



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS, ÁCIDOS GRASOS Y PIGMENTOS EN
Triceratium dictyotum SIMS & ROSS (1990) (BACILLARIOPHYTA:
COSCINODISCOPHYCEAE) BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS
POR DÉFICIT DE NITRÓGENO, DÉFICIT DE SILICIO Y DISTINTAS
IRRADIANCIAS.**

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Acuicultura)

Presenta

Carlos Alejandro Pérez Rojas

La Paz, Baja California Sur, Junio 2016.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 15 horas del día 10 del Mes de mayo del 2016, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS, ÁCIDOS GRASOS Y PIGMENTOS EN *Triceratium dictyotum* SIMS & ROSS (1990) (BACILLARIOPHYTA: COSCINODISCOPHYCEAE) BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS POR DÉFICIT DE NITRÓGENO, DÉFICIT DE SILICIO Y DISTINTAS IRRADIANCIAS.

Presentada por el alumno:

Carlos Alejandro Pérez Rojas

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Acuicultura**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA


Dra. Maria Concepción Lora Vilchis
Directora


Dra. Elena Palacios Mechetnov
Co-tutora


Dra. Luz Esthela González de Bashan
Co-tutora


Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

CONFORMACIÓN DE COMITÉS

Comité Tutorial

Dra. María Concepción Lora Vilchis	(Directora)	(CIBNOR, S.C)
Dra. Luz Estela González de Bashan	(Co-tutora)	(CIBNOR, S.C.)
Dra. Elena Palacios Mechetnov	(Co-tutora)	(CIBNOR, S.C.)

Comité Revisor de Tesis

Dra. María Concepción Lora Vilchis
Dra. Luz Estela González de Bashan
Dra. Elena Palacios Mechetnov

Jurado de examen de grado

Dra. María Concepción Lora Vilchis
Dra. Luz Estela González de Bashan
Dra. Elena Palacios Mechetnov
Dr. Alejandro López Cortés (Suplente) (CIBNOR, S.C.)

RESUMEN

La diatomea *Triceratium dictyotum* tiene un buen potencial para la producción de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y fucoxantina, pigmento carotenoide con gran potencial antioxidante, y es nativa del Golfo de California por lo que está adaptada a los factores abióticos y bióticos regionales predominantes, favoreciendo su uso para la producción local. Diversas especies de microalgas responden a un estrés por déficit nutricional mediante la producción de lípidos y de pigmentos, sin embargo, estos efectos no se ha estudiado en *T. dictyotum*. Con el objetivo de evaluar el efecto del estrés nutricional sobre el crecimiento, contenido de lípidos, ácidos grasos y fucoxantina; *T. dictyotum* fue cultivada y sometida a estrés por déficit de silicatos y nitratos, en irradiancias de 20, 70 y 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ en un sistema de dos etapas para generar biomasa en la primera y observar el efecto del estrés en la segunda. Para determinar que los tratamientos con distintas cantidades de nutrientes se aplicaron correctamente se midió la concentración de nitratos y silicatos. El efecto del estrés fue evaluado mediante la densidad celular, el contenido de lípidos totales, de ácidos grasos y de pigmentos fotosintéticos. El estrés por déficit de nitratos no fue adecuado para la producción de los PUFA AA, EPA, DHA ni fucoxantina resultando en productividades máximas de 0.03, 0.04, 0.002 y 0.02 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ respectivamente; el déficit de silicatos combinado con alta o baja irradiancia induce la producción de ácidos grasos y, solamente con baja irradiancia, la producción de pigmentos, sin embargo, la productividad disminuye debido la tasa de crecimiento baja, obteniendo valores máximos de 0.09, 0.4 y 0.029 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ de AA, EPA y DHA en alta irradiancia y 0.21 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ de fucoxantina en baja irradiancia; por otro lado, los cultivos sin estrés nutricional y con irradiancia media alcanzaron valores de productividad de 0.28, 0.71, 0.046 y 0.21 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ para AA, EPA, DHA y fucoxantina respectivamente, con estas condiciones no se limita el crecimiento de la microalga, permitiendo alcanzar la productividad más alta de PUFA y pigmentos.

Palabras clave: *Triceratium dictyotum*; pigmentos; ácidos grasos.

Vo. Bo.

Dra. María concepción Lora Vilchis

Directora de tesis

ABSTRACT

The diatom *Triceratium dictyotum* is native to the Gulf of California and adapted to regional abiotic and biotic factors, favoring its for local production because of its potential for production of polyunsaturated fatty acids (PUFA) and fucoxanthin, a carotenoid pigment with great antioxidant potential. Several species of microalgae respond to stress by nutritional deficiency producing lipids and pigments; however, it has not been studied in *T. dictyotum*. The effect of nutritional stress was evaluated on growth, content of lipids, fatty acids, and fucoxanthin. *T. dictyotum* was cultured and exposed to silicate and nitrogen starvation stress with irradiance of 20, 70, and 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ in a two-step system to generate biomass in the first one and observe the effect of stress on the second one. The concentration of nitrates and silicates was measured to assess the nutritional deficit. The effect of stress was evaluated using cell density, total lipid content, fatty acids and photosynthetic pigments. Nitrate deficit stress was not appropriate for the production of PUFA AA, EPA, DHA nor fucoxanthin resulting maximum productivities of 0.03, 0.04, 0.002, and 0.02 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, respectively. Silicate deficit combined with high or low irradiance induces the production of fatty acids and only with low irradiance, pigment production. However, productivity decreased because growth rate was lower than without stress, obtaining maximum values of 0.09, 0.4, and 0.029 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ for AA, EPA, and DHA in high irradiance and 0.21 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ for fucoxanthin in low irradiance. On the other hand, crops without nutritional stress and average irradiance reached productivity values of 0.28, 0.71, 0.046, and 0.21 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ for AA, EPA, DHA, and fucoxanthin, respectively; these conditions did not limit growth in microalgae, reaching higher productivity for PUFA and pigments.

Key words: *Triceratium dictyotum*; pigments; fatty acids.

Approval



Dra. María concepción Lora Vilchis

Thesis director

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mi familia: por siempre procurar darme lo mejor que tienen a su alcance y haberme llevado de la mano hasta este punto de mi vida.

A mi madre y mi padre por su guía, amor y educación.

A mis hermanos por todas las locuras, bromas y travesuras que realizamos juntos.

AGRADECIMIENTOS

A las instituciones: CIBNOR, por permitir realizar el presente estudio en sus instalaciones, así como por todo apoyo otorgado. Al CONACyT, por la beca de manutención (Reg. 301923). Al SENER – CONACyT por el apoyo mediante el proyecto No.000000000152931: "Biorefinería para la producción de biogás biodiesel e hidrógeno a partir de microalgas y de aguas residuales domésticas"

A la Dra. María Concepción Lora Vilchis, Cony, por compartirme su experiencia y conocimiento dentro del laboratorio y su amistad fuera de él y por ayudarme a adentrarme y conocer el mundo de las microalgas.

A mis Co -Tutoras, la Dra. Elena Palacios Mechetnov y la Dra. Luz Estela González de Bashan, por el tiempo dedicado a revisar este trabajo y todos los consejos que contribuyeron a mejorarlo.

A todo el personal del CIBNOR que me apoyó con capacitación, consejos, equipos, mantenimiento y revisiones permitieron la realización de este trabajo: Roberto Hernández Herrera, Gabriela Mendoza Carrión, Jorge Cobos Anaya, Marte Virgen Félix, Adriana Greene Yee, Mauricio Pérez Lizarra, Salvador Anwart Meza Jiménez, Ma. Olivia Arjona López, Francisco E. Hernández, Diana Leticia Dorantes Salas, Araceli y a Cynthia Elizabeth Aldana Avilés que en paz descanse.

A los profesionales que no pertenecen al CIBNOR pero también proporcionaron mucha ayuda: Jorge del Ángel y Francisco Omar López Fuerte.

A mis amigos y compañeros de la generación, por compartir muchos momentos agradables durante nuestra estancia y apoyarnos mutuamente.

A Vero por acompañarme en gran parte de esta experiencia dándome su apoyo.

A mi familia, que aun estando lejos están siempre pendientes de mí, me dan todo su apoyo y por estar siempre que lo necesito.

¡MUCHAS GRACIAS A TODOS!

CONTENIDO

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
CONTENIDO.....	v
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABLAS	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Importancia de las algas.....	3
2.1.1. Biotecnología de microalgas	3
2.1.2. <i>Triceratium dictyotum</i>	4
2.2. Lípidos como compuestos bioactivos	7
2.2.1. Ácidos grasos	7
2.2.2. Pigmentos, fotosíntesis y fucoxantina	9
2.3. Factores que aumentan la acumulación de compuestos bioactivos	11
2.3.1. Iluminación.....	11
2.3.2. Nitrógeno	12
2.3.3. Silicio.....	13
2.4. El medio de cultivo como factor de calidad.....	15
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. PREGUNTA E HIPÓTESIS.....	17
4.1. Pregunta	17
4.2. Hipótesis.....	17
5. OBJETIVOS	18
5.1. Objetivo general	18
5.2. Objetivos particulares	18
6. MATERIALES Y MÉTODOS	19
6.1. Cepa y medios de cultivo.....	19
6.2. Preparación de inóculo	19
6.3. Selección del medio de cultivo y fuente de nitrógeno	19
6.3.1. Selección del medio de cultivo	19
6.3.2. Selección de la fuente de nitrógeno	21

6.4 Establecimiento del sistema de cultivo para evaluar efectos de condiciones estresantes.....	22
6.4.1. Cultivos en una sola etapa.....	22
6.4.2. Sistema en dos etapas.....	24
6.4.3. Evaluación de nutrientes en el medio y comparación de crecimiento en agua marina natural vs. agua marina sintética.....	25
6.4.4. Evaluación de sistema semi-continuo en dos etapas.....	26
6.5. Evaluación de efecto del déficit de nitrógeno y el efecto del déficit de silicio en irradiancias de 20, 70 y 120 $\mu\text{mol de fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	28
7. RESULTADOS.....	30
7.1. Selección del medio de cultivo y fuente de nitrógeno.....	30
7.1.1 Selección del medio de cultivo.....	30
7.1.2 Selección de la fuente de nitrógeno.....	31
7.2 Establecimiento de sistema de cultivo para evaluar efectos de condiciones estresantes.....	33
7.2.1. Cultivos en una sola etapa.....	33
7.2.2. Sistema en dos etapas.....	34
7.2.3. Evaluación de nutrientes en el medio y comparación de crecimiento en agua marina natural vs agua marina sintética.....	39
7.2.4. Evaluación de sistema semi-continuo en dos etapas.....	40
7.3. Evaluación de efecto del déficit de nitrógeno y el efecto del déficit de silicio en irradiancias de 20, 70 y 120 $\mu\text{mol de fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	41
7.3.1. Concentración de nutrientes: Silicatos y nitratos.....	41
7.3.2. Características de la biomasa.....	42
7.3.3. Evaluación de crecimiento.....	43
7.3.4. Cenizas.....	46
7.3.5. Lípidos totales.....	47
7.3.6. Ácidos grasos.....	48
7.3.7. Pigmentos.....	55
8. DISCUSIÓN.....	60
9. CONCLUSIONES.....	72
10. BIBLIOGRAFÍA.....	74
11. ANEXOS.....	81

ANEXO 1. Formulación del Medio f/2 de Guillard.....	81
ANEXO 2. Formulación del Medio Conway	82
ANEXO 3. Formulación del agua marina sintética.....	83
ANEXO 4. Procedimiento realizado para seleccionar un tratamiento para eliminar bacterias en los cultivos	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotografía de <i>T. dictyotum</i> tomada por microscopía electrónica.....	6
Figura 2. Representación del fotosistema.....	9
Figura 3. Estructuras de la fucoxantina y sus metabolitos fucoxantínol, amarouciaxantina A y halocintiaxantina.....	10
Figura 4. Fotografías con aumento 40x en fluorescencia de <i>T. dictyotum</i> teñida con BODIPY.....	14
Figura 5. Sistema de cultivo estático para <i>T. dictyotum</i> en matraces de 1L.....	20
Figura 6. Sistema de cultivo semi-continuo empleado en los experimentos de aplicación de estrés a <i>T. dictyotum</i> durante la segunda etapa de cultivo.....	26
Figura 7. Curvas de crecimiento de <i>T. dictyotum</i> cultivada en medio f/2 de Guillard y en medio Conway.....	30
Figura 8. Curvas de crecimiento en el experimento de selección de la fuente de nitrógeno.....	32
Figura 9. Curvas de crecimiento de <i>T. dictyotum</i> en el experimento de estrés por ausencia de nutrientes empleando un sistema de una sola etapa.....	33
Figura 10. Curvas de crecimiento de los cultivos sometidos estrés nutricional en sistema de dos etapas.....	35
Figura 11. Porcentaje de lípidos totales con respecto a masa seca en los cultivos de <i>T. dictyotum</i> a $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	35
Figura 12. Concentraciones de los ácidos grasos 16:0, 16:1n-7, AA y EPA en <i>T. dictyotum</i> cultivada con irradiancia de $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ en un sistema de dos etapas.....	37
Figura 13. Pigmentos identificados en cultivos sometidos $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de irradiancia.....	38
Figura 14. Variación de nitratos y silicatos en el medio de cultivo.....	39
Figura 15. Concentración de silicatos y densidad celular durante siete días de cultivo de <i>T. dictyotum</i>	40
Figura 16. Concentración final de silicatos en el medio de cultivo con irradiancia de 20, 70 y $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	41
Figura 17. Concentración final de nitratos en el medio de cultivo con irradiancia de 20, 70 y $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	42
Figura 18. Fotografía de células cosechadas sometidas a distintos tipos de estrés nutricional.....	43
Figura 19. Tasas de crecimiento (μ) de <i>T. dictyotum</i> cultivada con nutrientes completos en sistema semicontínuo a irradiancias de 20, 70 y $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	45
Figura 20. Tasas de crecimiento (μ) de <i>T. dictyotum</i> cultivada en sistema semi-continuo en condiciones de nutrientes completos y bajo estrés nutritivo.....	46
Figura 21. Porcentaje de cenizas de <i>T. dictyotum</i> cultivada en sistema semicontínuo en condiciones de nutrientes completos y bajo estrés nutricional.....	47
Figura 22. Concentración de AA en <i>T. dictyotum</i> cultivada en irradiancia de 20, 70 y $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	49

Figura 23. Productividad de AA en <i>T. dictyotum</i> cultivada con irradiancias de 20, 70 y 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	51
Figura 24. Concentración de EPA en <i>T. dictyotum</i> cultivada con irradiancias de 20, 70 y 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	52
Figura 25. Productividad de EPA en <i>T. dictyotum</i> cultivada con irradiancias de 20, 70 y 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	53
Figura 26. Concentración de DHA en <i>T. dictyotum</i> cultivada con irradiancias de 20, 70 y 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	54
Figura 27. Productividad de DHA en <i>T. dictyotum</i> cultivada con irradiancias de 20, 70 y 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	54
Figura 28. Concentración de fucoxantina en <i>T. dictyotum</i> cultivada con irradiancias de 20, 70 y 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	55
Figura 29. Productividad de fucoxantina en <i>T. dictyotum</i> cultivada con nutrientes completos, con déficit de silicatos y déficit de nitratos.....	56
Figura 30. Concentración de clorofila “a” en <i>T. dictyotum</i> cultivada con irradiancias de 20, 70 y 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	57
Figura 31. Productividad de clorofila “a” en <i>T. dictyotum</i> cultivada con nutrientes completos, con déficit de silicatos y déficit de nitratos.....	58
Figura 32. Concentración de clorofila “c” en <i>T. dictyotum</i> cultivada con irradiancias de 20, 70 y 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	58
Figura 33. Productividad de clorofila “c” en <i>T. dictyotum</i> cultivada con nutrientes completos, déficit de silicatos y déficit de nitratos.....	59
Figura 34. Fotografías de <i>T. dictyotum</i> observada al microscopio óptico con luz blanca, de cultivos tratados para reducir su población de bacterias.....	86
Figura 35. Fotografías en contraste de fases observadas al microscopio óptico, de cultivos tratados para reducir su población de bacterias.....	86

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Clasificación de las algas y principal interés biotecnológico	5
Tabla II. Especies de microalgas de gran relevancia por sus aplicaciones biotecnológicas y que actualmente se comercializan.....	6
Tabla III. Clasificación taxonómica de <i>T. dictyotum</i>	7
Tabla IV. Diseño experimental para evaluar el efecto del déficit de nitratos y déficit de silicatos respecto a un control con nutrientes completos a diferentes irradiancias de la diatomea <i>T. dictyotum</i>	28
Tabla V. Tasas de crecimiento (μ) en experimento de selección de medio de cultivo.	31
Tabla VI. Tasas de crecimiento (μ) en experimento de selección de fuente de nitrógeno.....	32
Tabla VII. Concentración de ácidos grasos ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ MS) de <i>T. dictyotum</i> después de 3 días de estrés nutricional e irradiancia de $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	36
Tabla VIII. Resultados de la prueba de ANOVA bifactorial a las tasas de crecimiento obtenidas durante la etapa de cultivo estático..	44
Tabla IX. Resultados de la prueba de ANCOVA bifactorial de la tasa de crecimiento.	45
Tabla X. Porcentaje de lípidos totales de <i>T. dictyotum</i> cultivada en sistema semicontínuo en distintas irradiancias y condiciones de nutrientes completos y con déficit de silicatos y déficit de nitratos	48
Tabla XI. Ácidos grasos identificados ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ MOS) en <i>T. dictyotum</i> cultivada en sistema semicontínuo con distintas irradiancias y nutrientes completos, déficit de silicatos y déficit de nitratos.....	50
Tabla XII. Tasas de crecimiento de diatomeas obtenidas en distintos estudios....	64
Tabla XIII. Comparación de la productividad, concentración y % molar obtenidos con <i>T. dictyotum</i> con resultados obtenidos en distintos estudios.	70
Tabla XIV. Descripción de los tratamientos para reducir la contaminación por bacterias.	85

1. INTRODUCCIÓN

La biotecnología de microalgas ha ganado importancia debido al potencial de estos organismos para producir compuestos bioactivos con aplicación en los sectores farmacéutico, alimentario y bio-energético (Pulz y Gross, 2004; Chisti, 2007; Keerthi *et al.*, 2013). Entre las microalgas con gran potencial para su cultivo a escala comercial y obtención de nutraceuticos (combinación de los sectores farmacéutico y alimentario) se encuentran las diatomeas, las cuales contienen lípidos ricos en ácidos grasos esenciales para los humanos (Peng *et al.*, 2011; Keerthi *et al.*, 2013) y son prometedoras como una buena fuente de fucoxantina, el cual es un pigmento carotenoide que ha mostrado tener una fuerte actividad antioxidante. El consumo de ácidos grasos esenciales omega 3 (n-3) y omega 6 (n-6) en proporciones (n-3/n-6) que van desde 1/6 hasta 1/2 (Wijendrn y Hayes, 2004; Simopoulos, 2008) ha mostrado tener múltiples beneficios en la salud por su capacidad anti-inflamatoria, anti-obesidad, anti-diabética, anti-cancerígena y anti-hipertensiva (Peng *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2013). Se sabe que es posible inducir un incremento en la producción de estos compuestos cuando las microalgas son sometidas a condiciones estresantes tales como la alta irradiancia y el déficit de nutrientes (Solovchenko, 2013; Xia *et al.*, 2013).

Triceratium dictyotum Sims & Ross (1990) es una diatomea aislada de B. C. S., que en experimentos preliminares mostró características morfológicas, de cultivo y de respuesta al estrés que sugirieron que esta cepa podía tener alto potencial en la producción de lípidos, ácidos grasos y pigmentos carotenoides. El uso de especies nativas, como lo es *T. dictyotum* a la región del golfo de California, ofrece muchas ventajas ya que están adaptadas a los factores abióticos y bióticos regionales predominantes, y por lo tanto están evolutivamente preparadas para la producción local, además no representan un riesgo de convertirse en especies invasoras nocivas. Por otra parte, las algas nativas proporcionan una plataforma ideal para el desarrollo y optimización de otras cepas adicionales (Wilkie *et al.*, 2011). Actualmente no existen reportes sobre su fisiología y respuesta a condiciones

estresantes, las cuales podrían incrementar la producción de compuestos bioactivos en esta especie

En el presente trabajo se estudió a *T. dictyotum*, con el objetivo de conocer parte de su fisiología y determinar si la producción de compuestos bioactivos de esta especie puede ser aprovechada como fuente de producción de fucoxantina y/o ácidos grasos esenciales, específicamente de ácido eicosapentaenoico (20:5n-3), así como también el determinar la influencia de los parámetros irradiancia y nutrientes sobre la producción de estos compuestos.

2. ANTECEDENTES

2.1. Importancia de las algas

Las algas constituyen un grupo muy diverso ya que incluyen organismos procariontes y eucariontes que van desde unicelulares hasta las algas marinas parenquimatosas pluricelulares de más de 50 metros de largo (McFadden, 2001). Se caracterizan por su capacidad de realizar fotosíntesis oxigénica, gracias a la cual pueden sintetizar compuestos orgánicos complejos que pueden mantener dentro de las células o liberarlos, esto con la ventaja añadida de un descenso en los niveles de CO₂ en el ambiente (Chisti, 2007; Guedes *et al.*, 2011).

Estos organismos se distribuyen por todo el mundo en ambientes muy diversos y pueden sobrevivir a gran cantidad de ambientes adversos, incluyendo (pero no limitado a) calor, frío, sequía, salinidad, foto-oxidación, anaerobiosis, presión osmótica y exposición a rayos UV (Guedes *et al.*, 2011). Las algas son muy importantes desde una perspectiva ecológica, ya que son los productores primarios de los océanos, y cuerpos de agua dulce o salobre donde también pueden existir. Estos organismos también se encuentran sobre y dentro del suelo, rocas, hielo, nieve, plantas y animales; son responsables del 40% de la fotosíntesis mundial, por lo que contribuyen casi con la mitad del oxígeno terrestre (Andersen, 1992; Falkowski y Raven, 2007).

2.1.1. Biotecnología de microalgas

Todas las algas microscópicas, sean unicelulares o filamentosas, son llamadas microalgas y, aunque este término no sea taxonómico, resulta práctico cuando se habla en términos generales de estos organismos. La biotecnología de microalgas está relacionada con la producción, uso y aplicaciones biotecnológicas de las microalgas, por lo tanto, un conocimiento básico de la fisiología, ecología y taxonomía de las algas (en forma general) es importante (Tabla I) (Pulz y Gross, 2004).

Las microalgas combinan de manera equilibrada, algunas propiedades típicas de las plantas superiores (por ejemplo, fotosíntesis oxigénica eficiente y requerimientos nutricionales simples) con atributos biotecnológicos propios de los microorganismos (como la rapidez de crecimiento y la capacidad de acumular o secretar metabolitos primarios y secundarios) (Guedes *et al.*, 2011). Forman una gran biodiversidad, estimada entre 200,000 y varios millones de especies en comparación con la de plantas superiores con cerca de 250,000 especies (Pulz y Gross, 2004). Su cultivo no se limita a las tierras de cultivo o el agua potable, lo que permite el uso de las tierras marginales, los acuíferos salinos, las aguas residuales y los océanos para la producción de recursos biológicos (Wilkie *et al.*, 2011). Estas características han llevado a la selección de dichos microorganismos para procesos aplicados, y representan el fundamento básico de la biotecnología de microalgas (Guedes *et al.*, 2011).

El éxito de la biotecnología de microalgas depende, principalmente, de la elección de microalgas adecuadas, con propiedades relevantes para realizar cultivos y obtener productos específicos de alto valor, como los carotenoides y ácidos grasos esenciales como el araquidónico (20:4n-6, AA) eicosapentaenoico (20:5n-3, EPA) y docosahexaenoico (22:6n-3, DHA), entre otros (Tabla II) (Pulz y Gross, 2004).

2.1.2. *Triceratium dictyotum*

T. dictyotum es una microalga que fue colectada en aguas marinas de La Poza, Mar de Cortés, BCS., considerándose como una especie nativa del Golfo de California; fue aislada en el cepario de microalgas del CIBNOR, y fue identificada utilizando microscopía electrónica por el Dr. Francisco Omar López Fuerte (2015).

Tabla I. Clasificación de las algas y principal interés biotecnológico (Pulz y Gross, 2004).

