



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR**



**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN RECURSOS ACUÁTICOS**

**EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE FÓSFORO  
SOBRE EL CONTENIDO DE BIOMASA, LÍPIDOS  
Y EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS EN  
*Thalassiosira weissflogii* y *Chaetoceros muelleri***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS EN RECURSOS ACUÁTICOS  
EN EL ÁREA DE ACUICULTURA**

**PRESENTA:  
LIC. YANETH SANCHEZ CAMARA**

**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. DIANA JUDITH LÓPEZ PERAZA  
DR. JOSÉ FRANCISCO BERMUDEZ LIZÁRRAGA**

**MAZATLÁN, SINALOA, MÉXICO, OCTUBRE 2024.**



Dirección General de Bibliotecas  
Ciudad Universitaria  
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios  
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.  
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57  
dgbuas@uas.edu.mx

## UAS-Dirección General de Bibliotecas

### Repositorio Institucional Buelna

#### Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial  
Compartir Igual, 4.0 Internacional



## RESUMEN

Las microalgas contienen ácidos grasos de cadena larga: araquidónico (ARA), eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA), los cuales son esenciales para el crecimiento de los organismos bajo cultivo. La calidad nutricional de las microalgas depende de la especie, pero también puede ser modulada mediante las condiciones del cultivo. El fósforo es un nutriente que, en condiciones limitantes o deficientes, puede desencadenar la acumulación de lípidos y ácidos grasos en las microalgas. El objetivo de este estudio fue analizar el contenido de lípidos y la producción de ácidos grasos en las microalgas *Thalassiosira weissflogii* (TH-W-1) y *Chaetoceros muelleri* (CH-M-1) en respuesta a diferentes concentraciones de fósforo: f, f/2, f/4, f/0, siendo el f, el tratamiento control. El experimento se realizó en recipientes transparentes en un volumen útil de 15 L. El cultivo se mantuvo a 26 °C con iluminación y aireación constante. La extracción de lípidos totales se determinó usando la técnica de Bligh y Dyer (1959). La extracción de ácidos grasos fue por transesterificación y su cuantificación por cromatografía de gases. Se encontró un aumento significativo de lípidos producidos por unidad de volumen y en porcentaje de PO con relación a la disminución de fósforo en la microalga únicamente en la microalga CH-M-1, siendo el tratamiento f/4 el que registró los valores más altos:  $49.95 \pm 2.72 \mu\text{g} \cdot \text{mL}$  y  $(29.33 \pm 2.33\%)$ , además los valores registrados en CH-M-1 fueron significativamente superiores a lo registrado en TH-W-1 en todos los tratamientos. El contenido de PUFA en TH-W-1 fue de  $14.11 \pm 0.89\%$  y de  $3.97 \pm 0.57\%$  para el EPA y DHA, respectivamente, no se detectó ARA en esta especie. Mientras que, en CH-M-1 el ARA registró valores de  $9.84 \pm 0.47\%$ , y de  $7.35 \pm 0.39\%$  y  $0.84 \pm 0.10\%$  de EPA y DHA respectivamente. El contenido de EPA y DHA en TH-W-1 fue significativamente mayor al contenido registrado en CH-M-1. Se concluye que CH-M-1 representa una fuente mayor de lípidos, en comparación con TH-W-1, sin embargo, TH-W-1 es una mejor fuente potencial de EPA y DHA ( $14.11 \pm 0.89\%$  y  $3.97 \pm 0.57\%$ ), en comparación con CH-M-1 ( $7.35 \pm 0.39\%$  y  $0.84 \pm 0.10\%$ ), mientras que para el ARA ( $9.84 \pm 0.47\%$ ) la especie idónea es CH-M-1, ya que no se detectó este ácido graso en TH-W-1. No obstante, un aspecto importante a considerar en la elección de la mejor fuente de EPA y DHA es la biomasa alcanzada por unidad de volumen, la cual fue mayor en CH-M-1 que en TH-W-1, lo que podría compensar el bajo contenido de estos compuestos en la microalga TH-W-1.

Palabras clave: diatomeas; cultivo de microalgas; ácidos grasos esenciales; macronutriente; limitante.

## SUMMARY

Microalgae contain long-chain fatty acids: arachidonic acid (ARA), eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), which are essential for the growth of organisms under culture. The nutritional quality of microalgae depends on the species but can also be modulated by culture conditions. Phosphorus is a nutrient that, under limiting or deficient conditions, can trigger the accumulation of lipids and fatty acids in microalgae. The objective of this study was to analyze the lipid content and fatty acid production in the microalgae *Thalassiosira weissflogii* (TH-W-1) and *Chaetoceros muelleri* (CH-M-1) in response to different phosphorus concentrations: f, f/2, f/4, f/0, with f being the control treatment. The experiment was carried out in transparent containers in a useful volume of 15 L. The culture was maintained at 26 °C and constant illumination and aeration. Total lipid extraction was determined using the technique of Bligh and Dyer (1959). Fatty acids were extracted by transesterification and quantified by gas chromatography. A significant increase in lipids produced per unit volume and in percentage of PO was found in relation to the decrease in phosphorus in the microalgae only in the microalgae CH-M-1, with the f/4 treatment being the one that registered the highest values:  $49.95 \pm 2.72 \mu\text{g} \cdot \text{mL}$  and  $(29.33 \pm 2.33\%)$ , in addition, the values recorded in CH-M-1 were significantly higher than those recorded in TH-W-1 in all treatments. The PUFA content in TH-W-1 was  $14.11 \pm 0.89\%$  and  $3.97 \pm 0.57\%$  for EPA and DHA, respectively, no ARA was detected in this species. While, in CH-M-1 the ARA registered values of  $9.84 \pm 0.47\%$ , and  $7.35 \pm 0.39\%$  and  $0.84 \pm 0.10\%$  of EPA and DHA respectively. The EPA and DHA content in TH-W-1 was significantly higher than the content recorded in CH-M-1. It is concluded that CH-M-1 represents a greater source of lipids, compared to TH-W-1, however, TH-W-1 is a better potential source of EPA and DHA ( $14.11 \pm 0.89\%$  and  $3.97 \pm 0.57\%$ ), compared to CH-M-1 ( $7.35 \pm 0.39\%$  and  $0.84 \pm 0.10\%$ ), while for ARA ( $9.84 \pm 0.47\%$ ) the ideal species is CH-M-1, since this fatty acid was not detected in TH-W-1. However, an important aspect to consider in choosing the best source of EPA and DHA is that the biomass achieved per unit volume, which was higher in CH-M-1 than in TH-W-1, which could compensate for the low content of these compounds in the microalgae TH-W-1.

Key words: diatoms; microalgae culture; essential fatty acids; macronutrient; limiting.

## **DEDICATORIA**

Gracias al ETERNO por darme sabiduría y fortaleza en cada etapa de mi vida para lograr mis metas.

A mis padres y a mi amado por darme él apoyó y la confianza para lograr obtener una carrera profesional y en especial para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Recursos Acuáticos, la cual se la dedico a ellos.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Sinaloa y al Programa de Posgrado de la Facultad de Ciencias del Mar, por haberme brindado la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el apoyo económico otorgado a través de una beca de estudios de Maestría No. 1239110.

Al proyecto PROFAPI Clave PRO\_A7\_041 titulado “Caracterización y mejoramiento de la calidad nutricional del alimento vivo que comúnmente es usado en la acuicultura y su efecto sobre las postlarvas de *Penaeus vannamei*”, por los recursos económicos otorgados para la realización de este estudio.

A mi directora de tesis, Dra. Diana Judith López Peraza, por brindarme todo el apoyo durante todo el trabajo de Maestría. A mi codirector de tesis, Dr. José Francisco Bermudes Lizárraga por su participación en este proyecto.

Al comité sinodal, a la Dra. Socorro Jiménez Valera, al Dr. Mario Nieves Soto y al Dr. José Cristóbal Román Reyes, quienes fueron parte fundamental para la realización de este trabajo.

A los estudiantes de Servicio Social, Gabriela, Susana y Blue, que participaron en el proyecto de Maestría.

A todos mis compañeros y Maestros de Generación.

Gracias a todos.

## ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	6
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
IV. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	14
V. HIPÓTESIS.....	14
VI. OBJETIVO GENERAL.....	15
VII. OBJETIVOS PARTICULARES.....	15
VIII MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
VIII. 1 CULTIVO DE MICROALGAS.....	16
VIII. 2 CÁLCULO DE LA DENSIDAD CELULAR.....	18
VIII. 3 ANÁLISIS DE LA BIOMASA (PESO SECO Y ORGÁNICO).....	19
VIII. 4 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE LÍPIDOS.....	19
VIII. 5 DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS.....	21
VIII. 6 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	22
IX. RESULTADOS.....	24
IX. 1 DENSIDAD CELULAR.....	24
IX.2 ANÁLISIS DE BIOMASA (PESO SECO Y PESO ORGÁNICO).....	24
IX.3 ANÁLISIS DE LÍPIDOS.....	27
IX.4 ANÁLISIS DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS.....	31
X. DISCUSIÓN.....	43
XI. CONCLUSIONES.....	53
XII. LITERATURA CITADA.....	55

XIII. ANEXOS .....	65
XIV. CURVA DE LÍPIDOS.....	66



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diatomea planctónica <i>Chaetoceros muelleri</i> ; A) largo: 8.6 µm; B) ancho: 6.6 µm C) longitud de las setas: 26.8 µm. Tomada de Pacheco-vega, (2010).....	7
Figura 2. Diatomea planctónica <i>Thalassiosira weissflogii</i> . Tomada de Etesami <i>et al.</i> (2022). .....	7
Figura 3. Biosíntesis de triacilgliceroles en orgánulos de microalgas tomado de Pandey <i>et al.</i> (2024).....	9
Figura 4. Diseño del experimento para evaluar la biomasa, el contenido de lípidos y la producción de ácidos grasos poliinsaturados en las microalgas <i>T. weissflogii</i> y <i>C. muelleri</i> cultivadas en cuatro concentraciones de fósforo f: 15 mL de fósforo, tratamiento f/2: 7.5 mL, f/4: 3.75 mL y el tratamiento f/0: sin fósforo.....	17
Figura 5. Porcentaje (%) de lípidos respecto al peso orgánico de las microalgas <i>Chaetoceros muelleri</i> y <i>Thalassiosira weissflogii</i> cultivadas en el medio f en cuatro concentraciones de fósforo (f, f/2, f/4 y f/0). El valor de (p< 0.05) indica diferencias significativas entre los tratamientos (Prueba ANOVA dos vías y Fisher LSD).....	30
Figura 6. Composición de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos identificados) agrupados de acuerdo con el número de insaturaciones (Saturados, Monoinsaturados, Poliinsaturados) de <i>Chaetoceros muelleri</i> cultivada en cuatro concentraciones de fósforo (f, f/2, f/4 y f/0).....	34
Figura 7. Porcentaje (%) de ácidos grasos agrupados de acuerdo con el número de insaturaciones (Saturados, Monoinsaturados, Poliinsaturados) de las cadenas lipídicas de <i>Thalassiosira weissflogii</i> cultivada en el medio f en cuatro concentraciones de fósforo (f, f/2, f/4 y f/0). .....	37
Figura 8. Porcentaje (%) de ácidos grasos saturados de las microalgas <i>Chaetoceros muelleri</i> y <i>Thalassiosira weissflogii</i> cultivadas en el medio f en cuatro concentraciones de fósforo (f, f/2, f/4 y f/0). El valor de (p < 0.05) indica diferencias significativas entre los tratamientos y especies (Prueba ANOVA de dos vías y Fisher LSD).....	38
Figura 9. Porcentaje (%) de ácidos grasos monoinsaturados de las microalgas <i>Chaetoceros muelleri</i> y <i>Thalassiosira weissflogii</i> cultivadas en el medio f en cuatro concentraciones de	

fósforo (f, f/2, f/4 y f/0). El valor de ( $p < 0.05$ ) indica diferencias significativas entre los tratamientos y especies (Prueba ANOVA de dos vías). .....	39
Figura 10. Porcentaje (%) de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de las microalgas <i>Chaetoceros muelleri</i> y <i>Thalassiosira weissflogii</i> cultivadas en el medio f en cuatro concentraciones de fósforo (f, f/2, f/4 y f/0). El valor de ( $p < 0.05$ ) indica diferencias significativas entre los tratamientos y especies (Prueba ANOVA de dos vías y Fisher LSD). .....	40
Figura 11. La relación lineal entre la absorbancia y la concentración de lípidos de tripalmitina .....	67

### LISTA DE TABLAS

Tabla I. Formulación del medio f de Guillard y Ryther (1962) utilizado para el cultivo de las microalgas <i>Chaetoceros muelleri</i> y <i>Thalassiosira weissflogii</i> . .....	18
Tabla II. Valores promedio y error estándar en la densidad celular registrada a las 72 h en <i>T. weissflogii</i> y <i>C. muelleri</i> . Diferentes superíndices dentro de la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ , $a < b$ ). Prueba ANOVA de una vía y prueba Fisher LSD. ....	24
Tabla III. Valores promedio y error estándar del peso seco en $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de las microalgas <i>T. weissflogii</i> (TH-W-1) y <i>C. muelleri</i> (CH-M-1) cultivadas en cuatro concentraciones de fósforo f, f/2, f/4, f/0. Diferentes superíndices dentro de la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ , $a < b$ ). Prueba ANOVA de una vía y prueba Fisher LSD.....	25
Tabla IV. Valores promedio y error estándar del PS en $\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1}$ de las microalgas <i>T. weissflogii</i> (TH-W-1) y <i>C. muelleri</i> (CH-M-1) en cuatro concentraciones de fósforo f, f/2, f/4, f/0. Diferentes superíndices dentro de la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ , $a < b$ ). Prueba ANOVA de una vía y Prueba Fisher LSD.....	25
Tabla V. Valores promedio y error estándar del peso orgánico en $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de las microalgas <i>T. weissflogii</i> (TH-W-1) y <i>C. muelleri</i> (CH-M-1) cultivadas en cuatro concentraciones de fósforo f, f/2, f/4, f/0. Diferentes superíndices dentro de la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ , $a < b$ ). Prueba ANOVA de una vía y Prueba Fisher LSD.....	26

Tabla VI. Valores promedio y error estándar del PO en $\text{pg}\cdot\text{cel}^{-1}$ de las microalgas <i>T. weissflogii</i> (TH-W-1) y <i>C. muelleri</i> (CH-M-1) cultivadas en cuatro concentraciones de fósforo f, f/2, f/4, f/0. Diferentes superíndices dentro de la misma columna indican diferencias significativas ( $p<0.05$ , $a<b$ ). Prueba ANOVA una vía y Fisher LSD. ....	27
Tabla VII. Contenido de lípidos en $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PS de las microalgas <i>Thalassiosira weissflogii</i> (TH-W-1) y <i>Chaetoceros muelleri</i> (CH-M-1), cultivadas en cuatro concentraciones de fósforo f, f/2, f/4 y f/0. Los resultados son valores promedio $\pm$ error estándar. Diferentes letras en superíndice entre los factores (especies y tratamientos) indican diferencias significativas ( $p<0.05$ , $a<b$ ). Prueba ANOVA dos vías y Fisher LSD. ....	28
Tabla VIII. Concentración de lípidos en $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PO de las microalgas <i>Thalassiosira weissflogii</i> (TH-W-1) y <i>Chaetoceros muelleri</i> (CH-M-1) cultivadas en cuatro concentraciones de fósforo f, f/2, f/4, f/0. Los resultados son valores promedio $\pm$ error estándar. Diferentes letras en superíndice entre los factores (especies y tratamientos) indican diferencias significativas ( $p<0.05$ , $a<b$ ). Prueba ANOVA dos vías y Fisher LSD. ....	29
Tabla IX. Concentración de lípidos en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}$ de las microalgas <i>Thalassiosira weissflogii</i> (TH-W-1) y <i>Chaetoceros muelleri</i> (CH-M-1) cultivadas en cuatro concentraciones de fósforo f, f/2, f/4, f/0. Los resultados son valores promedio $\pm$ error estándar. Diferentes letras en superíndice entre los factores (especies y tratamientos) indican diferencias significativas ( $p<0.05$ , $a<b$ ). Prueba ANOVA dos vías y Fisher LSD. ....	31
Tabla X. Composición de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos identificados) de la microalga <i>Chaetoceros muelleri</i> cultivada en cuatro concentraciones de fósforo f, f/2, f/4, f/0. ....	33
Tabla XI. Composición de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos identificados) de la microalga <i>Thalassiosira weissflogii</i> cultivada en cuatro concentraciones de fósforo f, f/2, f/4, f/0. ....	36
Tabla XII. Porcentajes de <b>20:5n-3 (EPA)</b> respecto al total de ácidos grasos de las microalgas <i>Thalassiosira weissflogii</i> (TH-W-1) y <i>Chaetoceros muelleri</i> (CH-M-1), cultivadas en cuatro concentraciones de fósforo. Los resultados son valores promedio $\pm$ error estándar. Diferentes letras en superíndice entre los factores (especies y tratamientos) indican diferencias significativas ( $p<0.05$ , $a<b$ ). Prueba ANOVA dos vías y Fisher LSD. ....	41

Tabla XIII. Porcentajes del **22:6n-3 (DHA)** respecto al total de ácidos grasos de las microalgas *Thalassiosira weissflogii* (TH-W-1) y *Chaetoceros muelleri* (CH-M-1), cultivadas en cuatro concentraciones de fósforo. Los resultados son valores promedio± error estándar. Diferentes letras en superíndice entre los factores (especies y tratamientos) indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ,  $a < b$ ). Prueba ANOVA dos vías y Fisher LSD. ....42

## I. INTRODUCCIÓN

Las microalgas son organismos unicelulares que se distribuyen ampliamente en ambientes de agua dulce y salinos (Kim, 2015). Se calcula que existen entre 200,000 a 800,000 especies (Venkatesan *et al.*, 2015). Su importancia ecológica radica en que representan la base de la cadena trófica, y a que producen alrededor del 50% del oxígeno atmosférico (Gualtieri & Barsanti, 2006). Asimismo, las microalgas contienen diversos compuestos bioactivos, entre ellos: polímeros, péptidos, ácidos grasos, carotenoides, toxinas y esteroides. Estos compuestos son empleados en diversas industrias como en la nutrición humana y animal, en la elaboración de cosméticos y de productos farmacéuticos, para la producción de bioenergía y para el tratamiento de aguas residuales (Venkatesan *et al.*, 2015).

En la acuicultura, las microalgas son empleadas como alimento directo e indirecto para los animales en cultivos. Los moluscos bivalvos como las ostras, las almejas y los pectínidos, se alimentan directamente de microalgas durante todo el ciclo de su vida, mientras que en los camarones y los peces solo lo hacen durante los primeros estadios larvales. El uso de las microalgas como alimento indirecto consiste la producción de zooplankton (ej. rotíferos, artemias y copépodos) como “presas vivas” para posteriormente con estas, alimentar a larvas y peces juveniles, así como a adultos de peces pequeños (Wikfors & Ohno, 2001; Patil *et al.*, 2005; Haoujar *et al.*, 2022). Las especies de microalgas más empleadas en la acuicultura son las pertenecientes a los siguientes géneros: *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Pavlova*, *Phaeodactylum*, *Dunaliella*, *Nannochloropsis*, *Arthrospira*, *Haematococcus*, *Schizochytrium*, *Skeletonema*, *Chaetoceros* y *Thalassiosira* (Wikfors & Ohno, 2001; Yaakob *et al.*, 2014; Haoujar *et al.*, 2022).

Con relación a su composición proximal, las microalgas presentan alrededor de 50-65% en proteínas, 8-14% carbohidratos y 4-9% lípidos (Guedes & Malcata, 2012; Roy & Pal, 2015). Los lípidos se componen de ácidos grasos que se diferencian en la longitud de la cadena de hidrocarburos, en la presencia y número de dobles enlaces (Maltsev *et al.*, 2023). Los lípidos de microalgas son diversos y están agrupados en dos clases: lípidos polares y no polares. Por una parte, los no polares (neutrales) son los lípidos de almacenamiento, es decir, triglicéridos,

diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres. Los lípidos polares son componentes estructurales importantes de las membranas celulares y orgánulos, como los glicolípidos y los fosfolípidos. La bicapa de fosfolípidos en la membrana celular consiste de una cabeza hidrofílica polar y dos colas de ácidos grasos hidrofóbicos, que pueden estar separadas de colas saturadas puras o combinadas con colas insaturadas (Pandey *et al.*, 2024).

La síntesis de lípidos en las células eucariotas se produce en dos orgánulos: primero, en el cloroplasto y después en el retículo endoplasmático. En el cloroplasto, mediante un conjunto de enzimas y reacciones químicas, da la formación de lípidos con 16 a 18 átomos de carbono. Por último, se utiliza glicerol 3 fosfato para la posterior incorporación de ácidos grasos. El ácido graso libre se almacena como triacilgliceroles en el cloroplasto o en el retículo endoplásmico (Pandey *et al.*, 2024).

