costos al utilizar el fertilizante agrícola como medio de cultivo. Este presentó una diferencia de precio de \$45 en comparación con el medio F/2 en su presentación lista para usar y una diferencia aún mayor de más de \$161 si se compara con el costo de los reactivos químicos si estos se compran por aparte para elaborar este medio en el laboratorio. Esta reducción de costos es comprobada por diferentes autores, entre ellos Silva-Benavides (2016), quien asegura que el emplear fertilizantes agrícolas como medio de cultivo para microalgas representa una de las mayores ventajas económicas del proceso, ya que aportan gran cantidad de los nutrientes necesarios para generar altos rendimientos y productividades y pueden diluirse a las concentraciones deseadas para utilizarlos en cultivos masivos.

Otra ventaja fue la disponibilidad de agua marina para cultivar la diatomea, ya que se evitó el uso de agua dulce para fines de investigación, aspecto importante que se debe considerar especialmente en zonas áridas y semiáridas o con problemas de escasez. Se

utilizaron aproximadamente 400 L de agua marina para uso en los cultivos y 50 L para lavado de materiales. De estos 400 L, el 94% se desinfectó con cloro comercial, por lo que se evitó el uso de técnicas dependientes de energía eléctrica, por ejemplo, la radiación con lámparas ultravioleta. Esta cloración es una opción viable para el proceso de esterilización del medio. Según Pérsico et al. (2011), resulta efectivo en la reducción de otros microorganismos y la mayor inversión se debe hacer al adquirir el tiosulfato de sodio que se utiliza en pocas cantidades en la neutralización, por lo que puede ser utilizado en múltiples investigaciones.

Por otra parte, se utilizaron materiales que pueden ser reutilizados debido a su larga vida útil. Los garrafones en los que se establecieron los cultivos a 14 L son envases reutilizados luego de ser adquiridos con agua potable para consumo humano. En el caso de las columnas de policarbonato, estas tienen un costo de más de \$600 cada una, sin embargo, pueden funcionar por más de 20 años. Los sensores de temperatura e irradiancia tienen un costo aproximado de \$70.04 cada uno y pueden utilizarse por años con un adecuado mantenimiento y cambio de baterías, son sumergibles, fáciles de manejar y prácticos para su instalación.

Otro aspecto del proceso de cultivo fue el cosechado de la biomasa. *Nanofrustulum shiloi*, al ser una diatomea bentónica, sedimentó en el fondo de las columnas con gran rapidez, lo que hizo posible una separación por decantación. El diseño de las columnas con una llave de escape en el fondo de las mismas permitió extraer más rápido la biomasa. De esta manera se evitó el uso de procesos extra en el cultivo a gran escala, como por ejemplo la centrifugación. Sin embargo, para posteriores investigaciones con cultivos masivos y si se desea cultivar con fines comerciales, es importante considerar más técnicas para la recuperación de la biomasa microalgal, como la floculación o filtración (García Cubero, 2014).

6. Conclusiones

En próximos estudios con *Nanofrustulum shiloi* es necesario mantener los cultivos por más tiempo e ir graficando y visualizando su curva de crecimiento y determinar claramente cada una de sus fases.

La medida de la densidad óptica del cultivo de *Nanofrustulum shiloi* a una $\lambda=748$ nm, representa una herramienta para estimar la concentración en peso seco de la biomasa en diferentes tiempos de su crecimiento.

El desarrollo del cultivo de *Nanofrustulum shiloi* en condiciones al exterior, no afectó la tasa de crecimiento ni su tiempo de generación. Sin embargo, sí se produjeron cambios en su rendimiento y productividad.

A pesar de las altas variaciones en las condiciones de irradiancia y temperatura, el crecimiento *Nanofrustulum shiloi* se mantuvo en aumento hasta su tiempo de cosecha y no se vio afectada la composición bioquímica.

Nanofrustulum shiloi posee mayor cantidad de los ácidos grasos palmítico (21%), palmitoleico (32%), eicosapentaenoico (17%) y araquidónico (4.2%), respecto a su total de ácidos grasos. Además, posee mayor contenido de clorofila *a* (17%), *c* (39%) y fucoxantina (13%), respecto a su total de pigmentos totales.

Nanofrustulum shiloi es una posible candidata para la producción de biodiesel debido a sus altos porcentajes relativos de ácidos grasos de 14-18 carbonos respecto al total.

Nanofrustulum shiloi posee mayor porcentaje relativo de ácidos grasos $\omega 3$ debido principalmente al alto contenido del ácido eicosapentaenoico, lo que la hace foco de interés para la producción de este metabolito como reemplazo de otros comúnmente utilizados, como por ejemplo los aceites de pescado.

El sistema empleado para el cultivo en condiciones externas de *Nanofrustulum shiloi* resulta económicamente viable para utilizar en su producción a mayor escala en el campo de la investigación y bioprospección. Si se desea producir con fines comerciales, es necesario

tomar en cuenta los costos relacionados con la productividad de la biomasa para calcular la rentabilidad del cultivo.

Es posible el uso de *Nanofrustulum shiloi* en cultivos masivos debido a su amplio rango de tolerancia a las fluctuaciones ambientales, sin embargo, se debe realizar más investigación para determinar las condiciones en las que se obtienen mejores tasas de crecimiento y rendimientos.

Nanofrustulum shiloi podría emplearse como una alternativa de alimento en la acuicultura de acuerdo a su morfología, tamaño y composición bioquímica, sin embargo, es de vital importancia realizar pruebas de digestibilidad y efectos en animales.

La metodología empleada es completamente reproducible en Costa Rica, por lo que podría emplearse para incentivar la bioprospección de nuevos organismos o sus productos en nuestras costas. Por ejemplo, realizar el aislamiento de especies marinas locales y evaluar su potencial acuícola, de manera que no se dependa de fitoplancton importado para alimentar organismos acuáticos.