Grupo de algas	Características	Uso / Interés biotecnológico
Cyanobacteria	<ul style="list-style-type: none"> • 2,000 especies conocidas - 150 géneros • Único de naturaleza procarionte. • Clorofila "a", ficocianinas, ficoeritrina. • Órdenes: Chroococcales, Oscillatoriales, Nostocales y Stigonematales • Fotótrofos estrictas - algunas mixotróficas o heterotróficas • Almacenan gran cantidad de fósforo, nitrógeno, carbono y energía. • Reproducción: fisión celular 	<ul style="list-style-type: none"> • Producción hepatotoxinas o neurotoxinas. • Uso terapéutico: antivirales, inmuno-reguladores, inhibidores o citostáticos. • Especies importantes: <i>Spirulina (Arthrospira) platensis</i>, <i>Nostoc commune</i> y <i>Aphanizomenon flos-aquae</i>.
Verdes	<ul style="list-style-type: none"> • Grupos: Chlorophyta y Conjugaphyta • Subgrupos de Chlorophyta: Prasinophyceae (algas unicelulares flageladas), Chlorophyceae (unicelulares o filamentosas), Ulvophyceae y Charophyceae (ambos grupos son algas macroscópicas) 	<ul style="list-style-type: none"> • Alimento: <i>Tetraselmis</i>, <i>Pyramimonas</i> y <i>Micromonas</i> • Carotenoides: <i>Dunaliella salina</i> • Astaxantina: <i>Haematococcus pluvialis</i>.
Heterocontas	<ul style="list-style-type: none"> • Grupos: Phaeophyta (algas marrones), Xanthophyta (algas verde-amarillas), Chrysophyta (algas doradas) y Bacillariophyta (diatomeas subdivididas en tres grupos: Coscinodiscophyceae, Fragilariophyceae y Bacillariophyceae). • Presencia de Fucoxantina. • Reservas de energía: crisolaminarina y lípidos. • Lípidos - flotabilidad. 	<ul style="list-style-type: none"> • Alimento: <i>Olisthodiscus</i> y <i>Nannochloropsis</i>, <i>Isochrysis</i>, <i>Pavlova</i>, <i>Chaetoceros</i>. • Producción de EPA y alimento de moluscos y crustáceos y de zooplancton de uso en acuicultura.
Cryptophyta	<ul style="list-style-type: none"> • 60 especies - 20 géneros. • Unicelulares y móviles. • Clorofila, carotenoides y ficobiliproteínas en plástidos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Alimento a rotíferos y bivalvos en acuicultura.
Dinoflagellata	<ul style="list-style-type: none"> • 4,000 especies - 550 géneros • Agua dulce y salada. • Heterotróficas, no llevan a cabo fotosíntesis en su gran mayoría. • Reservas de almidón, lípidos, esteroides, ácidos grasos y otros metabolitos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Producción de toxinas. • Alimento de larvas de pescado en acuicultura: <i>Gymnodinium</i> • Producción de esteroides y DHA.
Extremófilas	<ul style="list-style-type: none"> • Crecimiento más lento que el de las algas comunes. 	<ul style="list-style-type: none"> • Cultivos con menor riesgo de contaminación. • Producción de enzimas o metabolitos extracelulares con propiedades cinéticas únicas.

Tabla II. Especies de microalgas de gran relevancia por sus aplicaciones biotecnológicas y que actualmente se comercializan (Pulz y Gross, 2004).

Especie/Grupo	Producto	Áreas de aplicación	Sistema de cultivo Estanque / Reactor
<i>Spirulina (Arthrospira) platensis</i> / Cyanobacteria	Ficocianina, biomasa	Salud alimentaria, cosméticos	EA, lagos naturales
<i>Chlorella vulgaris</i> / Chlorophyta	Biomasa	Salud alimentaria, suplementos alimenticios y sustitutos de alimentos	EA y PBR
<i>Dunaliella salina</i> / Chlorophyta	Carotenoides y β -caroteno	Salud alimentaria, suplementos alimenticios y alimentación	EA, lagunas hipersalinas
<i>Haematococcus pluvialis</i> / Chlorophyta	Carotenoides y astaxantina	Salud alimentaria, farmacéuticos y aditivos alimenticios	EA, PBR
<i>Odontella aurita</i> / Bacillariophyta	Ácidos grasos	Farmacéuticos, cosméticos y alimento para bebé	EA
<i>Porphyridium cruentum</i> / Rhodophyta	Polisacáridos	Farmacéuticos, cosméticos y nutrición	PBR tubular
<i>Isochrysis galbana</i> / Chlorophyta	Ácidos grasos	Nutrición animal	EA
<i>Phaedactylum tricorutum</i> / Bacillariohyta	Lípidos, ácidos grasos	Nutrición y producción de combustibles	EA, contenedores
<i>Lyngbya majuscula</i> / Cyanobacteria	Inmuno-reguladores	Farmacéuticos y nutrición	PBR

EA: Estanque abierto, PBR: fotobioreactor.

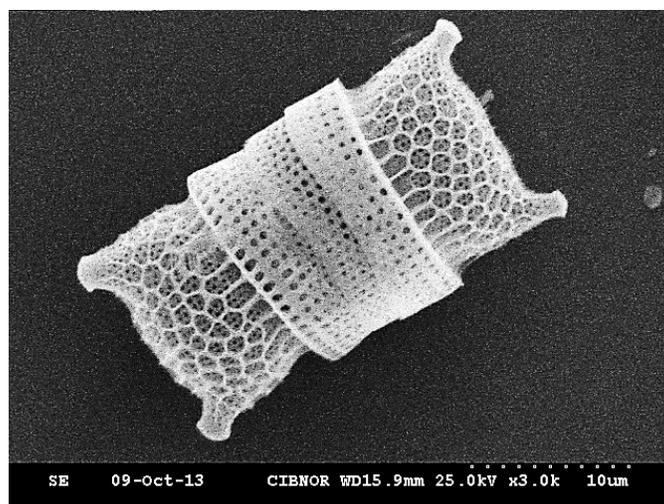


Figura 1. Fotografía de *T. dictyotum* tomada por microscopía electrónica (obtenida de los archivos del cepario de microalgas del CIBNOR).

T. dictyotum (Fig. 1) pertenece al grupo de las diatomeas (Tabla III), por lo que tiene un gran potencial para la producción de fucoxantina y ácidos grasos esenciales (Keerthi *et al.*, 2013).

Tabla III. Clasificación taxonómica de *T. dictyotum* (Guiry, 2016).

Reino	Chromista
Phylum	Bacillariophyta
Clase	Coscinodiscophyceae
Familia	Triceratiaceae
Género	<i>Triceratium</i>

2.2. Lípidos como compuestos bioactivos

Los lípidos comprenden una gran variedad de compuestos que son caracterizados por ser hidrofóbicos y solubles en solventes orgánicos. Cumplen con diversas funciones en los organismos por lo que son importantes desde un punto de vista nutricional. Comúnmente se clasifican en tres grandes grupos:

1. Lípidos simples (no polares): acilgliceroles, ceras, esteroides y ácidos grasos.
2. Lípidos complejos (polares): fosfolípidos, glucolípidos y lipoproteínas
3. Lípidos asociados: pigmentos, esteroides.

Los grupos de lípidos simples y complejos contienen, al menos, una molécula de ácidos grasos, los cuáles son considerados como el componente básico de los lípidos. (Silva *et al.*, 2012).

2.2.1. Ácidos grasos

Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos con cadenas alifáticas que contienen un extremo metilo terminal (-CH₃) y otro extremo carboxilo terminal (-COOH), esas cadenas pueden ser simples o ramificadas y saturadas o insaturadas. Basándose

en el número de dobles enlaces (insaturaciones) que tienen los ácidos grasos se clasifican como saturados (SFA, todas las abreviaturas están dadas por sus siglas en inglés) cuando no tienen dobles enlaces, monoinsaturados (MUFA) si tienen un doble enlace y poliinsaturados (PUFA) si tienen dos o más. Los PUFA incluyen un subgrupo de ácidos grasos conocido como altamente insaturados (HUFA) si tienen una cadena de 20 o más carbonos y al menos 3 dobles enlaces; por practicidad, en este trabajo se utilizará solo el término PUFA para referirse tanto a PUFA y HUFA. Otros grupos en los que se subdividen los PUFA son omega 3 (n-3) y omega 6 (n-6) que incluyen a todos los PUFA con el primer doble enlace en la tercera o sexta posición, respectivamente, a partir del último carbono del extremo metilo terminal (carbono omega). Los PUFA se encuentran, principalmente, formando parte de los fosfolípidos en las membranas de las células ya que facilitan la semipermeabilidad de las mismas, aunque también llegan a encontrarse en los triglicéridos que se encuentran en el citoplasma (Silva *et al.*, 2012).

El consumo de PUFA puede generar beneficios a la salud ya que se les atribuyen efectos hipotriglicéridémicos, hipocolesterolémicos, antitrombóticos, antiinflamatorios, reguladores y protectores de la función del sistema nervioso, protectores del desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, entre otros (Kumari *et al.*, 2013; Valenzuela *et al.*, 2014). Para que el consumo de PUFA beneficie al sistema cardiovascular se recomienda que la relación n-3/n-6 sea en proporción mínima de 1/6 (Wijendrn y Hayes, 2004) hasta 1/4, consumiendo una proporción de 2/5 se reduce el riesgo y proliferación del cáncer colorectal, también se ha observado que entre más alta es esta proporción se reduce, en la misma medida, el riesgo de cáncer de seno en mujeres, la inflamación en pacientes con artritis reumatoide se ha visto disminuida consumiendo los PUFA en proporciones de 1/3 y en pacientes con asma se han observado efectos benéficos con la proporción de 1/5 (Simopoulos, 2008). En las microalgas marinas, los PUFA que se encuentran con frecuencia son AA, EPA y DHA (Kumari *et al.*, 2013).

2.2.2. Pigmentos, fotosíntesis y fucoxantina

Los organismos fotosintéticos son capaces de absorber la radiación visible e iniciar las reacciones fotoquímicas de la fotosíntesis. Logran esto gracias a los fotosistemas I y II en los que se transfiere la energía desde los pigmentos antena hasta el centro de reacción que contiene clorofila "a" (Fig. 2). Algunos de los pigmentos antena involucrados en este proceso son los carotenoides (Karp, 2009).

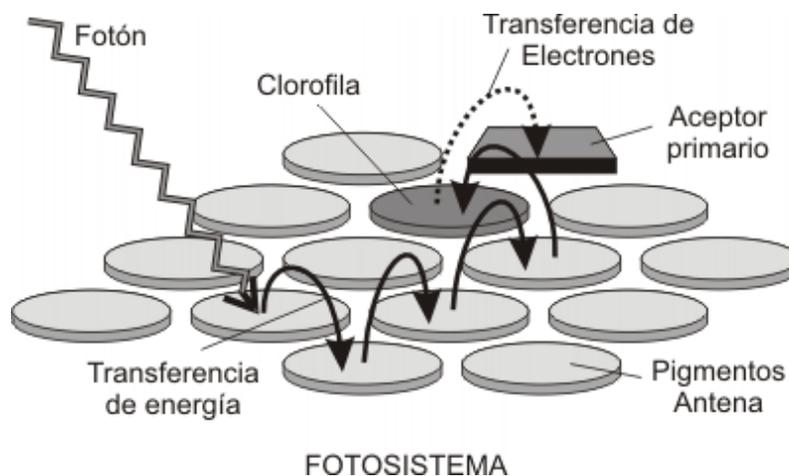


Figura 2. Representación del fotosistema (Solomon *et al.*, 1998).

Aunque se ha logrado producir grandes cantidades de carotenoides específicos en microalgas, como el β -caroteno en *Dunaliella salina*, astaxantina en *Haematococcus pluvialis* y luteína en *Scenedesmus almeriensis* y *Muriellopsis* sp., aún no se identifica una especie que se pueda explotar para la producción de fucoxantina (Xia *et al.*, 2013). Esto posiblemente se debe a que los pigmentos β -caroteno, astaxantina y luteína, tienen como función principal proteger al sistema fotosintético de la excesiva irradiación más que ser un pigmento antena, como es el caso de la fucoxantina (Blankenship, 2002).

Se ha reportado que la fucoxantina exhibe propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antiobesidad, antidiabéticas, anticancerígenas y antihipertensivas; también se puede utilizar como un aditivo para la alimentación animal en las industrias de aves de corral y de la acuicultura (Peng *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2013).

La fucoxantina es importante en las algas, especialmente en diatomeas; ésta cumple con la función captar la energía luminosa y transferir la excitación ya que es un pigmento antena. También protege a las células de irradiancias muy altas gracias a su estructura, ya que tiene un enlace alénico, un carbonilo conjugado, un grupo 5, 6-monoepóxido y un grupo acetilo que contribuyen a una estructura única, además de una cadena con siete dobles enlaces que permiten el flujo de electrones en esta molécula (Fig. 3) (Peng *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2013).

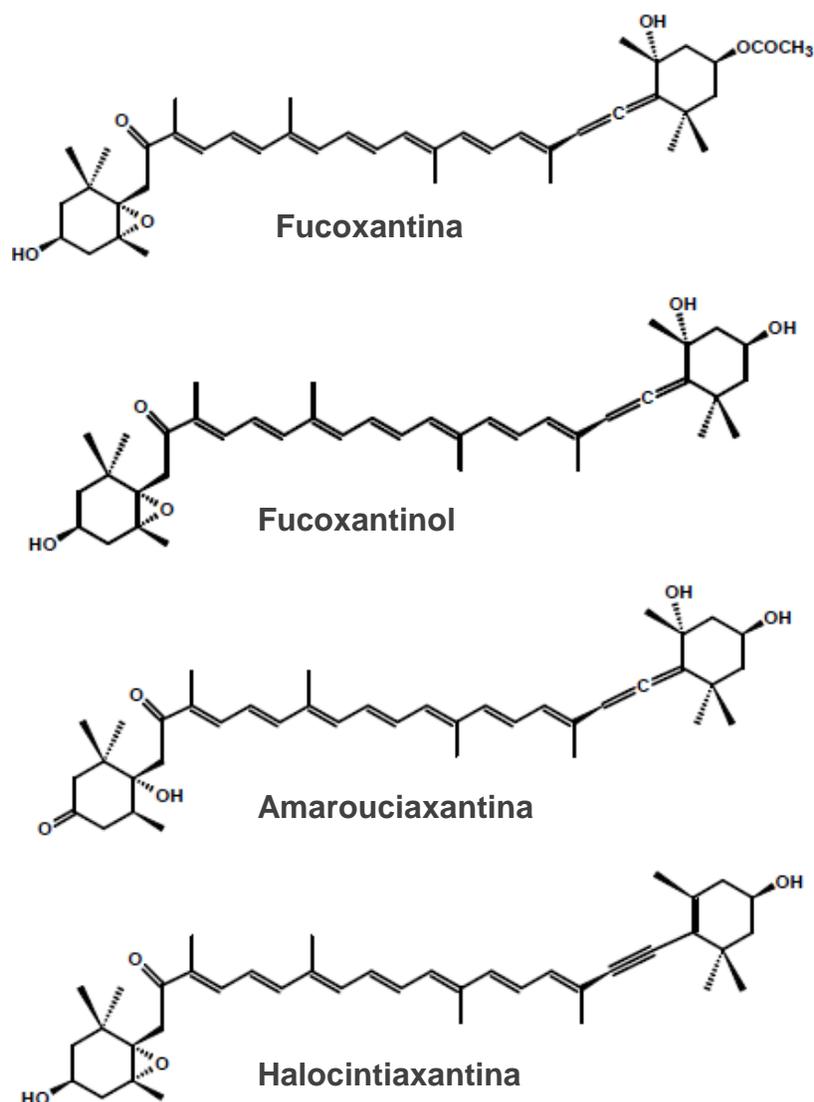


Figura 3. Estructuras de la fucoxantina y sus metabolitos fucoxantíno, amarouciaxantina A y halocintíaxantina (Peng *et al.*, 2011).

2.3. Factores que aumentan la acumulación de compuestos bioactivos

2.3.1. Iluminación

La iluminación puede modularse principalmente en su intensidad, fotoperíodo, longitud de onda y en la fuente de donde provenga. La intensidad o irradiancia, se refiere al flujo de luz por unidad de área a la cual están expuestas las microalgas; el fotoperíodo, corresponde a la cantidad de horas durante el día en la que las microalgas son sometidas a dicha irradiación (Watanabe, 2005). La longitud de onda se refiere a la distancia entre dos crestas o dos valles consecutivos de una onda de radiación electromagnética. La fuente de iluminación determina el tipo de ondas que se generan; en el caso de la iluminación solar, la longitud de onda no es una sino todas las que componen la luz blanca que es una mezcla de todas las longitudes de onda del espectro visible.

Cuando los cultivos de microalgas se exponen a un nivel elevado de irradiación, se producen reacciones de foto-oxidación debido al exceso de energía, que afectan de manera negativa la actividad de pigmentos fotosintéticos, enzimas y otras macromoléculas importantes. A este nivel de irradiancia se le conoce como el punto de saturación lumínica, y por encima de él la velocidad de fotosíntesis se puede ver reducida; este fenómeno se conoce como fotoinhibición (Massol-Deyá y Fuentes, 2002).

Muchos de los microorganismos que habitan en zonas sujetas a una alta irradiación solar han desarrollado mecanismos de adaptación para evitar la fotoinhibición, tales como la producción de carotenoides (antioxidantes) y el desarrollo de mecanismos eficientes de reparación del ADN (Massol-Deyá y Fuentes, 2002; Guedes *et al.*, 2011). Por ejemplo *H. pluvialis* es capaz de soportar la alta irradiación gracias a que tiene astaxantina que permite la disipación del exceso de energía (Guedes *et al.*, 2011). *D. salina* produce β -caroteno bajo las mismas condiciones (Park *et al.*, 2006) y *Odontella aurita* incrementa su producción de fucoxantina al ser sometida a irradiación alta (Xia *et al.*, 2013).

Con irradiancia baja también se han observado efectos importantes: Se puede inducir la formación de fosfolípidos y PUFA debido a la generación de tilacoides (ricos en membranas), que son necesarios para captar con mayor eficiencia la luz disponible; en contraste, las altas intensidades luminosas disminuyen el contenido de lípidos polares y estimulan la producción de triglicéridos (Solovchenko *et al.*, 2008). La producción de fucoxantina también se ve incrementada a baja irradiancia ya que es un pigmento antena que forma un complejo con las clorofilas, las cuales incrementan su producción con baja irradiancia para incrementar la eficiencia de la fotosíntesis (Wright *et al.*, 1991; Blankenship, 2002).

2.3.2. Nitrógeno

El nitrógeno es necesario principalmente para la formación de ácidos nucleicos y proteínas, así como de pigmentos fotosintéticos. Es importante determinar la fuente de nitrógeno que se utilizará. El amonio es la fuente de nitrógeno que las plantas y algas consumen primeramente cuándo está disponible, sin embargo, en ambientes eutróficos muchas algas crecen mejor utilizando nitratos, aun cuando se requiere que las células lo reduzcan posteriormente a amoníaco. Esto se debe en gran medida a la toxicidad del hidróxido de amonio producido a pH altos, como son los que se observan durante periodos de alta actividad fotosintética en ambientes eutróficos (Massol-Deyá y Fuentes, 2002). Algunas microalgas como *Isochrysis* han mostrado mayor afinidad por urea (Fidalgo *et al.*, 1998).

En algunas especies de microalgas, la deficiencia de nitrógeno favorece la producción y acumulación de lípidos y pigmentos (Xia *et al.*, 2013; Griffiths *et al.*, 2014). Cuando un cultivo es expuesto a una intensidad luminosa adecuada, pero con limitación de nutrientes, se disminuye la tasa de división celular (aunque se sigue convirtiendo energía solar en energía química), pero a menor velocidad y como mecanismo de supervivencia, se desvía el flujo de carbono fijado por la fotosíntesis a síntesis de lípidos, principalmente triglicéridos (Arias Peñaranda *et al.*, 2012). Las diatomeas son un grupo que ha llamado la atención con respecto a la

acumulación de lípidos, cuando *Phaedactylum tricornutum* es sometida a condiciones de déficit de nitrógeno llega a acumular hasta el 60% de su peso seco solo en lípidos (Pulz y Gross, 2004; Levitan *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014). En *D. salina* se ha observado que el déficit de nitrógeno induce a la acumulación de β -caroteno, obteniendo mejores resultados combinando este déficit con alta irradiancia (Park *et al.*, 2006). *H. pluvialis* también incrementa su producción de astaxantina bajo condiciones de déficit de nitrógeno y magnesio (Guedes *et al.*, 2011). Sin embargo, este tipo de estrés reduce la tasa de crecimiento, haciendo que no sea la mejor opción si se busca como objetivo principal el aumentar la productividad de lípidos (Levitan *et al.*, 2014). *T. dictyotum* no es la excepción, al cultivarla con deficiencia de nitrógeno y observarla al microscopio aplicando luz fluorescente, se observaron cambios consistentes en el aumento del área cubierta por la fluorescencia de los lípidos comparando con células no estresadas (Fig. 4).

2.3.3. Silicio

El silicio es un nutriente esencial para las diatomeas en las cuales representa desde 25 hasta 60% del peso seco, estas algas lo obtienen por lo general en forma de silicatos y lo utilizan para formar sus frústulas. Algunos estudios realizados con cultivos de laboratorio indican que las diatomeas no pueden reproducirse si la concentración de silicio es menor de 0.5 mg/L (Massol-Deyá y Fuentes, 2002). Otro efecto que tiene el déficit de silicio es la acumulación de lípidos con efectos secundarios menores a los que se observan con déficit de nitrógeno, como son alcanzar las fases de meseta y muerte en poco tiempo. Un estudio sobre nueve diatomeas mostró que esta forma de estrés aumentó su contenido de lípidos desde 28 hasta 61% en peso seco, con un promedio de 45%. De hecho, se ha reportado que el déficit de silicio a menudo conduce a una mayor acumulación de lípidos totales en las diatomeas que el déficit de nitrógeno (Levitan *et al.*, 2014).

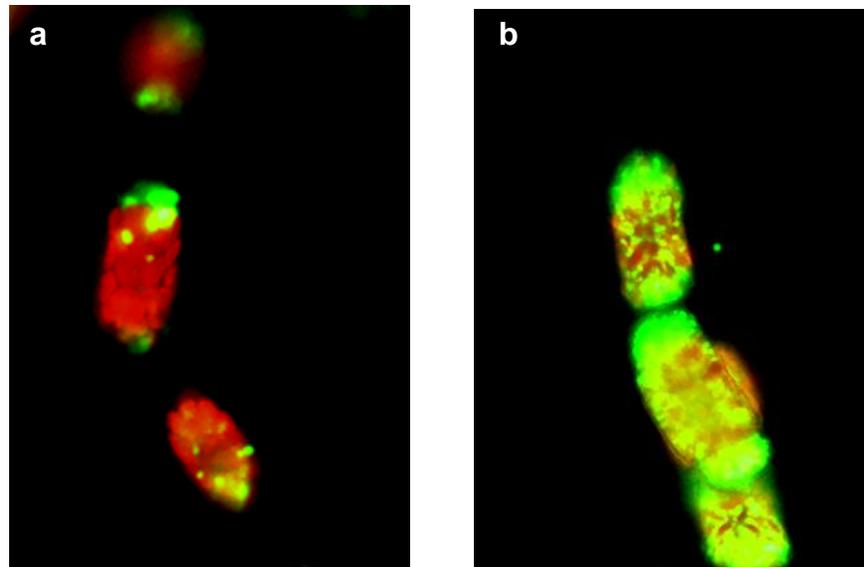


Figura 4. Fotografías con aumento 40x en fluorescencia de *T. dictyotum* teñida con BODIPY. El color rojo corresponde a la fluorescencia natural de la clorofila, el color verde corresponde a los lípidos que se tiñeron con el colorante. a) Células sin estresar, b) Células estresadas con déficit de nitrógeno.

En diversos estudios se ha observado que los lípidos que acumulan las microalgas en mayor cantidad cuando están bajo condiciones de estrés por déficit de silicio, al igual que por déficit de nitrógeno, son triglicéridos. Esto probablemente se produce en las algas bajo distintos tipos de estrés ambiental, como medio de almacenamiento de energía química en una forma compacta que puede ser utilizado fácilmente cuando las condiciones ambientales se vuelven más favorables (Roessler, 1988).

Al combinar el déficit de silicio con baja irradiancia se ha observado que la producción de pigmentos se detiene en *O. aurita* (Xia *et al.*, 2013) y en *Navicula pelliculosa* (Healey *et al.*, 1967), sucediendo lo contrario al combinarlo con alta irradiancia.