Los ácidos grasos constituyen la mayor fracción de lípidos en las microalgas, suponiendo del 20 al 40% de los lípidos totales (Abalde *et al.*, 1995). Los ácidos grasos son cadenas de carbono alifático que varían en longitud y el número de dobles enlaces (Sargent *et al.*, 2002; Khozin-Goldberg, 2016). En la nomenclatura sistemática se considera: a) número de átomos de carbono, y b) cantidad de dobles enlaces y sus posiciones en las moléculas de ácidos grasos. Dentro los ácidos grasos se encuentran tres familias: ácidos grasos saturados (sin enlaces insaturados), ácidos grasos monoinsaturados (un solo enlace insaturado) y los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, por sus siglas en inglés) que son de cadena larga y un mayor número de dobles enlaces (Sargent *et al.*, 2002; Glencross, 2009; Khozin-Goldberg, 2016). El contenido de PUFA, ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y ácidos grasos saturados (SAT) varía entre las clases de lípidos. Los lípidos neutros (no polares) son ricos en MUFA, mientras que los lípidos polares (glicolípidos y fosfolípidos) muestran un mayor porcentaje de PUFA (Maltsev *et al.*, 2023).

Entre los ácidos grasos poliinsaturados más importantes en la nutrición acuícola se encuentran los altamente insaturados (HUFA, por sus siglas en inglés) como el 20:4n-6 (ácido araquidónico, ARA), 20:5n-3 (ácido eicosapentaenoico, EPA) y 22:6n-3 (ácido docosahexaenoico, DHA) comúnmente conocidos como omega 3 y 6. El precursor del DHA y EPA es el ácido linolénico (18:3n-3), mientras que el ácido linoleico (18:2n-6) es el

precursor del ARA (Sargent *et al.*, 2002; Izquierdo, 2005). Los HUFA se consideran ácidos grasos esenciales para los organismos marinos debido a que tienen una capacidad limitada de producirlos en cantidades adecuadas a partir de los precursores correspondientes. Esto se debe a que las enzimas desaturasa y la elongasa, las cuales son clave en la ruta de síntesis de estos ácidos grasos, se encuentran en cantidades limitadas en estos organismos (Sargent *et al.*, 2002; Izquierdo, 2005). La síntesis de los ácidos grasos es una de las principales vías metabólicas a nivel celular en el cual se proporcionan restos de ácidos grasos (grupos acilo) para el ensamblaje de los principales lípidos acilo de la membrana, como glicoglicerolípidos y fosfoglicerolípidos. En las microalgas, la biosíntesis de novo de ácidos grasos en el cloroplasto da como resultado los compuestos de 16 y 18 átomos de carbono. Para esto se requiere carbono en forma de acetil-coenzima A, energía ATP y poder reductor NADPH. La elongación de la cadena de carbono de los ácidos grasos de cadena corta inicia mediante la condensación de acetil-CoA y malonil-ACP e implica la adición en cadena de una unidad de dos carbonos del malonil-ACP a la cadena de acilo (Khozin-Goldberg, 2016).

La biosíntesis de ácidos grasos en el cloroplasto finaliza mediante la acción de las acil-ACP tioesterasas que generan ácidos grasos libres (16:0, 18:0), los cuales son liberados al retículo endoplasmático y el ácido graso 18:1n-9 es exportado de la envoltura del cloroplasto. La biosíntesis de ácidos grasos C18 y C20 inicia mediante la desaturación  $\Delta 12$  del ácido oleico (AO; 18:1n-9), generando ácido linoleico (LA; 18:2n-6) que a su vez podría ser desaturada aún más por una  $\Delta 15$  desaturasa, específica del extremo omega dando lugar al ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA; 18:3n-3). Tanto el LA como el ALA se procesan paso a paso a través de la vía  $\Delta 6$  desaturasa/ $\Delta 6$  elongasa, dando lugar al ARA y EPA. Esta ruta comienza con la  $\Delta 6$  desaturasa e incluye pasos alternos de desaturación y elongación mediados por la elongasa  $\Delta 6$  y la  $\Delta 5$  desaturasa (Khozin-Goldberg, 2016). Las respectivas vías que se inician con el LA o ALA (las denominadas vías n-6 y n-3) comprenden los intermedios de PUFA n-6 o n-3. La vía n-3 conduce a la síntesis de EPA y DHA, mientras que la vía n-6 genera ARA. Las enzimas desaturasas  $\Delta 5$  y  $\Delta 6$  involucradas en las vías de biosíntesis de PUFA pertenecen a las desaturasas “frontales” que introducen un nuevo doble enlace entre el doble enlace preexistente y el extremo carboxilo del ácido graso (Khozin-Goldberg, 2016). En el medio

silvestre, los mamíferos y los peces obtienen los ácidos grasos esenciales (ARA, EPA, DHA) a través de la cadena trófica (Pratiwy & Pratiwi, 2020). Sin embargo, en la acuicultura el ARA, EPA y DHA son añadidos para balancear las dietas de los organismos, lo cual garantiza un crecimiento, desarrollo y supervivencia adecuada en peces y camarones (Sargent *et al.*, 2002; Izquierdo, 2005).

Los ácidos grasos poliinsaturados están involucrados en diferentes funciones fisiológicas en peces y camarones. El DHA influye sobre el desarrollo del sistema nervioso y visual. Además, el DHA y el EPA mantienen la estructura de las membranas celulares (Sargent *et al.*, 2002; Glencross, 2009). El ARA está involucrado en las respuestas inmunológicas, la regulación osmótica, producción de hormonas y coagulación de la sangre (Glencross, 2009). El ARA y el EPA intervienen en varias reacciones a situaciones de estrés (Sargent *et al.*, 2002). Una deficiencia de omega-3 afecta negativamente a la fecundidad, la fertilización y las tasas de eclosión en peces marinos (Patil *et al.*, 2005).

Por otra parte, el fósforo (P) forma parte de las moléculas estructurales de las microalgas e interviene en la mayoría de los procesos celulares de obtención y transferencia de energía (Abalde *et al.*, 1995; Karl, 2014; Dyhrman, 2016). Los principales compuestos bioquímicos de una célula que son ricos en fósforo son los ácidos nucleicos, ribosomas y fosfolípidos, estos últimos se encuentran en la membrana celular (Alberts *et al.*, 2002; Karl, 2014; Dyhrman, 2016). Estructuralmente, los fosfolípidos tienen un grupo de cabeza polar y dos colas de hidrocarburos hidrofóbicos. Principalmente, las colas contienen ácidos grasos y varían en longitud entre 14 y 24 átomos de carbono. Una cola puede tener uno o más dobles enlaces *cis* (insaturada), mientras que la otra cola no las tiene (saturada). El grado de longitud y saturación de las colas de ácidos grasos influye en la fluidez de la membrana (Alberts *et al.*, 2002).

En resumen, el P es un macronutriente esencial para el crecimiento, mantenimiento y composición de las microalgas (Dyhrman, 2016). No obstante, es bien sabido que la composición bioquímica de las microalgas está altamente influenciada por las condiciones de cultivo, entre las cuales se encuentra, principalmente, la concentración de nutrientes del medio (Pacheco-Vega & Sánchez-Saavedra, 2009; García *et al.*, 2012). El estrés causado por



el agotamiento de nutrientes (nitratos, fosfatos, silicatos) es actualmente la estrategia más utilizada para desencadenar la biosíntesis de lípidos en las microalgas (Lin *et al.*, 2018).

## II. ANTECEDENTES

Las microalgas se clasifican en diversos grupos: Cyanophyceae (cianobacterias), Chlorophyta o Chlorophyceae (algas verdes), Pyrrhophyceae (dinoflagelados) y las diatomeas (Bacillariophyceae) (Packer *et al.*, 2016). Las diatomeas son el grupo más representativo, se calcula que existen alrededor de 100,000 especies. Su característica distintiva es que estas presentan una pared celular de silicato (Packer *et al.*, 2016), misma que funciona como protección contra sus depredadores. El estudio de las diatomeas es de interés por producir naturalmente compuestos de importancia comercial (Bozarth *et al.*, 2009). Estos compuestos son: astaxantina, luteína, betacaroteno, clorofila, ficobiliproteína, proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas, antioxidantes, oligoelementos y ácidos grasos poliinsaturados (Yaakob *et al.*, 2014). Las microalgas se pueden cultivar tanto en sistemas abiertos como cerrados. Los sistemas abiertos representan un menor costo y bajo mantenimiento, pero una de las principales desventajas es que el cultivo está expuesto a la contaminación bacteriana y a las fluctuaciones ambientales. Por el contrario, los sistemas cerrados involucran un mayor costo por los gastos de inversión y operativos, pero permiten mayor control de las condiciones del cultivo (Santin *et al.*, 2022). Por lo que, para la obtención de compuestos de interés, p. ej. vitaminas, proteínas, carbohidratos, lípidos y PUFA se recomienda el sistema cerrado (Voltolina *et al.*, 2008).

En la acuicultura se emplean diversos géneros para la alimentación larvaria de organismos acuáticos; no obstante, las especies de microalgas pertenecientes a los géneros *Chaetoceros* y *Thalassiosira* son comúnmente empleadas como alimento para larvas de camarones peneidos y moluscos (Lebeau & Robert, 2003). Siendo las microalgas *Chaetoceros muelleri* y *Thalassiosira weissflogii* las especies más utilizadas para criar larvas de camarones, peces y moluscos en el norte de México (Voltolina *et al.*, 2008), debido a sus características bioquímicas y facilidad de producción (Pacheco-Vega & Sánchez-Saavedra, 2009). Los géneros *Chaetoceros* y *Thalassiosira* pertenecen a la clase Bacillariophyceae. Por un lado, *Chaetoceros* se distribuye ampliamente en todo el mundo y es el grupo más amplio de diatomeas marinas con hábitos planctónicos. Se han descrito alrededor de 400 especies

(Spaulding *et al.*, 2021). *Chaetoceros muelleri* es una diatomea marina, con tamaño promedio de 8.6  $\mu\text{m}$  de largo y de ancho 6.6  $\mu\text{m}$ , y presenta cuatro setas en sus extremos (Fig. 1).



Figura 1. Diatomea planctónica *Chaetoceros muelleri*; A) largo: 8.6  $\mu\text{m}$ ; B) ancho: 6.6  $\mu\text{m}$  C) longitud de las setas: 26.8  $\mu\text{m}$ . Tomada de Pacheco-vega, (2010).

Por otra parte, el género *Thalassiosira* se distribuye en ambientes marinos y se han descrito alrededor de 194 especies. *T. weissflogii* es una diatomea planctónica cilíndrica con un diámetro de 10 a 20  $\mu\text{m}$  (Von Dassow *et al.*, 2006; Fig. 2)

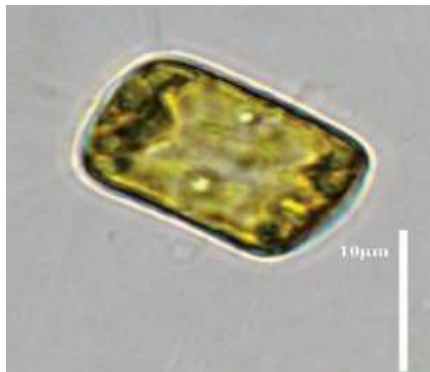


Figura 2. Diatomea planctónica *Thalassiosira weissflogii*. Tomada de Etesami *et al.* (2022).

La constitución del medio del cultivo de las microalgas tiene una influencia directa sobre la densidad celular y biomasa, pero también sobre la composición bioquímica de las especies de microalgas. Se ha registrado que la salinidad influye en la densidad celular de *T. weissflogii*, ya que a 25 UPS la densidad celular fue mayor ( $43 \times 10^4 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) que lo

registrado a 50 UPS,  $35 \times 10^4$  cel·mL<sup>-1</sup> (Garcia *et al.*, 2012). Mientras que el contenido de proteínas (350 y 320 mg g<sup>-1</sup>) de esta misma especie fue mayor a bajas salinidades a 25 y 30 UPS, respectivamente (Garcia *et al.*, 2012). Asimismo, la irradiancia en los cultivos de la microalga *T. pseudonana* de cultivo influyeron significativamente en el crecimiento celular, observándose las mayores densidades celulares ( $4.6 \times 10^6$  cel· mL<sup>-1</sup>) a 180  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^2\text{s}$  (Suárez *et al.*, 2013). Con relación a los nutrientes del medio de cultivo, Pacheco Vega *et al.* (2010) evaluaron tres concentraciones de fertilizante agrícola (A, AF/2, AF/4) y tres modificaciones del medio f (f, f/2, f/4) en el cultivo de *C. muelleri*. Encontrando que, la mayor densidad celular fue obtenida en el tratamiento AF ( $3818.7$  cel·mL<sup>-1</sup>). Por otra parte, Peraza-Yee *et al.* (2022) observaron que la deficiencia simultánea de nutrientes como el nitrógeno, fósforo y silicato en el medio f (4f, 2f, f, f/2 y f/4), provoca una disminución en la densidad celular y, por ende, una menor tasa de división celular acumulada en *T. weissflogii*, mientras que los valores más altos se registraron en la concentración más alta en el medio f (4f). También observaron que, la composición de carbohidratos, proteínas y lípidos varió en función de los nutrientes del medio, donde los valores más altos de estos componentes (54.7, 39.0 y 68.6 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente) se registraron en el tratamiento 2f.

Asimismo, se ha registrado una influencia de la concentración de fósforo en el medio de cultivo sobre la concentración de lípidos, pero también en la composición y perfil de ácidos grasos, la cual también varía en función de la especie de microalga que se trate (Adenan *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2018). Por ejemplo, Lovio-Fragoso, (2021) evaluó el efecto de 4 concentraciones del fósforo (control: 72, exceso: 144, limitante A: 18 y B: 7  $\mu\text{M}$ ) en el medio de cultivo de *C. muelleri*, encontrando que, el mayor contenido de lípidos en la microalga (4.42%) se registró en el tratamiento limitante B. Respecto a los PUFA, El-Kassas, (2013) evaluó el contenido de estos compuestos en la microalga *Picochlorum* sp. observando que el mayor contenido de PUFA (4.5%) se registró en el tratamiento con 50% fósforo en el medio de cultivo.

En condiciones limitantes o deficientes en nutrientes, los lípidos se acumulan utilizando los ácidos grasos libres existentes a través de la vía de Kennedy en el retículo endoplásmico (Pandey *et al.*, 2024). En el retículo endoplásmico, los ácidos grasos libres, producen acil

CoA en presencia de CoA. La acil CoA junto con el glicerol 3-fosfato produce moléculas de ácido lisofosfatídico (LPAT) con TAG como producto final. El tercer y último paso es el empaquetamiento y distribución de los lípidos en los cuerpos de Golgi (Pandey *et al.*, 2024, Fig. 3).

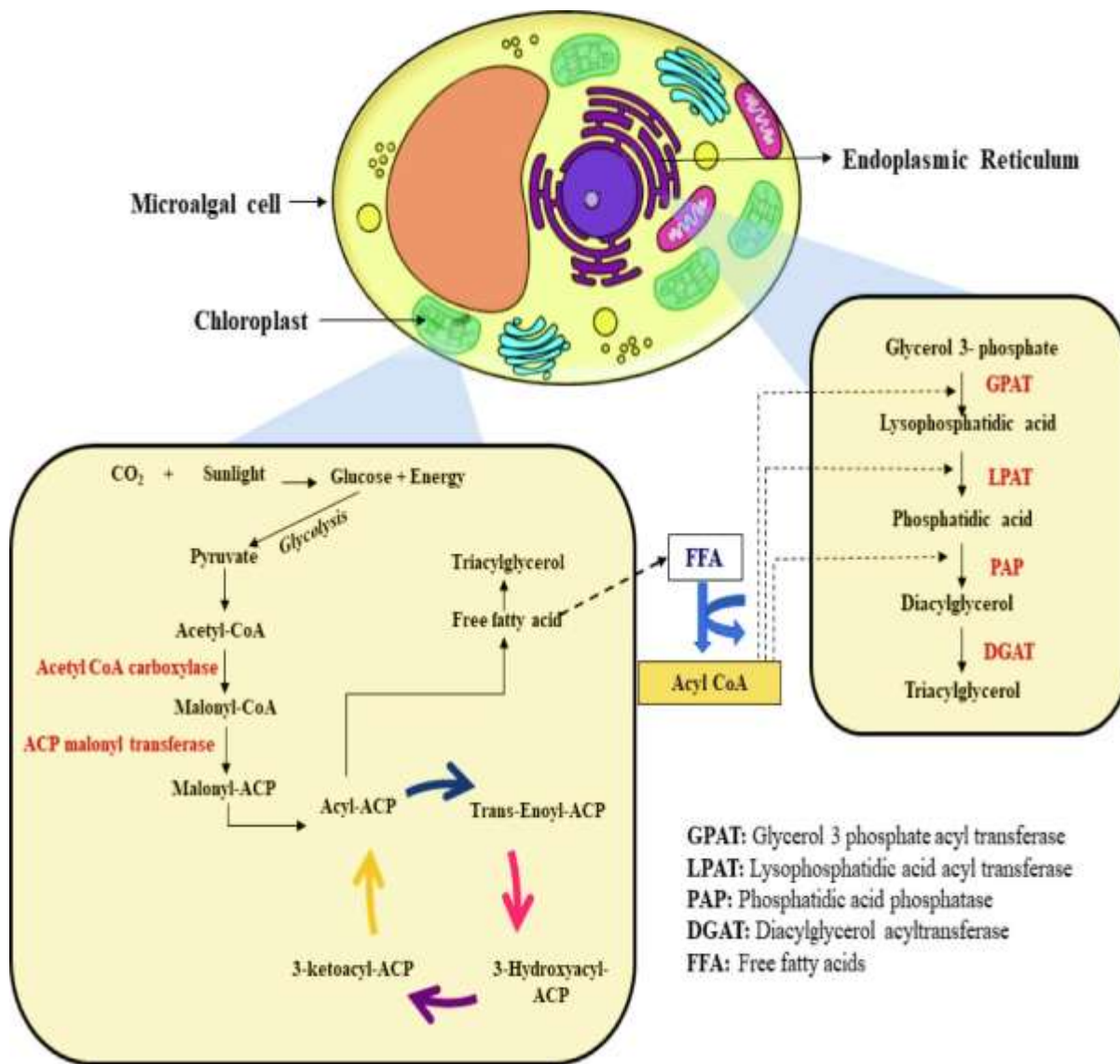


Figura 3. Biosíntesis de triacilgliceroles en orgánulos de microalgas tomado de Pandey *et al.* (2024).

También se ha observado una tendencia al incremento en el contenido de ARA y EPA en las microalgas marinas en función de la deficiencia y/o disminución del fósforo en el medio de cultivo. Tal es el caso de la microalga *Nannochloropsis oculata* donde el ARA (de 8.43 a 11.28%) y el EPA (de 15.71 a 29.97%) incrementaron de manera significativa en condiciones deficientes en este nutriente en el medio de cultivo (Matsui *et al.*, 2020). Resultados similares fueron obtenidos por Adenan *et al.* (2016) en la microalga *Chaetoceros calcitrans*, donde el contenido de ARA (7.0%) y el EPA (29.3%) fueron significativamente mayores en condiciones deficientes de fósforo. Por otra parte, la cantidad de EPA fue mayor en *T. weissflogii* (de 10.64%) y DHA (1.93%) y en *C. muelleri* ARA (0.85%) y EPA (3.25%) en un tratamiento deficiente de fósforo en el medio de cultivo (Lin *et al.*, 2018).

No obstante, contrario a la tendencia mostrada en las microalgas marinas, donde la deficiencia de fósforo en el medio de cultivo incrementa el contenido de ARA y EPA, en la microalga dulceacuícola *Scenedesmus abundans* se registró mayor contenido de ARA (2.73%) en la mayor concentración de fósforo evaluado (80 mg·L<sup>-1</sup>; Mandotra *et al.*, 2016). Por otra parte, se conoce que, el crecimiento de las microalgas se mide mediante el incremento en el número de células en el cultivo, el cual consiste en cuatro fases: retardada, logarítmica, estacionaria y muerte (Maltsev *et al.*, 2023). La velocidad de transición de una fase a otra depende principalmente de las condiciones de crecimiento, suministro de nutrientes, la concentración de nutrientes y las características fisiológicas de la especie (Xing *et al.*, 2022; Maltsev *et al.*, 2023). La cantidad y calidad de lípidos pueden verse influenciado conforme al crecimiento del cultivo. Por ejemplo: en la fase exponencial existe mayor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, por el contrario, en la fase estacionaria se considera que se acumula más triacilglicerol (Rodríguez-Núñez & Toledo-Agüero, 2017; Maltsev *et al.*, 2023). En este sentido, Rodríguez-Núñez & Toledo-Agüero, (2017) observaron que las microalgas *Nitzschia* sp. y *Chaetoceros* sp. registraron la mayor cantidad de EPA (32.80 y 6.44%, respectivamente) durante en la fase exponencial, y, por el contrario, los valores más bajos se registraron en la fase estacionaria.

Además de todos los factores anteriormente mencionados, que pueden influir en la composición proximal y bioquímica de las microalgas, específicamente sobre la composición

de lípidos y contenido de ácidos grasos poliinsaturados; otro factor determinante es la elección de las especies de microalgas, lo cual es una consideración clave, ya que la calidad y cantidad de ácidos grasos varían entre especies. En el caso de las microalgas de interés para este estudio, se ha observado que, *C. muelleri* cultivada en medio f contiene aproximadamente 18.99% de EPA, 2.73% de DHA y 2.26% de ARA. Sin embargo, en condiciones deficientes de fósforo, el ARA incrementa el doble 4.69% (Lin *et al.*, 2018). Por otro lado, *T. weissflogii* es rica en EPA 14.71% y DHA 2.89% (Lin *et al.*, 2018).