7. Referencias bibliográficas

- Adarme-Vega, T., Lim, D. K. Y., Timmins, M., Vernen, F., Li, Y., & Schenk, P. M. (2012). Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. *Microbial Cell Factories*, *11*(1), 96. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-96>
- AGROformuladoraDelta'. (2020). *Fertilizante FertiPLUS+ Microelementos*. http://www.agrodelta.com.mx/productos/fu_fertiplus.html
- Ahmad, M. T., Shariff, M., Md. Yusoff, F., Goh, Y. M., & Banerjee, S. (2020). Applications of microalga *Chlorella vulgaris* in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, *12*(1), 328–346. <https://doi.org/10.1111/raq.12320>
- Ansari, F. A., Singh, P., Guldhe, A., & Bux, F. (2017). Microalgal cultivation using aquaculture wastewater: Integrated biomass generation and nutrient remediation. *Algal Research*, *21*, 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.015>
- ARESEP. (2020). *Consulta de tarifas eléctricas*. <https://aresep.go.cr/electricidad/tarifas>
- Arredondo-Vega, B. O., Cordero Esquivel, B., & Voltolina, D. (2017a). Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. En B. O. Arredondo-Vega, D. Voltolina, T. Zenteno Savín, M. Arce Montoya, & G. A. Gómez Anduro (Eds.), *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal* (2nd ed., pp. 44–50). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Arredondo-Vega, B. O., Cordero Esquivel, B., & Voltolina, D. (2017c). Determinación de peso seco y contenido orgánico e inorgánico. En B. O. Arredondo-Vega, D. Voltolina, T. Zenteno Zavín, M. Arce Montoya, & G. A. Gómez Anduro (Eds.), *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal* (2nd ed., pp. 51–54). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Arredondo-Vega, B. O., Cordero Esquivel, B., & Voltolina, D. (2017d). Determinación de

- proteínas por métodos espectrofotométricos. En B. O. Arredondo-Vega, D. Voltolina, T. Zenteno Savín, M. Arce Montoya, & G. Gómez Anduro (Eds.), *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal* (2nd ed., pp. 64–70). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Arredondo-Vega, B. O., Cordero Esquivel, B., & Voltolina, D. (2017b). Determinación de carbohidratos por métodos espectrofotométricos. En B. O. Arredondo-Vega, D. Voltolina, T. Zenteno Savín, M. Arce Montoya, & G. A. Gómez Anduro (Eds.), *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal* (2nd ed., pp. 71–74). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Arredondo-Vega, B. O., & Voltolina, D. (2017). Determinación de pigmentos totales por métodos espectrofotométricos. En B. O. Arredondo-Vega, D. Voltolina, T. Zenteno, M. Arce, & G. Gómez (Eds.), *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal* (2nd ed., pp. 75–85). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Banerjee, S., Ee Hew, W., Khatoon, H., Shariff, M., & Yusoff, F. M. (2011). Growth and proximate composition of tropical marine *Chaetoceros calcitrans* and *Nannochloropsis oculata* cultured outdoors and under laboratory conditions. *African Journal of Biotechnology*, *10*(8), 1375–1383. <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/92946>
- Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2014). *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology* (Second Edition). CRC Press. https://books.google.co.cr/books?id=uazMBQAAQBAJ&pg=PA267&dq=anatomy+of+microalgae&hl=es-419&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=anatomy+of+microalgae&f=false
- Begum, H., Yusoff, F. M., Banerjee, S., Khatoon, H., & Shariff, M. (2016). Availability and utilization of pigments from microalgae. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *56*(13), 2209–2222. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.764841>
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification.

Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 37(8), 911–917.
<https://doi.org/10.1139/o59-099>

Bui-Xuan, N.-H., Tang, P. M.-K., Wong, C.-K., & Fung, K.-P. (2010). Photo-activated pheophorbide-a, an active component of *Scutellaria barbata*, enhances apoptosis via the suppression of ERK-mediated autophagy in the estrogen receptor-negative human breast adenocarcinoma cells MDA-MB-231. *Journal of Ethnopharmacology*, 131(1), 95–103. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2010.06.007>

Bux, F. (2013). *Biotechnological applications of microalgae: biodiesel and value added products*. CRC Press.
https://books.google.co.cr/books?id=PHnNBQAAQBAJ&pg=PA7&dq=microalgae+morphology&hl=es419&sa=X&ved=0ahUKEwj6_jawsvTAhVF4iYKHZHYBSEQ6AEILzAC#v=onepage&q&f=false

Carranza Espinal, E. O., Gómez Portillo, R., & Antonio Martínez, M. (2015). Comparación de tres salinidades para evaluar el crecimiento poblacional de la microalga *Chaetoceros muelleri*. *Revista Ciencia y Tecnología*, 36–49. <https://doi.org/10.5377/rct.v0i16.2178>

Carreón-Palau, L., Cazares Salazar, A., Galván Álvarez, V. A., & Arredondo-Vega, B. O. (2017). Extracción y cuantificación de pigmentos, lípidos y ácidos grasos de microalgas. En B. O. Arredondo-Vega, D. Voltolina, T. Zenteno Savín, M. Arce Montoya, & G. A. Gómez Anduro (Eds.), *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal* (2nd ed., pp. 90–95). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.