Se ha observado que estos tres factores (alta irradiancia, déficit de nitrógeno y déficit de silicio) no incrementan solo los triglicéridos, en algunas especies de microalgas incrementan la concentración de fosfolípidos, glicolípidos y PUFA n-3; *Botryococcus braunii* acumula EPA bajo déficit de nitrógeno, *Euglena gracilis* y *C.*

vulgaris producen fosfolípidos y PUFA de 18 carbonos en irradiación alta (Ramaraj *et al.*, 2015). Considerar estas posibilidades es importante, porque los triglicéridos son mayormente aprovechados como reservas de energía, mientras que la incorporación de PUFA n-3 y n-6 provenientes de fosfolípidos se dirige con mayor facilidad a las membranas, por lo tanto el consumo de fosfolípidos aporta mayores beneficios a la salud (Valenzuela *et al.*, 2014).

2.4. El medio de cultivo como factor de calidad

El desempeño en el crecimiento de las microalgas está fuertemente determinado por la calidad del medio de cultivo. Cuando las algas se cultivan en medios abiertos al ambiente y son destinadas al uso en la acuicultura se prefiere utilizar fertilizantes comerciales derivados de fuentes minerales; sin embargo, el cultivo de cepas puras requiere de un control estricto del contenido de nutrientes en el medio de cultivo (Lanahan *et al.*, 2013).

La formulación especial de medios de cultivo, como f/2 de Guillard y Conway (Anexos 1 y 2), son utilizadas comúnmente para producir monocultivos de muchos tipos microalgas (incluyendo diatomeas) a escala de laboratorio. El aporte correcto de nutrientes para el crecimiento de las microalgas es un paso clave para producir biomasa de microalgas de alta calidad y en grandes cantidades (Córdoba *et al.*, 2005; Lanahan *et al.*, 2013).

3. JUSTIFICACIÓN

T. dictyotum es una microalga del grupo de las diatomeas nativa del Golfo de California, lo cuál facilita su cultivo y uso para la producción de PUFA y fucoxantina, dotándola de gran potencial biotecnológico por sus características morfológicas y bioquímicas. Estos compuestos son de gran valor debido a su posible uso como nutraceuticos para prevenir y combatir enfermedades (Pulz y Gross, 2004; Chisti, 2007; Keerthi *et al.*, 2013).

No existen estudios previos reportados sobre la fisiología de *T. dictyotum*, por lo que es importante evaluar su potencial productor de los compuestos bioactivos mencionados. El ser nativa de Baja California Sur, ofrece ventajas para su uso a gran escala ya que está adaptada a las condiciones ambientales del Golfo (tales como temperatura y salinidad del agua marina elevadas la mayor parte del año), por lo que su acondicionamiento a procesos a gran escala puede resultar más sencillo, aportando una gran oportunidad para el desarrollo tecnológico de la región.

Estudios realizados con otras diatomeas, nos permiten tener un punto de de referencia con las respuestas fisiológicas que presenta *T. dictyotum* a distintos tipos de estrés y la comparación con los resultados reportados puede indicar su potencial biotecnológico para la producción de los mismos compuestos.

4. PREGUNTA E HIPÓTESIS.

4.1. Pregunta

¿Se puede inducir la producción de lípidos, PUFA y fucoxantina en *T. dictyotum* someténdola a estrés nutricional por déficit nitrógeno o silicio bajo distintas irradiancias?

4.2. Hipótesis

La diatomea *T. dictyotum* tiene una composición bioquímica alta en PUFA y en el pigmento fucoxantina, y es responsiva a estímulos de estrés que permitirán los siguientes cambios en su metabolismo:

- El déficit de nitrógeno inducirá un incremento en la producción de lípidos. Combinado con alta irradiancia, almacenará energía en forma de SFA y MUFA al no tener nitrógeno suficiente para producir proteínas, pero también inducirá la producción de fucoxantina como antioxidante; en irradiancia baja se inducirá la producción de PUFA y disminuirá la de SFA, dado que hay menor cantidad de energía disponible para almacenar y la cantidad de pigmentos antena incrementará. La densidad celular será menor en todos los casos respecto a cultivos sin estresar.
- El déficit de silicatos inducirá un incremento de lípidos que en alta irradiancia corresponderá a SFA y MUFA y fucoxantina como antioxidante, mientras que en irradiancias bajas se producirá mayor cantidad de PUFA y pigmentos antena. La densidad celular no se verá afectada en gran medida pero la concentración de ácidos grasos será menor que aplicando déficit de nitrógeno.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar el potencial productor de fucoxantina, lípidos, y ácidos grasos en respuesta a estrés por déficit de nutrientes y distintas irradiancias en la diatomea *T. dictyotum*.

5.2. Objetivos particulares

1. Determinar el medio de cultivo y la fuente nitrógeno apropiados para el crecimiento y desarrollo de *T. dictyotum*.
2. Establecer un sistema de cultivo que permita el control adecuado tanto de las condiciones control como de las condiciones de estrés aplicado a *T. dictyotum*.
3. Determinar el efecto del déficit de nitrógeno y el efecto del déficit de silicio bajo irradiancias de 20, 70 y 120 $\mu\text{mol de fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ sobre la producción de biomasa, pigmentos, lípidos y ácidos grasos de *T. dictyotum*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Cepa y medios de cultivo

La cepa empleada pertenece al taxon *Triceratium dictyotum* (Sims & Ross, 1990) la cual se aisló en el laboratorio de microalgas del CIBNOR campus La Paz y se encuentra resguardada en el cepario de microalgas de la misma institución con la clave: CIBM 8/3. Dicho taxon fue identificado por el Dr. Francisco Omar López Fuerte basandose en la morfología de la frústula, observada tanto en microscopio óptico como electrónico. La taxonomía se apegó en la medida de lo posible a lo establecido en Round *et al.* (1990) y se verificó su valides taxonómica en el sitio web AlgaeBase (Guiry, 2016).

Los medios de cultivo empleados fueron: f/2 de Guillard (Guillard, 1975) (Anexo 1) y Conway (Tompkins *et al.*, 1995) (Anexo 2).

6.2. Preparación de inóculo

T. dictyotum fue cultivada en sistema de cultivo estático, en matraces de 1 L con 500 mL de medio f/2 de Guillard, se agregaron 50 mL de un cultivo anterior como inóculo, con una densidad celular aproximada de 2×10^4 cel·mL⁻¹, la temperatura de incubación fue de 25 °C, se emplearon lámparas fluorescentes de luz blanca con irradiancia de 70 μ mol de fotones·m⁻²·s⁻¹ y fotoperiodo de 12:12. Cada 7 días se hizo resiembra del inóculo para mantenerlo en fase exponencial. El medio fue esterilizado en autoclave y el trabajo de inoculación y muestreo se realizó en la atmósfera estéril de una campana de flujo laminar.

6.3. Selección del medio de cultivo y fuente de nitrógeno

6.3.1. Selección del medio de cultivo

Los medios f/2 de Guillard y Conway fueron evaluados por comparación de las tasas de crecimiento y densidad celular al final del periodo de cultivo para determinar el más adecuado para un mayor crecimiento de *T. dictyotum*.

1. Cultivos: se hicieron por triplicado para cada medio de cultivo, empleando matraces estériles de 1 L con 500 mL de cada medio preparado en agua de mar filtrada y salinidad ajustada a 35 ups con agua destilada. Se les añadió 50 mL de inóculo con densidad celular aproximada de 2×10^4 cel·mL⁻¹ y fueron incubados en temperatura de 25 °C, la iluminación se suministró con lámparas fluorescentes de luz blanca a $70 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de irradiancia y fotoperiodo de 12:12, con suministro constante de aire filtrado, durante 14 días (Fig. 5).

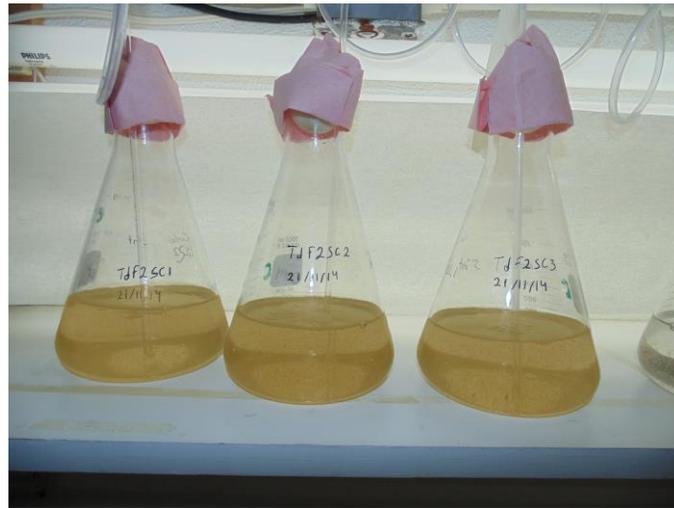


Figura 5. Sistema de cultivo estático para *T. dictyotum* en matraces de 1L.

2. Muestreos: se tomaron muestras de 10 mL cada 2 días a cada recipiente de cultivo.
3. Análisis de muestras: se realizaron conteos celulares en cámara de Neubauer con aumento de 10x, se graficaron las curvas de crecimiento y se identificó la fase exponencial en la curva de crecimiento de cada cultivo para calcular las tasas de crecimiento con la ecuación:

$$\mu = \frac{\ln \frac{x}{x_0}}{t} \quad (\text{Eq. 1})$$

Donde:

μ = Tasa de crecimiento.

x = Densidad celular al final de la fase exponencial.

x_0 = Densidad celular al inicio de la fase exponencial.

t = tiempo transcurrido desde el inicio hasta el final de la fase exponencial.

4. Análisis estadístico: El diseño experimental fue por bloques al azar, se utilizó el software "Statistica 11" y se estableció el nivel de significancia $\alpha=0.05$. Se realizó la prueba del contraste de Shapiro-Wilks para determinar la normalidad de los datos y se calculó el estadístico de Levene para determinar la homogeneidad de las varianzas (homocedasticidad). Se realizó un ANOVA bifactorial (empleando como variables independientes medio de cultivo y tiempo de cultivo) y se empleó la prueba de Tukey para evaluar diferencias en la densidad celular al final del experimento, también se realizó la prueba "t" de Student para determinar diferencias significativas entre las tasas de crecimiento.
5. El medio de cultivo donde *T. dictyotum* alcanzó mayor densidad celular y tasa de crecimiento fue el seleccionado para utilizarse en los siguientes experimentos.

6.3.2. Selección de la fuente de nitrógeno

Una vez seleccionado el medio de cultivo, se buscó la fuente de nitrógeno más adecuada para esta microalga, los compuestos evaluados fueron nitrato de sodio, cloruro de amonio y urea.

1. Cultivos: se hicieron por triplicado para cada fuente de nitrógeno. Se emplearon matraces estériles de 1 L con 500 mL para cada fuente de nitrógeno. El medio de cultivo se preparó de manera normal sustituyendo, el nitrato de sodio por el equivalente de nitrógeno de 882 μM del medio f/2, de alguno de los compuestos antes mencionados a evaluar. Los matraces fueron

inoculados con 50 mL de inóculo con densidad celular aproximada de 2×10^4 cel·mL⁻¹ e incubados en temperatura de 25 °C, la iluminación se suministró con lámparas fluorescentes de luz blanca a $70 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de irradiancia y fotoperiodo de 12:12, con suministro constante de aire filtrado, durante 14 días.

2. Muestreo: igual que en el punto 6.3.1.
3. Análisis de muestras: igual que en el punto 6.3.1.
4. Análisis estadístico: El diseño experimental fue de bloques al azar. Se realizó un ANOVA bifactorial para la tasa de crecimiento, empleando como variables independientes medio de cultivo y tiempo. Cuando se encontraron diferencias significativas, se realizó una prueba de Tukey para comparar los valores promedio de las tasas de crecimiento. Para evaluar la densidad celular, se realizó ANOVA unifactorial y la prueba de Tukey para comparar los valores medios de la densidad celular cuando se encontraron diferencias significativas.

6.4 Establecimiento del sistema de cultivo para evaluar efectos de condiciones estresantes

6.4.1. Cultivos en una sola etapa

Este sistema estático fue el mismo que se empleó en los experimentos anteriores y se utilizó para someter a *T. dictyotum* a las siguientes condiciones:

- Nutrientes completos: cultivos en medio f/2 adicionado con silicatos (medio control)
- Déficit de silicio: medio f/2 sin silicato de sodio.
- Déficit de nitrógeno: medio f/2 sin nitrato de sodio.

1. Cultivos: se realizaron cultivos siguiendo la misma metodología que en el punto 6.3.1, utilizando únicamente medio f/2 de Guillard con nitrato de sodio como fuente de nitrógeno y sin adicionar silicatos o nitratos, dependiendo del estímulo a aplicar.
2. Muestreo: Igual que en el punto 6.3.1.
3. Análisis de muestras: Se realizaron conteos celulares en cámara de Neubauer cada dos días, se graficaron las curvas de crecimiento y se determinó la tasa de crecimiento; al final del cultivo se cosechó la biomasa por decantación y centrifugación y se liofilizó, se determinaron las concentraciones de pigmentos, ácidos grasos y lípidos totales con respecto al peso de la materia seca (MS).
 - Para cuantificar los pigmentos se pesaron entre 15 y 20 mg de biomasa liofilizada de cada cultivo y se les añadió 2 mL de metanol (HPLC), en seguida se centrifugó (19300 xg y 4°C, por 10 min) para separar el sobrenadante; la determinación se realizó por HPLC con la técnica de Vidussi *et al.* (1996).
 - Para la cuantificación de los lípidos totales se pesaron aproximadamente 30 mg de biomasa liofilizada de cada cultivo. Se realizó la extracción de los lípidos con la metodología de Folch (1957) y se determinaron por gravimetría pesando en viales el total de lípidos mediante una balanza analítica Denverfischer XS-410.
 - El análisis de ácidos grasos se hizo por transesterificación directa. Se pesaron entre 15 y 20 mg de biomasa seca, después se agregaron 0.5 mL de HCl metanólico (SIGMA 33050-U) y se colocaron en baño María a 90°C por dos horas, finalmente se agregaron 2 ml de agua y 2 ml de heptano para extraer los metil ésteres de ácidos grasos (FAME, por sus siglas en inglés) en la fracción de heptano, se hizo un segundo lavado con 2 ml de heptano a la fracción de agua para tener un volumen final de 4 mL de muestra y cuantificarlo con la metodología descrita por Rivero-Rodríguez *et al.* (2007) mediante un cromatógrafo de gases FID 7820A, marca Agilent. La identificación y la cuantificación de los ácidos grasos se hizo con referencia a los tiempos de

retención y de los factores de corrección de un estándar de 37 metil ésteres de ácidos grasos (SIGMA Supelco - CRM47885).

4. Análisis estadístico: se procedió igual que en el punto 6.3.2 para todos los datos incluyendo los de pigmentos, ácidos grasos, y lípidos totales.

6.4.2. Sistema en dos etapas

Debido a que no se obtuvo suficiente biomasa al final de la aplicación del estrés, se procedió a experimentar empleando un sistema en dos etapas, para evaluar las mismas condiciones del apartado 6.4.1. La primera etapa propiciaba un incremento de biomasa y la segunda una aplicación del estímulo de estrés. Todos los experimentos en estas etapas se realizaron por quintuplicado.

- Etapa 1: matraces estériles de 1 L con 500 mL de medio f/2 de Guillard completo adicionado con silicatos. Los matraces fueron inoculados con 50 mL de inóculo con densidad celular aproximada de 2×10^4 cel·mL⁻¹ e incubados a temperatura de 25 °C, la iluminación se suministró con lámparas fluorescentes de luz blanca a $70 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de irradiancia y fotoperiodo de 12:12 h, con suministro constante de aire filtrado, durante 6 días.
- Etapa 2: se cosecharon la microalgas obtenidas en la etapa 1 y se resuspendieron nuevamente en 500 mL de medio fresco aplicando las condiciones descritas en 6.4.1; se incubaron a temperatura de 25 °C, con iluminación fluorescente de $70 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y fotoperiodo de 12:12 h, con suministro constante de aire filtrado, durante 3 días más.

1. Muestreo: diariamente se muestrearon 10 ml de cada recipiente de cultivo.
2. Análisis de muestras: igual que en el punto 6.4.1.
3. Análisis estadístico: igual que en el punto 6.4.1.

6.4.3. Evaluación de nutrientes en el medio y comparación de crecimiento en agua marina natural contra agua marina sintética

Debido a que se logró establecer la técnica de determinación de silicatos con muestras micro de volúmenes de 1 μL y menores, se pudo cuantificar la concentración de estos en el agua marina empleada, misma que fue de casi tres veces la reportada para el agua marina oceánica por lo que se decidió partir de condiciones controladas de silicatos y nitratos para así asegurar un estímulo estresante de déficit de nutrientes. Para este fin se comparó el crecimiento de *T. dictyotum* utilizando agua marina natural (AMN) y agua marina sintética (AMS) (Anexo 3) (Kester *et al*, 1967) adicionando los nutrientes de preparación del medio f/2, y cuidando que la concentración de silicatos y nitratos fuera igual en ambos medios. Previamente se evaluó la cinética del consumo de nitratos y silicatos para determinar si las condiciones de estrés se estaban cumpliendo y que los cultivos con nutrientes completos tuvieran suficiencia de estos durante todo el tiempo de cultivo.

1. Cultivos: se hicieron por quintuplicado para cada medio de cultivo. Se emplearon matraces estériles de 1 L con 500 mL de medio f/2 de Guillard completo adicionado con silicatos. Los matraces fueron inoculados con 50 mL de inóculo con densidad celular aproximada de $2 \times 10^4 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ e incubados en temperatura de 25 °C, con iluminación fluorescente de $70 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y fotoperiodo de 12:12, con suministro constante de aire filtrado, durante 6 días.
2. Muestreo: diariamente se muestrearon 10 ml de cada recipiente de cultivo.
3. Análisis de muestras: conteo en cámara de Neubauer para determinar la densidad celular y cuantificación de nitratos y silicatos disueltos en el medio con la metodología de Clesceri *et al.* (1998) y Strickland y Parsons (1972).

4. Análisis estadístico: Igual que en el punto 6.4.1 Con los datos correspondientes de concentración de nitratos y silicatos en el medio.

6.4.4. Evaluación de sistema semi-continuo en dos etapas

Para evitar que los nutrientes se agoten en el medio de cultivo y al mismo tiempo obtener una cantidad suficiente de biomasa para los análisis de lípidos y de ácidos grasos, se utilizó de nuevo un sistema en dos etapas, pero la segunda etapa fue en sistema semi-continuo en un volumen mayor (Fig. 6).



Figura 6. Sistema de cultivo semi-continuo empleado en los experimentos de aplicación de estrés a *T. dictyotum* durante la segunda etapa de cultivo.

1. Cultivos: se hicieron por triplicado
 - Etapa 1: Matraces estériles de 1 L con 500 mL de medio f/2 de Guillard completo preparado en AMS. Los matraces fueron inoculados con 50 mL de inóculo con densidad celular aproximada de $20,000 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ e incubados en temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$, con iluminación fluorescente de $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y fotoperiodo de 12:12 h, con suministro constante de aire filtrado, durante 4 días, al segundo y tercer día se agregaron 60 y 150 mg de silicatos respectivamente tomando como base una tasa de consumo de $7.18 \mu\text{mol}\cdot 1000 \text{ cel}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ y una tasa de crecimiento de 1.086 d^{-1} calculadas en el apartado 7.2.4.

- Etapa 2: se cosecharon la microalgas obtenidas en la etapa 1 y se resuspendieron nuevamente en 2 L de medio fresco utilizando botellas de PET (Fig. 6) y aplicando las condiciones descritas en 6.4.1. Se incubaron a temperatura de 25 °C, con iluminación fluorescente de 70 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y fotoperiodo de 12:12, con suministro constante de aire filtrado, durante 3 días con recambio de 15%.
2. Muestreo: diariamente se muestrearon 10 ml de cada recipiente durante la etapa 1 y en la etapa 2 se utilizó como muestra el volumen extraído durante el recambio.
 3. Análisis de muestras: Igual que en el punto 6.4.1, se evaluó la densidad celular, también se analizó la cuantificación de nitratos y silicatos como en el punto 6.4.3. Con los datos obtenidos de concentración de silicatos y densidad celular se calculó la tasa de consumo de silicatos por día utilizando la Eq. 2 y se realizó una aproximación del consumo de nitratos y silicatos en cada día de cultivo.

$$\mu_{Si} = \frac{[Na_2SiO_3]_a - [Na_2SiO_3]_b}{x_b - x_a} \quad (\text{Eq. 2})$$

Donde:

μ_{Si} = Tasa de consumo de silicatos ($\mu\text{M}/\text{cel}$).

$[Na_2SiO_3]_a$ = Concentración de silicatos inicial (μM).

$[Na_2SiO_3]_b$ = Concentración de silicatos 24 h después de $[Na_2SiO_3]_a$ (μM).

x_a = Densidad celular inicial.

x_b = Densidad celular 24 h después de x_a .

4. Análisis estadístico: se realizó igual que en el punto 6.4.2.

6.5. Evaluación de efecto del déficit de nitrógeno y el efecto del déficit de silicio en irradiancias de 20, 70 y 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Para evaluar los cambios en la producción de lípidos y pigmentos de *T. dictyotum* bajo estrés por déficit de nitrógeno y silicio a 20, 70 y 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, se realizaron tres experimentos que se resumen en la tabla IV con tres repeticiones en cada caso.

Tabla IV. Diseño experimental para evaluar el efecto del déficit de nitratos (-N) y déficit de silicatos (-Si) respecto a un control con nutrientes completos (C) a diferentes irradiancias de la diatomea *T. dictyotum*.

Irradiancia ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	Nutrientes	No. De repeticiones
20	C	3
	-Si	3
	-N	3
70	C	3
	-Si	3
	-N	3
120	C	3
	-Si	3
	-N	3

- Etapa 1: Matraces estériles de 1 L con 500 mL de medio f/2 de Guillard completo preparado en AMS. Los matraces fueron inoculados con 50 mL de inóculo con densidad celular aproximada de $2 \times 10^4 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ e incubados a temperatura de 25 °C, con iluminación fluorescente de 70 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y fotoperiodo de 12:12 h, con suministro constante de aire filtrado, durante 4 días, al segundo y tercer día se agregaron 60 y 150 mg de silicatos respectivamente tomando como base una tasa de consumo de $7.18 \mu\text{mol}\cdot 1000 \text{ cel}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ y una tasa de crecimiento de 1.086 d^{-1} calculadas en el apartado 7.2.4.
- Etapa 2: Se cosecharon la microalgas obtenidas en la etapa 1 por sedimentación y centrifugación, se resuspendieron nuevamente en 2 L de medio fresco utilizando botellas de PET y aplicando las condiciones descritas

en la tabla IV. Se incubaron a temperatura de 25 °C, con iluminación fluorescente y fotoperiodo de 12:12, con suministro constante de aire filtrado, durante 3 días se realizó un recambio del 15%. Diariamente durante esta etapa se agregaron silicatos extra a los cultivos: 120 mg después de llevarlas a 2 litros, 150 mg al primer día y al segundo día 225 mg.

1. Muestreo: diariamente se tomaron 10 ml de cada recipiente de cultivo.
2. Análisis de muestras: Se realizaron conteos celulares en cámara de Neubauer, se graficaron las curvas de crecimiento, al final del cultivo se cosechó la biomasa por decantación y centrifugación y se cuantificaron las concentraciones de pigmentos, ácidos grasos y lípidos totales con respecto a la materia orgánica seca (MOS) que es peso correspondiente a la biomasa seca sin cenizas; también se cuantificaron los nitratos y silicatos como en el punto 6.4.3.
3. Análisis estadístico: se realizó un ANOVA bifactorial.

7. RESULTADOS

7.1. Selección del medio de cultivo y fuente de nitrógeno

7.1.1 Selección del medio de cultivo

La densidad celular de los cultivos en medio f/2 de Guillard mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a la densidad obtenida con el medio Conway desde el segundo día de cultivo, alcanzando mayor densidad en el primero (Fig. 7). En los cultivos con medio f/2 de Guillard se alcanzó la fase estacionaria al quinto día y se mantuvo esta fase hasta los 14 días de cultivo.