## **II.1. Estrategias metabólicas de las microalgas en relación con la deficiencia de fósforo**

En los sistemas marinos con alto contenido de fósforo, las microalgas almacenan el exceso de nutriente en forma de polifosfato. El polifosfato consta de tres a miles de grupos de ortofosfato unidos en una cadena por enlaces fosfoanhidrido (P-O-P). Además, del polifosfato, el fósforo se encuentra en las células en forma de fosfomonoéster (P-O-C) y fosfodiéster (C-O-P-O-C; Dyhrman, 2016). Estos depósitos de fósforo se asemejan a pequeños gránulos vacuolares. Dichas reservas de polifosfato se metabolizan durante los periodos deficientes de fósforo en el medio de cultivo, suministrando fósforo a la célula aproximadamente entre cinco a diez días (Solovchenko *et al.*, 2019).

Las microalgas tienen la capacidad de reciclar el fósforo celular en condiciones limitantes o deficientes de fósforo a través de un conjunto de enzimas que hidrolizan los enlaces de los compuestos bioquímicos ricos en fósforo. En las células eucariotas, tres clases de fosfoesterasas están reguladas por niveles bajos de fósforo: la fosfatasa alcalina, fosfodiesterasa y 5' nucleotidasa. La enzima fosfatasa alcalina y las fosfodiesterasas actúan para romper los enlaces fosfomonoéster y fosfodiéster de los compuestos como ADN, ARN y en los lípidos. También, se ha planteado la hipótesis de que las fosfodiesterasas influyen en la descomposición de los fosfolípidos para que se absorban en las células en ambientes privados de fósforo. Por último, la 5' nucleotidasa actúa sobre el ATP (Dyhrman, 2016). Las microalgas absorben el P a través de múltiples transportadores ubicados en la membrana celular. Las formas y la abundancia de los transportadores de P que afectan la cinética de utilización de P están reguladas por la disponibilidad de este: los transportadores de alta

velocidad y mayor afinidad se acumulan en condiciones limitantes de P y los transportadores de alta velocidad y baja afinidad son característicos en condiciones altas de P (Dyhrman, 2016; Su *et al.*, 2022).

En las células eucariotas, el mayor depósito de P se encuentra en el ácido ribonucleico ARN, y demanda el 60% del P celular. En este sentido, se ha observado que las células eucariotas tienen la capacidad de modular su requerimiento de P, reduciendo así su uso celular. Por lo tanto, existe una disminución del ARN ribosomal y, por consiguiente, la transcripción de proteínas es gradual (Dyhrman, 2016).

Otro ejemplo en el rendimiento de las reservas de P, es el reemplazo de fosfolípidos a lípidos sin P. Por ejemplo, en las diatomeas *Thalassiosira pseudonana* y *T. weissflogii* se encontró una membrana rica en sulfolípidos (Wang *et al.*, 2014; Brembu *et al.*, 2017). Este mecanismo representa entre el 10 y el 30% para mantener las reservas de P celular (Dyhrman, 2016). También, evita reacciones metabólicas que requieran fósforo, por ejemplo: la glucólisis, donde la conversión de una molécula de glucosa en dos moléculas de piruvato requiere dos moléculas de fosfato (Dyhrman, 2016).

Los glicerolípidos y fosfolípidos se componen de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados. En los fosfolípidos, la cantidad de ácidos grasos altamente insaturados aumenta con relación a la deficiencia de P, debido a las respuestas fisiológicas de las microalgas para mantener la función y estructura de la membrana celular. Por ejemplo, la microalga *Nannochloropsis oculata* acumula ARA y EPA en las membranas mitocondriales para proteger la estructura del estrés oxidativo (Matsui *et al.*, 2020).

Los estudios que analizan el efecto de diferentes concentraciones del fósforo sobre los ácidos grasos poliinsaturados en *C. muelleri* y *T. weissflogii* son escasos, es por este motivo que surge la necesidad de contribuir al conocimiento de las respuestas fisiológicas de estas microalgas con la finalidad determinar las concentraciones óptimas de fósforo en el medio de cultivo que induzcan una mayor producción de estos compuestos de gran interés en la nutrición acuícola.



### **III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Las microalgas *C. muelleri* y *T. weissflogii* son empleadas comúnmente como alimento en la acuicultura debido a su composición bioquímica y a su relativa facilidad de cultivo. En este sentido, se ha observado que la composición bioquímica de las microalgas puede ser modulada mediante las condiciones del cultivo. Sin embargo, a pesar de la importancia de los PUFA en la dieta de los organismos, la mayoría de los estudios han evaluado el efecto de los nutrientes del medio de cultivo, la salinidad y la irradiancia sobre la respuesta en las concentraciones de proteínas, carbohidratos y lípidos en las microalgas. Son pocos los estudios que describan el efecto del fósforo con relación a la cantidad de PUFA. Por lo que es necesario explorar las condiciones de cultivo con las cuales se obtienen las mayores concentraciones de estos ácidos grasos esenciales. Por tal motivo, en el presente estudio se evaluó el contenido de lípidos y el perfil de ácidos grasos de las microalgas en respuesta a distintas concentraciones de fósforo en el medio de cultivo; con el fin de conocer la calidad nutricional de cada microalga, mismas que pudieran ser usadas para la acuicultura o para la producción de PUFA a nivel comercial.

#### **IV. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN**

- 1.- ¿Qué concentración de fósforo incrementa la biomasa (peso seco y orgánico), el contenido de lípidos y la producción de ácidos grasos poliinsaturados de las microalgas *Thalassiosira weissflogii* y *Chaetoceros muelleri*?
- 2.- ¿Cuál de las dos especies de microalgas estudiadas aporta la mayor composición de ácidos grasos esenciales y en qué tratamiento?

#### **V. HIPÓTESIS**

- ❖ Los tratamientos con limitación del fósforo inducen mayores valores en el contenido de lípidos y el de ácidos grasos esenciales en las microalgas *Thalassiosira weissflogii* y *Chaetoceros muelleri*, mientras que la mayor concentración de fósforo incrementa la biomasa (peso seco y orgánico).
- ❖ La microalga *Chaetoceros muelleri* cultivada en medio f con limitación de fósforo (f/4) aporta mayor contenido de ácidos grasos esenciales (EPA, ARA y DHA) en comparación a lo producido en *Thalassiosira weissflogii* en los tratamientos evaluados.

## **VI. OBJETIVO GENERAL**

- ❖ Evaluar el contenido de biomasa (peso seco y orgánico), lípidos y el perfil de ácidos grasos de las microalgas *Thalassiosira weissflogii* y *Chaetoceros muelleri* en respuesta a las diferentes concentraciones del fósforo en el medio f.

## **VII. OBJETIVOS PARTICULARES**

- ❖ Estimar el peso seco y orgánico de las microalgas cultivadas con diferentes concentraciones de fósforo: f (15 mL), f/2 (7.5 mL), f/4 (3.75 mL), f/0 (sin fósforo).
- ❖ Determinar el contenido de lípidos de las microalgas cultivadas con diferentes concentraciones de fósforo.
- ❖ Analizar el perfil de ácidos grasos de las microalgas cultivadas con diferentes concentraciones de fósforo.

## VIII MATERIALES Y MÉTODOS

### VIII. 1 CULTIVO DE MICROALGAS

El presente trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de Ecofisiología de Organismos Acuáticos y Cultivos de Apoyo para la Acuicultura, mejor conocido como Laboratorio de Microalgas, de la Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa.

Para cultivar las microalgas se utilizó agua de mar de la bahía de Mazatlán y fue pasada por 3 filtros de cartucho en serie. Los primeros tres con una capacidad progresiva de retención de partículas con diámetros de 10, 5 y 1  $\mu\text{m}$ . Posteriormente, el agua fue pasada por un cartucho de carbón activado para eliminar la materia orgánica disuelta. El agua filtrada se mantuvo en recipientes de 200 L y se desinfectó adicionando 1  $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$  de hipoclorito de sodio comercial al 5% por lo menos durante 24 horas. Al momento de su uso, se eliminó el cloro adicionando 60  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de tiosulfato de sodio, acelerando este proceso con aireación intensa durante 30 minutos (Hemerick, 1973). Previo al uso del agua, se corroboró la ausencia de cloro mediante el método colorimétrico basado en el indicador ortotoluidina.

Para el cultivo de las microalgas *C. muelleri* y *T. weissflogii*, se empleó la técnica de transferencias sucesivas, utilizando el cultivo de la cepa contenido en un tubo de ensayo de aproximadamente 15 mL. Se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 500 mL, usando un volumen útil de 250 mL. 72 horas después, el cultivo se transfirió a un recipiente de plástico transparente usando un volumen de 3 L. Después, el cultivo se transfirió en garrafones de 20 L usando un volumen útil de 15 L (Zazueta-Patrón, 2016). Cuando se obtuvo suficiente biomasa de las microalgas, se inoculó en cada uno de los tratamientos 10,000  $\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$  de *T. weissflogii*, mientras que de *C. muelleri* se inoculó 200,000  $\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$  en cada uno de los tratamientos.

Los cultivos experimentales se llevaron a cabo en recipientes transparentes con una capacidad de 20 L en un volumen útil de 15 L. Las microalgas se cultivaron con los nutrientes del medio f de Guillard & Ryther (1962) el cual contiene los nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo de las células (Tabla I). La cantidad de nutrientes del medio f fue

agregada a razón volumétrica de  $1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$  de agua de mar, a excepción del fósforo que se disminuyó gradualmente de la siguiente manera: de acuerdo con las cantidades suministradas de fósforo por cada unidad experimental de 15 L. En f: 15 mL de fósforo, tratamiento f/2: 7.5 mL, f/4: 3.75 mL y el tratamiento f/0: sin fósforo. Las concentraciones del resto de los nutrientes (nitratos, silicatos, metales traza y vitaminas) se mantuvieron constantes según el medio f. Cada tratamiento contó con cuatro repeticiones (Fig. 4).

Cada unidad experimental usada para los cultivos de las microalgas se ubicó en los estantes siguiendo un diseño experimental aleatorio. El aire en los cultivos permaneció constante y fue suministrado por un soplador (blower) de 2.5 HP de potencia, y antes de entrar a los cultivos se pasó por un filtro de cartucho de  $1 \mu\text{m}$ . La iluminación fue constante y suministrada por 6 lámparas fluorescentes de luz blanca que producen una intensidad de 6000-65000 luxes. La temperatura ambiente de la sala de los cultivos se mantuvo a  $26 \text{ }^\circ\text{C}$  utilizando sistemas de aire acondicionado.

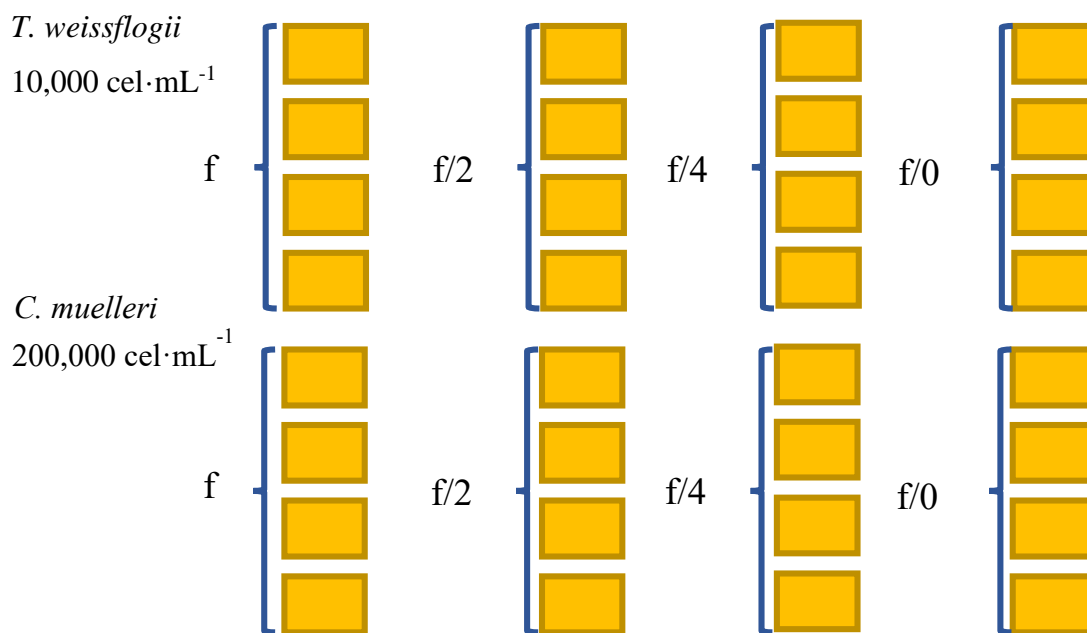


Figura 4. Diseño del experimento para evaluar la biomasa, el contenido de lípidos y la producción de ácidos grasos poliinsaturados en las microalgas *T. weissflogii* y *C. muelleri* cultivadas en cuatro concentraciones de fósforo f: 15 mL de fósforo, tratamiento f/2: 7.5 mL, f/4: 3.75 mL y el tratamiento f/0: sin fósforo.

Los cultivos se mantuvieron durante 72 h, lo que corresponde a la fase exponencial de los cultivos bajo estas condiciones, según se determinó en estudios preliminares de estas microalgas. A las 72 h se tomaron muestras de cada unidad experimental para determinar la biomasa mediante la densidad celular, el peso seco y orgánico, y además de muestras para la determinación del contenido de lípidos total y el perfil de ácidos grasos de las microalgas en los tratamientos.

Tabla I. Formulación del medio f de Guillard y Ryther (1962) utilizado para el cultivo de las microalgas *Chaetoceros muelleri* y *Thalassiosira weissflogii*.

<b>NUTRIENTES MAYORITARIOS</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>
Nitrato de sodio	1.76 mmol·L <sup>-1</sup>
Fosfato de sodio monobásico	0.072 mmol·L <sup>-1</sup>
Metasilicato de sodio	0.107 mmol·L <sup>-1</sup>
<b>MEZCLA DE METALES TRAZA</b>	
EDTA férrico	0.023 mmol·L <sup>-1</sup>
Sulfato cúprico	0.076x10 <sup>-3</sup> mmol·L <sup>-1</sup>
Sulfato de zinc	0.153x10 <sup>-3</sup> mmol·L <sup>-1</sup>
Cloruro de cobalto	0.085x10 <sup>-3</sup> mmol·L <sup>-1</sup>
Cloruro manganoso	1.83x10 <sup>-3</sup> mmol·L <sup>-1</sup>
Molibdato de sodio	0.052x10 <sup>-3</sup> mmol·L <sup>-1</sup>
<b>VITAMINAS</b>	
Biotina	1 µg·L <sup>-1</sup>
Cianocobalamina	1 µg·L <sup>-1</sup>
Tiamina	200 µg·L <sup>-1</sup>

## VIII. 2 CÁLCULO DE LA DENSIDAD CELULAR

Para determinar la densidad celular de los tratamientos mediante conteos celulares utilizando un microscopio óptico compuesto Olympus con una cámara de Neubauer con capacidad de 0.1 mm<sup>3</sup>. La concentración celular se calculó con la siguiente fórmula (Arredondo Vega & Voltolina, 2007).

$$C = N \cdot 10^4 \cdot dil$$

En donde:

C= cel·mL

N= promedio de células presentes en 1 mm<sup>2</sup> (0.1 µL)

dil= factor de dilución (cuando se consideró necesario diluir la muestra)

### **VIII. 3 ANÁLISIS DE LA BIOMASA (PESO SECO Y ORGÁNICO)**

Para la determinación del peso seco y orgánico de las microalgas, se usó el método gravimétrico descrito por (Sorokin, 1973); las muestras se concentraron mediante filtración a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF-C de 47 mm de diámetro, los cuales fueron previamente lavados con agua destilada, calcinados en una mufla a 250 °C por 4 horas para eliminar cualquier componente orgánico que pueda interferir con la muestra. Los filtros se pesaron en una balanza analítica Denver Instrument Modelo PI-225D con precisión de lectura de 0.01 mg antes de ser usados. Se filtró una cantidad conocida de muestras en cada filtro. En las muestras de la microalga *T. weissflogii* se filtró 150 mL en los tratamientos f y f/2. En los tratamientos f/4 y f/0 se filtró 250 mL. En las muestras de *Chaetoceros muelleri* se filtró 150 mL en los tratamientos f, f/2, f/4, y en el tratamiento f/0 200 mL. Posteriormente, a cada filtro se le añadieron 3 mL de formiato de amonio al 4% el cual cumple dos funciones: eliminar los residuos de sal marina que pudieran interferir en el cálculo de los pesos y preservar la integridad de las muestras.

Los filtros con muestras se colocaron en una estufa a una temperatura de 60 °C durante 48 horas. Posteriormente, se pesaron cada 24 horas hasta verificar su peso constante. Por último, se calcinaron a 450 °C en una mufla (Thermoline Furnace 48000) durante 10 horas y nuevamente se pesaron hasta alcanzar un peso constante para obtener el contenido inorgánico de las muestras. El peso orgánico de las mismas fue calculado por diferencia entre el peso seco y el peso cenizas de acuerdo con la metodología propuesta por (Sorokin, 1973).

### **VIII. 4 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE LÍPIDOS**

Para los lípidos se tomaron muestras concentradas en filtros de vidrio Whatman GF/C de 25 mm de diámetro y se almacenaron en un ultracongelador a -60 °C.

Antes del análisis de lípidos, se realizó la curva de calibración, usando un gradiente de concentración de tripalmitina de 0.0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4 mg/mL, obteniendo la ecuación la cual se usaría para determinar el contenido de lípidos de las muestras de las microalgas una vez que fueran procesadas.

La extracción de lípidos totales se determinó usando la técnica de (Bligh & Dyer, 1959). Consiste en la formación de una mezcla monofásica de cloroformo, metanol y agua ( $\text{CHCl}_3$ :  $\text{CH}_3\text{OH}$ :  $\text{H}_2\text{O}$ ) con la que se asegura la extracción de la mayoría de los lípidos, incluyendo aquellos que se encuentran ligados a otras moléculas. Primeramente, los filtros de Whatman GF-C de 25 mm que contenían las muestras de cada tratamiento de las microalgas se colocaron en tubos para centrífuga Corning de 15 mL. Los tubos se colocaron en un baño de hielo, y se les agregó la solución de extracción y se maceraron con una varilla de punta redonda. Cuando se terminó de macerar todos los filtros, se taparon los tubos con papel aluminio, se agitaron y se procedió a centrifugarlos a 4000 rpm en una centrífuga Eppendorf modelo 5810/ R durante 15 minutos. El sobrenadante resultante se pasó a un tubo de ensayo. Posteriormente, se realizó una segunda extracción. El sobrenadante de la segunda extracción se agregó al de la primera extracción y se añadieron 2 mL de agua destilada y se agitó vigorosamente cada uno de los tubos hasta formar una bifase. Los tubos se cubrieron con papel aluminio y se sometieron a refrigeración por mínimo 24 horas. Transcurrido el tiempo, se desechó la capa superior con una pipeta pasteur y se procedió a la evaporación de cloroformo en una estufa a temperatura a 50 °C durante dos días. Una vez evaporado completamente el solvente, se añadieron 3 mL de una solución ácida de dicromato de potasio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) al 2% cada uno de los tubos, se cubrieron con papel aluminio, y se colocaron en baño María a 100 °C durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo, se retiraron del termobañó y se dejaron enfriar a temperatura ambiente, para así posteriormente añadir 4.5 mL de agua destilada, se mezclaron vigorosamente y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Por último, se leyeron en el espectrofotómetro Jenway modelo 7300 a una longitud de onda de 590 nm. La estimación de los lípidos de las muestras se realizó sustituyendo los valores en la ecuación resultante de la curva de calibración con el estándar de tripalmitina.



## VIII. 5 DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

Para la determinación del perfil de ácidos grasos se tomó un volumen de 900 mL de cada unidad experimental, la cual fue concentrada por centrifugación (4000 rpm durante 5 min a 4 °C) usando una Centrífuga Eppendorf/5810 R, posteriormente las muestras fueron congeladas a -60 °C.

La extracción de ácidos grasos en *C. muelleri* y *T. weisflogii* se realizó siguiendo la metodología descrita por Folch *et al.* (1957). Pero sustituyendo el cloroformo por diclorometano en una proporción de 2:1 diclorometano: metanol (Cequier-Sánchez *et al.*, 2008). Primeramente, a cada tubo con muestra se le añadió la solución extractora diclorometano: metanol más BHT (Butil hidroxitolueno) al 1% disuelto en agua desionizada para evitar la oxidación de las muestras. Posteriormente, la muestra se trituró con ayuda de un homogeneizador de tejidos (Tissuelyser modelo F6/10) para romper la membrana celular. Los tubos de ensayo se cubrieron con papel aluminio y se guardaron en refrigeración durante 24 horas. Al día siguiente, se agitaron nuevamente los tubos de ensayo con muestra durante 2 min. Posteriormente, las muestras se transfirieron a tubos de centrifuga y se centrifugo a 3000 rpm por 10 min a 4 °C. El sobrenadante se colocó en viales previamente lavados y etiquetados. Los tubos con muestras se lavaron 2 o 3 veces con una mezcla 1:1 metanol: diclorometano. El sobrenadante de la extracción se le adicionó 1 mL de agua y una gotita de ácido clorhídrico a una concentración de 0.6 N para asegurar la extracción del grupo fosfato. Nuevamente se centrifugo a 3000 rpm por 10 min a 4 °C y posteriormente se eliminó el agua de la muestra con la ayuda de una pipeta Pasteur. Después, se evaporó el solvente con flujo de nitrógeno, los tubos se sellaron con papel parafilm y se almacenaron en el congelador durante 24 horas.