Carrera, S., Velasco, L. A., & Barreto-Hernández, A. (2018). Potencial de microalgas bentónicas del Mar Caribe como alimento en maricultura. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 53(3), 321. <https://doi.org/10.22370/rbmo.2018.53.3.1357>

Carvajal-Oses, M., Chacón-Guzmán, J., & Herrera-Ulloa, Á. (2018). Optimización en la producción de la microalga marina *Nannochloropsis oculata* en un fotobiorreactor tubular helicoidal. *Tecnología En Marcha*, 31(2), 117–126. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7438912>

- Castellanos, I. C., González-Peralta, K., & Pinzón-Torres, S. J. (2020). Microalgas como alternativa sostenible para la producción de biodiesel. *Revista Ontare*, 6. <https://doi.org/10.21158/23823399.v6.n0.2018.2425>
- Cota, K. (2019). *Efecto de la limitación de nutrientes en la composición bioquímica de Ettlia oleoabundans y su potencial en la producción de compuestos de alto valor agregado* (Tesis de maestría). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., Baja California Sur, México. <https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1001/1543>
- Cox, E. J. (2011). Morphology, Cell Wall, Cytology, Ultrastructure and Morphogenetic Studies. En Joseph Seckbach & P. Kociolek (Eds.), *The Diatom World* (Vol. 19, pp. 21–45). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-1327-7_2
- Cruz, I. (2019). *Evaluación de microalgas endémicas para el cultivo y enriquecimiento de presas vivas y su aplicación en la primera alimentación de Seriola rivoliana*. (Tesis doctoral). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., Baja California Sur, México. <http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/2960>
- Das, P., Thaher, M. I., Hakim, M. A. Q. M. A., & Al-Jabri, H. M. S. J. (2015). Sustainable production of toxin free marine microalgae biomass as fish feed in large scale open system in the Qatari desert. *Bioresource Technology*, 192, 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.019>
- Demirel, Z., Demirkaya, C., Imamoglu, E., & Dalay, M. C. (2016). Diatom cultivation and lipid productivity for non-cryopreserved and cryopreserved cells. *Agronomy Research*, 14(4), 1266–1273. http://agronomy.emu.ee/wp-content/uploads/2016/05/Vol14_nr4_Demirel.pdf
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350–356.
- Ellegaard, M., Lenau, T., Lundholm, N., Maibohm, C., Friis, S. M. M., Rottwitt, K., & Su, Y. (2016). The fascinating diatom frustule—can it play a role for attenuation of UV

- radiation? *Journal of Applied Phycology*, 28(6), 3295–3306.
<https://doi.org/10.1007/s10811-016-0893-5>
- Faé Neto, W. A., Borges Mendes, C. R., & Abreu, P. C. (2018). Carotenoid production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* in different low-cost culture media. *Aquaculture Research*, 49(7), 2527–2535. <https://doi.org/10.1111/are.13715>
- Falaise, C., François, C., Travers, M.-A., Morga, B., Haure, J., Tremblay, R., Turcotte, F., Pasetto, P., Gastineau, R., Hardivillier, Y., Leignel, V., & Mouget, J.-L. (2016). Antimicrobial Compounds from Eukaryotic Microalgae against Human Pathogens and Diseases in Aquaculture. *Marine Drugs*, 14(9), 159. <https://doi.org/10.3390/md14090159>
- Fernández-Linares, L. C., Guerrero Barajas, C., Durán Páramo, E., & Badillo Corona, J. A. (2017). Assessment of *Chlorella vulgaris* and indigenous microalgae biomass with treated wastewater as growth culture medium. *Bioresource Technology*, 244, 400–406. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.141>
- Fernández Ángel, M. (2013). *Diseño, montaje y caracterización de fotobiorreactores airlift para el cultivo de la microalga Chlorella sorokiniana*. Tesis de grado. Universidad EAFIT, Medellín, Colombia. <https://repository.eafit.edu.co/handle/10784/8219?show=full>
- Fon-Sing, S., & Borowitzka, M. A. (2016). Isolation and screening of euryhaline *Tetraselmis* spp. suitable for large-scale outdoor culture in hypersaline media for biofuels. *Journal of Applied Phycology*, 28(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0560-2>
- Gagez, A.-L., Thiery, V., Pasquet, V., Cadoret, J.-P., & Picot, L. (2012). Epoxycarotenoids and Cancer. Review. *Current Bioactive Compounds*, 8(2), 1–33. <https://doi.org/10.2174/157340712801784787>
- García-Romeral, J., Pavía-Gómez, M., García Sanz, T., Chivirivella-Martorell, J., & Serrano-Aroca, Á. (2017). Principios de Biotecnología y Bioingeniería en el cultivo de microalgas importancia, problemas tecnológicos, tipos y sistemas de cultivos, crecimiento, factores limitantes, selección, aislamiento, escalado y caracterización

- bioquímica. *Nereis: Revista Heroamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación*, 9, 115–130. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6041049>
- García Cubero, R. (2014). *Producción de biomasa de microalgas rica en carbohidratos acoplada a la eliminación fotosintética de CO₂* (Tesis doctoral). Universidad de Sevilla, Andalucía, España. <http://digital.csic.es/bitstream/10261/101928/1/TESIS DOCTORAL RGC.pdf>
- Gil, C. (2015). *Photosynthetic performance and biomass composition of *Chlorella fusca* (Chlorophyta) in thin-layer cascades: Possible biotechnological applications* (Tesis doctoral). Universidad de Málaga, Málaga, España. <https://riuma.uma.es/xmlui/handle/10630/9848>
- Gobierno del Estado de Baja California Sur. (2015). *Baja California Sur*. <http://www.bcs.gob.mx/conoce-bcs/baja-california-sur/>
- Goss, R., Ann Pinto, E., Wilhelm, C., & Richter, M. (2006). The importance of a highly active and Δ pH-regulated diatoxanthin epoxidase for the regulation of the PS II antenna function in diadinoxanthin cycle containing algae. *Journal of Plant Physiology*, 163(10), 1008–1021. <https://doi.org/10.1016/J.JPLPH.2005.09.008>
- Granata, T. (2017). Dependency of Microalgal Production on Biomass and the Relationship to Yield and Bioreactor Scale-up for Biofuels: a Statistical Analysis of 60+ Years of Algal Bioreactor Data. *BioEnergy Research*, 10(1), 267–287. <https://doi.org/10.1007/s12155-016-9787-2>
- Guedes, A. C., Sousa-Pinto, I., & Malcata, F. X. (2015). Application of Microalgae Protein to Aquafeed. En *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances* (pp. 93–125). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00008-X>
- Guerrero Cazorla, E. (2017). *Diseño y puesta a punto de un fotobiorreactor tubular con iluminación LED para cultivo de microalgas* (Trabajo de grado). Universidad de Almería, Almería, España. http://repositorio.ual.es/bitstream/handle/10835/7193/TFG_GUERRERO CAZORLA, ELENA.pdf?sequence=1