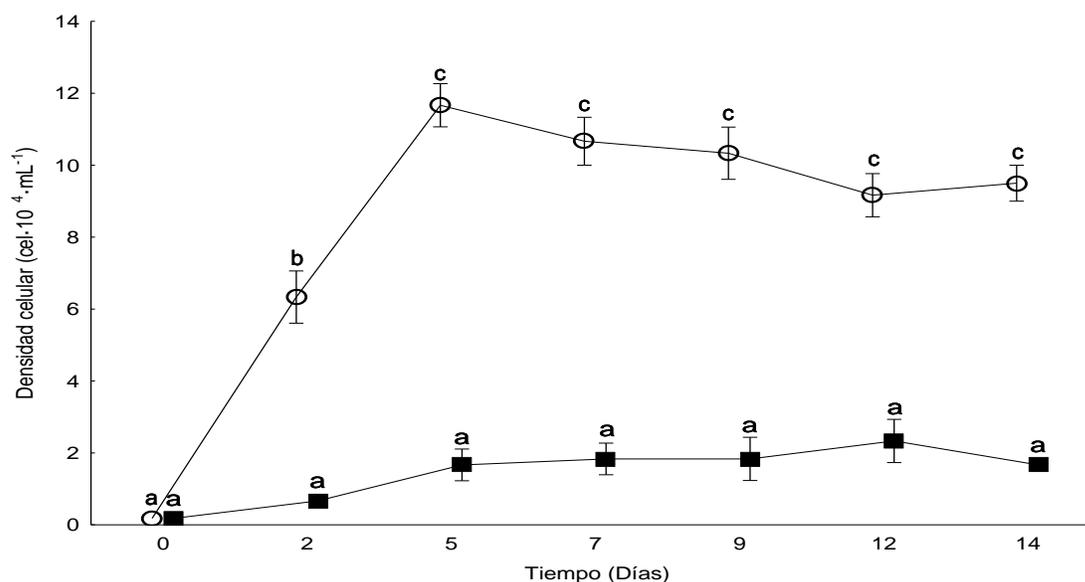


Figura 7. Curvas de crecimiento de *T. dictyotum* cultivada en medio f/2 de Guillard (círculos) y en medio Conway (cuadros). Se presentan los valores promedio \pm error estándar. Letras distintas indican diferencia significativa según los resultados de la prueba de Tukey ($p < 0.05$, $a < c$).

Las tasas de crecimiento también fueron mayores utilizando el medio f/2 de Guillard ($p \leq 0.05$) (Tabla V).

Tabla V. Tasas de crecimiento (μ) en experimento de selección de medio de cultivo.

Medio de cultivo	μ (d ⁻¹)
f/2	1.386 ± 0.017 ^b
Conway	0.794 ± 0.069 ^a

Se presentan los valores promedio ± error estándar ($p < 0.05$, $a < b$).

Con el medio f/2 de Guillard se obtuvieron densidades celulares más altas desde los primeros días de cultivo, además de una tasa de crecimiento mayor, por este motivo se seleccionó este medio de cultivo para realizar los experimentos siguientes.

7.1.2 Selección de la fuente de nitrógeno

La densidad celular en los cultivos con amonio fue menor con respecto a los otros dos tratamientos a partir del quinto día de cultivo y hasta pasados los catorce días ($p < 0.05$), también se observó que la densidad celular en los cultivos con urea fue menor que en los cultivos con nitrato hasta el día catorce, antes de este día no se observaron diferencias significativas con estos sustratos (Fig. 8). En los cultivos con nitrato y urea hubo un periodo de adaptación de dos días, mientras que en los cultivos con amonio este periodo duró cerca de cinco días.

Las tasas de crecimiento de los cultivos con las diferentes fuentes de nitrógeno no fueron diferentes significativamente ($p > 0.05$) (Tabla VI).

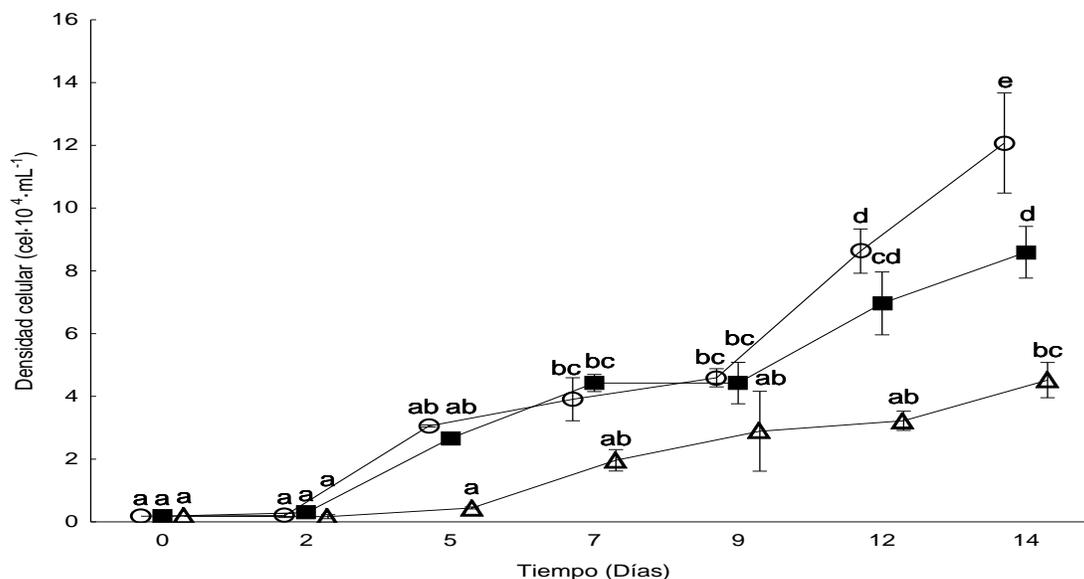


Figura 8. Curvas de crecimiento en el experimento de selección de la fuente de nitrógeno. Círculos: nitratos, cuadros: urea, triángulos: amonio. Se presentan los valores promedio \pm error estándar. Letras distintas indican diferencia significativa según los resultados de la prueba de Tukey ($p < 0.05$, $a < e$).

Tabla VI. Tasas de crecimiento (μ) en experimento de selección de fuente de nitrógeno.

Fuente de nitrógeno	μ (d ⁻¹)
Nitrato	1.0101 ± 0.127^a
Urea	0.9206 ± 0.106^a
Amonio	0.8764 ± 0.096^a

Se presentan los valores promedio \pm error estándar ($p < 0.05$).

El nitrato de sodio fue seleccionado como fuente de nitrógeno para los siguientes experimentos, debido a que produjo una mayor densidad celular a final de los 14 días.

7.2 Establecimiento de sistema de cultivo para evaluar efectos de condiciones estresantes

7.2.1. Cultivos en una sola etapa

El experimento finalizó prematuramente a los 10 días debido a la disminución de la densidad celular en los cultivos con déficit de nitrógeno.

La densidad celular suministrando nutrientes completos fue significativamente mayor ($p < 0.05$) a partir del séptimo día con respecto a los otros tratamientos, manteniéndose así hasta el décimo día de cultivo; la densidad celular de los cultivos con déficit de silicatos fue significativamente mayor con respecto a los cultivados con déficit de nitratos hasta el día 10, mientras que la densidad celular de estos últimos se mantuvo sin aumento durante todo el periodo y se observó que llegaron a la etapa de muerte en el día 7 (Fig. 9).

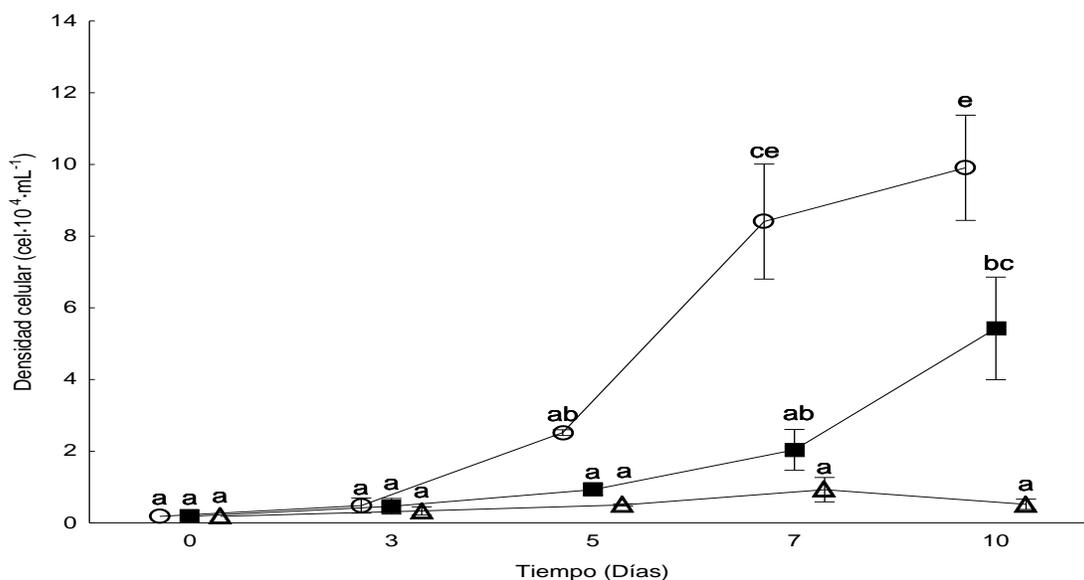


Figura 9. Curvas de crecimiento de *T. dictyotum* en el experimento de estrés por ausencia de nutrientes empleando un sistema de una sola etapa. Círculos: nutrientes completos, cuadros: déficit de silicatos, triángulos: déficit de nitratos. Se presentan los valores promedio \pm error estándar. Letras distintas indican diferencia significativa según los resultados de la prueba de Tukey ($p < 0.05$, a < e).

Los análisis de lípidos, ácidos grasos y pigmentos no se pudieron completar debido a que, en los cultivos con déficit de nitrógeno, la producción de biomasa fue muy baja. Se decidió omitir estos análisis en esta ocasión y repetir la prueba haciendo los ajustes necesarios para alcanzar producción suficiente de biomasa.

Se propuso realizar los cultivos en dos etapas, en la primera se generó una mayor biomasa y en la segunda se aplicaron a esta biomasa las condiciones estresantes de déficit de nutrientes con diferentes irradiancias.

7.2.2. Sistema en dos etapas.

Las densidades celulares no fueron diferentes significativamente ($p < 0.05$) en ninguno de los tres tratamientos durante la primera etapa, logrando el objetivo de generar una cantidad de biomasa grande para las tres condiciones estresantes (Fig. 10). En la segunda etapa se observó que, la densidad celular obtenida con déficit de nitratos fue significativamente menor ($p < 0.05$) que las obtenidas con los nutrientes completos y con déficit de silicatos, mientras que, en las densidades celulares obtenidas con estas últimas dos condiciones no se apreciaron diferencias significativas ($p > 0.05$).

El porcentaje de lípidos totales en las tres condiciones nutrimentales fue de alrededor de 10% sin diferencias significativas en ninguna de ellas ($p > 0.05$) (Fig. 11).

En el análisis de ácidos grasos se identificaron en total 18, los perfiles obtenidos en las distintas condiciones nutrimentales evaluadas tuvieron presencia de los mismos ácidos grasos y en proporciones aparentemente similares. El ácido graso palmítico (16:0) y el palmitoléico (16:1n-7) destacan por ser los más abundantes, dentro de los ácidos grasos esenciales se observa que esta microalga contiene AA, EPA y DHA, aunque este último en cantidades pequeñas (tabla VII).

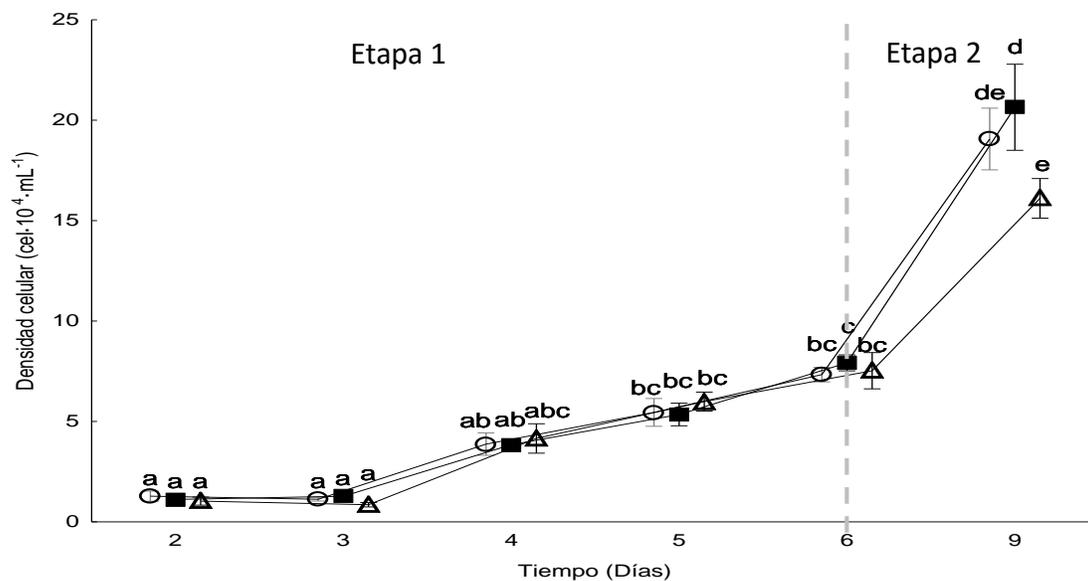


Figura 10. Curvas de crecimiento de los cultivos sometidos estrés nutricional en sistema de dos etapas. Círculos: nutrientes completos, cuadros: déficit de silicatos, triángulos: déficit de nitratos. Se presentan los valores promedio \pm error estándar. Letras distintas indican diferencia significativa según los resultados de la prueba de Tukey ($p < 0.05$, a<e).

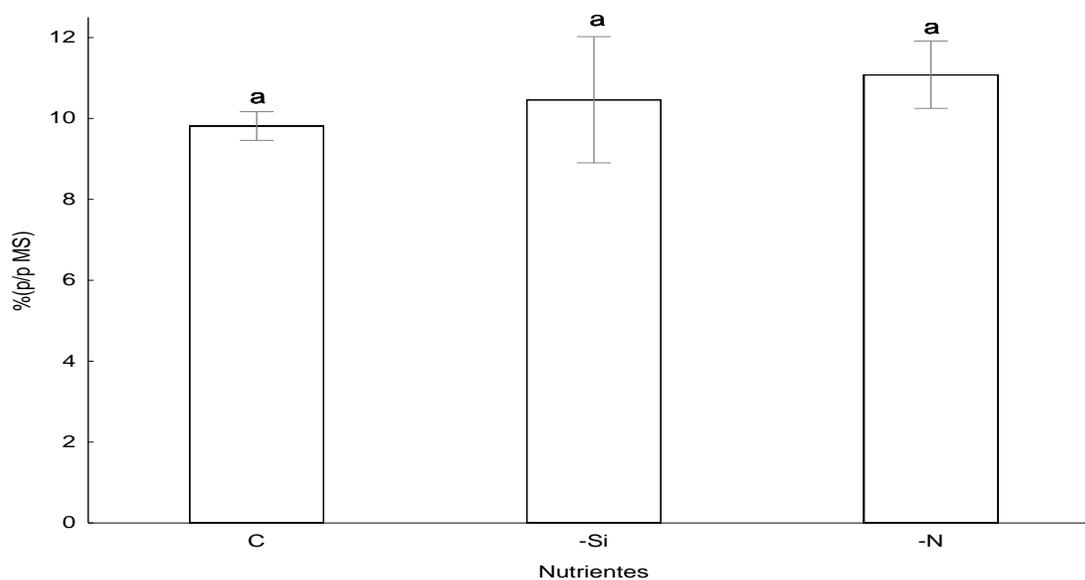


Figura 11. Porcentaje de lípidos totales con respecto a masa seca en los cultivos de *T. dictyotum* a $70 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Valores promedio, las barras representan la desviación estándar en cada punto).

Tabla VII. Concentración de ácidos grasos ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ MS) de *T. dictyotum* después de 3 días de estrés nutricional e irradiancia de $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Nutrientes	C	-Si	-N
14:0	3.527 \pm 0.318 ^b	5.166 \pm 0.636 ^a	4.496 \pm 0.099 ^b
15:0	0.202 \pm 0.018 ^b	0.281 \pm 0.055 ^a	0.305 \pm 0.010 ^a
16:0	7.576 \pm 0.720 ^b	10.554 \pm 1.740 ^a	11.417 \pm 0.441 ^a
18:0	0.164 \pm 0.011 ^b	0.227 \pm 0.032 ^a	0.208 \pm 0.025 ^a
22:0	0.011 \pm 0.014 ^b	0.054 \pm 0.016 ^a	0.021 \pm 0.003 ^b
ΣSFA	11.479 \pm 0.258 ^b	16.282 \pm 0.484 ^a	16.446 \pm 0.505 ^a
15:1n-5	0.057 \pm 0.025	0.070 \pm 0.030	0.083 \pm 0.024
16:1n-7	10.916 \pm 0.879 ^b	15.969 \pm 1.872 ^a	13.085 \pm 0.354 ^b
18:1n-7	0.259 \pm 0.024	0.273 \pm 0.023	0.270 \pm 0.025
16:1n-9	0.071 \pm 0.021	0.084 \pm 0.013	0.087 \pm 0.022
18:1n-9	0.165 \pm 0.008 ^b	0.161 \pm 0.041 ^b	0.276 \pm 0.010 ^a
ΣMUFA	11.469 \pm 0.217 ^b	16.557 \pm 0.803 ^a	13.802 \pm 0.214 ^b
16:2n-4	0.829 \pm 0.071 ^b	1.225 \pm 0.099 ^a	0.828 \pm 0.043 ^b
16:3n-4	1.487 \pm 0.146 ^b	2.045 \pm 0.200 ^a	1.390 \pm 0.108 ^b
20:5n-3	5.645 \pm 0.494 ^b	7.984 \pm 0.862 ^a	6.043 \pm 0.582 ^b
22:6n-3	0.298 \pm 0.020 ^b	0.408 \pm 0.043 ^a	0.339 \pm 0.031 ^{ab}
16:2n-6	0.119 \pm 0.009 ^{ab}	0.143 \pm 0.016 ^a	0.102 \pm 0.004 ^b
18:2n-6	0.377 \pm 0.040 ^b	0.422 \pm 0.064 ^{ab}	0.432 \pm 0.027 ^a
18:3n-6	0.416 \pm 0.057 ^b	0.503 \pm 0.107 ^b	0.656 \pm 0.025 ^a
20:4n-6	1.586 \pm 0.090 ^b	2.125 \pm 0.203 ^a	1.675 \pm 0.066 ^b
ΣPUFA	10.757 \pm 0.343 ^b	14.855 \pm 0.304 ^a	11.466 \pm 0.638 ^b

Se presentan los valores promedio \pm error estándar. C: nutrientes completos, -Si: déficit de silicatos, -N: déficit de nitratos. Las letras distintas indican diferencia significativa según los resultados de la prueba de Tukey para cada ácido graso ($p < 0.05$, $a > b$).

Se realizó un ANOVA unifactorial con las concentraciones de los ácidos grasos 16:0, 16:1n7, EPA y AA para determinar si existen diferencias significativas al cultivar con distintas condiciones nutrimentales (Fig. 12). Se puede observar que al cultivar a *T. dictyotum* con déficit de silicatos se obtuvieron concentraciones significativamente mayores ($p < 0.05$) de estos ácidos grasos que cultivando con nutrientes completos o déficit de nitratos las cuales no tuvieron diferencias significativas entre sí ($p > 0.05$) con excepción de la concentración obtenida en EPA.

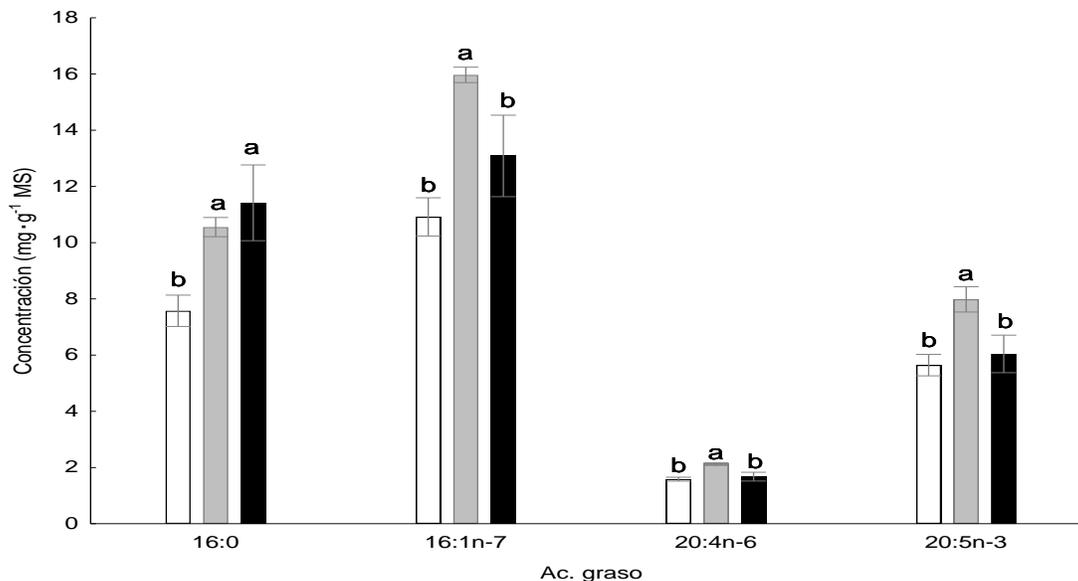


Figura 12. Concentraciones de los ácidos grasos 16:0, 16:1n-7, AA y EPA en *T. dictyotum* cultivada con irradiancia de $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ en un sistema de dos etapas. Se presentan los valores promedio \pm error estándar. Barras blancas: nutrientes completos, barras grises: déficit de silicatos, barras negras: déficit de nitratos. Las letras distintas indican diferencia significativa según los resultados de la prueba de Tukey para cada ácido graso ($p < 0.05$, $a > b$).

El perfil de pigmentos (Fig. 13) presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) al cultivar a *T. dictyotum* con déficit de nitratos, resultando menor concentración que cultivando con nutrientes completos o déficit de silicatos. De los 5 pigmentos identificados, el de mayor concentración fue la clorofila "a" y en segundo lugar la fucoxantina, se observó que las proporciones de los pigmentos son similares entre los tratamientos.

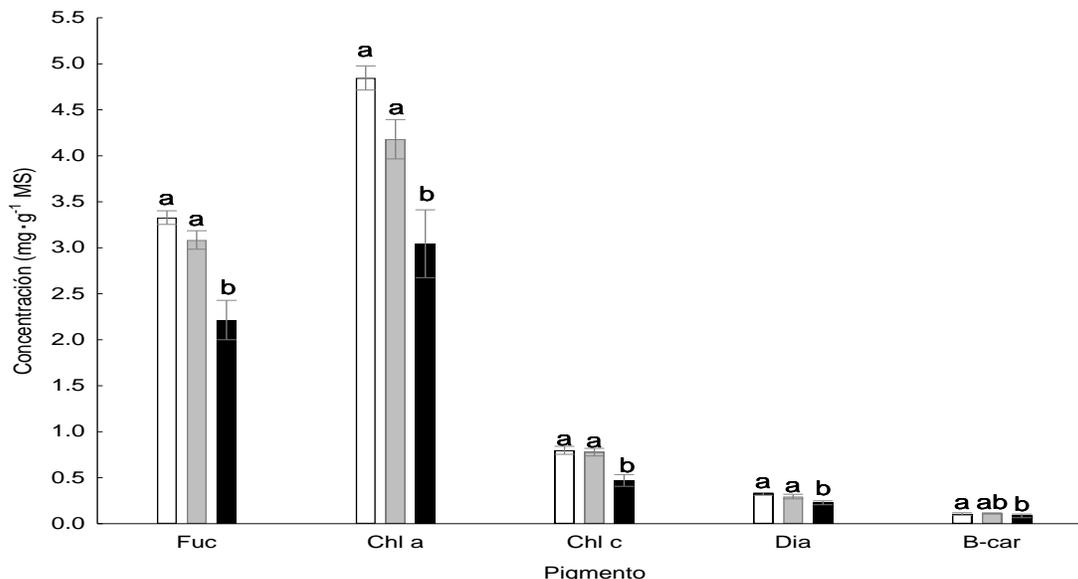


Figura 13. Pigmentos identificados en cultivos sometidos $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de irradiancia. Valores promedio \pm error estándar. Fuc: Fucoxantina, Chl a: Clorofila “a”, Chl c: Clorofila “c”, Dia: Diadinoxantina, B-car: β -caroteno, barras blancas: nutrientes completos, barras grises: déficit de silicatos, barras negras: déficit de nitratos. Letras distintas indican diferencia significativa según los resultados de la prueba de Tukey para cada pigmento ($p < 0.05$, $a > b$).