Para la saponificación, a cada muestra resultante se le agregó 100 µL de solución metanólica al 90% y se dejó en baño María a 60 °C por 30 min. Después, se agregaron 300 µL de agua destilada, más 200 µL de hexano y se agitó vigorosamente. Luego se centrifugó a 3000 rpm por 2 min a 4 °C, para separar los lípidos saponificables. Posteriormente, se agregó 300 µL de agua, y se acidificó con ácido clorhídrico HCl 6N (1 gota), y se adicionó 200 µL de

hexano, se agitó y se rescataron los lípidos saponificables, los cuales se secaron en atmósfera de nitrógeno gaseoso.

Finalmente, la metilación se efectuó adicionando 500  $\mu$ L el reactivo de esterificación trifluoruro de boro en metanol al 14% (BF<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH) a cada muestra, y se mantuvieron en baño María por 15 min a 60 °C. Posteriormente, se centrifugó a 2000 rpm por 5 min a 4 °C, para rescatar la fase superior hexano que contiene los ésteres de ácidos grasos, misma que fue transferida en viales color ámbar de 2 mL, los cuales se secaron con flujo de nitrógeno gaseoso, y fueron almacenados a -20 °C hasta su análisis (Morrison, 1986).

La determinación del perfil de ácidos grasos de *C. muelleri* y *T. weissflogii* se realizó en un cromatógrafo de gases de la marca Thermo Scientific Trace 1310 Gas Chromatograph, con una columna capilar DB-23 de 30 metros de longitud, un diámetro interno de 0.25 mm y 0.25  $\mu$ m de espesor y se utilizó nitrógeno UAP como gas acarreador. Para identificar el perfil de ácidos grasos se compararon los tiempos de retención con un estándar compuesto por 31 ácidos grasos (FAME Mix C4-C24, Supelco). Los ácidos grasos fueron calculados como porcentaje de los ácidos grasos metilados.

$$\% = \frac{\text{área del FAME de interés}}{\Sigma \text{área total de picos de interés}} \times 100$$

## VIII. 6 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se consideró como variables dependientes; la densidad celular, peso seco y orgánico, lípidos y ácidos grasos de las microalgas. Primeramente, los valores en proporciones de ácidos grasos, para su análisis estadístico, fueron transformados con la función arcoseno. Posteriormente, a las variables se les aplicó las pruebas de normalidad de Lilliefors y la prueba de homoscedasticidad de Bartlett para determinar la aplicación de pruebas estadísticas paramétricas o no paramétricas. Cuando los datos cumplieron con estos supuestos estadísticos, se les aplicó un ANOVA de una vía, para evaluar las diferencias significativas en el contenido de lípidos y perfil de ácidos grasos entre tratamientos, y ANOVA de dos vías para determinar diferencias entre (tratamientos y especies). Posteriormente, se aplicó una

prueba de Fisher LSD para identificar dichas diferencias. Cuando los datos no cumplieron con los supuestos estadísticos, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Los datos analizados con pruebas no paramétricas están marcados en las tablas con un asterisco (\*). En todas las pruebas estadísticas se consideró un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$  (Zar, 2010). Las pruebas estadísticas se realizaron utilizando el software STATISTICA.

## IX. RESULTADOS

### IX. 1 DENSIDAD CELULAR

A las 72 h del experimento, se encontraron  $3.12 \pm 0.53$  cel·mL<sup>-1</sup> de la microalga TH-W-1 cultivada en el tratamiento f,  $3.13 \pm 0.27$  en f/2,  $2.81 \pm 0.51$  en el medio f/4, y  $1.84 \pm 0.08$  cel·mL<sup>-1</sup> en el medio f/0. Los análisis estadísticos demostraron que no existen diferencias significativas en la densidad celular en TH-W-1 en los tratamientos evaluados. Por otro lado, en CH-M-1 cultivada en el tratamiento f, se registraron  $2.49 \pm 0.13$  cel·mL<sup>-1</sup>,  $2.29 \pm 0.22$  cel·mL<sup>-1</sup> en el medio f/2,  $2.33 \pm 0.04$  cel·mL<sup>-1</sup> en el medio f/4 y  $1.38 \pm 0.17$  cel·mL<sup>-1</sup> en el medio f/0. Donde la densidad celular en CH-M-1 cultivada en medio f/0 fue significativamente menor en relación con lo registrado al resto de los tratamientos (Tabla II).

Tabla II. Valores promedio y error estándar en la densidad celular registrada a las 72 h en *T. weissflogii* y *C. muelleri*. Diferentes superíndices dentro de la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ,  $a < b$ ). Prueba ANOVA de una vía y prueba Fisher LSD.

Tratamientos	TH-W ( $\times 10^5$ cel·mL <sup>-1</sup> )	CH-M ( $\times 10^6$ cel·mL <sup>-1</sup> )
f	$3.12 \pm 0.53$	$2.49 \pm 0.13^b$
f/2	$3.13 \pm 0.27$	$2.29 \pm 0.22^b$
f/4	$2.81 \pm 0.51$	$2.33 \pm 0.04^b$
f/0	$1.84 \pm 0.08$	$1.38 \pm 0.17^a$

### IX.2 ANÁLISIS DE BIOMASA (PESO SECO Y PESO ORGÁNICO)

Los valores de peso seco (PS) y peso orgánico (PO) se compararon entre los tratamientos de cada especie de microalgas. En el caso del volumen de producción de biomasa seca, TH-W-1 tuvo el mayor valor en el tratamiento f ( $30.11$  mg·mL<sup>-1</sup>) y el menor valor en el tratamiento f/0 ( $20.46$  mg·mL<sup>-1</sup>), pero sin diferencias significativas entre los tratamientos. En el caso de CH-M-1, se registró el mayor valor en el tratamiento f/4 ( $45.78$  mg·mL<sup>-1</sup>) y el menor valor en el tratamiento f ( $39.84$  mg·mL<sup>-1</sup>), así mismo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla III).

Tabla III. Valores promedio y error estándar del peso seco en  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1) y *C. muelleri* (CH-M-1) cultivadas en cuatro concentraciones de fósforo f, f/2, f/4, f/0. Diferentes superíndices dentro de la misma columna indican diferencias significativas ( $p<0.05$ ,  $a<b$ ). Prueba ANOVA de una vía y prueba Fisher LSD.

<b>Tratamientos</b>	<b>TH-W-1</b>	<b>CH-M-1</b>
<b>f</b>	30.11±1.88	39.84±1.60
<b>f/2</b>	27.01±1.72	40.34±2.83
<b>f/4</b>	28.93±3.93	45.78±0.46
<b>f/0</b>	20.46±2.25	42.34±3.31

Por otra parte, tomando en cuenta la producción de biomasa seca por célula; TH-W-1 registró el mayor valor en el tratamiento f ( $712.34 \text{ pg}\cdot\text{cel}^{-1}$ ) y el menor valor en el tratamiento f/0 ( $450.58 \text{ pg}\cdot\text{cel}^{-1}$ ), sin diferencias significativas entre sí, ni con el resto de los tratamientos (Tabla IV). En el caso de CH-M-1 el mayor valor de biomasa seca por célula fue en el tratamiento f/0 ( $151.31 \text{ pg}\cdot\text{cel}^{-1}$ ) y el menor valor en el tratamiento f ( $107.44 \text{ pg}\cdot\text{cel}^{-1}$ ), y de igual manera no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla IV).

Tabla IV. Valores promedio y error estándar del PS en  $\text{pg}\cdot\text{cel}^{-1}$  de las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1) y *C. muelleri* (CH-M-1) en cuatro concentraciones de fósforo f, f/2, f/4, f/0. Diferentes superíndices dentro de la misma columna indican diferencias significativas ( $p<0.05$ ,  $a<b$ ). Prueba ANOVA de una vía y Prueba Fisher LSD.

<b>Tratamientos</b>	<b>TH-W-1</b>	<b>CH-M-1*</b>
<b>f</b>	712.34±136.47	107.44±7.54
<b>f/2</b>	589.03±68.97	120.19±13.44
<b>f/4</b>	494.11±153.06	130.75±2.18
<b>f/0</b>	450.58±61.22	151.31±20.85

Prueba no paramétrica: \*

En relación con el volumen de producción de biomasa orgánica, las concentraciones de PO en la microalga TH-W-1 fue mayor en el tratamiento f/4 (14.71 mg·mL<sup>-1</sup>), el cual presentó diferencias significativas con el tratamiento f/2 (10.37 mg·mL<sup>-1</sup>) y f/0 (12.18 mg·mL<sup>-1</sup>), pero no con el f (12.57 mg·mL<sup>-1</sup>). En el caso de CH-M-1, el mayor contenido de PO se registró en el tratamiento f/4 (25.68 mg·mL<sup>-1</sup>) y el menor valor en el tratamiento f/2 (22.92 mg·mL<sup>-1</sup>), sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre estos valores de los tratamientos (Tabla V).

Tabla V. Valores promedio y error estándar del peso orgánico en mg·mL<sup>-1</sup> de las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1) y *C. muelleri* (CH-M-1) cultivadas en cuatro concentraciones de fósforo f, f/2, f/4, f/0. Diferentes superíndices dentro de la misma columna indican diferencias significativas (p<0.05, a<b). Prueba ANOVA de una vía y Prueba Fisher LSD.

Tratamientos	TH-W-1	CH-M-1
f	12.57±0.55 <sup>ab</sup>	22.98±1.02
f/2	10.37±0.30 <sup>a</sup>	22.92±1.80
f/4	14.71±1.07 <sup>b</sup>	25.68±0.59
f/0	12.18±0.70 <sup>a</sup>	23.98±1.46

En cuanto al contenido del peso orgánico celular o unitario, TH-W-1 registró el valor mayor en el tratamiento f (288.51 pg·cel<sup>-1</sup>) y el valor menor en el tratamiento f/2 (226.80 pg·cel<sup>-1</sup>), pero sin diferencias significativas entre los tratamientos. No obstante, para CH-M-1 el valor más alto se registró en el tratamiento f/0 (85.82 pg·cel<sup>-1</sup>) y el menor valor en f (61.76 pg·cel<sup>-1</sup>) y del mismo modo, sin diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla VI).

Tabla VI. Valores promedio y error estándar del PO en  $\text{pg}\cdot\text{cel}^{-1}$  de las microalgas *T. weissflogii* (TH-W-1) y *C. muelleri* (CH-M-1) cultivadas en cuatro concentraciones de fósforo f, f/2, f/4, f/0. Diferentes superíndices dentro de la misma columna indican diferencias significativas ( $p<0.05$ ,  $a<b$ ). Prueba ANOVA una vía y Fisher LSD.

Tratamientos	TH-W-1	CH-M-1*
<b>f</b>	288.51±40.28	61.76±3.68
<b>f/2</b>	226.80±25.20	68.34±8.18
<b>f/4</b>	249.18±74.87	73.28±0.83
<b>f/0</b>	267.60±24.72	85.82±11.76

Prueba de Kruskal-Wallis: \*

### IX.3 ANÁLISIS DE LÍPIDOS

En el análisis del contenido de lípidos totales en relación peso seco (PS) en la microalga CH-M-1 se observó que, el tratamiento con el mayor contenido de lípidos fue el f/2:  $7.32\pm 0.56 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  y el menor en f/4:  $5.70\pm 0.65 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ . Por otra parte, el contenido de lípidos en TH-W-1 fue mayor en el tratamiento f/2:  $13.28\pm 2.12 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  y el menor en f/0:  $8.36\pm 0.79 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ . No se encontró un efecto significativo de la disminución de fósforo ( $p=0.05$ ) en relación con el contenido de lípidos en ambas microalgas, pero sí en relación con el contenido de lípidos entre microalgas ( $p=0.00$ ); el contenido de lípidos en TH-W-1 ( $13.28\pm 2.12 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) fue significativamente mayor al contenido de lípidos en CH-M-1 ( $7.32\pm 0.56 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) (Tabla VII).

Tabla VII. Contenido de lípidos en  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  PS de las microalgas *Thalassiosira weissflogii* (TH-W-1) y *Chaetoceros muelleri* (CH-M-1), cultivadas en cuatro concentraciones de fósforo f, f/2, f/4 y f/0. Los resultados son valores promedio  $\pm$  error estándar. Diferentes letras en superíndice entre los factores (especies y tratamientos) indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ,  $a < b$ ). Prueba ANOVA dos vías y Fisher LSD.

	Tratamientos			
	f	f/2	f/4	f/0
<b>TH-W-1</b>	11.17 $\pm$ 1.56	13.28 $\pm$ 2.12	8.48 $\pm$ 1.58	8.36 $\pm$ 0.79
<b>CH-M-1</b>	7.25 $\pm$ 0.45	7.32 $\pm$ 0.56	5.70 $\pm$ 0.65	6.89 $\pm$ 0.82
<b>Efecto</b>	p-valor			
Especies	0.00			
Tratamientos	0.05			
Especies vs Tratamientos	0.31			

Por otra parte, se observó que la mayor cantidad del contenido de lípidos con relación al PO en la microalga TH-W-1 se registró en el tratamiento f/2 ( $5.08 \pm 0.77 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) y la menor cantidad en el tratamiento f/4 ( $4.23 \pm 0.54 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ), pero sin diferencias significativas entre los tratamientos. Mientras que para CH-M-1 el mayor contenido de lípidos se registró en los tratamientos f ( $4.16 \pm 0.05 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) y f/2 ( $4.16 \pm 0.37 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) y la menor cantidad en el tratamiento f/4 ( $3.27 \pm 0.40 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ), de igual forma, sin diferencias significativas. Por último, no se encontró aumento significativo ( $p = 0.27$ ) en la cantidad de lípidos en relación con el PO en las microalgas TH-W-1 y CH-M-1 cultivadas en cuatro concentraciones fósforo. Sin embargo, el contenido de lípidos en PO fue estadísticamente diferente entre las especies de microalgas (Tabla VIII).



Tabla VIII. Concentración de lípidos en  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  PO de las microalgas *Thalassiosira weissflogii* (TH-W-1) y *Chaetoceros muelleri* (CH-M-1) cultivadas en cuatro concentraciones de fósforo f, f/2, f/4, f/0. Los resultados son valores promedio  $\pm$  error estándar. Diferentes letras en superíndice entre los factores (especies y tratamientos) indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ,  $a < b$ ). Prueba ANOVA dos vías y Fisher LSD.

	Tratamientos			
	f	f/2	f/4	f/0
<b>TH-W-1</b>	4.62 $\pm$ 0.57	5.08 $\pm$ 0.77	4.23 $\pm$ 0.54	5.00 $\pm$ 0.31
<b>CH-M-1</b>	4.16 $\pm$ 0.05	4.16 $\pm$ 0.37	3.27 $\pm$ 0.40	3.88 $\pm$ 0.32
<b>Efecto</b>	p-valor			
Especies	0.01			
Tratamientos	0.27			
Especies vs Tratamientos	0.90			

Asimismo, se expresó la cantidad de lípidos en términos de porcentaje respecto al peso orgánico de las microalgas, lo que permite evaluar la proporción relativa de lípidos en relación con la biomasa total de las células. Este parámetro es importante para determinar la eficiencia lipídica de cada especie y su potencial para la producción de lípidos. Se observó, que la especie CH-M-1 presenta mayor porcentaje de lípidos (29.33 $\pm$ 2.33%) a diferencia de TH-W-1 (25.25 $\pm$ 4.15%), y se encontraron diferencias significativas entre las especies de microalgas ( $p=0.03$ ). Por una parte, en CH-M-1 el mayor porcentaje de lípidos se encontró en el tratamiento f/4 (29.33 $\pm$ 2.33%) y el menor en el tratamiento f (24.08 $\pm$ 0.32%). De igual forma, en TH-W-1 se encontró el mayor porcentaje de lípidos en el tratamiento f/4 (25.25 $\pm$ 4.15%), y el menor valor en el tratamiento f/0 (20.14 $\pm$ 1.40%). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (Fig. 5).

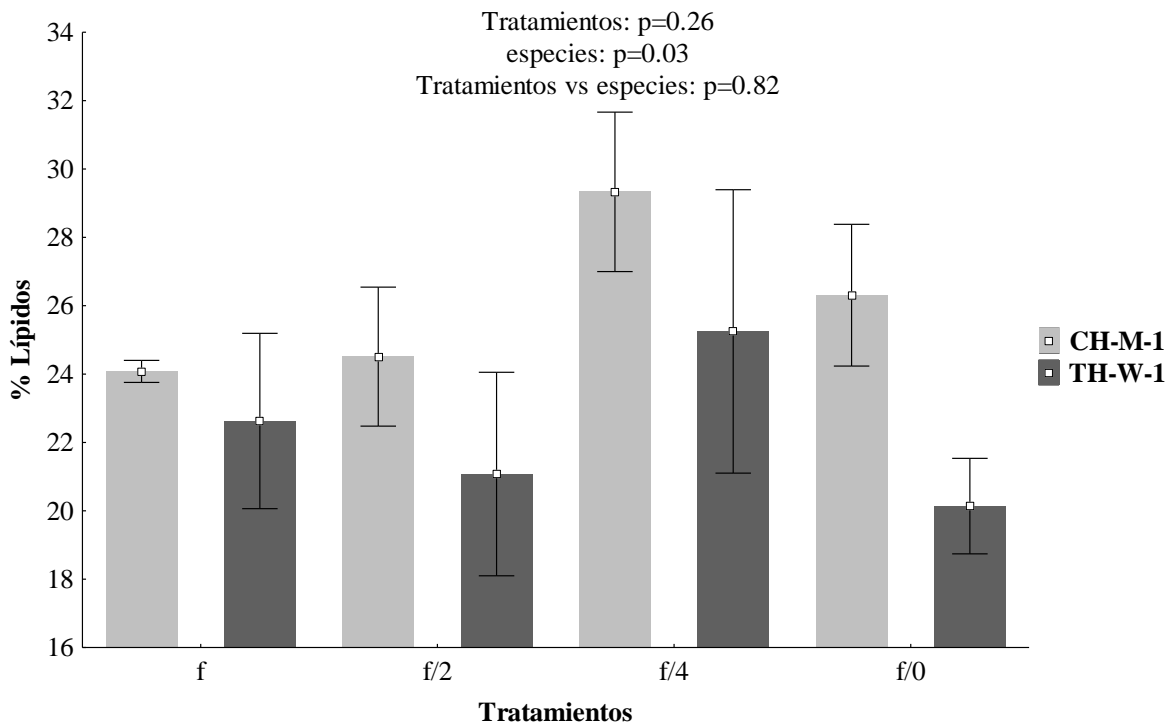


Figura 5. Porcentaje (%) de lípidos respecto al peso orgánico de las microalgas *Chaetoceros muelleri* y *Thalassiosira weissflogii* cultivadas en el medio f en cuatro concentraciones de fósforo (f, f/2, f/4 y f/0). El valor de ( $p < 0.05$ ) indica diferencias significativas entre los tratamientos (Prueba ANOVA dos vías y Fisher LSD).

Por último, se analizó la concentración de lípidos en términos de volumen en las dos especies de microalgas, con el objetivo de proporcionar información práctica y relevante para el sector acuícola, específicamente para los acuicultores que buscan optimizar la producción de microalgas con alto contenido de lípidos. En este sentido, se encontró que la especie CH-M-1 representa mayor contenido en lípidos ( $49.95 \pm 2.72 \mu\text{g}\cdot\text{mL}$ ) a diferencia de TH-W-1 ( $18.79 \pm 1.86 \mu\text{g}\cdot\text{mL}$ ). Por una parte, en la microalga CH-M-1 se observó un mayor contenido en lípidos en el tratamiento f/4 ( $49.95 \pm 2.72 \mu\text{g}\cdot\text{mL}$ ) y un menor valor en f/0 ( $29.42 \pm 1.06 \mu\text{g}\cdot\text{mL}$ ). Mientras que, en TH-W-1 se encontró un mayor valor en el tratamiento f ( $18.79 \pm 1.86 \mu\text{g}\cdot\text{mL}$ ) y un menor valor en f/0 ( $9.74 \pm 0.53 \mu\text{g}\cdot\text{mL}$ ). Cabe señalar que, las

microalgas cultivadas en f/0 produjeron la menor cantidad de lípido, encontrándose diferencias significativas con el resto de los tratamientos (Tabla IX).

Tabla IX. Concentración de lípidos en  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}$  de las microalgas *Thalassiosira weissflogii* (TH-W-1) y *Chaetoceros muelleri* (CH-M-1) cultivadas en cuatro concentraciones de fósforo f, f/2, f/4, f/0. Los resultados son valores promedio  $\pm$  error estándar. Diferentes letras en superíndice entre los factores (especies y tratamientos) indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ,  $a < b$ ). Prueba ANOVA dos vías y Fisher LSD.