- Guillard, R. R. L. (1975). Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. En *Culture of Marine Invertebrate Animals* (pp. 29–60). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9_3
- Guiry, M. D. (2018). *AlgaeBase*. World-Wide Electronic Publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>
- Gupta, P. L., Lee, S.-M., & Choi, H.-J. (2015). A mini review: photobioreactors for large scale algal cultivation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(9), 1409–1417. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1892-4>
- Haguët, Q., Bonnet, A., Bérard, J.-B., Goldberg, J., Joguet, N., Fleury, A., Thiéry, V., & Picot, L. (2017). Antimelanoma activity of *Heterocapsa triquetra* pigments. *Algal Research*, 25, 207–215. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2017.04.034>
- Han, P., Lu, Q., Fan, L., & Zhou, W. (2019). A review on the use of microalgae for sustainable aquaculture. *Applied Sciences (Switzerland)*, 9(11), 2377. <https://doi.org/10.3390/app9112377>
- Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(2), 157–173. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>
- Hernández Acevedo, H., Flores Ramos, L., & Ruiz Soto, A. (2019). Ácidos grasos en cepas de microalgas del Banco de Germoplasma de Organismos Acuáticos del Instituto del Mar del Perú (IMARPE). *Revista Peruana de Biología*, 26(3), 369–378. <https://search.proquest.com/openview/dce2b29c4907af80422d29b18d7ddb43/1?pq-origsite=gscholar&cbl=136066>
- Hernández, F. (2016). *Efecto de la deficiencia de nitrógeno y la radiación uv en la actividad fotosintética y en los compuestos antioxidantes de las cianobacterias Spirulina (Arthrospira) maxima y Phormidium persicinum* (Tesis de maestría). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., Baja California Sur, México. <https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1001/39>

- Hernández Reyes, B. M., Rodríguez Palacio, M. C., Lozano Ramírez, C., & Castilla Hernández, P. (2012). Remoción de nutrientes por tres cultivos de microalgas libres e inmovilizados. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, 3(1), 80–94. <https://www.researchgate.net/publication/260137177>
- Huancollo Chambi, E. Y. (2018). *Evaluación de parámetros de cultivo y análisis de la composición nutricional de la microalga Scenedesmus sp endémica del lago Titicaca en condiciones de laboratorio* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de San Agustín, Arequipa, Perú. <http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/7307>
- Huntley, M. E., Johnson, Z. I., Brown, S. L., Sills, D. L., Gerber, L., Archibald, I., Machesky, S. C., Granados, J., Beal, C., & Greene, C. H. (2015). Demonstrated large-scale production of marine microalgae for fuels and feed. *Algal Research*, 10, 249–265. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.04.016>
- Jiménez Varela, S. (2016). *Aislamiento y caracterización bioquímica de microalgas de Baja California como alternativas para la producción de lípidos* (Tesis doctoral). Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, México. <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/523>
- Jiménez Valera, S., & Sánchez Saavedra, M. (2016). Growth and fatty acid profiles of microalgae species isolated from the Baja California Peninsula, Mexico. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 44(4), 689–702. <https://doi.org/10.3856/vol44-issue4-fulltext-4>
- Kamyab, H., Md Din, M. F., Lee, C. T., Keyvanfar, A., Shafaghat, A., Majid, M. Z. A., Ponraj, M., & Yun, T. X. (2015). Lipid production by microalgae *Chlorella pyrenoidosa* cultivated in palm oil mill effluent (POME) using hybrid photo bioreactor (HPBR). *Desalination and Water Treatment*, 55(13), 3737–3749. <https://doi.org/10.1080/19443994.2014.957943>
- Kaparapu, J. (2018). Application of Microalgae in Aquaculture. *Phykos*, 48(1), 21–26. <https://www.researchgate.net/publication/342096192>
- Kilimnik, A., Kuklev, D. V., & Dembitsky, V. M. (2016). Antitumor Acetylenic Lipids.