Cultivando a *T. dictyotum* en condiciones óptimas durante 6 días para posteriormente aplicar el estrés tuvo el resultado esperado, ya que la biomasa obtenida al final del cultivo fue suficiente para realizar todos los análisis sin dificultad. No se observaron diferencias significativas en el contenido de lípidos totales y en la concentración de ácidos grasos, con excepción del 16:0, tampoco se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de nutrientes completos y déficit de nitratos, de manera similar la concentración de pigmentos no tuvo diferencias significativas entre los tratamientos de nutrientes completos y déficit de silicatos; observando que no se encontraron las diferencias significativas que se esperaban, se planteó la posibilidad de que hubiera alguna variable que afectó los resultados y que no se contempló en un inicio. Para resolver el problema se decidió medir la concentración de silicatos y nitratos en el medio de cultivo, también evaluar el uso de agua marina sintética (AMS) para preparar el medio de cultivo y tener un mejor control de los nutrientes.

7.2.3. Evaluación de nutrientes en el medio y comparación de crecimiento en agua marina natural vs agua marina sintética.

La concentración de nitratos y silicatos tanto en el agua marina natural (AMN) y en el AMS tuvieron tendencias similares (Fig. 14). Los nitratos no llegan a agotarse después 6 días de cultivo, se mantienen constantes durante 3-4 días, después disminuyen con rapidez; los silicatos fueron consumidos más rápido, a partir del segundo día su consumo se aceleró drásticamente causando agotamiento al día 4, observando esto se añadieron silicatos al medio de cultivo (hasta una concentración de 350 μM aproximadamente), se observó que esa cantidad extra se agotó en tan solo un día y al día 6 hubo déficit de silicatos en el medio. Por esta razón se calculó una tasa de consumo de silicatos para adicionar la cantidad suficiente para el cultivo y utilizar un sistema de cultivo semi-continuo que facilite tanto la administración y control de silicatos y nitratos.

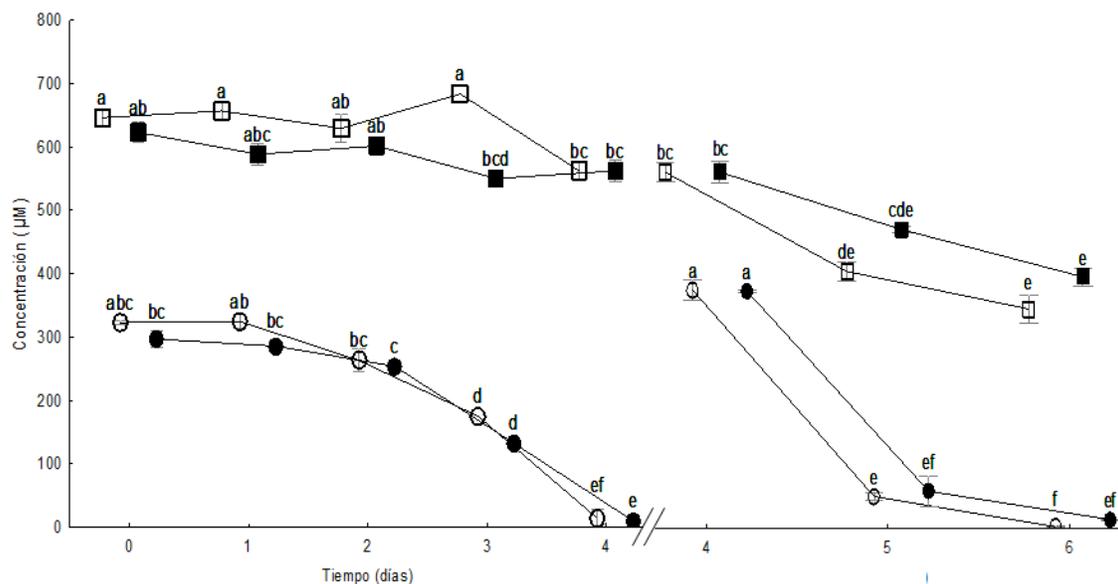


Figura 14. Variación de nitratos y silicatos en el medio de cultivo. El sesgo al día 4 indica que ese día la concentración de silicatos se llevó a 350 μM . Valores promedio \pm error estándar. Cuadros negros: Nitratos en AMN, cuadros blancos: Nitratos en AMS, círculos negros: silicatos en AMN, círculos blancos: silicatos en AMS. Letras distintas indican diferencia significativa según los resultados de la prueba de Tukey ($p < 0.05$, $a > f$).

7.2.4. Evaluación de sistema semi-continuo en dos etapas.

Se observó nuevamente que los silicatos llegan a agotarse al día 3, una vez que *T. dictyotum* agota los silicatos es capaz de consumir más de 300 μM por día. En la etapa de cultivo semi-continuo no fue suficiente el recambio de 15% para mantener condiciones de suficiencia de silicatos (Fig. 15).

Los datos obtenidos tanto de densidad celular como de concentración de silicatos permitieron calcular una tasa de consumo de silicatos de $7.18 \mu\text{mol}\cdot\text{cel} \times 10^{-6}\cdot\text{d}^{-1}$, con una tasa de crecimiento de 1.086 d^{-1} . Con esos datos será posible calcular el consumo aproximado de silicatos de *T. dictyotum* y así evitar que se llegue a condiciones de déficit de silicatos en los cultivos en los que no sea necesario.

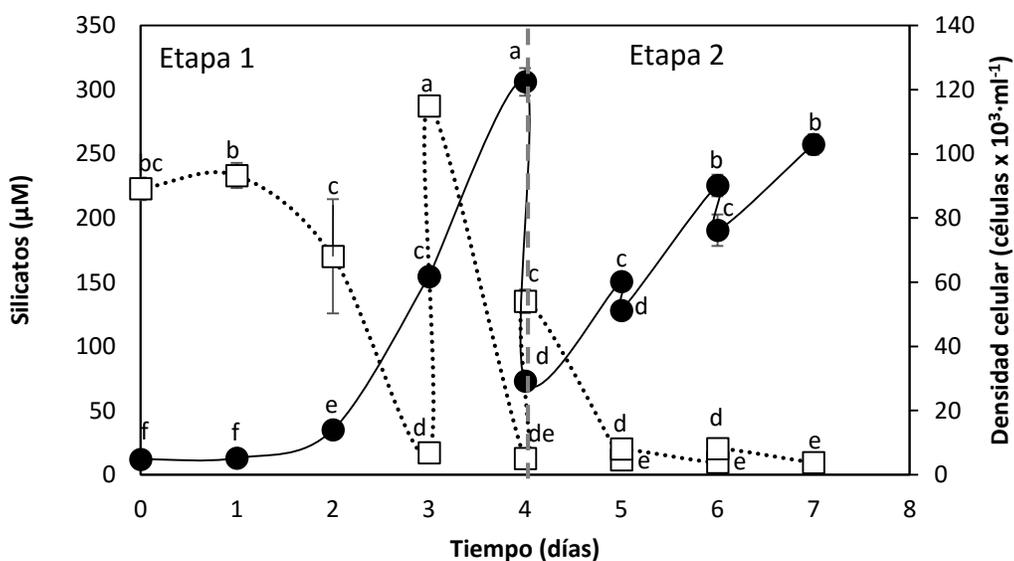


Figura 15. Concentración de silicatos y densidad celular durante siete días de cultivo de *T. dictyotum*. En el día 3 se llevó a una concentración 300 μM de silicatos, en el día 4 se cosecharon las células y se transfirieron a recipientes de 3 L con 2 L de medio fresco y en los días 5 y 6 se hizo un recambio del 15% del volumen. Se presentan los valores promedio \pm error estándar. Etapa 1: sistema estático, etapa 2: sistema semi-continuo. Cuadros: concentración de silicatos, círculos: densidad celular. Letras distintas indican diferencia significativa según los resultados de la prueba de Tukey para cada variable ($p < 0.05$, $a > e$).

7.3. Evaluación de efecto del déficit de nitrógeno y el efecto del déficit de silicio en irradiancias de 20, 70 y 120 μmol de fotones $\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

7.3.1. Concentración de nutrientes: Silicatos y nitratos.

Las concentraciones de silicatos en los cultivos a los que les aplicó su déficit fueron significativamente menores ($p < 0.05$) respecto de los cultivos con nutrientes completos y déficit de nitratos, así se confirmó que hubo un déficit de silicatos sólo en los experimentos con déficit de silicatos (Fig. 16).

Al medir la concentración de nitratos se observó que los cultivos con déficit de nitratos tuvieron concentraciones significativamente menores ($p < 0.05$) que las medidas en los otros cultivos (Fig. 17). Con base en esos resultados se confirmó que los cultivos con nutrientes completos y con déficit de silicatos no llegaron a tener condiciones estrés por déficit de nitratos.

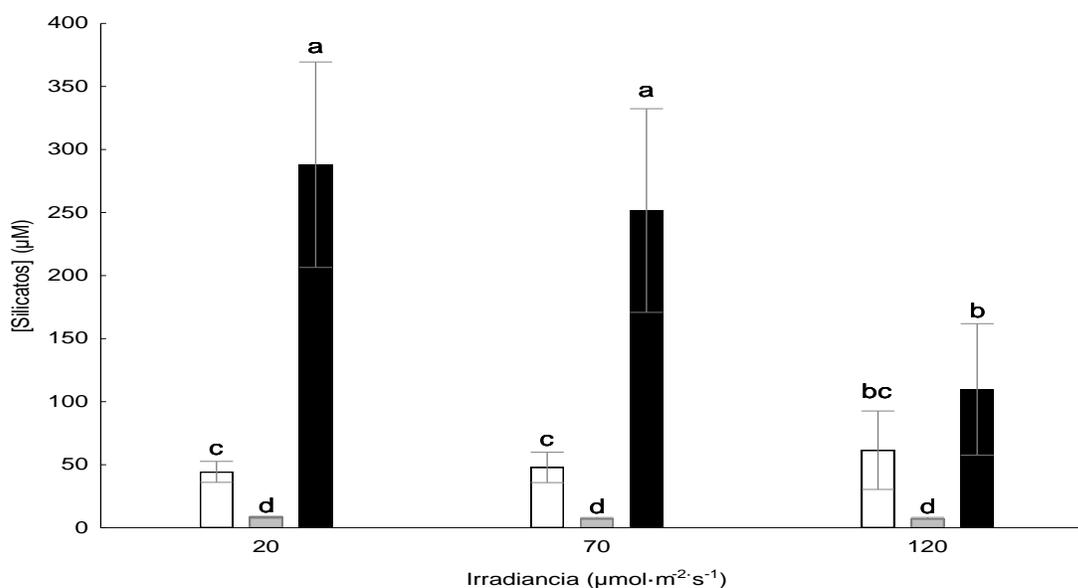


Figura 16. Concentración final de silicatos en el medio de cultivo con irradiancia de 20, 70 y 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Se presentan los valores promedio \pm error estándar. Barras blancas: nutrientes completos, Barras grises: déficit de silicatos, barras negras: déficit de nitratos. Letras distintas indican diferencia significativa según los resultados de la prueba de Tukey ($p < 0.05$, $a > d$).

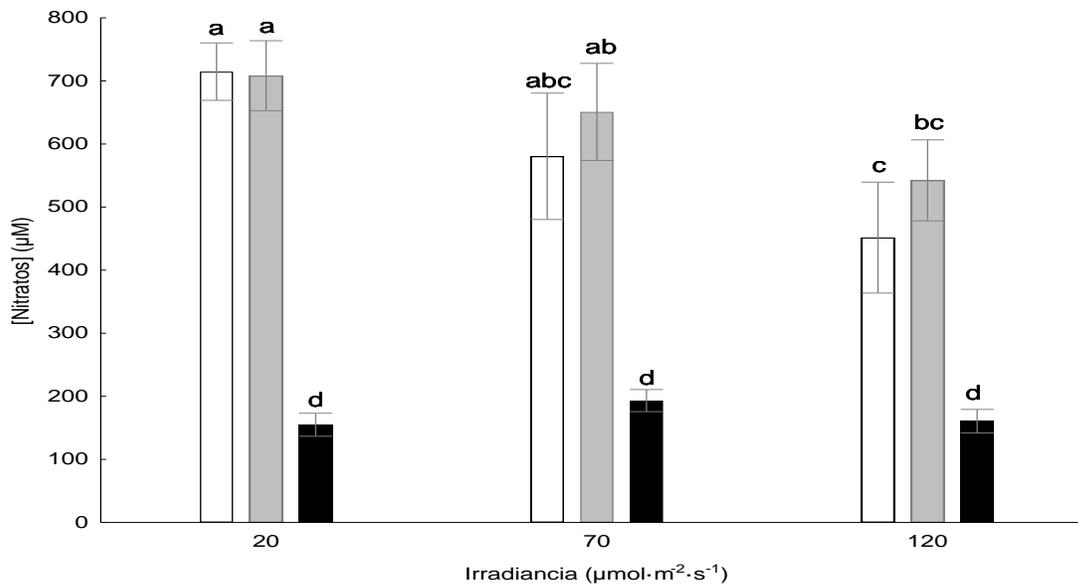


Figura 17. Concentración final de nitratos en el medio de cultivo con irradiancia de 20, 70 y 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Se presentan los valores promedio \pm error estándar. Barras blancas: nutrientes completos, Barras grises: déficit de silicatos, barras negras: déficit de nitratos. Letras distintas indican diferencia significativa según los resultados de la prueba de Tukey ($p < 0.05$, $a > d$).

7.3.2. Características de la biomasa

Se observaron diferencias entre los cultivos de los distintos tratamientos. Los cultivos con nutrientes completos fueron de color café brillante, el color en los cultivos con déficit de silicatos fue café oscuro y los cultivos con déficit de nitratos resultaron de color café muy pálido; la fluidez de las células después de retirar la mayor parte del medio en los cultivos con déficit de nitrógeno fue muy alta, con nutrientes completos fue menos fluido y con el déficit de silicatos se obtuvo una masa viscosa (Fig. 18). La irradiancia afectó al color y la fluidez de la biomasa.

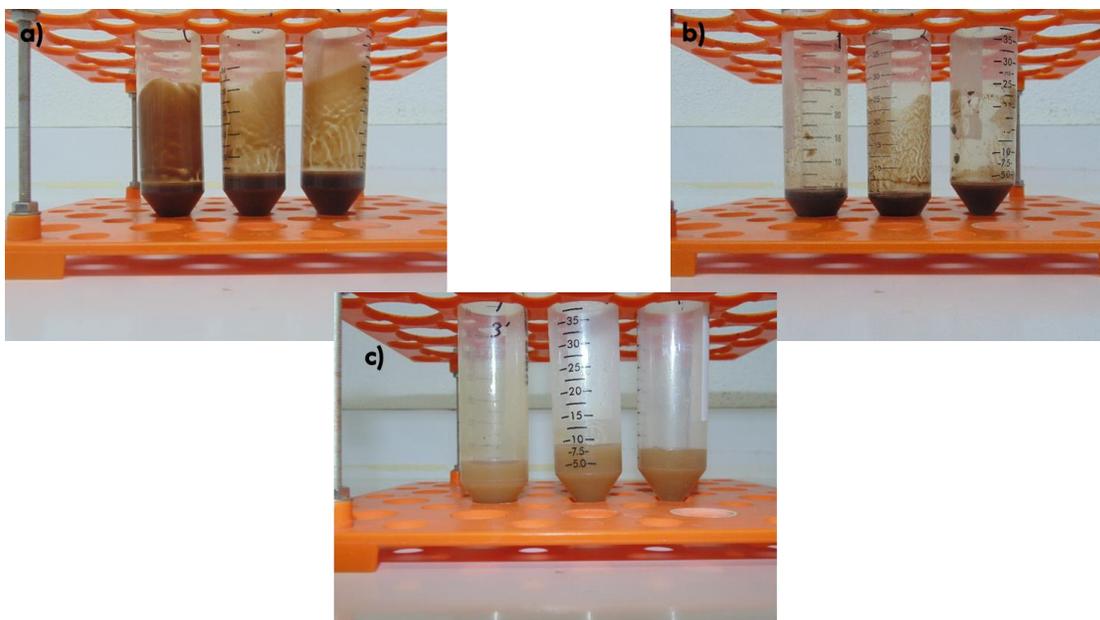


Figura 18. Fotografía de biomasa cosechadas sometidas a distintos tipos de estrés nutricional. a) Control, b) Déficit de silicatos, c) Déficit de nitratos.

7.3.3. Evaluación de crecimiento

Se determinaron las tasas de crecimiento de *T. dictyotum* cultivada en sistema estático y semi-continuo, irradiados con 20, 70 y 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; el sistema semi-continuo se mantuvo durante tres días aplicando simultáneamente un estrés nutricional en tres condiciones: nutrientes completos, déficit de silicatos y déficit de nitratos.

Primero se compararon las tasas de crecimiento obtenidas en cultivo estático. Todos los cultivos en esta etapa crecieron con irradiancia de 70 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y nutrientes completos, pero las células para cada combinación de estrés que se aplicó posteriormente fueron cultivadas de manera independiente. Para determinar si las condiciones aplicadas fueron similares, lo que se observaría si las tasas de crecimiento en estas condiciones no fuesen diferentes, se realizó una prueba de ANOVA bifactorial, utilizando como factores la irradiancia y el déficit de nutrientes y como variable dependiente la tasa de crecimiento (Tabla VIII). No se observaron diferencias significativas al comparar estas tasas ($p > 0.05$), por lo que se puede suponer que las condiciones empleadas en cada cultivo estático fueron similares,

de lo que se concluye que las células empleadas al inicio de las etapas de estrés estaban en fase exponencial en todos los casos y probablemente tendrían un estado fisiológico similar.

Tabla VIII. Resultados de la prueba de ANOVA bifactorial a las tasas de crecimiento obtenidas durante la etapa de cultivo estático. ($p < 0.05$).

Variable	Grados de libertad	F	p
Nutrientes	2	0.307	0.73909
Irradiancia	2	3.030	0.07342
Nutrientes-Irradiancia	4	1.701	0.19357
Error	18		

Después se compararon las tasas obtenidas en los cultivos en sistema semi-continuo y con nutrientes completos sometidos a distintas irradiancias y a diferentes tiempos de cosecha (días de cosecha) para evaluar si hubo cambios debidos al tiempo o a la irradiancia. Se utilizó una prueba de ANOVA bifactorial siendo los factores independientes el tiempo y la irradiancia, la tasa del día 0 corresponde con la tasa de crecimiento obtenida al finalizar la etapa de cultivo estático (Fig. 19). No hubo diferencias significativas en las tasas obtenidas con la irradiancia de $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, tomando en cuenta que los cultivos estáticos recibieron la misma irradiancia, se concluyó que la tasa de crecimiento no fue afectada por el cambio al sistema de cultivo semi-continuo; pero la tasa de crecimiento disminuyó con el paso del tiempo a irradiancias de 20 y $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ que si mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en función del tiempo.

Al realizar una regresión lineal de las tasas de crecimiento obtenidas en sistema semi-continuo con respecto al tiempo se observó que tienen un ajuste lineal ($r^2 = 0.338$ y $p < 0.05$); tomando en cuenta que el tiempo es una variable continua y que no se puede controlar, se realizó una prueba ANCOVA bifactorial (Tabla IX) a las tasas obtenidas en los sistemas semi-continuos con los diferentes tratamientos de luz y nutrientes. Se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) para el tiempo y los nutrientes, pero la irradiancia y la interacción irradiancia-nutrientes no resultaron significativas ($p > 0.05$), por lo tanto, se decidió realizar un ANCOVA más simple con los nutrientes como único factor independiente.

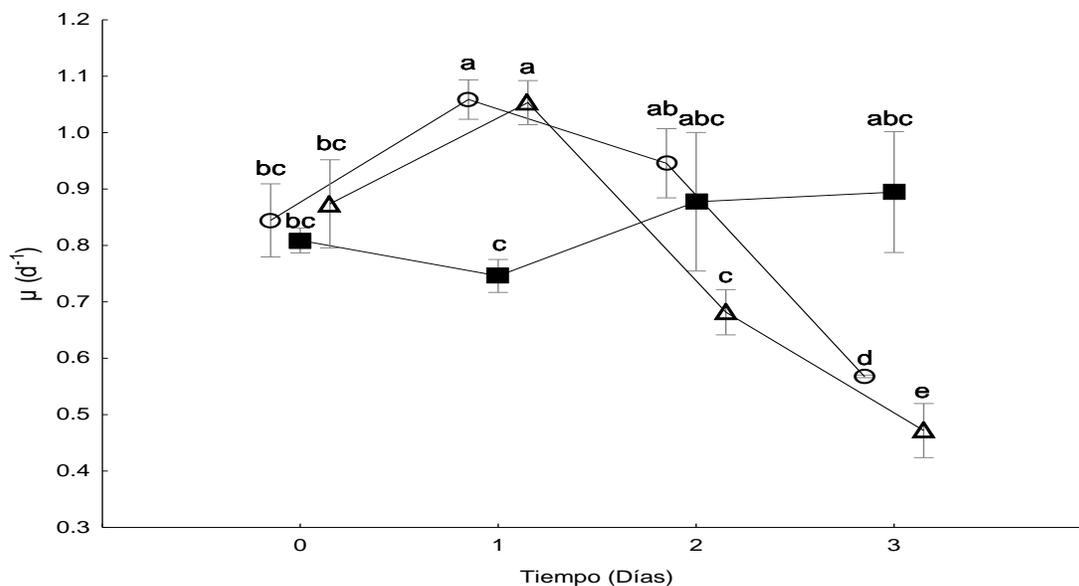


Figura 19. Tasas de crecimiento (μ) de *T. dictyotum* cultivada con nutrientes completos en sistema semicontínuo a irradiancias de 20, 70 y 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Se presentan los valores promedio \pm error estándar. Círculos: 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, cuadros: 70 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, triángulos: 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Letras distintas indican diferencia significativa según los resultados de la prueba de Tukey ($p < 0.05$, $a > e$).

Tabla IX. Resultados de la prueba de ANCOVA bifactorial de la tasa de crecimiento. Se tomó como covariable al tiempo, los factores en este análisis fueron los nutrientes y la irradiancia. ($p < 0.05$).

Variable	Grados de libertad	F	p
Tiempo	1	72.4486	<0.001
Irradiancia	2	0.7508	0.474691
Nutrientes	2	42.1954	<0.001
Irradiancia-Nutrientes	4	1.0618	0.379640
Error	98		

En el segundo ANCOVA (Fig. 20), se observó diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las tasas obtenidas con los distintos nutrientes; los cultivos con los nutrientes completos alcanzaron las tasas más altas, mientras que las dos condiciones de déficit de nutrientes resultaron en la disminución de la tasa crecimiento; con déficit de silicio se redujo cerca del 33% y con el déficit de nitrógeno se disminuyó en 70%.

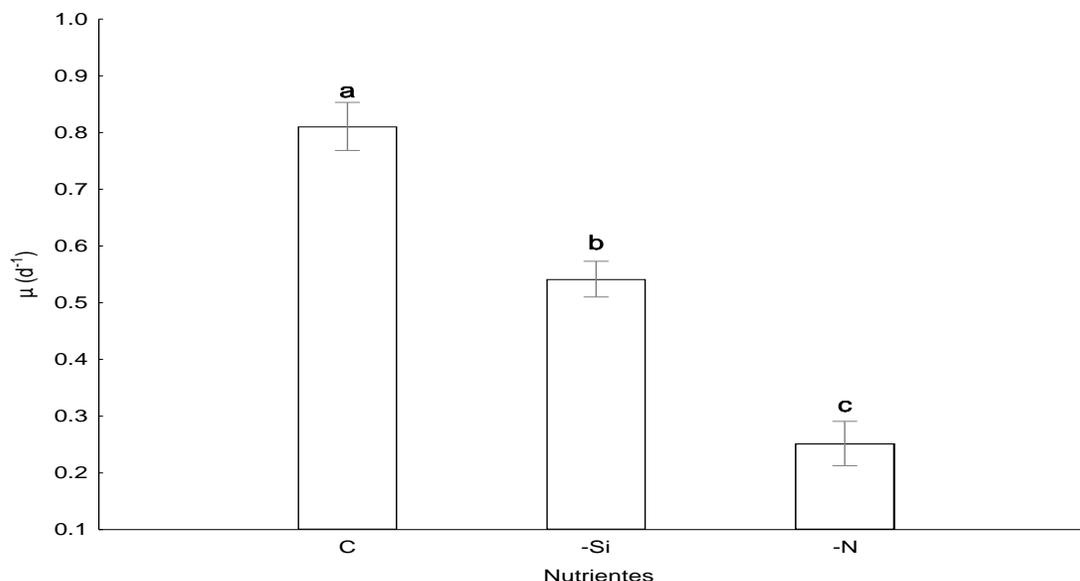


Figura 20. Tasas de crecimiento (μ) de *T. dictyotum* cultivada en sistema semi-continuo en condiciones de nutrientes completos (C) y bajo estrés nutritivo (-Si: déficit de silicatos, -N: déficit de nitratos). Se presentan los valores promedio \pm error estándar. Letras distintas indican diferencia significativa según los resultados de la prueba de Tukey ($p < 0.05$, $a > c$).