		<b>Tratamientos</b>			
		f	f/2	f/4	f/0
<b>TH-W-1</b>		18.79 $\pm$ 1.86 <sup>c</sup>	14.49 $\pm$ 1.84 <sup>b</sup>	14.40 $\pm$ 1.29 <sup>b</sup>	9.74 $\pm$ 0.53 <sup>a</sup>
<b>CH-M-1</b>		36.91 $\pm$ 1.85 <sup>e</sup>	37.02 $\pm$ 3.02 <sup>e</sup>	49.95 $\pm$ 2.72 <sup>f</sup>	29.42 $\pm$ 1.06 <sup>d</sup>
<b>Efecto</b>	p-valor				
Especies	0.00				
Tratamientos	0.00				
Especies vs	0.00				
Tratamientos					

#### **IX.4 ANÁLISIS DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS**

La composición de ácidos grasos de la microalga CH-M-1 se muestra en la Tabla X; donde se puede observar que, los ácidos grasos monoinsaturados (MONO) fueron los más abundantes, con valores promedio de 45.48 $\pm$ 10.24 hasta 52.42 $\pm$ 11.51% en los tratamientos f y f/0, respectivamente, mostrándose una tendencia al incremento de porcentaje de estos ácidos grasos respecto a la disminución del fósforo en los cultivos, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. El segundo grupo de ácidos grasos más abundante fueron los saturados (SAT), con valores promedios que van desde 32.91 $\pm$ 2.26 a 37.54 $\pm$ 2.71%, en f/4 y f respectivamente, sin diferencias significativas entre los tratamientos. Seguido de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) con valores de 12.96 $\pm$ 0.97 a 19.42 $\pm$ 1.73% en f/0 y f/2, respectivamente, sin diferencias significativas entre los tratamientos.

El ácido graso más abundante del grupo de los SAT fue el ácido palmítico (16:0), con valores promedio de  $13.61 \pm 1.68$  a  $19.69 \pm 1.15\%$ , en los tratamientos f/4 y f respectivamente, los cuales presentan diferencias entre sí, pero no con el resto de los tratamientos. También, el ácido mirístico (14:0) fue predominante con valores de  $13.42 \pm 0.54$  a  $15.07 \pm 0.99\%$ , correspondiente a los tratamientos f/0 y f/4, sin diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla X). Por otro lado, el ácido graso predominante del grupo MONO fue el ácido palmitoleico (16:1), con valores promedio de  $40.74 \pm 0.62$  a  $47.61 \pm 1.46\%$ , los cuales corresponden a lo registrado en los tratamientos f/2 y f/0. Se encontró que existen diferencias significativas en el tratamiento f/0 con todos los tratamientos.

Por último, en relación con los PUFA, se observó que el ácido araquidónico (20:4n-6) fue el más abundante, con valores promedio de  $6.13 \pm 0.95\%$  a  $9.84 \pm 0.47$ , en los tratamientos f/0 y f/2 respectivamente, seguido del ácido eicosapentaenoico (20:5n-3) con valores de  $4.04 \pm 0.70$  a  $7.35 \pm 0.39\%$ , en el tratamiento f/0 y f/2, respectivamente. Además, se detectó en cantidades mínimas de  $0.46 \pm 0.12$  a  $0.84 \pm 0.10\%$  del ácido docosahexaenoico, en f/0 y f/2 respectivamente. Cabe señalar que en ninguno de estos tres ácidos grasos poliinsaturados (ARA, EPA y DHA) se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, y de manera cuantitativa, tampoco se registró evidencia sobre la tendencia a la disminución en la concentración con la reducción gradual del fósforo en el medio de cultivo.

Tabla X. Composición de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos identificados) de la microalga *Chaetoceros muelleri* cultivada en cuatro concentraciones de fósforo f, f/2, f/4, f/0.

Ácido graso	Tratamientos			
	f	f/2	f/4	f/0
<b>Saturados</b>				
<b>12:0</b>	0.05±0.03	0.06±0.00	0.07±0.01	0.04±0.02
<b>13:0</b>	0.08±0.01	0.06±0.03	0.17±0.02	0.04±0.01
<b>14:0 (mirístico)</b>	13.77±1.06	13.77±0.48	15.07±0.99	13.42±0.54
<b>15:0</b>	0.52±0.04	0.43±0.00	0.45±0.02	0.44±0.02*
<b>16:0 (palmítico)</b>	19.69±1.15 <sup>b</sup>	16.52±0.88 <sup>ab</sup>	13.61±1.68 <sup>a</sup>	17.19±0.17 <sup>ab</sup>
<b>17:0</b>	3.01±0.10	3.08±0.28	2.95±0.03	2.15±0.10*
<b>18:0</b>	0.31±0.16	0.41±0.01	0.48±0.06	1.12±0.07*
<b>24:0</b>	0.10±0.06	0.12±0.03	0.11±0.02	0.23±0.03
<b>Monoinsaturados</b>				
<b>14:1</b>	0.07±0.04	0.08±0.00	0.10±0.01	0.06±0.00
<b>16:1 (palmitoleico)</b>	42.03±1.67 <sup>a</sup>	40.74±0.62 <sup>a</sup>	43.09±0.90 <sup>a</sup>	47.61±1.46 <sup>b</sup>
<b>17:1</b>	3.11±1.60	4.96±1.36	4.84±0.14	2.87±0.09*
<b>18:1 cis</b>	0.27±0.14	0.36±0.00	0.60±0.10	1.89±0.28*
<b>Poliinsaturados</b>				
<b>18:2cis</b>	0.32±0.01	0.26±0.13	0.39±0.19	1.06±0.11*
<b>18:3n-6</b>	0.80±0.13 <sup>a</sup>	0.97±0.48 <sup>b</sup>	1.51±0.14 <sup>b</sup>	1.08±0.15 <sup>ab</sup>
<b>20:3n-6</b>	0.14±0.02	0.17±0.01	0.21±0.01	0.20±0.02
<b>20:4n-6 (ARA)</b>	7.22±1.13	9.84±0.47	9.36±1.13	6.13±0.95
<b>20:5n-3 (EPA)</b>	6.14±1.30	7.35±0.39	6.45±0.50	4.04±0.70*
<b>22:6n-3 (DHA)</b>	0.65±0.17	0.84±0.10	0.56±0.05	0.46±0.12
<b>ΣSAT</b>	37.54±2.71	34.44±2.41	32.91±2.26	34.62±2.43*
<b>ΣMON</b>	45.48±10.24	46.14±9.80	48.63±10.37	52.42±11.51*
<b>ΣPUFA</b>	15.28±1.32	19.42±1.73	18.46±1.58	12.96±0.97*
<b>ΣÁGE</b>	14.01±2.03	18.02±2.68	16.36±2.59	10.63±1.66

SAT ácido graso saturado, MONO ácido graso monoinsaturado, PUFA ácido graso poliinsaturado, ÁGE ácido grasos esenciales. Los valores son la media ± error estándar (n=3). Letras diferentes indican que hay diferencias significativas (p < 0.05) entre los tratamientos (ANOVA una vía, prueba de Fisher LSD). Prueba de Kruskal-Wallis: \*

Asimismo, es importante señalar que, en ninguno de los tres grupos ácidos grasos: MONO, SAT y PUFA analizados en la microalga CH-M-1 no se encontró un incremento significativo de su porcentaje en relación con la disminución del fósforo en el medio de cultivo (Fig. 6).

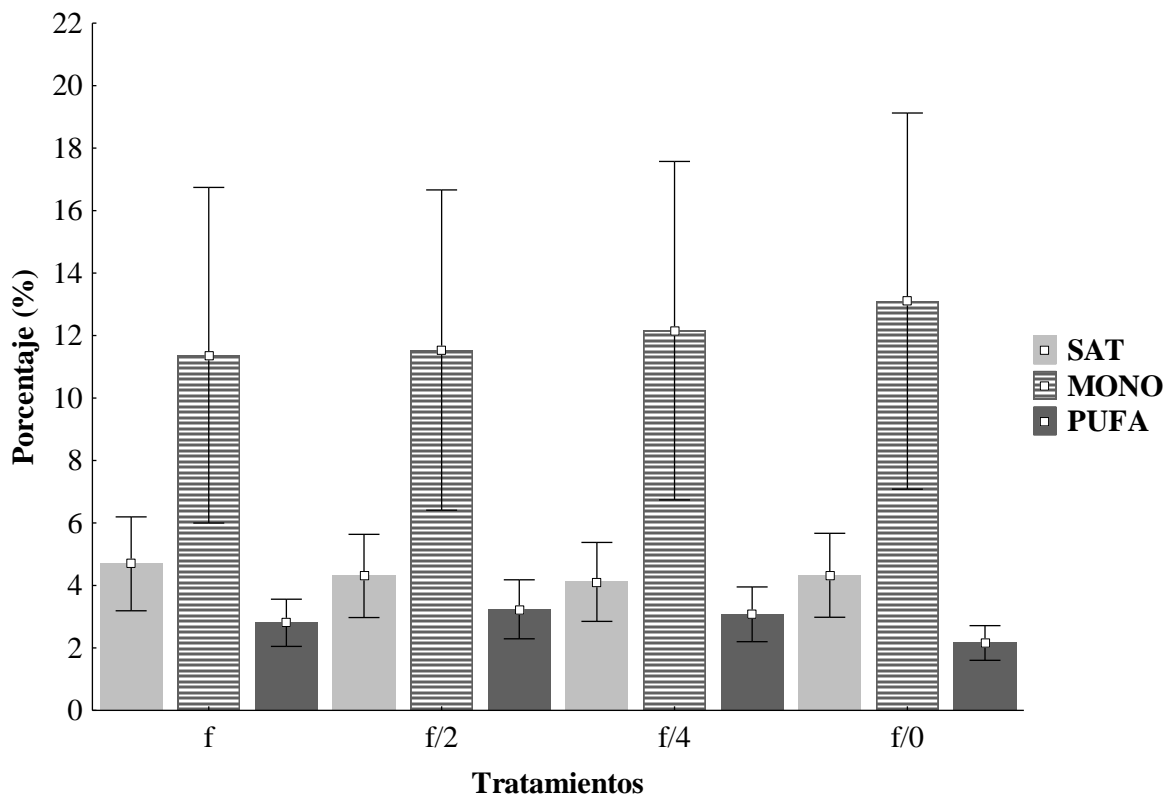


Figura 6. Composición de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos identificados) agrupados de acuerdo con el número de insaturaciones (Saturados, Monoinsaturados, Poliinsaturados) de *Chaetoceros muelleri* cultivada en cuatro concentraciones de fósforo (f, f/2, f/4 y f/0).

En cuanto a la microalga TH-W-1, se detectaron un total de 11 ácidos grasos (Tabla XI), de los cuales se encontró que los ácidos grasos SAT fueron los más abundantes, con valores entre  $38.97 \pm 4.50$  y  $46.80 \pm 5.11\%$ , valores que corresponden a los registrados en los tratamientos f/0 y f/2, respectivamente. Seguido de los ácidos grasos MONO con valores que van desde los  $36.89 \pm 7.12$  a  $44.31 \pm 11.35\%$ , registrados en los tratamientos f/2 y f/0,

respectivamente. Por último, los ácidos grasos de cadena larga, los PUFA registraron valores de  $15.63 \pm 3.42$  a  $18.67 \pm 4.06\%$ , mismos que corresponden a lo registrado en los tratamientos f y f/4.

Al igual que con la microalga CH-M-1, el ácido graso más abundante de los SAT en TH-W-1 fue el ácido palmítico, con valores que van desde  $24.53 \pm 0.20$  a los  $30.17 \pm 0.09\%$ , valores que corresponden a lo registrado en los tratamientos f/0 y f, respectivamente. Asimismo, se observó una tendencia a la disminución del contenido de este ácido en relación con la disminución gradual del fósforo; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas. También, el ácido mirístico fue abundante, con valores promedios de  $8.84 \pm 0.15$  a  $10.53 \pm 1.19\%$ , correspondientes a lo registrado en los tratamientos f y f/2, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas en los tratamientos. En el grupo de ácidos grasos MONO, el ácido palmitoleico (16:1) fue el más predominante, con valores de  $25.63 \pm 0.81$  a  $37.28 \pm 0.85\%$ , en los tratamientos en f/2 y f/0 respectivamente. No se apreció una clara tendencia al incremento de este ácido graso con relación a la disminución del fósforo en el medio de cultivo, sin embargo, el valor registrado en el tratamiento f/0 fue significativamente superior a lo registrado en el resto de los tratamientos. Por último, 17:1 (ácido cis-10 heptadecenoico) registró valores de  $6.13 \pm 0.05$  y  $9.99 \pm 0.74\%$  correspondientes a los tratamientos f/0 y f/2, encontrándose diferencias significativas entre los tratamientos.

Tabla XI. Composición de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos identificados) de la microalga *Thalassiosira weissflogii* cultivada en cuatro concentraciones de fósforo f, f/2, f/4, f/0.

Ácido graso	Tratamientos			
	f	f/2	f/4	f/0
<b>Saturado</b>				
<b>14:0 (mirístico)</b>	8.84±0.15	10.53±1.19	9.46±0.40	9.88±0.08*
<b>15:0</b>	0.98±0.06	0.99±0.02	0.98±0.01	0.92±0.02
<b>16:0 (palmítico)</b>	30.17±0.09	28.59±0.85	29.05±1.04	24.53±0.20*
<b>17:0</b>	3.40±0.24	5.30±0.09	3.04±1.24	2.63±0.07*
<b>18:0</b>	1.43±0.20	1.39±0.08	0.99±0.20	1.01±0.52
<b>Monoinsaturado</b>				
<b>16:1(palmitoleico)</b>	32.03±0.79 <sup>b</sup>	25.63±0.81 <sup>a</sup>	28.43±1.63 <sup>a</sup>	37.28±0.85 <sup>c</sup>
<b>17:1 (cis-10 heptadecenoico)</b>	6.44±0.06 <sup>ab</sup>	9.99±0.74 <sup>b</sup>	8.66±1.13 <sup>ab</sup>	6.13±0.05 <sup>a*</sup>
<b>18:1 cis</b>	1.07±0.22	1.27±0.31	0.71±0.10	0.90±0.46
<b>Poliinsaturado</b>				
<b>18:2cis</b>	0.38±0.03	0.61±0.09	0.59±0.10	0.35±0.18
<b>20:5n-3 EPA</b>	11.81±0.80	12.30±1.75	14.11±0.89	13.07±0.30
<b>22:6n-3 DHA</b>	3.43±0.36	3.40±0.62	3.97±0.57	3.30±0.08
<b>ΣSAT</b>	44.82±5.48	46.80±5.11	43.54±5.32	38.97±4.50
<b>ΣMONO</b>	39.55±9.55	36.89±7.12	37.79±8.24	44.31±11.35
<b>ΣPUFA</b>	15.63±3.42	16.31±3.52	18.67±4.06	16.72±3.84
<b>ΣÁGE</b>	15.25±4.19	15.70±4.45	18.08±5.07	16.37±4.88

SAT ácido graso saturado, MONO ácido graso monoinsaturado, PUFA ácido graso poliinsaturado, ÁGE ácido grasos esenciales. Los valores son la media ± error estándar (n=3). Letras diferentes indican que hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos (ANOVA de una vía, prueba de Fisher LSD). Prueba de Kruskal-Wallis: \*

En todos los casos, se observó que la disminución gradual del fósforo en el medio de cultivo no influyó de manera significativa entre el contenido de los ácidos grasos SAT, MONO y PUFA entre los tratamientos. Tampoco se mostró una tendencia cuantitativa en el incremento de los PUFA (Fig. 7).



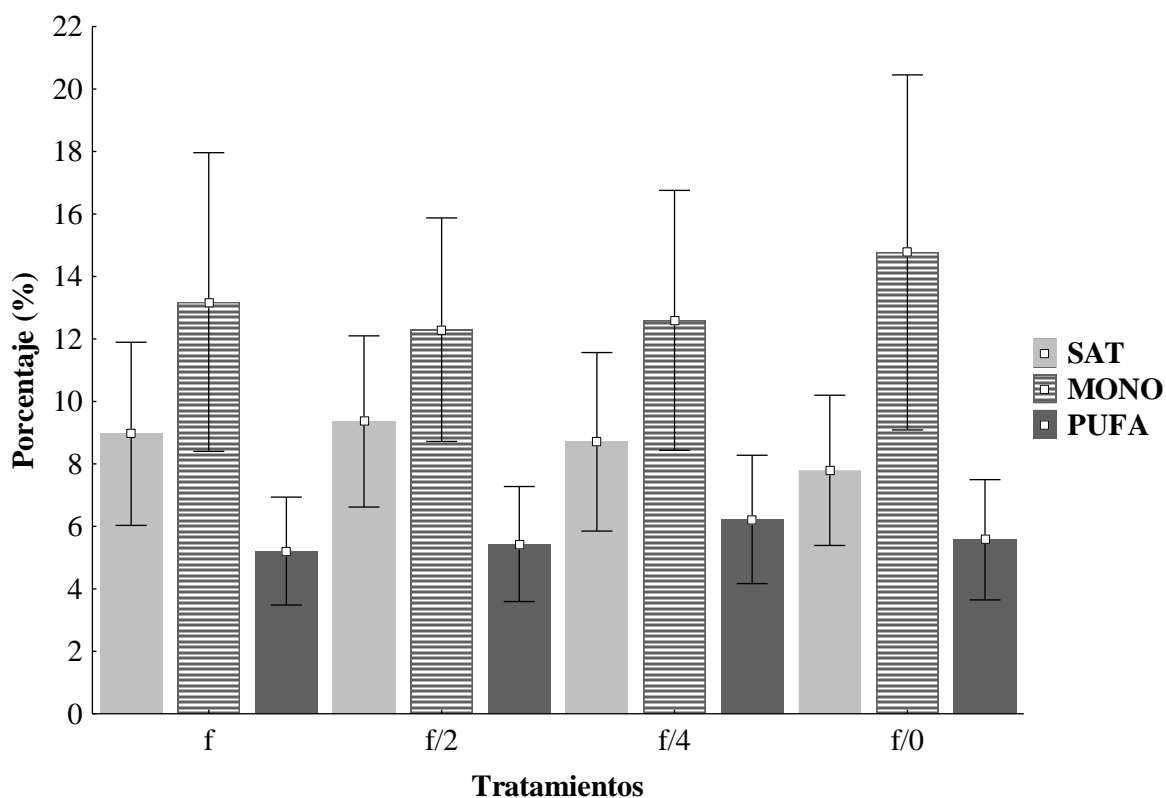


Figura 7. Porcentaje (%) de ácidos grasos agrupados de acuerdo con el número de insaturaciones (Saturados, Monoinsaturados, Poliinsaturados) de las cadenas lipídicas de *Thalassiosira weissflogii* cultivada en el medio f en cuatro concentraciones de fósforo (f, f/2, f/4 y f/0).

La microalga TH-W-1 contenía dos ácidos grasos esenciales: 20:5n-3 (EPA) y 22:6n-3 (DHA). De los cuales, el EPA fue el ácido graso más abundante, con un mayor valor de  $14.11 \pm 0.89\%$  en el tratamiento f/4, mientras que el menor valor ( $11.81 \pm 0.80\%$ ) se registró en el tratamiento f, sin embargo, no se presentaron diferencias significativas entre los valores registrados en todos los tratamientos. Por último, y de igual manera que el EPA, el mayor contenido de DHA se registró en el tratamiento f/4, con un valor ( $3.97 \pm 0.57\%$ ), pero el menor valor de este ácido graso se registró en tratamiento f/0 ( $3.30 \pm 0.08\%$ ), no obstante, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla XI).

Por otra parte, al comparar el contenido de SAT, MONO y PUFA entre las dos especies de microalgas objeto de este estudio (CH-M-1 y TH-W-1), las cuales fueron cultivadas bajo diferentes concentraciones de fósforo, se observó que, la microalga TH-W-1 registró la mayor cantidad de ácidos grasos SAT ( $8.73 \pm 3.64\%$ ) en contraste a la microalga CH-M-1 ( $4.37 \pm 2.78\%$ ), encontrándose diferencias significativas ( $p=0.00$ ) entre el contenido de ácidos grasos SAT de ambas especies (Fig. 8). Se encontró en TH-W-1 valores de ácidos grasos SAT de  $7.90 \pm 2.38$  a  $9.36 \pm 2.74\%$  correspondientes a los tratamientos f/0 y f/2. En CH-M-1 los valores fueron de  $4.11 \pm 0.84$  a  $4.72 \pm 1.50\%$  registrados en f/4 y f.