- Kiron, V., Phromkunthong, W., Huntley, M., Archibald, I., & Scheemaker, G. (2012). Marine microalgae from biorefinery as a potential feed protein source for Atlantic salmon, common carp and whiteleg shrimp. *Aquaculture Nutrition*, 18(5), 521–531. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2011.00923.x>
- Lamers, P. P., Van de Laak, C. C. W., Kaasenbrood, P. S., Lorier, J., Janssen, M., De Vos, R. C. H., Bino, R. J., & Wijffels, R. H. (2010). Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed *Dunaliella salina*. *Biotechnology and Bioengineering*, 106(4), 638–648. <https://doi.org/10.1002/bit.22725>
- Lan, S., Wu, L., Zhang, D., & Hu, C. (2015). Effects of light and temperature on open cultivation of desert cyanobacterium *Microcoleus vaginatus*. *Bioresource Technology*, 182, 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.002>
- Lee, J. (2011). *Diatoms as Endosymbionts* (pp. 437–464). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-1327-7_20
- Lee, J. J., Reimer, C. W., & McEnery, M. E. (1980). The Identification of Diatoms Isolated as Endosymbionts from Larger Foraminifera from the Gulf of Eilat (Red Sea) and the Description of 2 New Species, *Fragilaria shiloi* sp. nov. and *Navicula reissii* sp. nov. *Botanica Marina*, 23(1), 41–48. <https://doi.org/10.1515/botm.1980.23.1.41>
- Leyva García, D. (2013). *Evaluación del contenido de fenoles totales, lípidos y ensayos de evaluación de la actividad antioxidante en la microalga Phaeodactylum tricornutum mantenida en distintas condiciones de cultivo* (Tesis de maestría). Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, México. <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/618>
- Li, C., Gastineau, R., Turmel, M., Witkowski, A., Otis, C., Car, A., & Lemieux, C. (2019). Complete chloroplast genome of the tiny marine diatom *Nanofrustulum shiloi* (Bacillariophyta) from the Adriatic Sea. *Mitochondrial DNA Part B*, 4(2), 3374–3376. <https://doi.org/10.1080/23802359.2019.1673245>

- López-Fuerte, F., Siqueiros-Beltrones, D., & Yabur, R. (2015). First record of benthic diatoms (Bacillariophyceae and Fragilariophyceae) from Isla Guadalupe, Baja California, Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 86(2), 281–292. <https://doi.org/10.1016/J.RMB.2015.04.016>
- López-Fuerte, F., Lora Vilchis, M., Veleza, L., Siqueiros-Beltrones, D., Arredondo Vega, B., & Virgen Felix, M. (2016). Primeros registros de *Nanofrustulum shiloi* (Lee, Reimer & Mcenery) Round, Hallsteinsen & Paasche y *Nitzschia nienhuisii* Sterrenburg & Sterrenburg (Bacillariophyceae; Ochrophyta) en aguas mexicanas. *CICIMAR Océánides*, 31(1), 35–41. <https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/593/1/Lopez-F.pdf>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biology Chemistry*, 193, 265–275. [http://devbio.wustl.edu/InfoSource/ISPDFs/Lowry 1951.pdf](http://devbio.wustl.edu/InfoSource/ISPDFs/Lowry%201951.pdf)
- Maeda, Y., Yoshino, T., Matsunaga, T., Matsumoto, M., & Tanaka, T. (2018). Marine microalgae for production of biofuels and chemicals. *Current Opinion in Biotechnology*, 50, 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.11.018>
- Malakootian, M., Hatami, B., Dowlatshahi, S., & Rajabizadeh, A. (2015). Optimization of Culture Media for Lipid Production by *Nannochloropsis oculata* for Biodiesel Production. *Environmental Health Engineering and Management Journal*, 2(3), 141–147. https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=2685007
- Marín Camacho, Á. (2018). *Estudio de la producción de Productos Microbiológicos Solubles (SMP) en un cultivo de microalgas bajo condiciones operacionales de estrés* (Tesis de maestría). Universitat Politècnica de València, Valencia, España. <https://riunet.upv.es/handle/10251/114372>
- Martínez-Córdova, L. R., Campaña-Torres, A., Martínez-Porchas, M., López-Elías, J. A., & García-Sifuentes, C. O. (2012). Efecto de medios alternativos sobre la producción y composición proximal de la microalga *Chaetoceros muelleri* como alimento en cultivo del copépodo *Acartia* sp. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 40(1), 169–176.

<https://doi.org/10.4067/s0718-560x2012000100016>

Martínez-Macías, R., Meza-Escalante, E., Serrano-Palacios, D., Gortáres-Moroyoqui, P., Ruíz-Ruíz, P. E., & Ulloa-Mercado, G. (2018). Effect of fed-batch and semicontinuous regimen on *Nannochloropsis oculata* grown in different culture media to high-value products. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 93(2), 585–590. <https://doi.org/10.1002/jctb.5405>

Montes González, O. G. (2014). *Efecto de la intensidad de la luz y de la tasa de inyección de aire en el crecimiento y la productividad de la microalga Nannochloropsis sp., cultivada en un biorreactor plano* (Tesis de maestría). Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, México. <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/121>

Mooij, P. R., De Jongh, L. D., Van Loosdrecht, M. C. M., & Kleerebezem, R. (2016). Influence of silicate on enrichment of highly productive microalgae from a mixed culture. *Journal of Applied Phycology*, 28(3), 1453–1457. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0678-2>

Moreno, J., Medina, C., & Albarracín, V. (2012). Aspectos ecológicos y metodológicos del muestreo, identificación y cuantificación de cianobacterias y microalgas eucariotas. *REDUCA (Biología)*, 5(5). <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/964>

Myounglae, C., Gab Man, P., Su Nam, K., Touseef, A., Seokjoon, L., & Woon Seob, S. (2014). Glioblastoma-Specific Anticancer Activity of Pheophorbide a from the Edible Red Seaweed *Grateloupia elliptica*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(3), 346–353. <https://doi.org/10.4014/jmb.1308.08090>

Navarro-Vargas, G., Díaz-Ramos, J., Troccoli-Ghinaglia, L., & Subero-Pino, S. (2014). Dinoflagelados epibentónicos presentes en diferentes sustratos en la Bahía Turpialito, Golfo de Cariaco, Venezuela. *Boletín Del Instituto Oceanográfico de Venezuela*, 53(2), 161–170. <http://www.ojs.udo.edu.ve/index.php/boletiniov/article/view/1595/1134>

Nevarez Alvarez, L. F., Carrillo Pérez, E., López Elias, J. A., Vargas López, J. M., & Noriega Rodríguez, J. A. (2017). Cinética de crecimiento de la microalga *Chaetoceros muelleri*