7.3.4. Cenizas

Se determinó con un ANOVA que los porcentajes de cenizas obtenidos en cada condición nutrimental fueron diferentes significativamente ($p < 0.05$), pero la variación por la irradiancia o la interacción irradiancia*nutrientes no fue significativa. Con déficit de silicatos las cenizas forman cerca del 30% de la biomasa y con el déficit de nitratos se obtuvo el valor más alto llegando a formar el 50% de la biomasa, el valor de cenizas con nutrientes completos es de 40% (Fig. 21). Estos cambios en la cantidad de cenizas agregan variabilidad al reportar las cantidades de lípidos, ácidos grasos y pigmentos tomando en cuenta la materia seca (MS), por esta razón se decidió comparar los resultados de composición de estos productos en función de la materia orgánica seca (MOS).

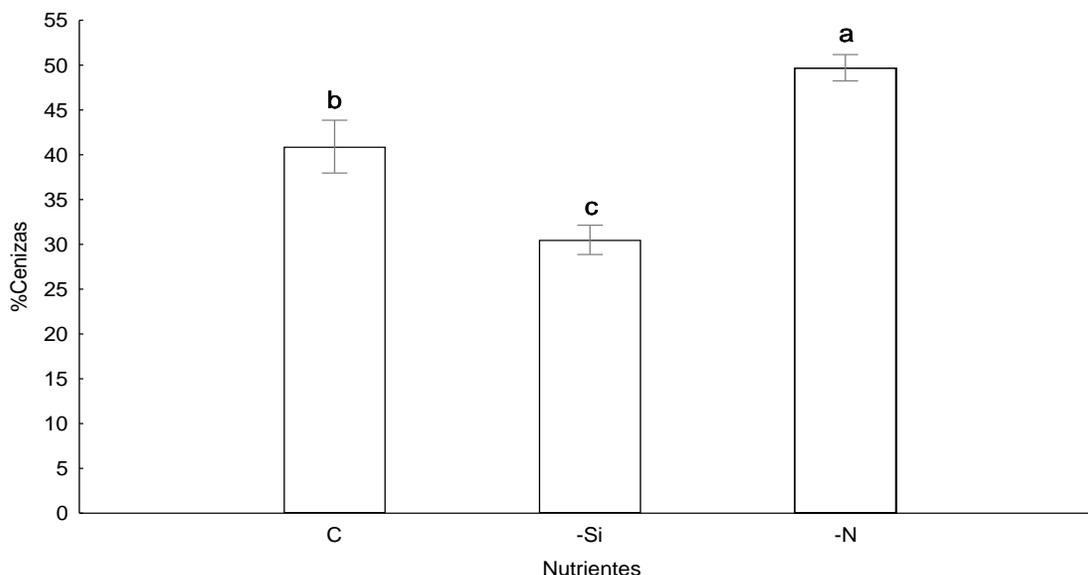


Figura 21. Porcentaje de cenizas de *T. dictyotum* cultivada en sistema semicontinuo en condiciones de nutrientes completos (C) y bajo estrés nutricional (-Si: déficit de silicatos, -N: déficit de nitratos). Se presentan los valores promedio \pm error estándar. Letras distintas indican diferencia significativa según los resultados de la prueba de Tukey ($p < 0.05$, $a > c$).

7.3.5. Lípidos totales

El porcentaje de lípidos totales fue comparado mediante un ANOVA bifactorial para determinar diferencias significativas. Se encontró que la interacción de los factores Irradiancia*nutrientes no es significativa, pero analizando los factores por separado sí se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) (Tabla X). Con respecto a la irradiancia $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ se obtuvo el porcentaje de lípidos más alto sin diferencia del obtenido con $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, sin embargo, la tendencia que se observa es que el porcentaje de lípidos se incrementa conforme se incrementa la irradiancia. Con respecto al efecto de los nutrientes se observó que el déficit de silicatos tuvo un resultado mayor en la acumulación de lípidos, que fue el doble de lo obtenido con nutrientes completos y con déficit de nitrógeno.

Tabla X. Porcentaje de lípidos totales de *T. dictyotum* cultivada en sistema semicontínuo en distintas irradiancias y condiciones de nutrientes completos (C) y con déficit de silicatos (-Si) y déficit de nitratos (-N).

Variable		% Lípidos Totales (p/p-MS)	% Lípidos Totales (p/p-MOS)
Irradiancia ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	20	3.275 \pm 0.751 ^b	5.346 \pm 0.992 ^b
	70	4.060 \pm 0.928 ^{ab}	6.516 \pm 1.094 ^{ab}
	120	4.888 \pm 1.007 ^a	7.854 \pm 1.236 ^a
Nutrientes	C	2.847 \pm 0.263 ^b	5.118 \pm 0.433 ^b
	-Si	7.383 \pm 0.612 ^a	10.480 \pm 0.851 ^a
	-N	1.992 \pm 0.239 ^b	4.118 \pm 0.514 ^b

Valores promedio \pm error estándar. Las letras se representan los resultados de la comparación por prueba de Tukey para cada variable ($p < 0.05$, $a > b$).

7.3.6. Ácidos grasos

Los ácidos grasos identificados en *T. dictyotum* (Tabla XI) fueron analizados por un ANOVA bifactorial. De manera general, se observó que hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) en la concentración SFA debidas a la irradiancia o a los nutrientes, pero la interacción de estos factores no fue significativa. El déficit de nutrientes ya sea nitratos o silicatos contribuyó a una mayor concentración de SFA y obteniendo valores mayores con 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Los MUFA fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) con el déficit de silicatos y también incrementó su concentración, aunque en menor medida, con el déficit de nitratos combinado ya sea con baja o alta irradiancia. Comparando las irradiancias, se observó una tendencia a incrementar los MUFA conforme se incrementa la irradiancia obteniendo la mayor concentración de MUFA con la combinación de déficit de silicatos con 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. La concentración de PUFA se vio influenciada por los nutrientes y por la interacción de los factores irradiancia-nutrientes ($p < 0.05$), pero no se observó influencia de la irradiancia por sí sola. Las concentraciones más altas de PUFA se observaron con déficit de silicatos combinado con irradiancias de 20 y 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. La relación n-3/n-6 fue mayor a 1/6 (relación mínima adecuada para la nutrición humana de acuerdo con Wijendrn y Hayes, 2004) en todos los casos, pero se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) que muestran que la

relación más alta se obtiene al combinar el déficit de silicatos con irradiancia de 70 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, seguida de la combinación con 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y en tercer lugar la combinación de nutrientes completos o déficit de silicatos con 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Los PUFA más importantes identificados en *T. dictyotum* fueron AA, EPA y DHA. Para estos ácidos grasos, además de la concentración, se calculó la productividad y se realizó un ANOVA bifactorial y la prueba de Tukey para cada uno.

La concentración de AA se incrementó con irradiancias de 70 y 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Fig. 22). En la condición de déficit de silicatos hubo concentraciones altas a 20 y 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. En la condición de déficit de nitratos se observaron concentraciones bajas de AA en todas las irradiancias.

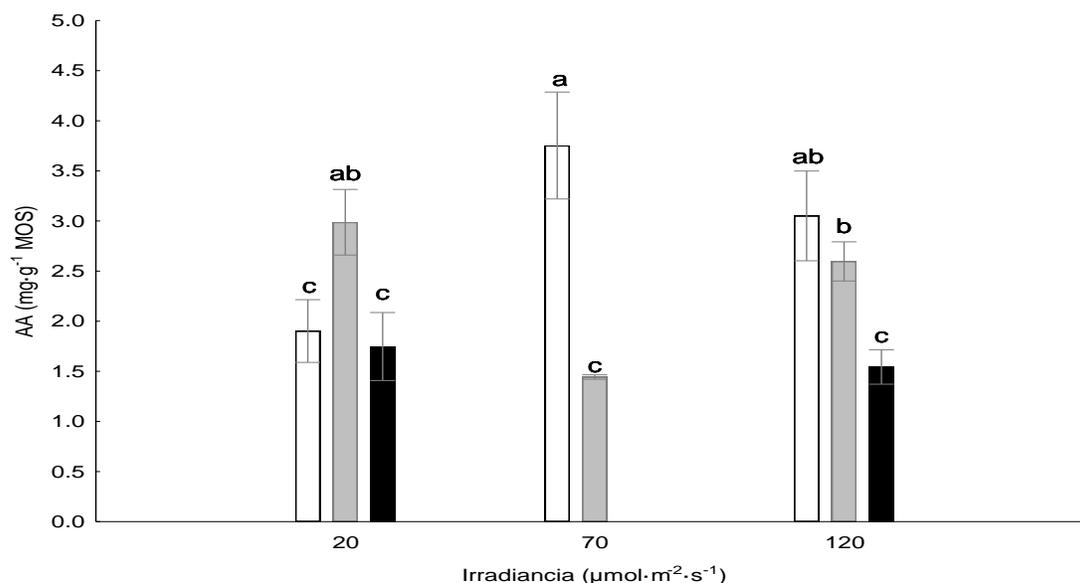


Figura 22. Concentración de AA en *T. dictyotum* cultivada en irradiancia de 20, 70 y 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Se presentan los valores promedio \pm error estándar. Barras blancas: nutrientes completos, barras grises: déficit de silicatos, barras negras: déficit de nitratos. Letras distintas indican diferencia significativa según los resultados de la prueba de Tukey ($p < 0.05$, $a > c$).

Tabla XI. Ácidos grasos identificados ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ MOS) en *T. dictyotum* cultivada en sistema semi-continuo, distintas irradiancias y nutrientes completos (C), déficit de silicatos (-Si) y déficit de nitratos (-N).

Irradiancia ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	20				70				120				
	C	-Si	-N	I* ^N	C	-Si	-N	I	C	-Si	-N	I	I* ^N
14:0	4.223 ± 0.148 d	10.489 ± 0.334 b	5.368 ± 0.079 cd	**	7.731 ± 0.670 bc	9.808 ± 0.617 b	5.335 ± 0.334 cd	**	9.139 ± 1.295 b	14.324 ± 0.658 a	10.507 ± 0.415 b	**	**
15:0	0.084 ± 0.040 d	0.480 ± 0.037 bc	0.308 ± 0.010 c	**	0.354 ± 0.040 c	0.509 ± 0.053 bc	0.338 ± 0.037 c	**	0.488 ± 0.080 bc	0.780 ± 0.041 a	0.635 ± 0.037 ab	**	**
16:0	2.902 ± 0.315 d	9.511 ± 0.568 cd	17.517 ± 0.803 bc	**	8.815 ± 1.301 cd	13.152 ± 0.604 bc	19.523 ± 3.019 b	**	10.752 ± 0.534 cd	21.424 ± 1.312 b	31.690 ± 3.577 a	**	**
18:0	0.024 ± 0.012 b	0.194 ± 0.023 ab	0.486 ± 0.053 ab	**	0.056 ± 0.001 bc	0.263 ± 0.013 ab	0.232 ± 0.027 ab	**	0.136 ± 0.056 b	0.509 ± 0.052 a	0.478 ± 0.172 a	**	**
22:0	0.025 ± 0.025 b	0.226 ± 0.009 a	0.000 ± 0.000 b	NS	0.000 ± 0.000 b	0.165 ± 0.165 ab	0.000 ± 0.000 b	NS	0.000 ± 0.000 b	0.185 ± 0.065 a	0.000 ± 0.000 b	NS	**
24:0	0.000 ± 0.000	0.128 ± 0.050	0.125 ± 0.073	NS	0.036 ± 0.019	0.036 ± 0.018	0.022 ± 0.022	NS	0.085 ± 0.055	0.043 ± 0.043	0.107 ± 0.055	NS	NS
ΣSFA	7.258 ± 0.446 d	21.027 ± 0.839 c	23.504 ± 0.875 c	**	16.992 ± 2.018 cd	23.933 ± 0.991 c	25.449 ± 3.324 bc	**	20.600 ± 1.906 c	37.265 ± 2.171 ab	43.417 ± 4.127 a	**	**
14:1n-5	0.000 ± 0.000 b	0.061 ± 0.013 a	0.000 ± 0.000 b	NS	0.007 ± 0.007 b	0.060 ± 0.006 a	0.000 ± 0.000 b	NS	0.018 ± 0.009 b	0.067 ± 0.016 a	0.015 ± 0.008 b	NS	**
15:1n-5	0.000 ± 0.000 c	0.295 ± 0.028 a	0.022 ± 0.013 c	*	0.000 ± 0.000 c	0.175 ± 0.052 b	0.000 ± 0.000 c	*	0.000 ± 0.000 c	0.278 ± 0.035 ab	0.011 ± 0.011 b	*	**
16:1n-7	4.875 ± 0.398 e	17.711 ± 1.436 bc	10.826 ± 0.377 d	**	9.176 ± 1.339 de	19.465 ± 0.924 b	7.993 ± 0.788 de	**	12.995 ± 1.259 cd	34.971 ± 0.950 a	19.337 ± 1.684 b	**	**
18:1n-7	0.064 ± 0.032 c	0.276 ± 0.037 b	0.122 ± 0.004 bc	**	0.000 ± 0.000 c	0.159 ± 0.018 bc	0.264 ± 0.031 b	**	0.262 ± 0.024 b	0.518 ± 0.070 a	0.126 ± 0.069 bc	**	**
16:1n-9	0.000 ± 0.000 b	0.166 ± 0.004 b	0.585 ± 0.026 a	NS	0.039 ± 0.039 b	0.172 ± 0.054 b	0.794 ± 0.174 a	NS	0.000 ± 0.000 b	0.178 ± 0.089 b	0.662 ± 0.050 a	NS	**
18:1n-9	0.017 ± 0.017 d	0.088 ± 0.005 c	0.273 ± 0.056 a	*	0.067 ± 0.009 c	0.134 ± 0.009 b	0.213 ± 0.111 ab	*	0.263 ± 0.013 a	0.270 ± 0.015 a	0.235 ± 0.020 a	**	*
ΣMUFA	4.956 ± 0.376 e	18.596 ± 1.391 bc	11.828 ± 0.371 d	**	9.289 ± 1.332 de	20.165 ± 0.934 b	9.264 ± 0.689 de	**	13.478 ± 1.267 cd	36.282 ± 1.106 a	20.387 ± 1.721 b	**	**
16:2n-4	0.238 ± 0.009 de	0.986 ± 0.043 cd	0.409 ± 0.043 de	**	1.357 ± 0.175 bc	1.727 ± 0.128 abc	0.137 ± 0.040 e	**	2.050 ± 0.375 ab	2.357 ± 0.115 a	0.491 ± 0.052 de	**	**
16:3n-4	1.663 ± 0.236 bcd	4.925 ± 0.297 a	0.221 ± 0.201 cd	*	0.028 ± 0.003 d	1.843 ± 0.940 bc	0.006 ± 0.006 d	**	0.032 ± 0.005 d	3.181 ± 0.222 ab	0.045 ± 0.003 d	**	*
18:4n-3	0.009 ± 0.009 bc	0.077 ± 0.014 a	0.000 ± 0.000 c	*	0.000 ± 0.000 c	0.037 ± 0.037 abc	0.000 ± 0.000 c	*	0.000 ± 0.000 c	0.088 ± 0.029 a	0.029 ± 0.014 b	*	*
20:5n-3	5.339 ± 0.550 b	9.155 ± 0.658 a	2.259 ± 0.463 c	**	9.568 ± 0.124 a	7.686 ± 0.215 ab	0.837 ± 0.042 c	**	6.046 ± 1.395 b	10.512 ± 0.663 a	2.207 ± 0.292 cd	NS	**
22:6n-3	0.287 ± 0.057 bc	0.797 ± 0.081 a	0.075 ± 0.075 c	*	0.626 ± 0.108 ab	0.667 ± 0.035 ab	0.000 ± 0.000 c	*	0.331 ± 0.166 bc	0.870 ± 0.083 a	0.000 ± 0.000 c	NS	*
16:2n-6	0.093 ± 0.083	0.324 ± 0.260	0.067 ± 0.012	NS	0.089 ± 0.026	0.115 ± 0.055	0.123 ± 0.043	NS	0.087 ± 0.024	0.121 ± 0.039	0.043 ± 0.022	NS	NS
18:2n-6	0.139 ± 0.076 d	0.343 ± 0.020 cd	0.570 ± 0.045 bc	**	0.990 ± 0.139 a	0.486 ± 0.011 bc	0.419 ± 0.055 bcd	**	0.656 ± 0.035 bc	0.603 ± 0.018 bc	0.703 ± 0.061 ab	**	**
18:3n-6	0.023 ± 0.012 d	0.047 ± 0.023 d	0.618 ± 0.121 b	*	0.147 ± 0.074 d	0.123 ± 0.011 d	0.564 ± 0.046 bc	*	0.223 ± 0.041 cd	0.290 ± 0.057 bcd	1.119 ± 0.141 a	**	*
20:3n-6	0.000 ± 0.000 d	0.019 ± 0.010 c	0.134 ± 0.024 a	*	0.000 ± 0.000 d	0.000 ± 0.000 d	0.000 ± 0.000 d	*	0.000 ± 0.000 d	0.123 ± 0.003 ab	0.043 ± 0.043 cd	**	**
20:4n-6	1.902 ± 0.313 bc	2.967 ± 0.328 abc	1.748 ± 0.339 bc	**	3.753 ± 0.533 a	1.443 ± 0.022 cd	0.000 ± 0.000 d	**	3.051 ± 0.448 ab	2.596 ± 0.195 abc	1.544 ± 0.172 bcd	NS	**
22:5n-6	0.000 ± 0.000 c	0.000 ± 0.000 c	0.255 ± 0.128 a	*	0.000 ± 0.000 c	0.013 ± 0.013 bc	0.497 ± 0.118 a	*	0.031 ± 0.018 b	0.028 ± 0.028 bc	0.341 ± 0.171 a	NS	**
ΣPUFA	9.693 ± 0.593 de	19.661 ± 0.526 ab	6.354 ± 1.105 ef	**	16.568 ± 0.842 abc	14.140 ± 1.340 bcd	2.563 ± 0.222 f	**	12.506 ± 2.421 cd	20.771 ± 0.717 a	6.565 ± 0.622 ef	NS	**
n-3/n-6	2.616 ± 0.099 c	2.688 ± 0.111 bc	0.673 ± 0.080 e	*	2.149 ± 0.352 cd	3.853 ± 0.102 a	0.532 ± 0.049 e	*	1.525 ± 0.194 d	3.046 ± 0.105 b	0.592 ± 0.067 e	*	**

I: irradiancia, N: nutrientes, I*^N: interacción irradiancia*nutrientes, SFA = ácidos grasos saturados, MUFA = ac. grasos monoinsaturados, PUFA = ac. grasos poliinsaturados. **:p<0.01, *:p<0.05, NS: No significativo. Valores promedio ± error estándar (p<0.05, a>f).

La productividad de AA tuvo diferencias significativas ($p < 0.05$) en los cultivos con los nutrientes completos respecto a las otras condiciones nutrimentales, sobresaliendo la productividad obtenida combinando los nutrientes completos con 70 y 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Fig. 23).

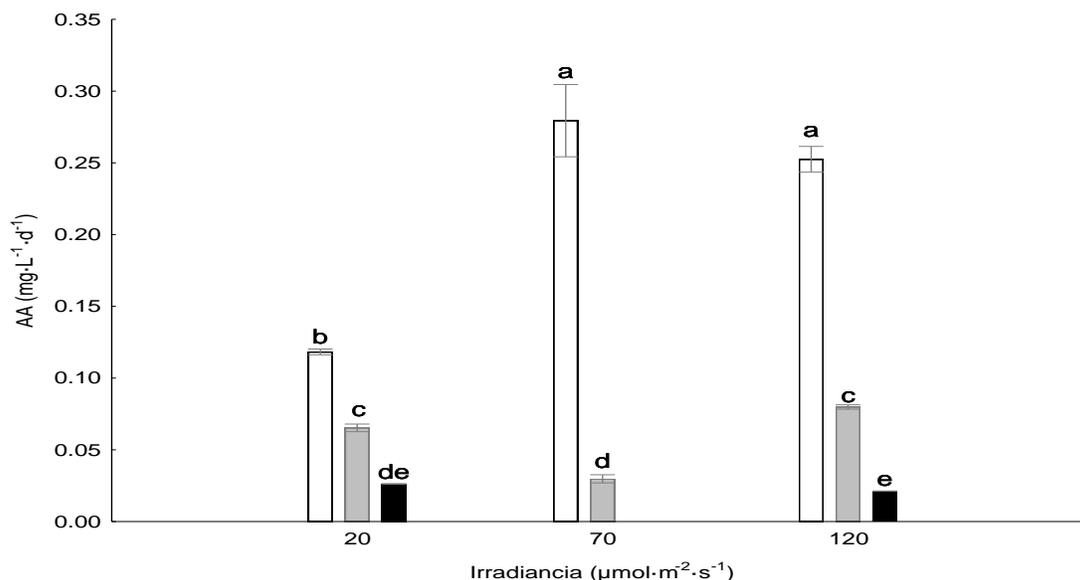


Figura 23. Productividad de AA en *T. dictyotum* cultivada con irradiancias de 20, 70 y 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Valores promedio \pm error estándar. Barras blancas: nutrientes completos, barras grises: déficit de silicatos, barras negras: déficit de nitratos. Letras distintas indican diferencia significativa según los resultados de la prueba de Tukey ($p < 0.05$, $a > e$).

Con lo observado tanto en la concentración y como en la productividad de AA, se concluyó que las mejores condiciones para una mayor producción de este ácido graso en *T. dictyotum* son: un medio con suficiencia de nutrientes durante todo el tiempo de cultivo e irradiancias que pueden ir de 70 a 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

La concentración de EPA en las diferentes condiciones de cultivo fue significativamente diferente ($p < 0.05$), con mayor concentración en los cultivos sometidos a déficit de silicatos, en especial a 20 y 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, y cultivada con nutrientes completos y 70 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Fig. 24). Al aplicar un déficit de nitrógeno se redujo la concentración de EPA llegando a su mínimo con irradiancia de 70 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

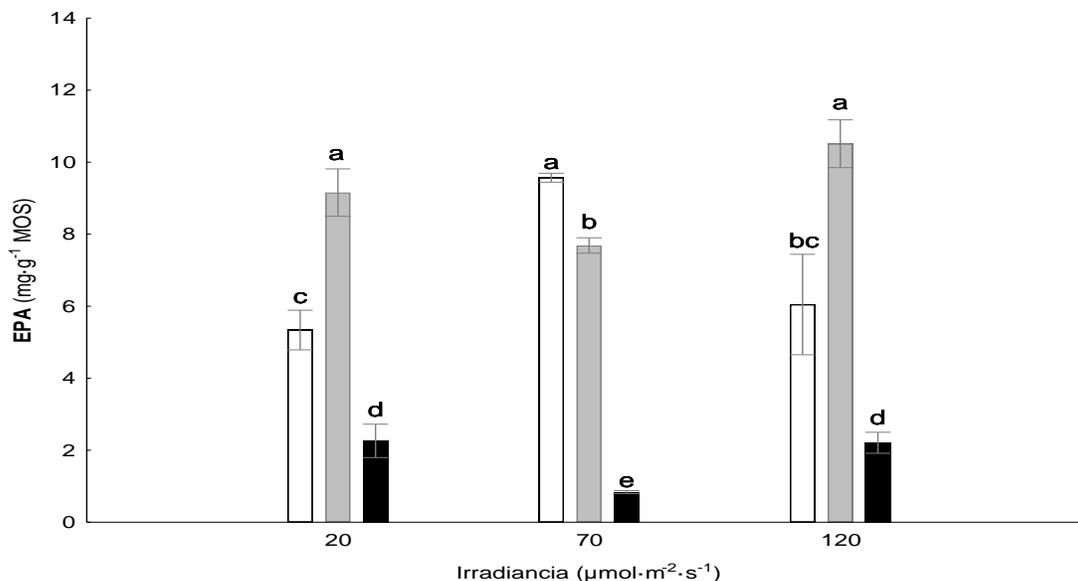


Figura 24. Concentración de EPA en *T. dictyotum* cultivada con irradiancias de 20, 70 y 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Valores promedio \pm error estándar. Barras blancas: nutrientes completos, barras grises: déficit de silicatos, barras negras: déficit de nitratos. Letras distintas indican diferencia significativa según los resultados de la prueba de Tukey ($p < 0.05$, $a > e$).