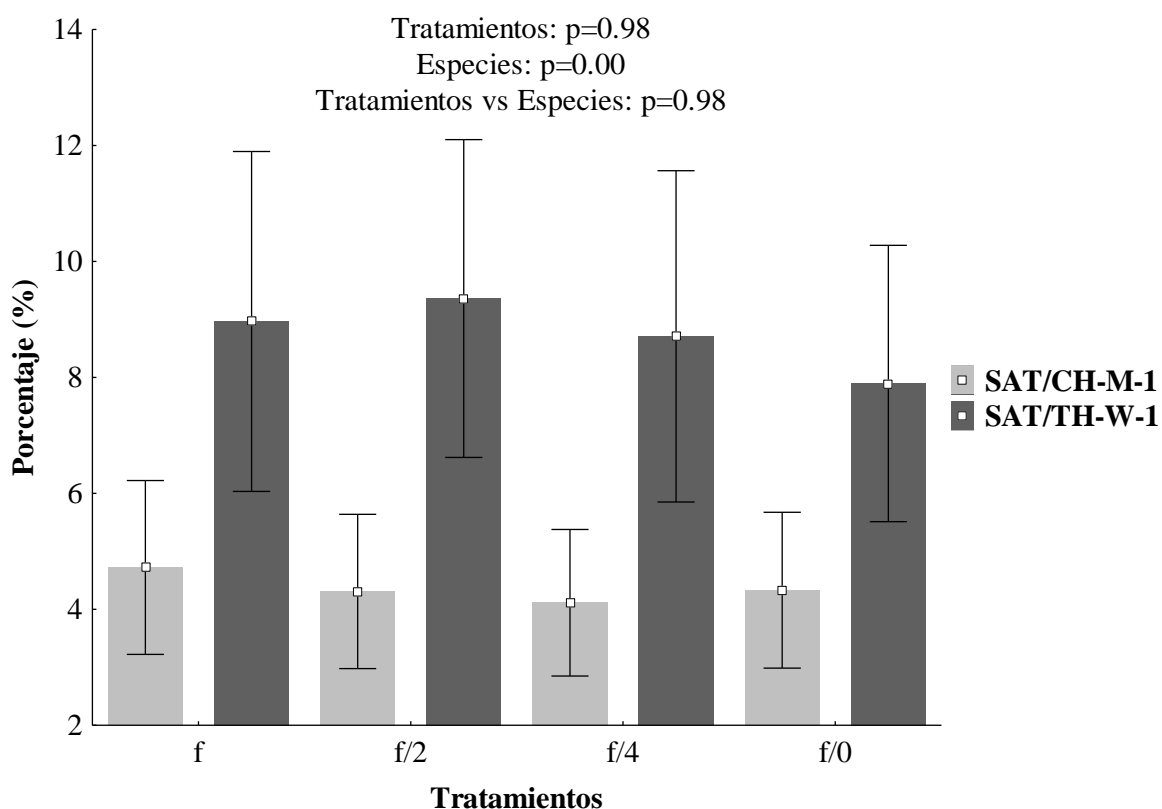


Figura 8. Porcentaje (%) de ácidos grasos saturados de las microalgas *Chaetoceros muelleri* y *Thalassiosira weissflogii* cultivadas en el medio f en cuatro concentraciones de fósforo (f, f/2, f/4 y f/0). El valor de ( $p < 0.05$ ) indica diferencias significativas entre los tratamientos y especies (Prueba ANOVA de dos vías y Fisher LSD).

En relación con el contenido de ácidos grasos MONO, se observó que los valores fueron similares en CH-M-1 ( $12.15 \pm 2.07\%$ ) y TH-W-1 ( $13.25 \pm 3.69\%$ ), debido a que no se encontraron diferencias significativas entre ambas especies (Fig. 9). Se encontraron valores de ( $12.30 \pm 3.58$  a  $14.92 \pm 5.64$ ) en los tratamientos f/2 y f/0 en la microalga TH-W-1. Con relación a CH-M-1 los valores oscilaron de ( $11.54 \pm 5.13$  a  $13.10 \pm 6.02\%$ ) en f/2 y f/0.

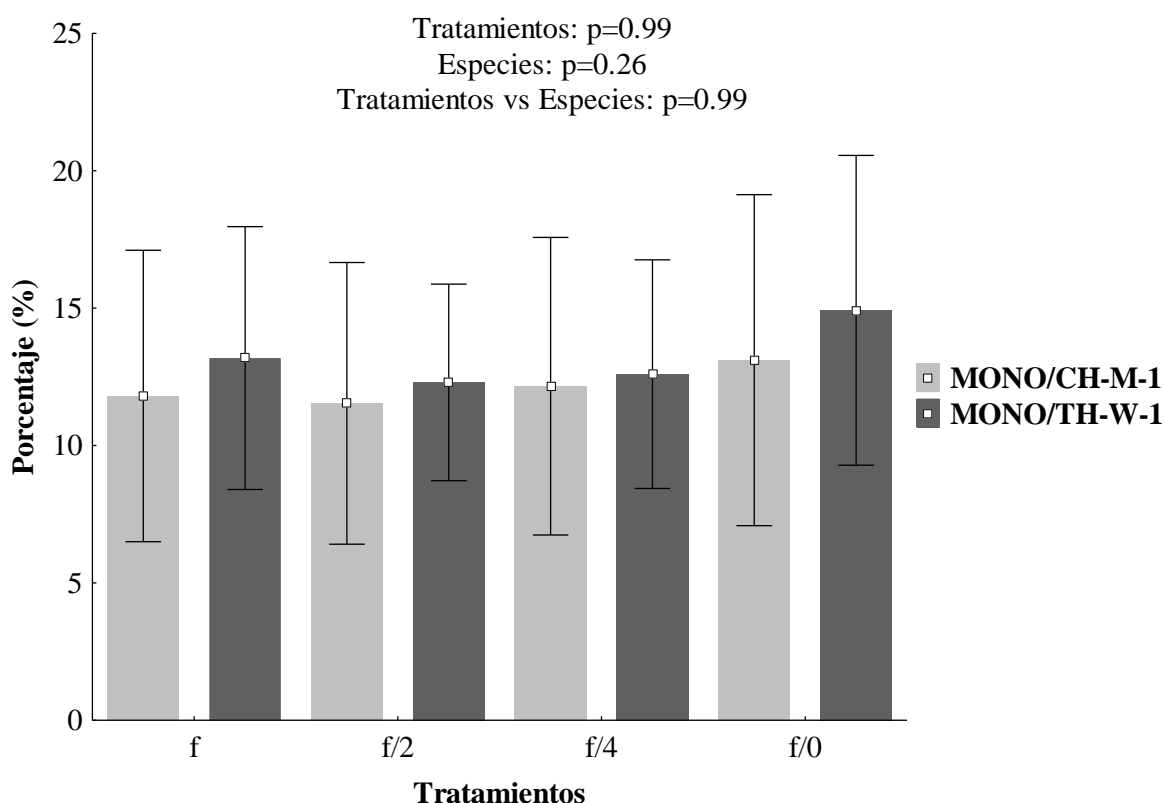


Figura 9. Porcentaje (%) de ácidos grasos monoinsaturados de las microalgas *Chaetoceros muelleri* y *Thalassiosira weissflogii* cultivadas en el medio f en cuatro concentraciones de fósforo (f, f/2, f/4 y f/0). El valor de ( $p < 0.05$ ) indica diferencias significativas entre los tratamientos y especies (Prueba ANOVA de dos vías).

En cuanto al total de PUFA, la microalga TH-W-1 registró la mayor cantidad de estos ácidos grasos ( $5.63 \pm 2.19\%$ ), los cuales fueron significativamente superiores en comparación a lo encontrado en la microalga CH-M-1 ( $2.85 \pm 1.88\%$ ) en todos los tratamientos evaluados (Fig.

10). En la microalga TH-W-1 se reportaron valores de ( $5.21 \pm 1.73$  a  $6.22 \pm 2.05\%$ ) en los tratamientos f y f/4. Por último, en CH-M-1 los valores fueron de ( $2.16 \pm 0.55$  a  $3.34 \pm 0.93\%$ ) en los tratamientos f/0 y f/2.

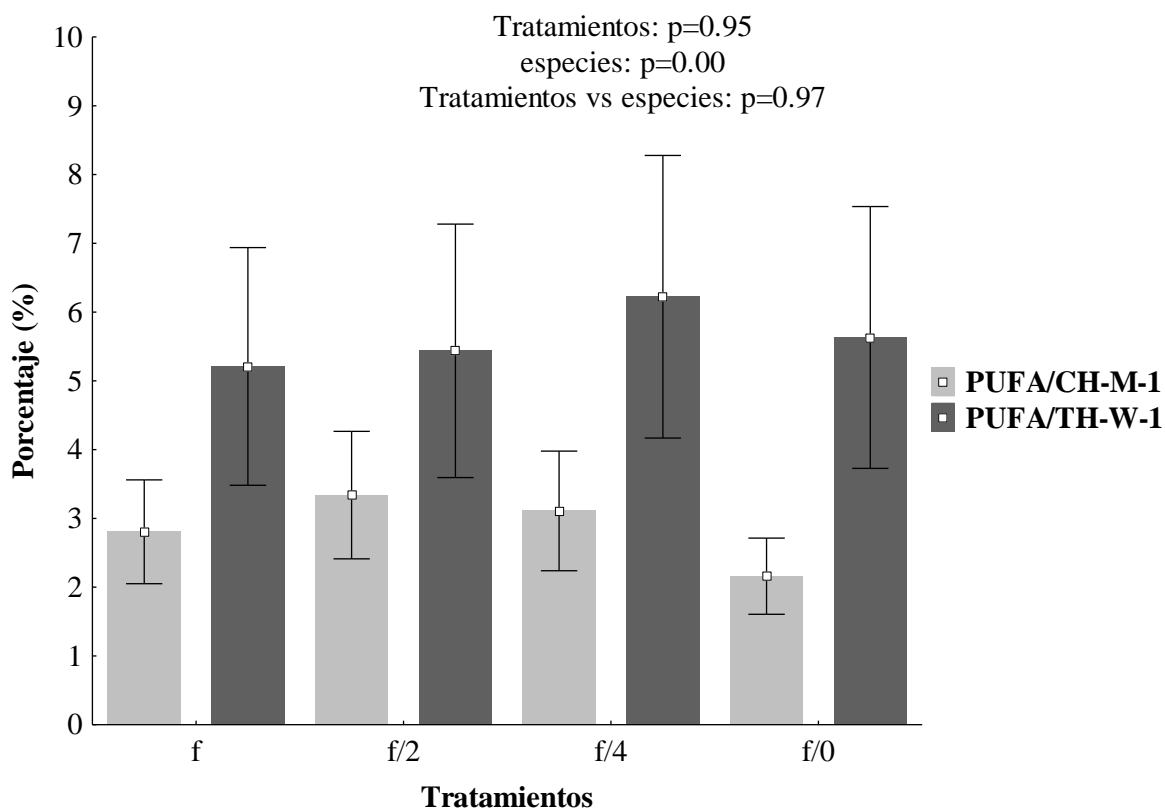


Figura 10. Porcentaje (%) de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de las microalgas *Chaetoceros muelleri* y *Thalassiosira weissflogii* cultivadas en el medio f en cuatro concentraciones de fósforo (f, f/2, f/4 y f/0). El valor de ( $p < 0.05$ ) indica diferencias significativas entre los tratamientos y especies (Prueba ANOVA de dos vías y Fisher LSD).

Al comparar el contenido de EPA de las dos especies de microalgas cultivadas bajo diferentes concentraciones de fósforo. La microalga TH-W-1 registró la mayor cantidad de este ácido graso esencial ( $14.11 \pm 0.89\%$ ) en contraste a la microalga CH-M-1 ( $7.35 \pm 0.39$ ) con diferencias significativas entre las dos especies (Tabla XII).

Tabla XII. Porcentajes de **20:5n-3 (EPA)** respecto al total de ácidos grasos de las microalgas *Thalassiosira weissflogii* (TH-W-1) y *Chaetoceros muelleri* (CH-M-1), cultivadas en cuatro concentraciones de fósforo. Los resultados son valores promedio± error estándar. Diferentes letras en superíndice entre los factores (especies y tratamientos) indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ,  $a < b$ ). Prueba ANOVA dos vías y Fisher LSD.

	Tratamientos			
	f	f/2	f/4	f/0
<b>TH-W-1</b>	11.81±0.80	12.30±1.75	14.11±0.89	13.07±0.30
<b>CH-M-1</b>	6.14±1.30	7.35±0.39	6.45±0.50	4.04±0.70
<b>Efecto</b>	p-valor			
Especies	0.00			
Tratamientos	0.19			
Esp. vs Trat.	0.10			

Mientras que con relación al contenido de DHA, la microalga TH-W-1 registró mayor DHA (3.97±0.57%) a diferencia de CH-M-1 (0.84±0.10%), encontrándose diferencias significativas en cuanto al contenido de DHA entre especies (Tabla XIII).

Tabla XIII. Porcentajes del **22:6n-3 (DHA)** respecto al total de ácidos grasos de las microalgas *Thalassiosira weissflogii* (TH-W-1) y *Chaetoceros muelleri* (CH-M-1), cultivadas en cuatro concentraciones de fósforo. Los resultados son valores promedio± error estándar. Diferentes letras en superíndice entre los factores (especies y tratamientos) indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ,  $a < b$ ). Prueba ANOVA dos vías y Fisher LSD.

	<b>Tratamientos</b>			
	f	f/2	f/4	f/0
<b>TH-W-1</b>	3.43±0.36	3.40±0.62	3.97±0.57	3.30±0.08
<b>CH-M-1</b>	0.65±0.17	0.84±0.10	0.56±0.05	0.46±0.12
<b>Efecto</b>	p-valor			
Especies	0.00			
Tratamiento	0.57			
Especies vs. tratamiento	0.47			

## X. DISCUSIÓN

En el sector acuícola, es importante considerar la densidad celular de las microalgas y los volúmenes de producción, pero también la biomasa producida, que puede ser medida en términos de peso seco y orgánico. Debido a que con la estimación de estos parámetros se podrá estimar si se logrará satisfacer la demanda de alimento vivo para los organismos en cultivo. En este estudio, la densidad celular de la microalga CH-M-1 a las 72 h de cultivo en los tratamientos evaluados fue mayor en comparación a TH-W-1. Esta diferencia se atribuye a la fisiología de la especie de microalga, principalmente al tamaño de las células. Las microalgas pequeñas tienen una tasa de crecimiento más rápida, a diferencia de las microalgas más grandes. Esto se debe a que las células pequeñas tienen una relación superficie/volumen más alto, lo que les permite absorber nutrientes y luz de forma más eficiente (Reynolds, 2006). Por una parte, la microalga CH-M-1, tiene un diámetro promedio de 4 a 9  $\mu\text{m}$ , en contraste a TH-W-1, con un tamaño de 10 a 20  $\mu\text{m}$  (Von Dassow *et al.*, 2006; González-Galena, 2019).

Respecto al peso orgánico (PO) de las microalgas, este se refiere a la cantidad de materia orgánica, es decir, la cantidad de carbono orgánico, proteínas, carbohidratos, lípidos, entre otros compuestos. Por lo tanto, el PO expresa la cantidad total de energía disponible para los organismos marinos (Vega & Voltolina, 2007; Nieves *et al.*, 2009). En este estudio, la especie CH-M-1 fue la que presentó mayor PO a diferencia de TH-W-1 en cuanto al volumen de producción, la cual está relacionado con la densidad celular. Por lo tanto, la alta densidad celular obtenida en CH-M-1 la convierte como especie idónea en la producción de alimento en la acuicultura, a pesar de ser una especie de células más pequeñas en comparación TH-W-1. Por un lado, se ha reportado que la especie CH-M-1 contiene valores de biomasa orgánica de 89.46 a 137.92  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Nieves *et al.*, 2009; Lovio Fragoso *et al.*, 2019). Por otra parte, en la microalga TH-W-1 se han registrado valores de PO de 28.77 a 66.68  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (López-Tapia, 2002; Salas, 2017). Valores diferentes a los obtenidos en este estudio, estos contrastes podrían deberse a las distintas condiciones de cultivo entre cada estudio.

Por otra parte, se ha observado que las microalgas cultivadas en condiciones limitantes en P reducen la división celular y el crecimiento de las células (El-Kassas, 2013; Adenan *et al.*, 2016; Matsui *et al.*, 2020; Lovio-Fragoso, 2021). El P es un nutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de las microalgas, ya que es un componente clave de moléculas como el ADN, ARN, ATP y fosfolípidos (Su, 2021; Maltsev *et al.*, 2023). Por lo tanto, la falta de P limita la capacidad de las microalgas para sintetizar moléculas esenciales, lo que a su vez limita su crecimiento y desarrollo. Lovio-Fragoso, (2021) observó que la biomasa seca de CH-M-1 disminuyó de 311.42 a 199.92 mg·L<sup>-1</sup> en un medio de cultivo limitante en P. Lin *et al.* (2018) encontraron que la disminución del P en el medio de cultivo influyó notablemente en CH-M-1 (1240.0 a 859.00 mg·L<sup>-1</sup>) a diferencia de TH-W-1 (de 496.00 a 446.00 mg·L<sup>-1</sup>). Sin embargo, en nuestro estudio la biomasa de TH-W-1 y CH-M-1 en f/2 y f/4 fueron constantes. Es importante mencionar que las concentraciones de nitrógeno en el medio de cultivo se mantuvieron constantes. Se ha reportado que el N constituye entre el 1 y 14% del peso seco de las microalgas y proporciona el metabolismo relacionado con la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos (El-Kassas, 2013; Gao *et al.*, 2013; Maltsev *et al.*, 2023). Mientras que el P, constituye menos del 1% de la biomasa total de las microalgas (Yaakob *et al.*, 2014; Maltsev *et al.*, 2023). Además, las microalgas tienen la capacidad de reorganizar el P celular para sostener el crecimiento (Adenan *et al.*, 2016).

Además, a pesar de que los tratamientos f/0 carecían de fósforo, el cual es considerado un nutriente esencial para las microalgas, se obtuvo crecimiento celular de CH-M-1 y TH-W-1, lo cual podría deberse al fósforo proveniente del agua de mar. No se midió la concentración de este nutriente en el agua de mar usada para los cultivos de microalgas, pero se ha reportado que el agua de mar de la bahía de Mazatlán contiene en promedio 1.39 hasta 10.17 μM de fósforo (Pérez-Verdugo, 2007). Posiblemente, las microalgas aprovecharon los nutrientes disponibles en el agua de mar para el crecimiento y desarrollo celular.

Las microalgas contienen entre el 2 y 40% de lípidos en peso seco. Sin embargo, la cantidad de lípidos es específica de la especie y está fuertemente influenciada por las condiciones de cultivo (Lari *et al.*, 2016). Por lo tanto, es importante conocer el contenido de lípidos de las



microalgas para determinar las especies de microalgas idóneas como alimento para el cultivo de organismos marinos. El contenido de lípidos registrado en TH-W-1 en los tratamientos evaluados en el presente estudio fueron menores a los valores reportados por Peraza-Yee *et al.* (2022) y a Millán-Almaraz *et al.* (2023);  $47.4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , y  $117.99 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  respectivamente para esta misma especie cuando fue cultivada en medio f. Estos contrastes, podrían deberse a las diferencias en las condiciones de cultivo entre estudios. Por ejemplo, Peraza-Yee *et al.* (2022), disminuyeron la concentración de tres nutrientes del medio f. Mientras que, en el estudio de Millán-Almaraz *et al.* (2023), mantuvieron la concentración de nutrientes constantes en el medio de cultivo, sin disminuir el fósforo. Por otra parte, el contenido de lípidos de CH-M-1 obtenido en los tratamientos evaluados en este estudio fueron mayores a lo reportado ( $4.42 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) por Lovio-Fragoso, (2021) cuando fue cultivada en medio f. Dichas diferencias podrían también deberse a las distintas condiciones de cultivo, en particular la capacidad de las unidades experimentales usadas, ya que en el estudio de Lovio-Fragoso, (2021) utilizaron matraces de 1 L, y no aplicaron aireación en los cultivos.

Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que la producción de lípidos de CH-M-1 por unidad de volumen de cultivo (Tabla IX), así como el porcentaje de lípidos en relación con el contenido de PO representaron un mayor rendimiento a diferencia de TH-W-1. En la industria acuícola, estos resultados son relevantes, ya que presentaría un menor costo producir CH-M-1 y con un mayor aporte de lípidos para el crecimiento y desarrollo de los organismos. Además, los tratamientos donde registró una mayor producción de lípidos en CH-M-1 fueron en f/4, seguido del f/2, lo que indica una influencia de la disminución del fósforo en el medio de cultivo respecto al incremento de los lípidos. Mientras que, el tratamiento con ausencia de fósforo (f/0) tuvo un efecto contrario, debido que fue el tratamiento donde se registraron los valores más bajos en ambas especies de microalgas.

Aunque se ha observado en otros trabajos (Hu *et al.*, 2008; Lari *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2018) que las condiciones limitantes o deficientes de fósforo en el medio de cultivo promueven la biosíntesis de lípidos en las microalgas, en este estudio no se registró esa tendencia. Debido a que el mayor contenido de lípidos se encontró en el tratamiento f/2 para ambas especies, y

no en los tratamientos limitantes de este nutriente (f/4 y f/0). Lo que podrían deberse a las distintas condiciones de cultivo entre los estudios, inóculo inicial, nutrientes y temperatura. Por otra parte, los resultados obtenidos en la microalga TH-W-1 coinciden con lo reportado por Peraza-Yee *et al.* (2022), donde el contenido de lípidos en las células no aumentó, no obstante, como se mencionó anteriormente, estos autores no solo limitaron la concentración del fósforo en el medio, sino también el nitrógeno y silicato.

Por otra parte, las microalgas producen ácidos grasos que, varían de acuerdo con el grado de longitud de átomos de carbono y al número de dobles enlaces. En este estudio, se aplicó la nomenclatura de ácidos grasos IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada). Los ácidos grasos saturados (SAT) con 4 a 30 átomos de carbono y sin dobles enlaces, los ácidos grasos monoinsaturados (MONO) con 14 a 29 átomos de carbono y con un doble enlace y los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) con 18 a 22 átomos de carbono y hasta seis dobles enlaces en su cadena (Graciani Constante *et al.*, 2006).