- en un fotobiorreactor. *Biotecnia*, 19(0), 14–18.
<https://doi.org/10.18633/BIOTECNIA.V19I0.360>
- Niizawa, I. (2015). *Diseño, modelado y optimización de foto-bioreactores destinados al cultivo de microalgas para diferentes aplicaciones tecnológicas* (Tesis doctoral). Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.
<https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/handle/11185/878>
- Ocampo Álvarez, H. (2013). *Disipación del exceso de energía en el aparato fotosintético de *Macrocystis pyrifera*: control molecular y respuesta a la temperatura* (Tesis doctoral). Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, México. <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/812>
- ONSET. (2020). *Data Loggers UA-002-64*. <https://www.onsetcomp.com/products/data-loggers/ua-002-64/>.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2018). *2018 El estado mundial de la pesca y la acuicultura: Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible*. Food & Agriculture Org.
https://books.google.co.cr/books?id=tXhjDwAAQBAJ&dq=países+productores+de+microalgas&hl=es&source=gbs_navlinks_s
- Ortiz-Moreno, M. L., Cortés-Castillo, C. E., Sánchez-Villarraga, J., Padilla, J., & Otero-Paternina, A. M. (2012). Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas. *Orinoquia*, 16(1), 11–20.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S012137092012000100002
- Osorio, F. J., Rodríguez, J., & Montoya, Y. (2014). Sucesión de microalgas perifíticas en tributarios del Río Gaira, Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 20(2), 119–131. <https://doi.org/10.15446/abc.v20n2.41932>
- Pacheco, J. M., Cadena, M. A., Sánchez, M. del P., Tovar, D., & Rangel, C. (2010). Effect of culture medium and nutrient concentration on fatty acid content of *Chaetoceros*

- muelleri*. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, 1(1), 6–15.
<http://uniciencia.ambientalex.info/revistas/Revlatbioambalgre.pdf#page=91>
- Paladino, O., & Neviani, M. (2020). Scale-up of photo-bioreactors for microalgae cultivation by π -theorem. *Biochemical Engineering Journal*, 153, 107398.
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107398>
- Pérez, L., Salgueiro, J. L., González, J., Parralejo, A. I., Maceiras, R., & Cancela, Á. (2017). Scaled up from indoor to outdoor cultures of *Chaetoceros gracilis* and *Skeletonema costatum* microalgae for biomass and oil production. *Biochemical Engineering Journal*, 127, 180–187. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2017.08.016>
- Pérsico, M. M., Moris, M., Tranier, E. D., Zanazzi, A. N., Saubidet, A. A., & Beligni, M. V. (2011). Evaluación de un sistema exterior de cultivo masivo de la microalga marina *Nannochloropsis oculata*, en una zona templada oceánica de Argentina. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, 2(1), 30–48.
<http://www.solabiaa.org/ojs3/index.php/RELBAA/article/view/26>
- Pires, J. C. M., Alvim-Ferraz, M. C. M., & Martins, F. G. (2017). Photobioreactor design for microalgae production through computational fluid dynamics: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79, 248–254.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.064>
- Podola, B., Li, T., & Melkonian, M. (2017). Porous Substrate Bioreactors: A Paradigm Shift in Microalgal Biotechnology?. *Trends in Biotechnology*, 35(2), 121–132.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.06.004>
- Rendón-Castrillón, L., Ramírez-Carmona, M., & Vélez-Salazar, Y. (2013). *Microalgas para la industria alimenticia*. Editorial Universidad Pontificia Bolivariana.
<https://www.researchgate.net/publication/299769593>
- Rivera, C., & Botero, M. (2009). Alimento vivo enriquecido con ácidos grasos para el desarrollo larvario de peces. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 22(4), 607–618. <http://www.redalyc.org/html/2950/295023527004/>

- Rodríguez-Núñez, K., Toledo, P., & Arias, S. (2016). Aislamiento de dos especies de diatomeas con potencial acuícola (Bacillariophyceae) en el Pacífico de Costa Rica. *Research Journal of the Costa Rican Distance Education University*, 8(1), 93–98. http://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/45171710/13RODRIGUEZAislamiento_de_dos_especies_de_diatomeas.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1492896541&Signature=e5iEG2LAWtejcRzLouRsh6rcG54%3D&response-content-disposition=inline%3Bfile
- Round, F. E., Hallsteinsen, H., & Paasche, E. (1999). On a previously controversial “fragilarioid” diatom now placed in a new genus *Nanofrustulum*. *Diatom Research*, 14(2), 343–356. <https://doi.org/10.1080/0269249X.1999.9705476>
- Roy, S. Sen, & Pal, R. (2015). Microalgae in Aquaculture: A Review with Special References to Nutritional Value and Fish Dietetics. *Proceedings of the Zoological Society*, 68(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s12595-013-0089-9>
- Ruiz, A. (2016). *Composición y abundancia de especies de dinoflagelados asociados a praderas de pastos marinos y macroalgas en la isla de Barú, durante diferentes periodos climáticos* (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. <http://www.bdigital.unal.edu.co/55022/>
- Ruocco, N., Costantini, S., Zupo, V., Lauritano, C., Caramiello, D., Ianora, A., Budillon, A., Romano, G., Nuzzo, G., D’Ippolito, G., Fontana, A., & Costantini, M. (2018). Toxigenic effects of two benthic diatoms upon grazing activity of the sea urchin: morphological, metabolomic and de novo transcriptomic analysis. *Scientific Reports*, 8(1), 5622. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24023-9>
- Sabbe, K., Verleyen, E., Hodgson, D. A., Vanhoutte, K., & Vyverman, W. (2003). Benthic diatom flora of freshwater and saline lakes in the Larsemann Hills and Rauer Islands, East Antarctica. *Antarctic Science*, 15(2), 227–248. <https://doi.org/10.1017/S095410200300124X>
- Sahin, M., Zeliha, D., Alkan, C., & Dalay, M. C. (2017). Effects of Different Light Intensities On Growth Rate and Fucoxanthin Concentration Of Diatom Species. En K. Kopalová,