La productividad de EPA de *T. dictyotum*, en las distintas condiciones de cultivo, tuvo diferencias significativas ($p < 0.05$). La mayor productividad de este ácido graso fue de $0.75 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ en los cultivos con nutrientes completos e irradiancia de $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, la productividad alcanzada con las otras condiciones de cultivo fue menor, pero en todas las irradiancias se observó mayor productividad de EPA al cultivar con nutrientes completos, con déficit de nitrógeno disminuyó teniendo valores por debajo de $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (Fig. 25).

Con base en la concentración y productividad de EPA en *T. dictyotum* se observó que las mejores condiciones de crecimiento son: un medio sin déficit de nutrientes e irradiancia cercana a $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

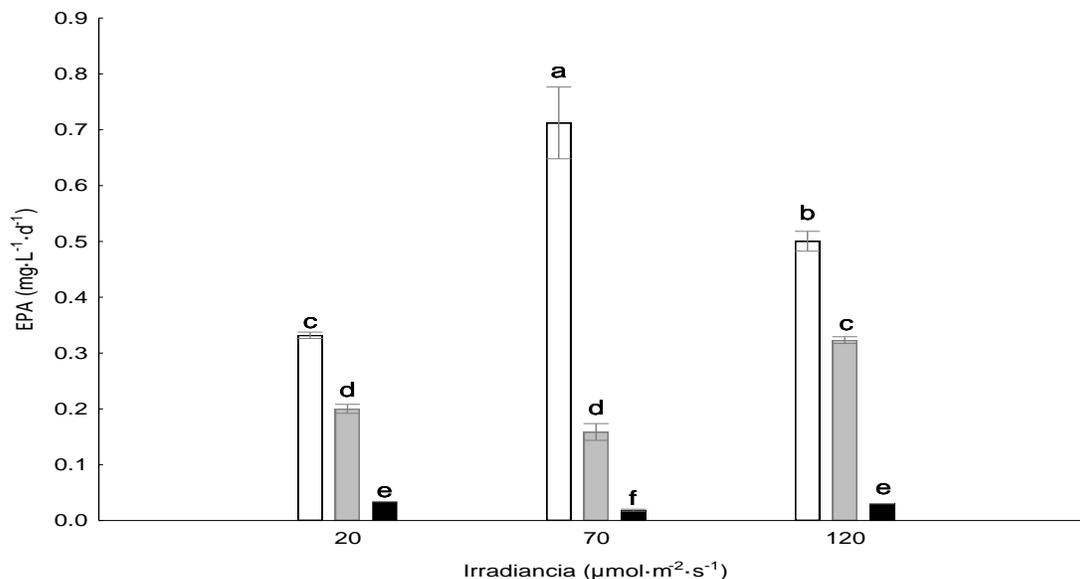


Figura 25. Productividad de EPA en *T. dictyotum* cultivada con irradiancias de 20, 70 y 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Se presentan los valores promedio \pm error estándar. Barras blancas: nutrientes completos, barras grises: déficit de silicatos, barras negras: déficit de nitratos. Letras distintas indican diferencia significativa según los resultados de la prueba de Tukey ($p < 0.05$, a>f).

La concentración de DHA también tuvo diferencias significativas ($p < 0.05$) (Fig. 26), alcanzando la mayor concentración al cultivar con déficit de silicatos en las tres irradiancias, cultivando con nutrientes completos también tuvo concentración alta al someterla a 70 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, y con déficit de nitratos no hubo producción.

La máxima productividad de DHA ($p < 0.05$) (Fig. 27) se obtuvo al cultivar con nutrientes completos e irradiancia de 70 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; en otras condiciones tanto nutritivas como de irradiancia, *T. dictyotum* alcanzó productividades mucho más bajas, solo el 50% de la máxima.

Con base en la concentración y productividad de DHA, las condiciones de cultivo apropiadas para obtener mayores rendimientos fueron cultivando a *T. dictyotum* con nutrientes completos e irradiancias de 70 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

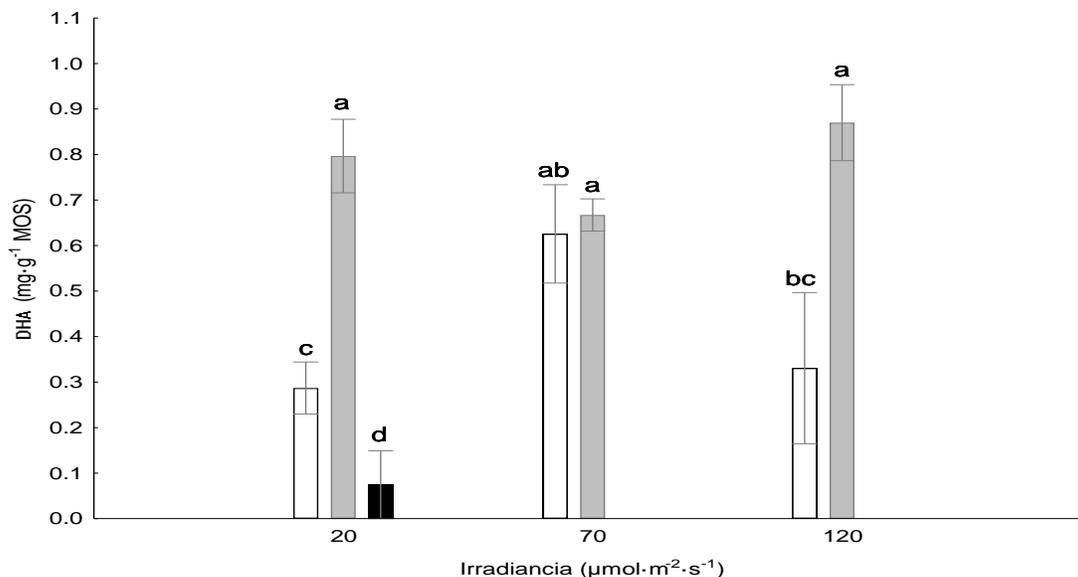


Figura 26. Concentración de DHA en *T. dictyotum* cultivada con irradiancias de 20, 70 y 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Valores promedio \pm error estándar. Barras blancas: nutrientes completos, barras grises: déficit de silicatos, barras negras: déficit de nitratos. Letras distintas indican diferencia significativa según los resultados de la prueba de Tukey ($p < 0.05$, $a > d$).

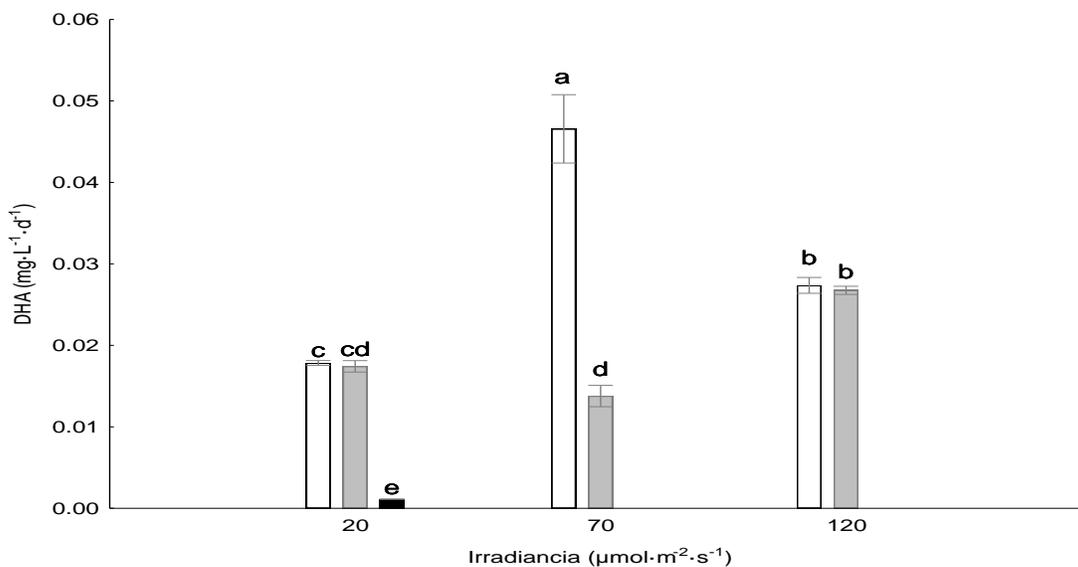


Figura 27. Productividad de DHA en *T. dictyotum* cultivada con irradiancias de 20, 70 y 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Valores promedio \pm error estándar. Barras blancas: nutrientes completos, barras grises: déficit de silicatos, barras negras: déficit de nitratos. Letras distintas indican diferencia significativa según los resultados de la prueba de Tukey ($p < 0.05$, $a > e$).

7.3.7. Pigmentos

Entre los pigmentos principales encontrados en *T. dictyotum* se encuentran la fucoxantina y las clorofilas a y c. Se midió la concentración final y se calculó la productividad para los tres pigmentos y para determinar diferencias significativas entre los tratamientos se utilizó el ANOVA bifactorial y prueba de Tukey para cada uno de los pigmentos.

La concentración de fucoxantina fue mayor en *T. dictyotum* ($p < 0.05$) (Fig. 28) cultivado con déficit de silicatos, alcanzando valores máximos al cultivar con 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; en la condición de nutrientes completos se observaron concentraciones menores que las obtenidas con déficit de silicatos; y con déficit de nitratos se obtuvieron concentraciones muy bajas de fucoxantina.

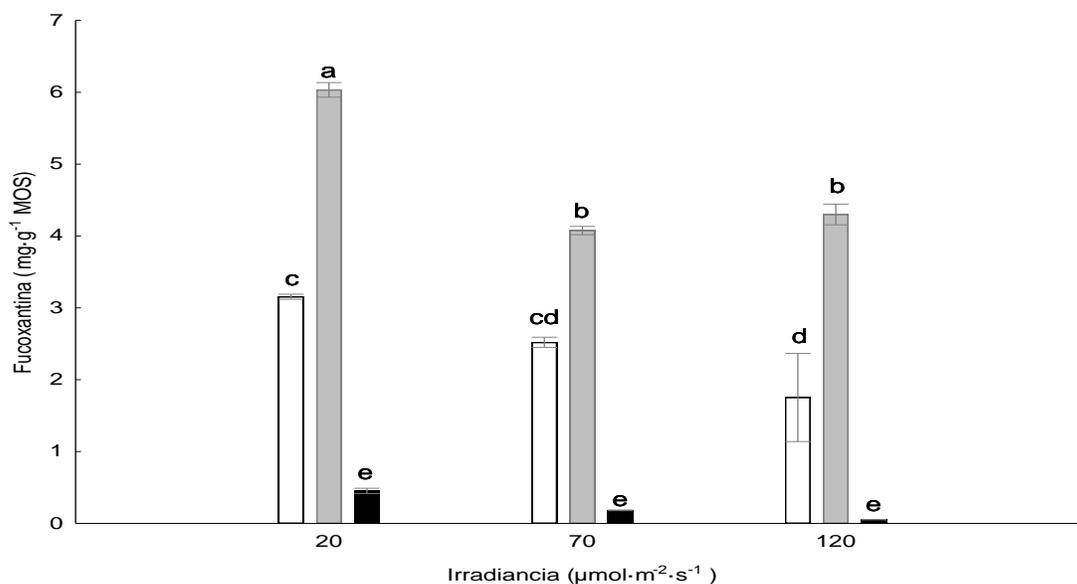


Figura 28. Concentración de fucoxantina en *T. dictyotum* cultivada con irradiancias de 20, 70 y 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Valores promedio \pm error estándar. Barras blancas: nutrientes completos, barras grises: déficit de silicatos, barras negras: déficit de nitratos. Letras distintas indican diferencia significativa según los resultados de la prueba de Tukey ($p < 0.05$, $a > e$).

Para evaluar la productividad de fucoxantina se observó que, después de realizar el ANOVA, la irradiancia y la interacción de los factores irradiancia*nutrientes no

fueron significativas ($p > 0.05$). Con el único factor que la productividad mostró diferencia significativa ($p < 0.05$) fue con los nutrientes (Fig. 29). La mejor productividad se obtuvo cultivando a *T. dictyotum* en nutrientes completos y con déficit de silicatos, mientras que la productividad alcanzada con déficit de nitratos fue muy baja.

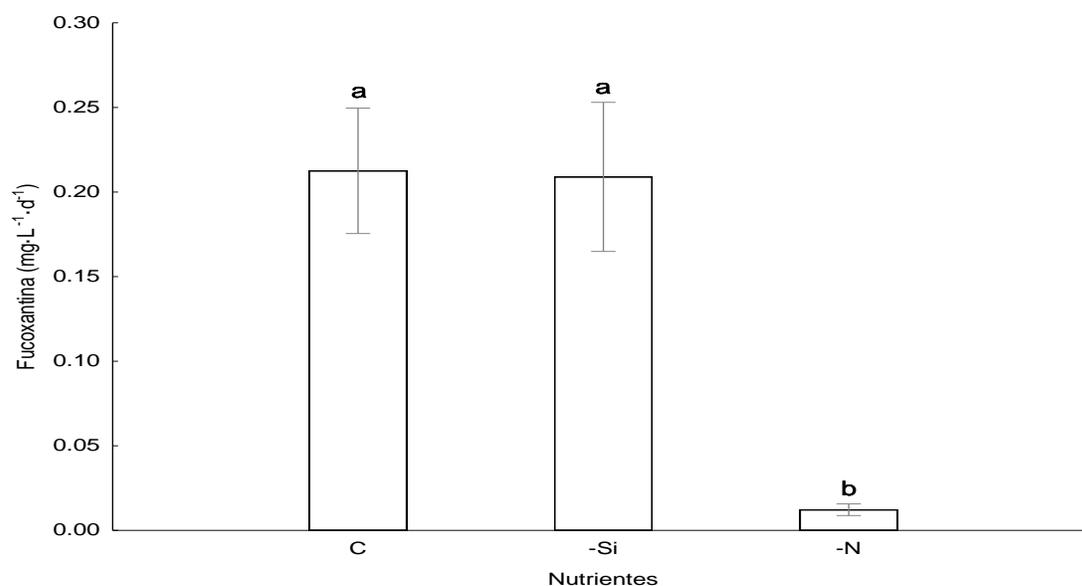


Figura 29. Productividad de fucoxantina en *T. dictyotum* cultivada con nutrientes completos (C), con déficit de silicatos (-Si) y déficit de nitratos (-N). Se presentan los valores promedio \pm error estándar. Letras distintas indican diferencia significativa según los resultados de la prueba de Tukey ($p < 0.05$, $a > b$).

Con base en estos resultados, las condiciones de cultivo apropiadas para una mayor productividad de fucoxantina por *T. dictyotum* son: un medio de cultivo deficiente en silicatos o con nutrientes completos, la irradiancia no afecta la productividad, pero si a la concentración que es más alta con $20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

La clorofila "a" tuvo un comportamiento similar a lo observado con la fucoxantina, obteniendo diferencias significativas ($p < 0.05$) al cultivar a *T. dictyotum* con déficit de silicatos, alcanzando la concentración más alta con $20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Fig. 30); nuevamente se observó que la concentración fue más baja al cultivar con nutrientes completos y con déficit de nitratos la concentración es cercana a cero.

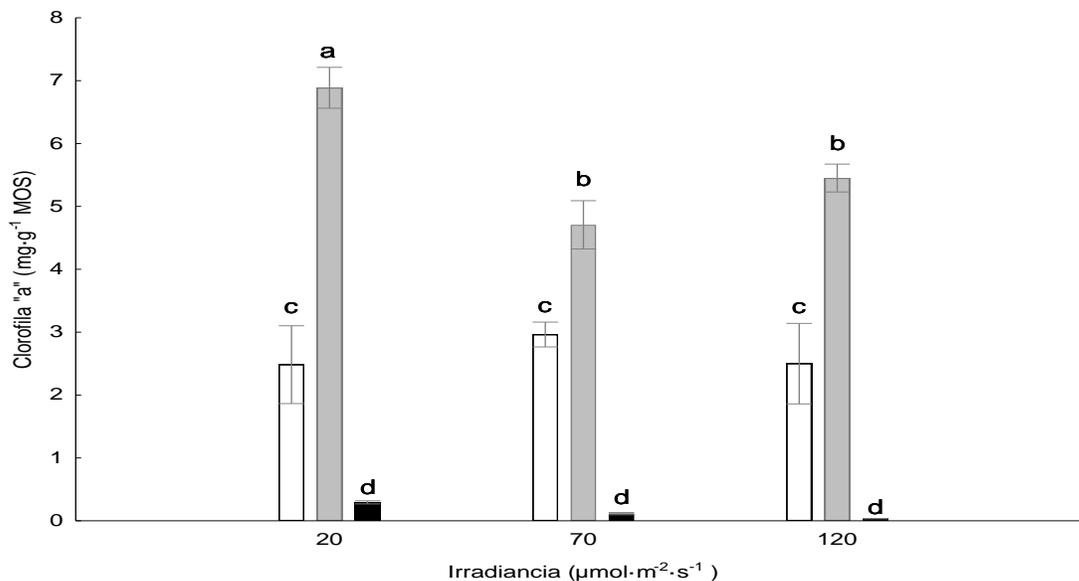


Figura 30. Concentración de clorofila “a” en *T. dictyotum* cultivada con irradiancias de 20, 70 y 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Valores promedio \pm error estándar. Barras blancas: nutrientes completos, barras grises: déficit de silicatos, barras negras: déficit de nitratos. Letras distintas indican diferencia significativa según los resultados de la prueba de Tukey ($p < 0.05$, a>d).

La productividad de clorofila “a”, tampoco tuvo diferencias significativas con la irradiancia ni la interacción de los factores irradiancia*nutrientes ($p > 0.05$), encontrando diferencias significativas ($p < 0.05$) solo con los nutrientes (Fig. 31). La productividad cultivando a *T. dictyotum* en nutrientes completos fue similar que cultivando con déficit de silicatos, cultivando con déficit de nitratos no se obtuvieron buenos resultados ya que la productividad fue muy baja.

Tomando en cuenta la concentración y productividad de clorofila “a”, las condiciones de cultivo apropiadas son las mismas que para producir fucoxantina: medio de cultivo con nutrientes completos o deficiente en silicatos, con irradiancias que pueden ir desde 20 hasta 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Con la clorofila “c” se observan resultados similares a los obtenidos con la fucoxantina y la clorofila “a”. La concentración fue mayor ($p < 0.05$) cultivando con déficit de silicatos, siendo más alta con 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Fig. 32).

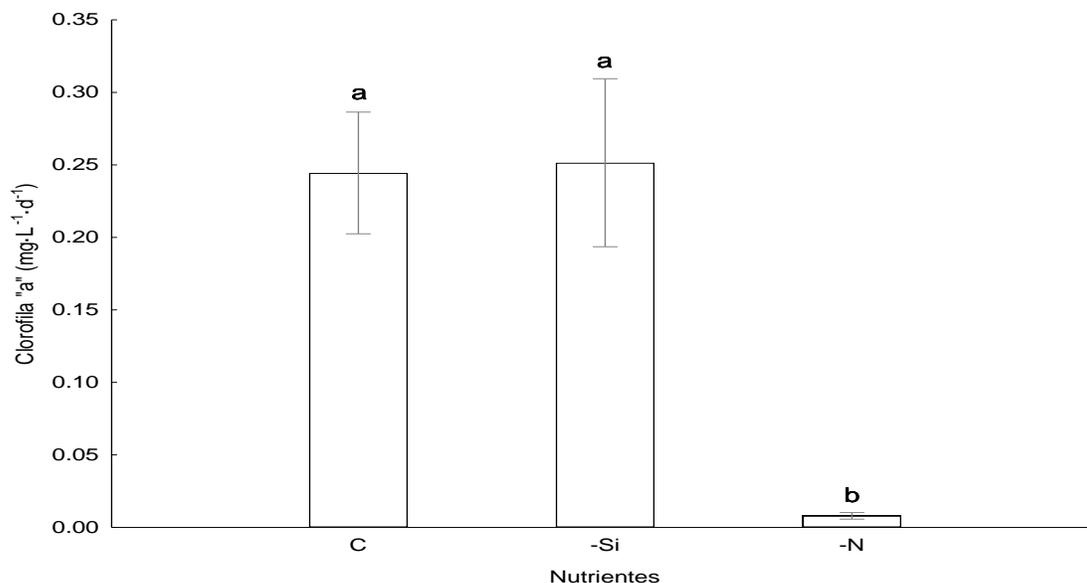


Figura 31. Productividad de clorofila "a" en *T. dictyotum* cultivada con nutrientes completos (C), con déficit de silicatos (-Si) y déficit de nitratos (-N). Se presentan los valores promedio \pm error estándar. Letras distintas indican diferencia significativa según los resultados de la prueba de Tukey ($p < 0.05$, $a > b$).

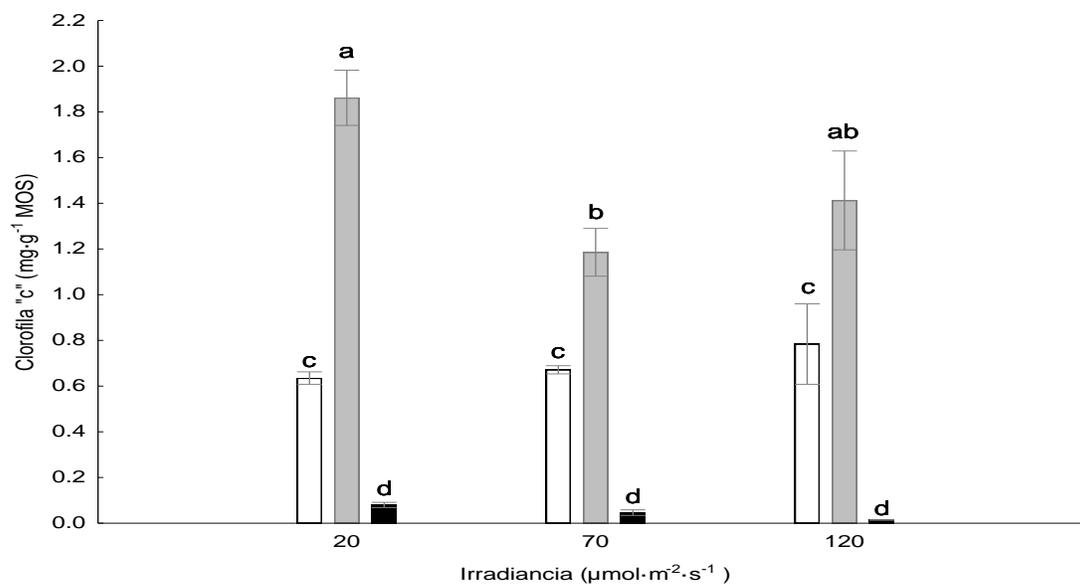


Figura 32. Concentración de clorofila "c" en *T. dictyotum* cultivada con irradiancias de 20, 70 y 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Valores promedio \pm error estándar. Barras blancas: nutrientes completos, barras grises: déficit de silicatos, barras negras: déficit de nitratos. Letras distintas indican diferencia significativa según los resultados de la prueba de Tukey ($p < 0.05$, $a > d$).

La productividad de clorofila “c” solo tuvo diferencias ($p < 0.05$) en función de los nutrientes (Fig. 33) pero no por efecto de la irradiancia o la interacción de ambos ($p > 0.05$); la más alta se obtuvo cultivando con nutrientes completos o con déficit de silicatos, en forma similar a la producción de fucoxantina y clorofila “a”.