Al analizar el perfil de ácidos grasos en CH-M-1 y TH-W-1 se observó una mayor proporción en ácidos grasos de 14 y 16 átomos de carbono, particularmente 14:0 (ácido mirístico), 16:0 (ácido palmítico) y 16:1 (ácido palmitoleico). Por un lado, la predominancia de los ácidos grasos de 14 y 16 átomos en la microalga CH-M-1, coinciden con lo reportado por Lovio-Fragoso, (2021) en la misma microalga, 14:0, 16:0, 16:1. Respecto al perfil de ácidos grasos en TH-W-1 reportado en este estudio, son similares con lo registrado por Tam *et al.* (2021), quienes encontraron 16:0, 16:1, 16:2, 16:3. Se ha documentado en la literatura que un rasgo característico de las diatomeas es la predominancia de ácidos grasos de 14 a 16 átomos de carbono, mientras que los ácidos grasos de 18 átomos de carbonos generalmente se encuentran en cantidades mínimas, a diferencia de las cianofíceas y clorófitas (Vuppaladadiyam *et al.*, 2018; Zulu *et al.*, 2018).

En este estudio se observó una disminución significativa en el contenido del ácido graso palmítico en *C. muelleri* en el tratamiento limitante de fósforo f/4 en comparación al tratamiento control f. Por lo contrario, el contenido de ácido palmitoleico fue mayor en el tratamiento ausente de fósforo de f/0. Respecto a la microalga TH-W-1, el ácido palmítico

no se vio afectado con la disminución gradual del fósforo; mientras que el ácido palmitoleico aumentó de 32.03 a 37.28%. Estos resultados son consistentes con lo observado por Cañavate *et al.* (2017) en la microalga *P. tricornutum*, quienes registraron un incremento en el contenido de ácido palmítico (de 16.22 a 27.59%) y palmitoleico (de 21.45 a 42.13%) en deficiencia de fósforo en comparación a aquellas que fueron cultivadas en el medio f/2. Son escasos los estudios que reporten el efecto de la concentración del fósforo sobre el perfil de ácidos grasos en las especies del género *Chaetoceros* y *Thalassiosira*. No obstante, Cañavate *et al.* (2017) cultivaron a la microalga *Chaetoceros gracilis* en un tratamiento sin fósforo, observando que el ácido palmítico se duplicó (de 18.49 a 36.39%) a diferencia del ácido palmitoleico (de 26.15 a 30.82%). Gao *et al.* (2013) cultivaron a CH-M-1, en ausencia de P, encontrando que el ácido palmítico (de 39.63 a 58.10%) y el ácido palmitoleico (de 2.85 a 5.33%) se duplicaron. Asimismo, Lovio-Fragoso, (2021) cultivaron a CH-M-1, en dos tratamientos limitantes de fósforo, y reportaron un aumento significativo del ácido palmitoleico (de 34.04 a 39.15%) a diferencia del ácido palmítico que no aumentó significativamente (de 18.62 a 20.62%). También, Lin *et al.* (2018) cultivaron CH-M-1 y TH-W-1 en condiciones limitantes en fósforo, donde registraron que, por un lado, el contenido de ácido palmítico en CH-M-1 aumentó notablemente (de 23.22 a 33.23%) mientras que el ácido palmitoleico incrementó en concentraciones mínimas (de 36.76 a 39.48%). Tendencia contraria se observó en TH-W-1 donde el ácido palmitoleico aumentó (de 25.62 a 34.09%), a diferencia del ácido palmítico (de 22.19 a 22.53%).

La síntesis de los ácidos grasos de 16:0 átomos de carbono, comienza en el cloroplasto de las células. La saturación y elongación del ácido graso de 16:0 da, como resultado, ácidos grasos de cadena larga (Khozin-Goldberg, 2016; Remize *et al.*, 2021). Para esto se requiere, carbono en forma de acetyl-coenzima A, energía ATP y poder reductor NADPH (Khozin-Goldberg, 2016). Las moléculas ATP y NADPH contienen P en su molécula. Por lo tanto, las microalgas requieren fósforo celular para formar los compuestos ATP y NADPH para la síntesis de ácidos grasos (Abalde *et al.*, 1995; Karl, 2014; Dyhrman, 2016). Sin embargo, en condiciones limitantes o deficientes en fósforo representados en los tratamientos f/4 y f/0, el ATP y el NADPH estarían a la baja, y la síntesis de lípidos estaría orientada hacia el

almacenamiento de triglicéridos, principalmente saturados y lípidos neutros (Hu *et al.*, 2008; Lari *et al.*, 2016).

Tal y como se ha observado en la diatomea *P. tricornutum* cultivada en condiciones deficientes en fósforo, lo cual promovió el incremento de los ácidos palmítico y palmitoleico es una respuesta con la acumulación de los triglicéridos y una disminución de los fosfolípidos y que ambos ácidos grasos pueden representar una fuente de energía de reserva (Siron *et al.*, 1989).

Por último, el 16:0 ácido palmítico y 16:1 ácido palmitoleico se encuentran dentro de la familia de ácidos grasos saturados y monoinsaturados, que son ideales para la producción de biocombustible, debido a que se prefieren los ácidos grasos de cadena media, ya que dan como resultado un biodiésel menos viscoso, a diferencia de los ácidos grasos poliinsaturados (Lin *et al.*, 2018; Zulu *et al.*, 2018). Además de los ácidos grasos de cadena corta y media, las diatomeas contienen ácidos grasos de cadena larga (PUFA) como el ácido araquidónico (ARA), el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) (Zulu *et al.*, 2018). Mismos que son considerados esenciales para la nutrición de los organismos marinos (Sargent *et al.*, 2002; Patil *et al.*, 2005; Glencross, 2009).

La microalga CH-M-1 contenía ARA, EPA y DHA en todos los tratamientos evaluados, lo que concuerda con reportes anteriores donde se ha registrado que esta especie contiene estos tres ácidos grasos poliinsaturados cuando es cultivada en medio f y f/2. Tal es el caso (De Jesús-Campos *et al.*, 2020), quienes registraron 7.85% de ARA, 10.55% de EPA y 1.21% de DHA. También, Lovio-Fragoso, (2021), en la misma especie de microalga, reportó 2.26% de ARA, 18.99% de EPA y 2.73% de DHA.

La composición y porcentaje de ácidos grasos pueden variar entre los estudios, en función de la procedencia de las cepas, el tipo de especie, así como las diferencias de las condiciones de cultivo. Pernet *et al.* (2003) encontraron en CH-M-1 proporciones bajas de ARA (0.08%), EPA (0.46%) y DHA (0.05%) cuando esta fue cultivada en volúmenes de 18 L y en medio f. Incluso, se ha observado que en algunos casos esta microalga no presenta los tres ácidos grasos esenciales, tal es el caso de Pacheco Vega *et al.* (2010) quienes encontraron solamente EPA (4.06%) en CH-M-1 cultivada en medio f. Mientras, que Lin *et al.* (2018) detectaron únicamente dos ácidos grasos; el ARA (2.37%) y el EPA (6.61%), en la misma especie

cultivada en medio f/2. En este sentido, se ha documentado que el contenido de ácidos grasos varía entre las especies de microalgas de acuerdo con el grupo taxonómico al que pertenece, incluso entre especies del mismo género (Rodríguez-Núñez & Toledo-Agüero, 2017). Jiménez-Valera, (2016) menciona al respecto que, la variación en el contenido de ácidos grasos puede atribuirse a que cada cepa o especie tiene una respuesta específica a las condiciones ambientales y a que las cepas aisladas provienen de diferente sitio de colecta, y en consecuencia distinta adaptación a las condiciones ambientales de cultivo.

En cuanto a TH-W-1, en todos los tratamientos se pudo registrar el contenido de EPA y DHA, más no el de ARA. Estos resultados coinciden con el perfil de ácidos grasos de TH-W-1 reportado en estudios previos, cultivada en medio f y f/2 como tratamiento control. Por un lado, Klein Breteler *et al.* (2005) encontraron proporciones de EPA de 9.6% y DHA de 1.1% en esta misma especie de microalga. Lin *et al.* (2018) cultivaron a TH-W-1 en medio f/2, y reportaron en el perfil de ácidos grasos EPA de 14.71% y DHA de 2.89%. También, Etesami *et al.* (2022) encontraron 0.68% de EPA y 7.26% de DHA. Mientras que Tam *et al.* (2021) cultivaron a TH-W-1 en medio f/2, encontrando 16.17% EPA, y no detectaron el DHA. Katayama *et al.* (2022), cultivaron a nueve diatomeas, entre las cuales se encontraba TH-W-1, con un contenido de 19.3% de EPA y 1.89% de DHA. En general, los resultados de estos autores coinciden con lo documentado anteriormente, al indicar que es un rasgo característico de las diatomeas, encontrar una mayor cantidad en EPA y una baja proporción de DHA (Remize *et al.*, 2021). En contraste, en las clorófitas el EPA se encuentra en cantidades mínimas (Klein Breteler *et al.*, 2005; Katayama *et al.*, 2022).

En este estudio no se detectó ARA en la microalga TH-W-1 en ninguno de los tratamientos evaluados. Lo que concuerda con algunos estudios anteriores que describen el perfil de ácidos grasos de TH-W-1, donde tampoco se ha reportado el ARA (Lin *et al.*, 2018; Katayama *et al.*, 2022; Etesami *et al.*, 2022). Sin embargo, cuando esta especie fue cultivada en condiciones limitantes en nitratos y silicatos en el medio f/2 se encontraron cantidades mínimas de ARA (1.13 y 0.55%; Lin *et al.*, 2018). Asimismo, Klein Breteler *et al.* (2005) reportan el contenido del ARA con la sumatoria del EPA con un valor de 9.6% cuando la

microalga fue cultivada en medio f/2, sin embargo, cuando limitaron el P, el ARA se encontró en cantidades mínimas 0.3%. También, Tam *et al.* (2021) reportaron cantidades mínimas de ARA (0.68%) cuando la microalga fue cultivada en recipientes de mayor volumen. De acuerdo con los antecedentes mencionados anteriormente que describen el perfil de ácidos grasos en TH-W-1 se puede determinar que el ARA no es característico en la especie TH-W-1, o se puede encontrar en cantidades mínimas bajo ciertas condiciones de cultivo, razón por la cual no fue detectado por el método empleado en este estudio.

Los ácidos grasos poliinsaturados en las microalgas CH-M-1 y TH-W-1 fueron evaluados en distintas concentraciones de fósforo del medio f con el objetivo de inducir mayor contenido en estos compuestos (Lin *et al.*, 2018; Lovio-Fragoso, 2021). Se ha observado, en la microalga verde *Nannochloropsis oculata* un aumento de EPA y ARA, cuando fue cultivada en medio f, en deficiencia en P (Matsui *et al.*, 2020). En la microalga marina *P. tricornutum* el contenido de EPA disminuyó notablemente en un medio deficiente en P (26.8 a 6.9%), los autores Siron *et al.* (1989) mencionan que limitar la concentración de P conduce una disminución significativa de los ácidos grasos de cadena larga alterando la insaturación total de los lípidos de las microalgas, y en especial la síntesis del EPA.

Asimismo, Lovio-Fragoso, (2021) cultivó a la microalga CH-M-1 en condiciones deficientes de P del medio f aplicando  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de P, este autor encontró aumento del contenido del ARA de 2.26 a 4.69%. Sin embargo, el contenido de EPA y DHA en CH-M-1 disminuyeron. Resultados similares reportó Lin *et al.* (2018) cuando cultivaron a CH-M-1 y TH-W-1 en  $2.96 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de P, observaron una disminución en los ácidos grasos poliinsaturados. También, Klein Breteler *et al.* (2005) encontraron que los ácidos grasos poliinsaturados disminuyeron, mientras que los ácidos grasos saturados y monoinsaturados aumentaron en TH-W1 cultivada en f/2 con  $0.30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de P. Por lo que, los autores sugirieron cultivar a la microalga sin disminuir el P en el medio de cultivo para no afectar la calidad nutricional de la microalga. En este estudio, no se encontró un efecto, negativo o positivo, de la disminución del P en el medio de cultivo sobre los ácidos grasos esenciales en ambas microalgas CH-M-1 y TH-W-1.

Matsui *et al.* (2020) encontraron un aumento del EPA y ARA en los fosfolípidos en la microalga verde *Nannochloropsis oculata*, cuando fue cultivada en condiciones deficientes en P, a diferencia de este estudio, clasificaron el contenido de ácidos grasos en glicolípidos y fosfolípidos. Los autores mencionan que el aumento de los ácidos grasos poliinsaturados en los fosfolípidos es un mecanismo de respuesta de la microalga para proteger la membrana mitocondrial del estrés oxidativo. Posiblemente, en este estudio las microalgas cultivadas en los tratamientos limitantes de P: f/2 y f/4, aprovecharon las reservas de P que se encuentran en la célula para administrar el requerimiento de este nutriente y así mantener la síntesis gradual de los ácidos grasos (Dyhrman, 2016; Solovchenko *et al.*, 2019). Por lo tanto, las concentraciones limitantes de P aplicadas en este estudio no fueron lo suficiente para inducir el aumento de los ácidos grasos de cadena larga.

En base a los resultados obtenidos en el presente estudio, se ha determinado que se rechaza parcialmente la primera hipótesis de trabajo. Esto debido a que, efectivamente, hubo una influencia de la disminución del P sobre el contenido de lípidos por unidad de volumen, así como en porcentaje respecto al PO, pero solo en la microalga CH-M-1, donde el tratamiento f/4 fue el que registró el mayor valor. Sin embargo, en la microalga TH-W-1, se observó la tendencia contraria, una disminución del contenido de lípidos en relación con la disminución del P en el medio de cultivo. Asimismo, no se registró evidencia de un incremento en el contenido de PUFA de ninguna de las dos microalgas usadas en este estudio con relación a la disminución del P en el medio. Mientras que, en relación con la densidad celular registrada, TH-W-1 no registró diferencias significativas en los tratamientos, y en CH-M-1 únicamente la densidad observada en el tratamiento f/0 fue menor al resto. Por lo tanto, se sugiere que en futuras investigaciones se cultiven a las microalgas por debajo de las concentraciones de P (f/2 y f/4), además de determinar el aporte de P del agua de mar usada para los cultivos, de tal manera este no afecte las respuestas de los tratamientos, y se logren explorar las respuestas fisiológicas de las microalgas propias por las variables dependientes del diseño experimental.

Respecto a la segunda hipótesis de investigación, de igual forma que la primera, es aceptada de manera parcial, debido a que esta sugiere que la microalga CH-M-1 cultivada en medio f con limitación en P (f/4) aportaría el mayor contenido de ácidos grasos esenciales (EPA,

ARA y DHA) en comparación con TH-W-1. TH-W-1 presentó un mayor contenido de EPA y DHA con respecto al registrado en CH-M-1 en los diferentes tratamientos evaluados. No obstante, no se detectó ARA en TH-W-1 en ninguno de los tratamientos. Por lo tanto, se sugiere que en futuras investigaciones se considere a TH-W-1 como una opción prometedora para la producción EPA y DHA, mientras que, si se requiere de una fuente de ARA, la microalga CH-M-1 es mejor candidata.



## **XI. CONCLUSIONES**

Las concentraciones limitantes de P (f/2 y f/4) no tuvieron un efecto significativo en la densidad celular, el peso seco y peso orgánico de las microalgas TH-W-1 y CH-M-1. Esto sugiere que ambas especies pueden adaptarse y crecer eficientemente en condiciones de limitación de P. Es importante mantener las concentraciones de los demás nutrientes (nitratos, vitaminas y minerales). Por lo tanto, las microalgas pueden ser cultivadas exitosamente en condiciones de limitación de P, lo que podría reducir los costos de producción de sistemas de cultivo de microalgas.

Cultivar a las microalgas en ausencia de fósforo (f/0) no es recomendable debido a que la densidad celular y la producción de biomasa orgánica se ven afectadas negativamente. Por lo tanto, existe una reducción en la cantidad y calidad de la biomasa proporcionada como alimento para los peces y camarones, lo que puede afectar negativamente en su crecimiento y desarrollo.

La microalga CH-M-1 presenta una mayor eficiencia en términos de densidad celular y producción de biomasa orgánica por volumen de cultivo, en comparación con TH-W-1. Este contraste sugiere que CH-M-1 es una especie más eficiente en términos de biomasa, lo que la convierte en una opción prometedora para la producción de alimento vivo en la acuicultura.

Las microalgas (CH-M-1 y TH-W-1) representan una fuente potencial de ácidos grasos saturados y monoinsaturados. Por lo que, si el objetivo es obtener una mayor proporción de estos compuestos, el medio f/2 y f/4 podrían ser un medio idóneo para obtener mayor cantidad en estos compuestos.

La disminución del P en los cultivos no indujo un aumento significativo en la producción de lípidos y de ácidos grasos esenciales (ARA, EPA y DHA) en ninguna de las especies de microalgas objeto de este estudio.

CH-M-1 representa una fuente mayor de lípidos, en comparación con TH-W-1 registrándose el mayor contenido en el tratamiento f/4 ( $29.33 \pm 2.33\%$ ). Mientras que, TH-W-1 es una mejor fuente potencial de EPA y DHA ( $14.11 \pm 1.55\%$  y  $3.97 \pm 0.99\%$ ), en comparación con CH-M-1 ( $7.35 \pm 0.67\%$  y  $0.84 \pm 0.17\%$ ), mientras que para el ARA ( $9.84 \pm 0.81\%$ ) la especie idónea es CH-M-1, ya que no se detectó este ácido graso en TH-W-1.

## XII. LITERATURA CITADA

- Abalde, J., Cid, Á., Fidalgo Paredes, P., Torres, E., & Herrero, C. (1995). *Microalgas: Cultivo y aplicaciones*. Universidade da Coruña, Servizo de Publicacións. <https://ruc.udc.es/dspace/handle/2183/25013>
- Adenan, N. S., Yusoff, F. M., Medipally, S. R., & Shariff, M. (2016). Enhancement of lipid production in two marine microalgae under different levels of nitrogen and phosphorus deficiency. *Journal of Environmental Biology*, 37(4 Spec No), 669-676.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (4th ed.). Garland Science.
- Arredondo Vega, B. O., & Voltolina, D. (2007). *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- 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>
- Bozarth, A., Maier, U.-G., & Zauner, S. (2009). Diatoms in biotechnology: Modern tools and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(2), 195-201. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1804-8>
- Brembu, T., Mühlroth, A., Alipanah, L., & Bones, A. M. (2017). The effects of phosphorus limitation on carbon metabolism in diatoms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 372(1728), 20160406. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0406>
- Brown, M. R. (2002). Nutritional Value and Use of Microalgae in Aquaculture. *Avances En Nutrición Acuicola*. <https://nutricionacuicola.uanl.mx/index.php/acu/article/view/242>
- Cañavate, J. P., Armada, I., & Hachero-Cruzado, I. (2017). Common and Species-Specific Effects of Phosphate on Marine Microalgae Fatty Acids Shape Their Function in Phytoplankton Trophic Ecology. *Microbial Ecology*, 74(3), 623-639. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-0983-1>

- Cequier-Sánchez, E., Rodríguez, C., Ravelo, Á. G., & Zárate, R. (2008). Dichloromethane as a Solvent for Lipid Extraction and Assessment of Lipid Classes and Fatty Acids from Samples of Different Natures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(12), 4297-4303. <https://doi.org/10.1021/jf073471e>
- De Jesús-Campos, D., López-Elías, J. A., Medina-Juarez, L. Á., Carvallo-Ruiz, G., Fimbres-Olivarria, D., & Hayano-Kanashiro, C. (2020). Chemical composition, fatty acid profile and molecular changes derived from nitrogen stress in the diatom *Chaetoceros muelleri*. *Aquaculture Reports*, *16*, 100281. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100281>
- Dyrhman, S. T. (2016). Nutrients and Their Acquisition: Phosphorus Physiology in Microalgae. En *The Physiology of of Microalgae* (pp. 155-183). Springer.
- El-Kassas, H. Y. (2013). Growth and fatty acid profile of the marine microalga *Picochlorum* Sp. Grown under nutrient stress conditions. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, *39*(4), 233-239. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2013.12.007>
- Etesami, E., Jorjani, S., & Noroozi, M. (2022). Improvement of *Thalassiosira weissflogii* as high valuable nutritional feed. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, *21*, 15-32. <https://doi.org/10.22092/IJFS.2022.125835>
- Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. H. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. 497-509.
- Gao, Y., Yang, M., & Wang, C. (2013). Nutrient deprivation enhances lipid content in marine microalgae. *Bioresource Technology*, *147*, 484-491. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.066>
- Garcia, N., Lopez Elias, J. A., Miranda, A., Martinez Porchas, M., Huerta, N., & Garcia, A. (2012). Effect of salinity on growth and chemical composition of the diatom *Thalassiosira weissflogii* at three culture phases. *Latin American Journal of Aquatic Research*, *40*(2), 435-440. <https://doi.org/10.3856/vol40-issue2-fulltext-18>
- Glencross, B. (2009). Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Reviews in Aquaculture*, *1*, 71-124. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2009.01006.x>

- González-Galena, P. (2019). Modelo de la cinética de crecimiento de *Chaetoceros muelleri* en un fotobiorreactor plano [Tesis de Maestría]. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE).
- Graciani Constante, E., Giacomelli, L., & Gómez Herrera, C. (2006). Componentes de los aceites y/o grasas y compuestos relacionados. *Los aceites y grasas: composición y propiedades*, 2006, ISBN 84-87440-36-3, págs. 11-118, 11-118. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3116716>
- Gualtieri, P., & Barsanti, L. (2006). *Algae: Anatomy, biochemistry, and biotechnology*. Taylor & Francis.
- Guedes, A., & Malcata, F. (2012). Nutritional Value and Uses of Microalgae in Aquaculture. En *Aquaculture* (Vol. 10). <https://doi.org/10.5772/30576>
- Guillard, R. R. L., & Ryther, J. H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms: *i. cyclotella nana hustedt*, and *detonula confervacea* (cleve) gran. *Canadian Journal of Microbiology*, 8(2), 229-239. <https://doi.org/10.1139/m62-029>
- Haoujar, I., Altemimi, A., Essafi, A., & Cacciola, F. (2022). Nutritional, sustainable source of aqua feed and food from microalgae: *A mini review*.
- Hemerick, G. (1973). Mass culture. En *Handbook of phyological methods* (pp. 255-273). Stein, J.R. (Ed.).
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., & Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 54(4), 621-639. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x>
- Izquierdo, M. (2005). Essential fatty acid requirements in Mediterranean fish species Cah. *Cahiers Options Méditerranéennes*. v. 63, pp. 91-102, 63.
- Jiménez-Valera, S. (2016). Aislamiento y caracterización bioquímica de microalgas de Baja California como alternativas para la producción de lípidos [Tesis de Doctorado]. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, CICESE.