- J. Kulichová, J. M. Bishop, B. Chattová, B. Beszteri, L. Ector, R. Jahn, P. J. Kociolek, L. Nedbalová, A. Pouličková, K. Sabbe, B. Van De Vijver, & C. Wetzel (Eds.), *Program & Abstracts, 11th Central European Diatom meeting, Prague, Czech Republic, 22-25 March 2017* (pp. 30–31). Charles University, Prague. <https://www.ced2017.eu/files/2017/03/ABSTRACT-book.pdf#page=28>
- Sahin, M., Khazi, M. I., Demirel, Z., & Dalay, M. C. (2019). Variation in growth, fucoxanthin, fatty acids profile and lipid content of marine diatoms *Nitzschia* sp. and *Nanofrustulum shiloi* in response to nitrogen and iron. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 390–398. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2018.12.023>
- Salomón Pérez, D. M. (2015). *Metodología de alto rendimiento para evaluar contenido de lípidos y producción de biomasa en microalgas* (Tesis de pregrado). Universidad de San Francisco de Quito, Quito, Ecuador. <http://192.188.53.14/handle/23000/5644>
- Sánchez-Estudillo, L. (2011). Alimento nutritivo, colorido y en movimiento: Los cultivos de apoyo en Acuicultura. *Ciencia y Mar*, 15(43), 55–60. https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/39643600/Alimento_nutritivo_colorido_CyM_LSE.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1559172435&Signature=%2BHedxoFGbwdRuKb8br%2BhrUNIMaY%3D&response-content-disposition=inline%3B filename%3DAlimen
- Sánchez-Saavedra, M. del P., & Voltolina, D. (2006). The growth rate, biomass production and composition of *Chaetoceros* sp. grown with different light sources. *Aquacultural Engineering*, 35(2), 161–165. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2005.12.001>
- Santos-Ballardo, D. U., Rossi, S., Hernández, V., Gómez, R. V., Rendón-Unceta, M., Carro-Corrales, J., & Valdez-Ortiz, A. (2015). A simple spectrophotometric method for biomass measurement of important microalgae species in aquaculture. *Aquaculture*, 448, 87–92. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.05.044>
- Santos-Ballardo, D. U., Rendón-Unceta, M. D. C., Rossi, S., Vázquez-Gómez, R., Hernández-Verdugo, S., & Valdez-Ortiz, A. (2016). Effects of outdoor cultures on the growth and lipid production of *Phaeodactylum tricornutum* using closed

- photobioreactors. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(128), 1–10.
<https://doi.org/10.1007/s11274-016-2089-1>
- Sar, E. A., & Sunesen, I. (2003). *Nanofrustulum shiloi* (Bacillariophyceae) from the Gulf of San Matías (Argentina): Morphology, distribution and comments about nomenclature. *Nova Hedwigia*, 77(3), 399–406. <https://doi.org/10.1127/0029-5035/2003/0077-0399>
- Sato, N., & Murata, N. (1988). Membrane lipids. *Methods in Enzymology*, 167, 251–259.
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)67027-3](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)67027-3)
- Sato, R., Maeda, Y., Yoshino, T., Tanaka, T., & Matsumoto, M. (2014). Seasonal variation of biomass and oil production of the oleaginous diatom *Fistulifera* sp. in outdoor vertical bubble column and raceway-type bioreactors. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117(6), 720–724. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOESC.2013.11.017>
- Seckbach, J., & Kociolek, J. P. (2011). *The diatom world*. Springer Science + Business Media. https://books.google.co.cr/books?id=Va35Mtn9VGYC&dq=Chaetoceros+cf.+Wighamii&source=gbs_navlinks_s
- Shah, M. R., Lutz, G. A., Alam, A., Sarker, P., Kabir Chowdhury, M. A., Parsaeimehr, A., Liang, Y., & Daroch, M. (2018). Microalgae in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry. *Journal of Applied Phycology*, 30(1), 197–213.
<https://doi.org/10.1007/s10811-017-1234-z>
- Silva-Benavides, A. M. (2016). Evaluación de fertilizantes agrícolas en la productividad de la microalga *Chlorella sorokiniana*. *Agronomía Mesoamericana*, 27(2), 265.
<https://doi.org/10.15517/am.v27i2.24361>
- Silva Benavides, A. M., Torzillo, G., Kopecký, J., & Masojídek, J. (2013). Productivity and biochemical composition of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) cultures grown outdoors in tubular photobioreactors and open ponds. *Biomass and Bioenergy*, 54, 115–122. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMBIOE.2013.03.016>
- Simopoulos, A. . (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56(8), 365–379.

[https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(02\)00253-6](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(02)00253-6)

Singh, D. J., Singh, V. K., & Singh, D. K. (2017). Photomediated Larvicidal Activity of Pheophorbide a against Cercaria Larvae of *Fasciola gigantica*. *Scientifica*, 2017, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2017/5219194>

Sirakov, I., Velichkova, K., Stoyanova, S., Velichkova, K., & Staykov, Y. (2015). The importance of microalgae for aquaculture industry. Review. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 2(4), 81–84. <https://www.researchgate.net/publication/272523704>

Sorokin, C. (1973). Dry weight, packed cell volume and optical density. En J. R. Stein (Ed.), *Handbook of Phycological methods - Culture methods and Growth measurements* (pp. 321–343). Cambridge University Press.