- Karl, D. M. (2014). Microbially mediated transformations of phosphorus in the sea: New views of an old cycle. *Annual Review of Marine Science*, 6, 279-337. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010213-135046>
- Katayama, T., Rahman, N. A., Khatoon, H., Kasan, N. A., Nagao, N., Yamada, Y., Takahashi, K., Furuya, K., Wahid, M. E. A., Yusoff, F. Md., & Jusoh, M. (2022). Bioprospecting of tropical microalgae for high-value products: N-3 polyunsaturated fatty acids and carotenoids. *Aquaculture Reports*, 27, 101406. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101406>
- Khozin-Goldberg, I. (2016). Lipid Metabolism in Microalgae. En *The Physiology of Microalgae* (pp. 413-484). Springer.
- Kim, S.-K. (2015). *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances*. Elsevier.
- Klein Breteler, W., Schogt, N., & Rampen, S. (2005). Effect of diatom nutrient limitation on copepod development: The role of essential lipids. *Marine Ecology Progress Series*, 291, 125-133. <https://doi.org/10.3354/meps291125>
- Lari, Z., Moradi-kheibari, N., Ahmadzadeh, H., Abrishamchi, P., Moheimani, N. R., & Murry, M. A. (2016). Bioprocess engineering of microalgae to optimize lipid production through nutrient management. *Journal of Applied Phycology*, 28(6), 3235-3250. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0884-6>
- Lebeau, T., & Robert, J.-M. (2003). Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part I: Cultivation at various scales. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(6), 612-623. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1176-4>
- Lin, Q., Zhuo, W.-H., Wang, X.-W., Chen, C.-P., Gao, Y.-H., & Liang, J.-R. (2018). Effects of fundamental nutrient stresses on the lipid accumulation profiles in two diatom species *Thalassiosira weissflogii* and *Chaetoceros muelleri*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 41(8), 1213-1224. <https://doi.org/10.1007/s00449-018-1950-z>
- López-Tapia, M. (2002). Evaluación nutricional de microalgas marinas en cultivos comerciales de larvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) [Tesis de Maestría]. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE).

- Lovio Fragoso, J., Hayano Kanashiro, C., & Lopez Elias, J. (2019). Effect of different phosphorus concentrations on growth and biochemical composition of *Chaetoceros muelleri*. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 47(2), 361-366. <https://doi.org/10.3856/vol47-issue2-fulltext-17>
- Lovio-Fragoso, J. (2021). Análisis Transcriptómico de la diatomea *Chaetoceros muelleri*, Bajo Condiciones Limitantes de Fósforo y su Relación con la Acumulación de aceites [Tesis de Doctorado]. Universidad de Sonora.
- Maltsev, Y., Kulikovskiy, M., & Maltseva, S. (2023). Nitrogen and phosphorus stress as a tool to induce lipid production in microalgae. *Microbial Cell Factories*, 22(1), 239. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02244-6>
- Mandotra, S. K., Kumar, P., Suseela, M. R., Nayaka, S., & Ramteke, P. W. (2016). Evaluation of fatty acid profile and biodiesel properties of microalga *Scenedesmus abundans* under the influence of phosphorus, pH and light intensities. *Bioresource Technology*, 201, 222-229. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.042>
- Matsui, H., Shiozaki, K., Okumura, Y., Ishikawa, M., Waqalevu, V., Hayasaka, O., Honda, A., & Kotani, T. (2020). Effects of phosphorous deficiency of a microalga *Nannochloropsis oculata* on its fatty acid profiles and intracellular structure and the effectiveness in rotifer nutrition. *Algal Research*, 49, 101905. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101905>
- Millán-Almaraz, M. I., López-Peraza, D. J., Nieves-Soto, M., & Peraza-Yee, M. M. (2023). Effect of 4 microalgal diets on the proximal composition, chlorophyll concentration, and total carotenoid content in *Artemia franciscana*. *Ciencias Marinas*. <https://doi.org/10.7773/cm.y2023.3381>
- Morrison, K. (1986). *Techniques of lipidology: Isolation, analysis and identification of lipids*. American Elsevier.
- Nieves, M., López, D. J., Medina, M. A., Piña, P., & Leal, S. (2009). Producción y calidad de *Chaetoceros muelleri*.
- Pacheco Vega, J. M. P., Cadena Roa, M. A., Sanchez Saavedra, M. del P., Tovar Ramírez, D., & Rangel Dávalos, C. (2010). Effect of culture medium and nutrient concentration on fatty acid content of *Chaetoceros muelleri*. 10.

- Pacheco-vega, J. M. (2010). Evaluación de la producción de ácidos grasos altamente insaturados de la microalga *Chaetoceros muelleri* por efecto de la concentración y el tipo de nutrientes en el medio de cultivo y su efecto en Zoeas de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) [Tesis de Doctorado]. Universidad Autónoma de Baja California Sur.
- Pacheco-Vega, J., & Sánchez-Saavedra, M. del P. (2009). The Biochemical Composition of *Chaetoceros muelleri* (Lemmermann Grown) with an Agricultural Fertilizer. *Journal of the World Aquaculture Society*, 40, 556-560. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2009.00276.x>
- Packer, M., Harris, G., & Adams, S. (2016). *Food and Feed Applications of Algae* (pp. 217-247). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-12334-9\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-319-12334-9_12)
- Pandey, S., Narayanan, I., Selvaraj, R., Varadavenkatesan, T., & Vinayagam, R. (2024). Biodiesel production from microalgae: A comprehensive review on influential factors, transesterification processes, and challenges. *Fuel*, 367, 131547. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2024.131547>
- Patil, V., Reitan, K., Knutsen, Mortensen, L., Källqvist, T., Olsen, Y., Vogt, G., & Gislerød, H. (2005). Microalgae as a source of polyunsaturated fatty acids for aquaculture. *Current topics in plant biology*, 6, 57-65.
- Peraza-Yee, M. M., Carranza-Díaz, O., Bermudes-Lizárraga, J. F., López-Peraza, D. J., Nieves-Soto, M., & Millán-Almaraz, M. I. (2022). The effect of major nutrients in five levels of an f medium on growth and proximal composition of *Thalassiosira weissflogii*. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 50(1), 110-123. <https://doi.org/10.3856/vol50-issue1-fulltext-2749>
- Pérez-Verdugo, F. (2007). Determinación de variables físicas, químicas y nutrientes (nitratos y fosfatos) en el Estero de Urías y en la Bahía de 112 Mazatlán, Sinaloa. [Tesis de Licenciatura]. Universidad Autónoma de Sinaloa, Facultad de Ciencias del Mar.
- Pernet, F., Tremblay, R., Demers, E., & Roussy, M. (2003). Variation of lipid class and fatty acid composition of *Chaetoceros muelleri* and *Isochrysis* sp. Grown in a semicontinuous system. *Aquaculture*, 221(1-4), 393-406. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00030-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00030-9)



- Pratiwy, F. M., & Pratiwi, D. Y. (2020). The potentiality of microalgae as a source of DHA and EPA for aquaculture feed: *A review*.
- Remize, M., Brunel, Y., Silva, J. L., Berthon, J.-Y., & Filaire, E. (2021). Microalgae n-3 PUFAs Production and Use in Food and Feed Industries. *Marine Drugs*, *19*(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/md19020113>
- Reynolds, C. S. (2006). *Ecology of Phytoplankton*. Cambridge University Press.
- Rodríguez-Núñez, K., & Toledo-Agüero, P. (2017). Fatty acids profile and nutritional composition of two tropical diatoms from the Costa Rican Pacific Coast. *Grasas y Aceites*, *68*(3), 209. <https://doi.org/10.3989/gya.1276162>
- Roy, S. S., & 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>
- Sajjadi, B., Chen, W.-Y., Raman, Abdul. Aziz. A., & Ibrahim, S. (2018). Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *97*, 200-232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.07.050>
- Salas, A. O. (2017). Cultivation of the Microalga *Thalassiosira weissflogii* to feed the Rotifer *Brachionus rotundiformis*. *Journal of Aquaculture & Marine Biology*, *6*(5). <https://doi.org/10.15406/jamb.2017.06.00169>
- Santin, A., Balzano, S., Russo, M. T., Palma Esposito, F., Ferrante, M. I., Blasio, M., Cavalletti, E., & Sardo, A. (2022). Microalgae-Based PUFAs for Food and Feed: Current Applications, Future Possibilities, and Constraints. *Journal of Marine Science and Engineering*, *10*(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/jmse10070844>
- Sargent, J. R., Tocher, D. R., & Bell, J. G. (2002). The Lipids. En *Fish Nutrition* (pp. 182-246). Academic Press.
- Siron, R., Giusti, G., & Berland, B. (1989). Changes in the fatty acid composition of *Phaeodactylum tricornutum* and *Dunaliella tertiolecta* during growth and under phosphorus deficiency. 95-100.
- Solovchenko, A., Khozin-Goldberg, I., Selyakh, I., Semenova, L., Ismagulova, T., Lukyanov, A., Mamedov, I., Vinogradova, E., Karpova, O., Konyukhov, I.,

- Vasilieva, S., Mojzes, P., Dijkema, C., Vecherskaya, M., Zvyagin, I., Nedbal, L., & Gorelova, O. (2019). Phosphorus starvation and luxury uptake in green microalgae revisited. *Algal Research*, 43, 101651. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101651>
- Sorokin, C. (1973). Dry weight, packed cell volume and optical density. En *Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements* (pp. 321-343). In: J.R. Stein (ed.).
- Spaulding, S. A., Potapova, M. G., Bishop, I. W., Lee, S. S., Gasperak, T. S., Jovanoska, E., Furey, P. C., & Edlund, M. B. (2021). Diatoms.org: Supporting taxonomists, connecting communities. *Diatom Research*, 36(4), 291-304. <https://doi.org/10.1080/0269249X.2021.2006790>
- Su, Y. (2021). Revisiting carbon, nitrogen, and phosphorus metabolisms in microalgae for wastewater treatment. *Science of The Total Environment*, 762, 144590. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144590>
- Su, Y., Zhu, X., Zou, R., & Zhang, Y. (2022). The interactions between microalgae and wastewater indigenous bacteria for treatment and valorization of brewery wastewater. *Resources, Conservation and Recycling*, 182, 106341. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2022.106341>
- Suárez, A., Guevara, M., González, M., Cortez, R., & Arredondo-Vega, B. (2013). Crecimiento y composición bioquímica de *Thalassiosira pseudonana* (Thalassiosirales: Thalassiosiraceae) bajo cultivo semi-continuo en diferentes medios y niveles de irradiancias. *Revista de Biología Tropical*, 61(3), 1003-1013.
- Tam, L., Cong, N., Ha, N., Hang, N., Minh, C., Vien, D., & Hong, D. (2021). Cultivation and biomass production of the diatom *Thalassiosira weissflogii* as a live feed for white-leg shrimp in hatcheries and commercial farms in Vietnam. *Journal of Applied Phycology*, 33. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02371-w>
- Vega, B. O. A., & Voltolina, D. (2007). Determinación de peso seco y contenido orgánico e inorgánico.
- Venkatesan, J., Manivasagan, P., & Kim, S. (2015). Marine Microalgae Biotechnology: Present Trends and Future Advances. En *Handbook of Marine Microalgae:*

- Biotechnology Advances* (pp. 1-9). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00001-7>
- Voltolina, D., Del, M., Sánchez-Saavedra, M. del P., Luz, M., & Torres-Rodríguez. (2008). Outdoor mass microalgae production in Bahia Kino, Sonora, NW Mexico. *Aquacultural Engineering*, 38, 93-96. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2007.11.004>
- Von Dassow, P., Chepurnov, V. A., & Armbrust, E. V. (2006). Relationships Between Growth Rate, Cell Size, and Induction of Spermatogenesis in the Centric Diatom *Thalassiosira Weissflogii* (bacillariophyta). *Journal of Phycology*, 42(4), 887-899. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.00250.x>
- Vuppaladadiyam, A. K., Prinsen, P., Raheem, A., Luque, R., & Zhao, M. (2018). Microalgae cultivation and metabolites production: A comprehensive review. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 12(2), 304-324. <https://doi.org/10.1002/bbb.1864>
- Wang, X., Huang, B., & Zhang, H. (2014). Phosphorus deficiency affects multiple macromolecular biosynthesis pathways of *Thalassiosira weissflogii*. *Acta Oceanologica Sinica*, 33(4), 85-91. <https://doi.org/10.1007/s13131-014-0413-x>
- Wikfors, G. H., & Ohno, M. (2001). Impact of Algal Research in Aquaculture. *Journal of Phycology*, 37(6), 968-974. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2001.01136.x>
- Xing, D., Li, X., Jin, C., Zhao, Y., Yang, X., Gao, M., Ji, J., Xu, X., She, Z., & Guo, L. (2022). Coupling of wastewater treatment and microalgae products recovery: Effect of phosphorus components on the biochemical composition and phosphorus absorption of *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Water Process Engineering*, 49, 102968. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.102968>
- Yaakob, Z., Ali, E., Zainal, A., Mohamad, M., & Takriff, M. S. (2014). An overview: Biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture. *Journal of Biological Research*, 21(1), 6. <https://doi.org/10.1186/2241-5793-21-6>
- Zar, J. H. (2010). *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall.
- Zazueta-Patrón, I. E. (2016). Crecimiento, Biomasa y Composición Proximal de Microalgas Cultivadas en Medios Limitantes de Nitrógeno [Tesis de Maestría]. Posgrado: Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Autónoma de Sinaloa (FACIMAR-UAS).

Zulu, N. N., Zienkiewicz, K., Vollheyde, K., & Feussner, I. (2018). Current trends to comprehend lipid metabolism in diatoms. *Progress in Lipid Research*, 70, 1-16.  
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.03.001>

### **XIII. ANEXOS**

Metodología para las transferencias sucesivas de cultivos de microalgas.

- 1) Lavar material con agua y dejar en ácido diluido durante 48 horas: matraces de 500 mL, envases de plásticos de 4 L y mangueras para la aireación. Una vez lavado el material enjuagar.
- 2) Antes de preparar el medio, los residuos de cloro libre se neutralizaron adicionando  $60 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  de tiosulfato de sodio por cada ml de hipoclorito de sodio agregado. Agitar y mantener durante veinte minutos.
- 3) Después verificar la ausencia de cloro adicionando ortotoluidina y registrando mediante un comparador colorimétrico.
- 4) A partir del contenido de un tubo de ensayo de aproximadamente 15 mL de cultivo con la cepa de la especie correspondiente, se inoculan 450 mL de medio en un matraz Erlenmeyer de 500 mL.
- 5) Limpiar el área de trabajo con alcohol y encender el mechero.
- 6) Los nutrientes tenerlos listos para vaciar 450  $\mu\text{L}$  de cada nutriente en cada matraz.
- 7) Rotular los matraces con nombre de la cepa, fecha y hora del cultivo.
- 8) Agregar la cepa y agitar.
- 9) En la boca del matraz colocar papel tafil y agujerear uniformemente en toda la superficie para el intercambio de gases.
- 10) Dejar los matraces separados en el cepario para evitar contaminación.
- 11) Agitar diariamente los matraces.
- 12) Después de 48 horas. Inocular 3 mL de medio en un recipiente de plástico de 3 L transparente esperando que la concentración celular sea lo suficientemente alta para inocular las cuatro réplicas de un tratamiento.

*Nota: Este procedimiento se empleó de la misma manera para hacer las transferencias en recipientes de plásticos de 4L, garrafrones de 20 L hasta que el cultivo alcanzó la densidad deseada.*

#### XIV. CURVA DE LÍPIDOS

Estándar de lípidos: Se pesan 100 mg de tripalmitina se diluyen en un matraz aforado de 25 mL.

Para la concentración de 0.4 mg/mL

Se toma **0.5 mL de la solución madre** y se le agregan **4.5 mL de cloroformo** para tener 5 mL con una concentración de 0.4 mg/mL.

Para la concentración de 0.8 mg/mL.

Se toman **1 mL de la solución madre** y se le agregan **4 mL de cloroformo** para tener 5 mL con una concentración de 0.8 mg/mL.

Para la concentración de 1.2 mg/mL.

Se toman **1.5 mL de la solución madre** y se le agregan **3.5 mL de cloroformo** para tener 5 mL con una concentración de 1.2 mg/mL.

Para la concentración de 1.6 mg/mL.

Se toman **2 mL de la solución madre** y se le agregan **3 mL de cloroformo** para tener 5 ml con una concentración de 1.6 mg/mL.

Para la concentración de 2.0 mg/mL.

Se toman **2.5 mL de la solución madre** y se le agregan **2.5 mL de cloroformo** para tener 5 mL con una concentración de 2 mg/mL.

Para la concentración de 2.4 mg/mL.

Se toman **3.0 mL de la solución madre** y se le agregan **2.0 mL de cloroformo** para tener 5 mL con una concentración de 2.4 mg/mL.

**\*\*Se le agrega 1mL a cada tubo y se deja evaporar\*\***

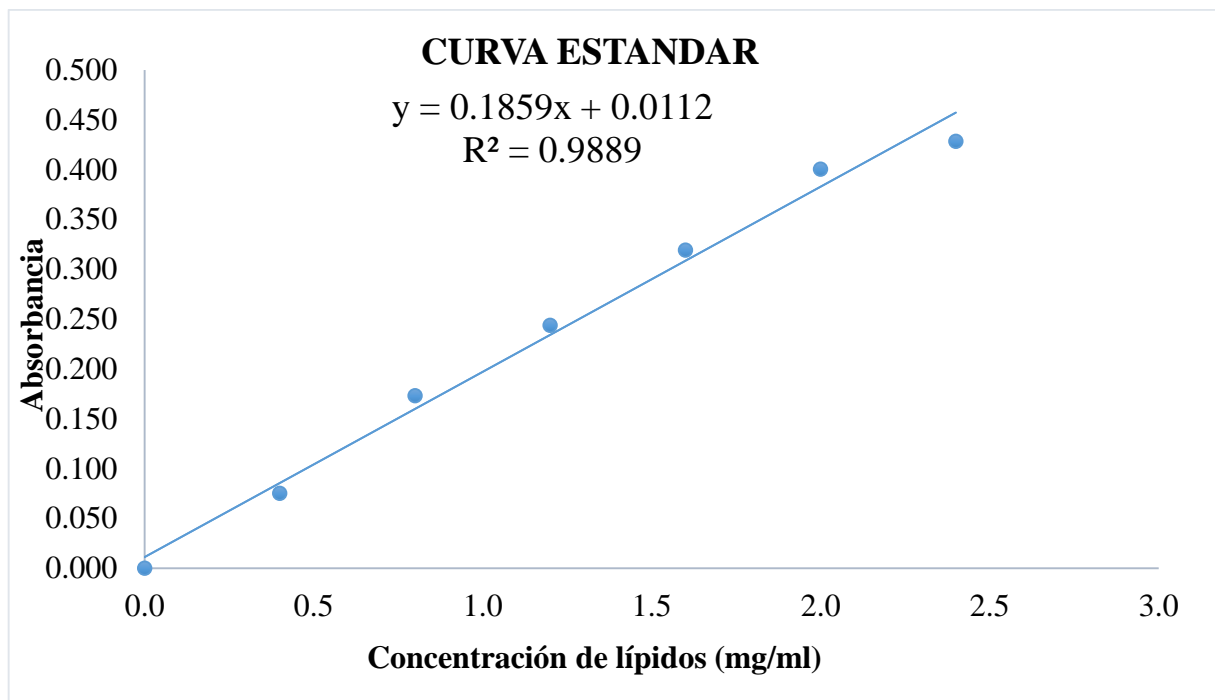


Figura 11. La relación lineal entre la absorbancia y la concentración de lípidos de tripalmitina