Steinrücken, P. (2018). *High-value fatty acids from microalgae. Bioprospecting and outdoor cultivation at northern latitudes* (Tesis doctoral). Universidad de Bergen, Noruega. <http://bora.uib.no/handle/1956/17722>

Steinrücken, P., Erga, S. R., Mjøs, S. A., Kleivdal, H., & Prestegard, S. K. (2017). Bioprospecting North Atlantic microalgae with fast growth and high polyunsaturated fatty acid (PUFA) content for microalgae-based technologies. *Algal Research*, 26, 392–401. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2017.07.030>

Tebbani, S., Lopes, F., Filali, R., Dumur, D., & Pareau, D. (2014). *CO₂ biofixation by microalgae modeling, estimation and control*. Wiley. https://books.google.co.cr/books?id=E8MBBAAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

Torzillo, G., Faraloni, C., Silva, A. M., Kopecký, J., Pilný, J., & Masojídek, J. (2012). Photoacclimation of *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae) cultures grown outdoors in photobioreactors and open ponds. *European Journal of Phycology*, 47(2), 169–181. <https://doi.org/10.1080/09670262.2012.683202>

Townley, H. E. (2011). Diatom Frustules: Physical, Optical, and Biotechnological

- Applications. En J. Seckbach & K. Patrick (Eds.), *The Diatom World* (pp. 273–289). Springer Science & Business. https://doi.org/10.1007/978-94-007-1327-7_12
- Trentacoste, E. M., Martínez, A. M., & Zenk, T. (2015). The place of algae in agriculture: policies for algal biomass production. *Photosynthesis Research*, 123(3), 305–315. <https://doi.org/10.1007/s11120-014-9985-8>
- Troyo Diéguez, E., Nieto Garibay, A., García Hernández, J. L., Murillo Amador, B., & Cariño, M. (2008). Diagnóstico agro-ambiental de Baja California Sur: estado actual y alternativas para el desarrollo agropecuario sostenible. En M. Cariño & M. Monteforte (Eds.), *Del saqueo a la conservación: historia ambiental contemporánea de Baja California Sur, 1940-2003*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. [https://books.google.co.cr/books?id=xPy1PxIUrRMC&pg=PA2005IA35&dq=baja+california+sur+clima&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=baja california sur clima&f=false](https://books.google.co.cr/books?id=xPy1PxIUrRMC&pg=PA2005IA35&dq=baja+california+sur+clima&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=baja%20california%20sur%20clima&f=false)
- UTEX. (2020). *Culture Collection of Algae*. <https://utex.org/products/f-2-medium?variant=31722216915034#>
- Valenzuela, R., Tapia, G., González, M., & Valenzuela, A. (2011). Ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA) y su aplicación en diversas situaciones clínicas. *Revista Chilena de Nutrición*, 38(3), 356–367. <https://doi.org/10.1002/pros.21359>
- Varela, J. C., Pereira, H., Vila, M., & León, R. (2015). Production of carotenoids by microalgae: achievements and challenges. *Photosynthesis Research*, 125(3), 423–436. <https://doi.org/10.1007/s11120-015-0149-2>
- Vidussi, F., Claustre, H., Bustillos-Guzmán, J., Cailliau, C., & Marty, J.-C. (1996). Determination of chlorophylls and carotenoids of marine phytoplankton: separation of chlorophyll *a* from divinylchlorophyll *a* and zeaxanthin from lutein. *Journal of Plankton Research*, 18(12), 2377–2382. <https://doi.org/10.1093/plankt/18.12.2377>
- Vivanco, G., Oliva, D., & Abarca, A. (2014). Efecto de dietas en base a microalgas tradicionales, nativas y dietas artificiales sobre el crecimiento y supervivencia en larvas velígeras de la almeja taquilla, *Mulinia edulis*. *Revista de Biología Marina y*

Oceanografía, 49(2), 339–349. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200012>

- Volkman, J. K. (2016). Sterols in Microalgae. En M. A. Borowitzka, J. Beardall, & J. A. Raven (Eds.), *The Physiology of Microalgae* (pp. 485–505). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2_19
- Voltolina, D., Sánchez-Saavedra, M. del P., & Torres-Rodríguez, L. M. (2008). Outdoor mass microalgae production in Bahía Kino, Sonora, NW Mexico. *Aquacultural Engineering*, 38(2), 93–96. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2007.11.004>
- Walne, P. R. (1970). Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria* and *Mytilus*. *Fish. Invest. Ser. 2*, 26(5). <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19711401894>
- Wang, L., Li, Y., Sommerfeld, M., & Hu, Q. (2012). A flexible culture process for production of the green microalga *Scenedesmus dimorphus* rich in protein, carbohydrate or lipid. *Bioresource Technology*, 129, 289–295. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.10.062>
- Wang, S.-K., Hu, Y.-R., Wang, F., Stiles, A. R., & Liu, C.-Z. (2014). Scale-up cultivation of *Chlorella ellipsoidea* from indoor to outdoor in bubble column bioreactors. *Bioresource Technology*, 156, 117–122. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.01.023>
- Woelfel, J., Schoknecht, A., Schaub, I., Enke, N., Schumann, R., & Karsten, U. (2014). Growth and photosynthesis characteristics of three benthic diatoms from the brackish southern Baltic Sea in relation to varying environmental conditions. *Phycologia*, 53(6), 639–651. <https://doi.org/10.2216/14-019.1>
- Zupo, V., Glaviano, F., Caramiello, D., & Mutalipassi, M. (2018). Effect of five benthic diatoms on the survival and development of *Paracentrotus lividus* post-larvae in the laboratory. *Aquaculture*, 495, 13–20. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2018.05.028>