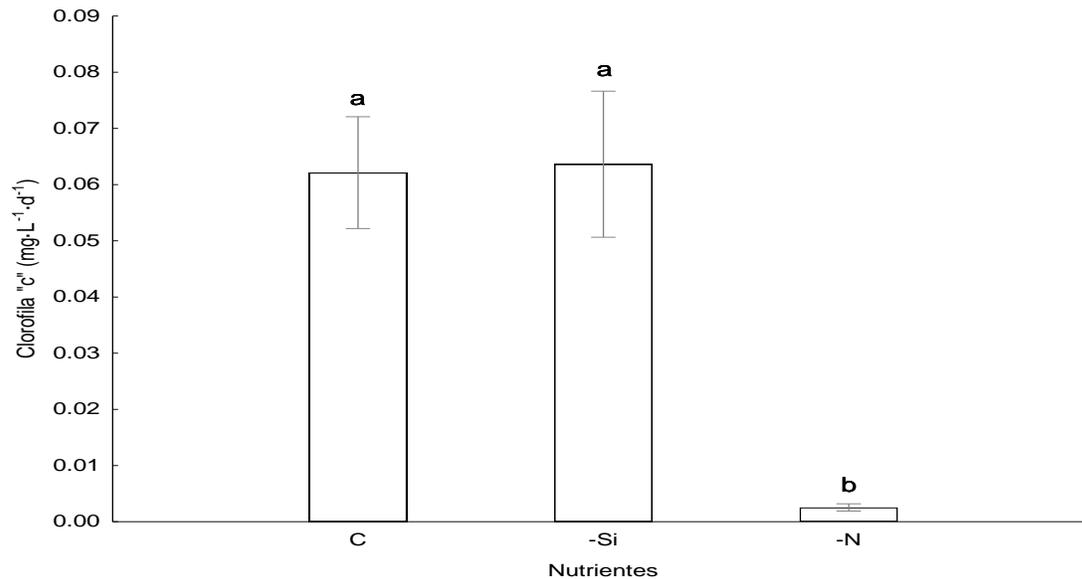


Figura 33. Productividad de clorofila “c” en *T. dictyotum* cultivada con nutrientes completos (C), déficit de silicatos (-Si) y déficit de nitratos (-N). Se presentan los valores promedio \pm error estándar. Letras distintas indican diferencia significativa según los resultados de la prueba de Tukey ($p < 0.05$, $a > b$).

8. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial productor de fucoxantina, lípidos, y ácidos grasos en respuesta a estrés por déficit de nutrientes bajo distintas irradiancias en la diatomea *T. dictyotum*. Esta diatomea tiene la ventaja de que, en experimentos preliminares, mostró ser responsiva a estímulos de estrés por déficit de nutrientes, es nativa de Baja California Sur, se ha cultivado en condiciones de laboratorio y en cultivos abiertos en el exterior, tiene un tamaño que permite su cosecha por filtración lo que resuelve uno de los principales cuellos de botella en la biotecnología de microalgas. Con estas características, el objetivo también fue valorarla en su potencial biotecnológico para la producción de los compuestos a evaluados. El primer paso fue la selección del medio de cultivo; de acuerdo a los resultados el medio más adecuado, de los dos evaluados, para *T. dictyotum* es el medio f/2 de Guillard. A pesar de que el medio Conway se ha empleado en otras diatomeas con buenos o similares resultados que el medio f/2 (Costard *et al.*, 2012; Adenan *et al.*, 2013; Lananan *et al.*, 2013), aquí no hizo un buen aporte nutrimental a la microalga aun teniendo mayor cantidad de los nutrientes nitrato y fosfato de sodio, posiblemente porque es deficiente en cloruro férrico. El hierro puede ser el factor limitante en el medio Conway, ya que este elemento es muy importante para poder realizar la fotosíntesis y la limitación del mismo puede resultar en un descenso o incluso en la inhibición del proceso fotosintético (Raven *et al.*, 1999).

La determinación de la fuente de nitrógeno más adecuada para *T. dictyotum* fue otro de los objetivos. De las fuentes evaluadas, el amonio fue la que generó menor crecimiento, en segundo lugar la urea y el nitrato de sodio fue la fuente que propició el mayor crecimiento al final de los 14 días, sin embargo hasta el día 9 de cultivo la tasa de crecimiento y la densidad celular no fueron distintas significativamente entre urea y nitrato de sodio. Estos resultados son similares a los observados con *Chaetoceros simplex* (Karthikeyan *et al.*, 2013); aunque en otras diatomeas tales como *Cyclotella criptica* no hubo diferencias en el crecimiento al emplear diferentes fuentes de nitrógeno (Pahl *et al.*, 2012). En el caso de que la célula pueda asimilar cualquier fuente de nitrógeno, es posible que para el estímulo de inducción de la

producción de lípidos, lo que más influya sea la fase de crecimiento, es decir la cantidad de nitrógeno disponible para la célula y no la fuente de nitrógeno (Fidalgo *et al.*, 1998; Pahl *et al.*, 2012). De acuerdo con la ruta metabólica del nitrógeno en las microalgas, el mayor crecimiento debió obtenerse con amonio ya que requiere de menos energía para poder ser utilizado en la síntesis de proteínas, sin embargo, disuelto en el medio, hay reportes de que puede generar compuestos tóxicos y/o acidificación del medio representando una desventaja para el cultivo de microalgas (Massol-Deyá, 2002; Karthikeyan *et al.*, 2013). Tanto el amonio como la urea comparten la desventaja de descomponerse en temperaturas elevadas, siendo que el método de esterilización empleado fue por calor húmedo, existe la posibilidad de que las diferencias observadas con respecto al nitrato de sodio se deban a la degradación de esos compuestos limitando la disponibilidad de nitrógeno en el medio (Tidwell *et al.*, 1955). Por motivos de estabilidad, precio y mayor densidad celular final se eligió al nitrato de sodio como fuente de nitrógeno para los siguientes experimentos.

Una vez determinados el medio de cultivo y la fuente nitrógeno adecuados, se trató de evaluar el efecto del déficit de nitratos, el déficit de silicatos y los cambios en la irradiancia, sin embargo, esto no fue sencillo. El primer problema fue que el déficit de nitratos limitó el crecimiento tanto, que fue nulo (Fig. 9). Otro problema surgió de la contaminación por bacterias. Aunque se sabe que la interacción microalga-bacteria suele ser benéfica para las microalgas mediante una relación mutualista (Rishiram *et al.*, 2016), las bacterias en altas densidades tienen un efecto negativo en el desarrollo de las microalgas debido a la competencia por nutrientes y por sustancias que producen las bacterias y resultan tóxicas para las microalgas (Qu *et al.*, 2014). Por lo anterior se buscó una manera de eliminar el exceso de bacterias sin recurrir al uso de antibióticos (Anexo 4); los antibióticos pueden tener efectos negativos en las microalgas que van desde disminuir la eficiencia fotoquímica de los fotosistemas (Min-Hyuk *et al.*, 2005) hasta causar la muerte de las microalgas (Hunter y McVeigh, 1961), además de una alta probabilidad de generar cepas de bacterias resistentes al antibiótico (Dever y Dermody, 1991). El tercer problema a resolver fue que *T. dictyotum* consume silicatos a una velocidad muy alta, aquí llegó

a agotar los silicatos del medio en solo 3 días. Esto puede deberse a que es una microalga con una estructura de pared muy grande, con un bio-volumen de $2827.433 \mu\text{m}^3$; como consecuencia, en los primeros experimentos sometiendo a esta diatomea a déficit de nutrientes se obtuvieron resultados similares en la producción de lípidos y ácidos grasos (Figs. 10-13 y tabla VII) en los tres tratamientos, ya que todos los cultivos alcanzaron condiciones de déficit de silicatos (Figs. 14-15).

La cinética que sigue el consumo de silicatos está descrita para la diatomea *Thalassiosira pseudonana* por Thamatrakoln y Hildebrand (2008) pero se piensa que puede ser aplicable a otras diatomeas. Ellos presentan un modelo de captura de silicatos que propone dos mecanismos de control: por transportadores de silicio cuando la concentración es baja y un transporte difusional determinado por el pool intracelular que depende de la incorporación de silicatos durante la formación de la pared celular cuando la concentración es alta. También reportan una tasa máxima de consumo de silicatos de $3.63 \mu\text{mol}\cdot\text{cel} \times 10^{-6}\cdot\text{d}^{-1}$ para *T. pseudonana*, esta tasa de consumo es aproximadamente la mitad de la calculada para *T. dictyotum* de $7.18 \mu\text{mol}\cdot\text{cel} \times 10^{-6}\cdot\text{d}^{-1}$. Taguchi *et al.* (1987) estudiaron la velocidad de consumo de silicatos en cultivos de *Chaetoceros gracilis*, *Hantzchia* sp. y *Cyclotella* sp.; Aunque no especifican la cantidad de inóculo inicial de las diatomeas que estudiaron determinaron densidades celulares máximas de 7.6, 9.2 y 11 $\times 10^4 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$, bio-volúmenes de 89, 800 y 100 μm^3 y tasas de crecimiento de 1.35, 1.47 y 1.67 d^{-1} respectivamente, todo esto utilizando una concentración de 50 μM de silicatos en el medio y 7, 9 y 11 días de cultivo respectivamente; con *T. dictyotum* se obtuvo una tasa de crecimiento promedio de 0.8 d^{-1} y una densidad celular máxima cercana a $9 \times 10^4 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ en 3-4 días de cultivo con poco más de 200 μM de silicatos, se puede observar que las densidades finales fueron similares pero *T. dictyotum* tuvo una tasa de crecimiento más baja, aún con esto consumió una cantidad mayor de silicatos en menos tiempo, lo cual parece estar relacionado con la gran diferencia en los bio-volúmenes. Tomando en cuenta estos problemas se realizaron modificaciones a los sistemas de cultivo; así se establecieron dos etapas de cultivo, una como sistema estático y una vez alcanzada la fase exponencial tardía se

trasladó el cultivo a un sistema semi-continuo. Otra modificación fue el uso de agua marina sintética, esto con el fin de tener una composición controlada en los nutrientes del medio de cultivo; previamente se determinó que no había diferencia en el crecimiento respecto del agua de mar natural.

Durante la fase de cultivo semi-continuo se realizó la comparación de los efectos producidos por estrés nutrimental (déficit de nitratos y déficit de silicatos) con irradiancia (baja, media y alta), se suministraron nutrientes extra diariamente para mantener la concentración de los nutrientes que no se deseaba inducir a estrés, tomando en cuenta la tasa de consumo previamente calculada.

Las tasas de crecimiento obtenidas para *T. dyctiotum* en este trabajo son comparables a las reportadas por otros autores en condiciones similares para otras diatomeas con alto potencial productor de PUFA y/o fucoxantina (Tabla XII).

La biomasa cosechada tuvo distintos colores relacionados con las condiciones nutrimentales de estrés a las que fue sometida. Los cultivos con déficit de nitrógeno resultaron pálidos debido a la falta de pigmentos, probablemente por un descenso en la producción de proteínas enzimáticas, la biomasa cosechada de los cultivos con déficit de silicatos fue más oscura debido a un mayor contenido de los pigmentos clorofila y fucoxantina (formando el complejo fotosintético); estos pigmentos probablemente se generaron debido a la acumulación de células bi-protoplásmicas (células en fase G2 del ciclo celular) que no pueden completar su división hasta que sean capaces de asimilar silicatos (De la Rocha y Passow, 2004).

Tabla XII. Tasas de crecimiento de diatomeas obtenidas en distintos estudios.

Autor	Especie	Sistema	Irradiancia	Nutrientes (mM)	Temperatura (°C)	Tasa de crecimiento (d ⁻¹)
Este trabajo	<i>T. dictyotum</i>	Semicontinuo, botella.	20-120	Nitrógeno (NaNO ₃): 0.882 Silicio (Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O): 0.106 Fósforo (NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O): 0.036	25	0.811 ± 0.22
Este trabajo	<i>T. dictyotum</i>	Semicontinuo, botella.	20-120	Nitrógeno (NaNO ₃): 0.882 Silicio (Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O): 0 Fósforo (NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O): 0.036	25	0.542 ± 0.164
Este trabajo	<i>T. dictyotum</i>	Semicontinuo, botella.	20-120	Nitrógeno (NaNO ₃): 0 Silicio (Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O): 0.106 Fósforo (NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O): 0.036	25	0.252 ± 0.203
Boelen (2013)	<i>Thalassiosira weissflogii</i>	Semicontinuo, bioreactor, columna.	75	Nitrógeno (NaNO ₃): 0.882 Silicio (Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O): 0.106 Fósforo (NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O): 0.036	16	0.42 ± 0.08
Boelen (2013)	<i>Thalassiosira weissflogii</i>	Semicontinuo, bioreactor, columna.	150	Nitrógeno (NaNO ₃): 0.882 Silicio (Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O): 0.106 Fósforo (NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O): 0.036	16	0.49 ± 0.09
Boelen (2013)	<i>Thalassiosira weissflogii</i>	Semicontinuo, bioreactor, columna.	10	Nitrógeno (NaNO ₃): 0.882 Silicio (Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O): 0.106 Fósforo (NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O): 0.036	20	0.31 ± 0.01
Xia et al. (2014)	<i>Odontella aurita</i>	Batch, bioreactor, columna	100	Nitrógeno: 6.000 Silicio: 0.420 Fósforo: 1.090	25	0.173
Xia et al. (2014)	<i>Odontella aurita</i>	Batch, bioreactor, columna	100	Nitrógeno: 18.000 Silicio: 0.420 Fósforo: 1.090	25	0.166

Continuación de Tabla XII

Autor	Especie	Sistema	Irradiancia	Nutrientes (mM)	Temperatura (°C)	Tasa de crecimiento (d ⁻¹)
Xia et al. (2014)	<i>Odontella aurita</i>	Batch, biorreactor, columna	300	Nitrógeno: 6.000 Silicio: 0.420 Fósforo: 1.090	25	0.156
Xia et al. (2014)	<i>Odontella aurita</i>	Batch, biorreactor, columna	300	Nitrógeno: 18.000 Silicio: 0.420 Fósforo: 1.090	25	0.192
Pasquet (2014)	<i>Odontella aurita</i>	Batch, matraz	300	Nitrógeno (NaNO ₃): 0.500 Silicio (Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O): 0.150 Fósforo (NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O): 0.050	8	0.491 ± 0.095
Pasquet (2014)	<i>Odontella aurita</i>	Batch, matraz	300	Nitrógeno (NaNO ₃): 0.500 Silicio (Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O): 0.150 Fósforo (NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O): 0.050	16	0.663 ± 0.148
Pasquet (2014)	<i>Odontella aurita</i>	Batch, matraz	300	Nitrógeno (NaNO ₃): 0.500 Silicio (Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O): 0.150 Fósforo (NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O): 0.050	24	0.813 ± 0.128

..

El porcentaje de cenizas calculado resultó menor en los cultivos con déficit de silicatos ya que éstos forman parte de las cenizas en las diatomeas; mientras que los cultivos con déficit de nitratos disminuyeron su contenido de materia orgánica al no sintetizar aminoácidos, proteínas, clorofila ni carbohidratos y por consiguiente su porcentaje de cenizas fue mayor (Hockin *et al.*, 2012). Debido a estos cambios en el contenido de materia inorgánica, las comparaciones entre los resultados de lípidos, ácidos grasos y pigmentos de este estudio se realizaron en unidades de MOS aunque también se realizaron los cálculos con en la materia seca (MS) total, estos datos se utilizaron para comparar con los resultados de otros autores, ya que en los trabajos con los que se compararon los resultados no hacen esta consideración (Boelen *et al.*, 2013; Pasquet *et al.*, 2014; Xia *et al.*, 2014).

El contenido de lípidos totales tiene una tendencia a incrementar conforme incrementa la irradiancia, pero el cultivar a la microalga con déficit de silicatos resulta en una proporción mayor de lípidos, sin ser necesario aplicar ambos tipos de estrés al mismo tiempo. Como describen Solovchenko *et al.* (2008) es posible que esta diatomea tienda a acumular más SFA y MUFA como almacén de energía bajo irradiancia alta y, contrario a lo esperado, la irradiancia no tiene efectos sobre la concentración de PUFA. En este trabajo el déficit de silicatos incrementó la concentración de todos los ácidos grasos, coincidiendo con lo descrito por De la Rocha y Passow (2004), pero en este caso los cultivos sometidos a irradiancia de $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y con nutrientes completos también produjeron cantidades altas de PUFA, posiblemente porque en estas condiciones la microalga alcanza su tasa de crecimiento más alta (Fig. 19) dando como resultado un gran número de células bi-protoplásmicas dividiéndose continuamente. La relación de PUFA n-3:n-6 en *T. dictyotum* es alta, e igual a 2.14, correspondiente con la tasa de crecimiento más alta, superando por mucho la relación recomendada por Wijendrn y Hayes (2004) que es de 1/6, por lo que se perfila como un alimento con muy buenas características nutrimentales.

Boelen *et al.* (2013), trabajaron con *Thalassiosira weissflogii*, una diatomea de zonas templadas con altas productividades de EPA y DHA, en cultivos semi-continuos observaron tasas de crecimiento máximas de 0.49 d^{-1} con irradiancia de $150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y de 0.42 d^{-1} a $75 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a $16 \text{ }^{\circ}\text{C}$, mientras que a $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (temperatura más cercana a la utilizada en este estudio) la mejor tasa que obtuvieron fue de 0.31 d^{-1} empleando una irradiancia de $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; estas tasas fueron obtenidas con nutrientes completos empleando medio f/2 de Guillard. En el presente trabajo *T. dictyotum* cultivada con nutrientes completos y con déficit de silicatos presentó tasas de crecimiento de entre 0.83 y 0.53 d^{-1} que son mayores a las obtenidas por Boelen *et al.* (2013) probablemente por la temperatura de cultivo que fue de $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, lo que indica un alto potencial de crecimiento de *T. dictyotum* que posiblemente puede incrementar suministrando CO_2 . El incremento en la irradiancia no tuvo efectos positivos o negativos sobre la tasa de crecimiento en el trabajo de Boelen *et al.* (2013), de manera similar en el presente trabajo tampoco se identificó algún efecto relacionado con la irradiancia al momento de comparar las tasas de crecimiento.

Otra diatomea conocida por su alto potencial productor de EPA y fucoxantina es *O. aurita* que tiene ya un amplio mercado como nutracéutico con diferentes estudios respecto de sus efectos fisiológicos en los organismos (Guihéneuf *et al.*, 2010; Haimeur *et al.*, 2012; Pasquet *et al.*, 2014; Xia *et al.*, 2014) y ha sido estudiada por Xia *et al.* (2013) en sus características de productividad. Estos autores evaluaron el efecto de la concentración de nutrientes y la irradiancia sobre el crecimiento de esta especie, emplearon un sistema estático de altas densidades ($1 - 6 \text{ g/l}$) con volúmenes menores de 400ml . Sus resultados indican que las tasas de crecimiento no se ven influenciadas por la irradiancia, lo que corresponde con lo observado en este trabajo con *T. dictyotum*; observaron también una relación proporcional entre la densidad celular y la concentración de nitrógeno obteniendo una tasa de crecimiento máxima de 0.464 d^{-1} con 18 mM a los 4 días de cultivo, a partir de este punto disminuyó su tasa de crecimiento en función del tiempo y también conforme se redujo el nitrógeno en el medio. Experimentando con la concentración de silicatos

las tasas de crecimiento variaron menos, sin embargo observaron una tasa máxima de 0.437 d^{-1} al cultivar con 0.42 mM de silicio al cuarto día de cultivo. Las tasas de crecimiento que obtuvieron Xia *et al.* (2013) fueron cercanas a la tasa de 0.53 d^{-1} obtenida en este trabajo cultivando a *T. dictyotum* con deficiencia de silicatos y son menores que la tasa de 0.83 d^{-1} obtenida cultivando con nutrientes completos; esto confirma el alto potencial de crecimiento de *T. dictyotum*.

Pasquet *et al.* (2014) también estudiaron a *O. aurita*, pero con interés únicamente en la producción de PUFA, experimentado con irradiancia alta ($300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y distintas temperaturas. La tasa de crecimiento que alcanzaron sus cultivos a $24 \text{ }^\circ\text{C}$ (0.813 d^{-1}) fue muy similar a la alcanzada por *T. dictyotum* cultivada con los nutrientes completos (0.811 d^{-1}); se observó en el estudio de Pasquet *et al.* (2014) que, conforme disminuye la temperatura también disminuye la tasa de crecimiento, contrario a lo observado por Boelen *et al.* (2013) en *T. weissflogii*, lo que puede indicar que cada especie tiene características metabólicas específicas.

Comparando la productividad de EPA y DHA de *T. dictyotum* con las obtenidas en el estudio de Boelen *et al.* (2013) (tabla XIII), se puede observar que se obtuvieron valores más altos con *T. dictyotum* sobre todo al ser cultivada con nutrientes completos y $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Al comparar las concentraciones de estos PUFA con las reportadas por Xia *et al.* (2014) se observó que ellos lograron concentraciones mayores tanto en AA como en EPA, esta diferencia puede deberse que utilizaron cantidades de nutrientes (nitratos, silicatos y fosfatos) casi 10 veces mayores que las del medio f/2 de Guillard. Esto sugiere que utilizando mayor cantidad de nutrientes se podría incrementar la concentración de AA, EPA y posiblemente DHA en *T. dictyotum*. Sin embargo, esta podría ser una opción poco rentable ya que solo incrementa 50 por ciento o menos la concentración de los PUFA, y debido a las tasas de crecimiento bajas que se observaron en su estudio, es probable que la productividad de AA y EPA sea baja. Por su parte, Pasquet *et al.* (2014) reportaron el porcentaje molar de las concentraciones de ácidos grasos y, de acuerdo con lo que describe, el contenido de PUFA se incrementó al disminuir la temperatura,

coincidiendo en este punto con Boelen *et al.* (2013). Comparando los porcentajes molares de AA, EPA y DHA de estos autores, con los obtenidos en *T. dictyotum*, en el presente trabajo, a 25 °C con nutrientes completos podemos observar que son mayores que los que obtuvieron Pasquet *et al.* (2014) a 24 °C, las proporciones a 16 °C son similares a las obtenidas con *T. dictyotum* y a 8 °C resultan mucho mayores lo resultados obtenidos con *O. aurita* en el estudio de Pasquet *et al.* (2014). Con esos resultados podemos suponer que, reduciendo la temperatura del cultivo disminuirá la tasa de crecimiento pero la concentración EPA y DHA se incrementaría.

T. dictyotum también tuvo resultados importantes en la producción de fucoxantina, alcanzando una concentración máxima de 4.14 mg·g⁻¹ MS; Xia *et al.* (2013) indicaron que la concentración mínima que obtuvieron en su estudio con *O. aurita* fue de 4.28 mg·g⁻¹ MS con cultivos a los que se les agregó 6 mM de nitratos, una cantidad muy grande comparada con los 0.882 mM de nitrato de sodio que se agregan al medio f/2 de Guillard. Esto es un dato importante ya que se observó que el nitrógeno influye mucho en la producción de pigmentos, esto se puede confirmar con los resultados de Xia *et al.* (2013) donde se puede observar algo similar, los cultivos con mayor cantidad de nitratos producen mayor cantidad de fucoxantina; otro factor que beneficia a la producción de fucoxantina y que se observa tanto en los resultados de Xia *et al.* (2013) como en los obtenidos con *T. dictyotum* es la baja irradiancia. Con esta información se puede suponer que si *T. dictyotum* se cultiva en un medio rico en nitratos combinado con baja irradiancia, incrementará su producción de fucoxantina y otros pigmentos también.

Tabla XIII. Comparación de la productividad, concentración y % molar obtenidos con *T. dictyotum* con resultados obtenidos en distintos estudios.

Autor	Organismo	AA			EPA			DHA					
		N	I	T	Productividad (mg·L ⁻¹ ·d ⁻¹)	Concentración (mg·g ⁻¹ MS)	%molar	Productividad (mg·L ⁻¹ ·d ⁻¹)	Concentración (mg·g ⁻¹ MS)	%molar	Productividad (mg·L ⁻¹ ·d ⁻¹)	Concentración (mg·g ⁻¹ MS)	%molar
Este trabajo	<i>T. dictyotum</i>	C	20	25	0.118 ± 0.003	1.019 ± 0.290	8.682	0.332 ± 0.010	2.859 ± 0.510	24.370	0.018 ± 0.001	0.154 ± 0.053	1.310
	<i>T. dictyotum</i>	C	70	25	0.279 ± 0.044	2.002 ± 0.492	8.761	0.712 ± 0.111	5.103 ± 0.115	22.336	0.047 ± 0.007	0.334 ± 0.100	1.460
	<i>T. dictyotum</i>	C	120	25	0.252 ± 0.016	1.809 ± 0.460	6.549	0.500 ± 0.031	3.585 ± 1.433	12.980	0.027 ± 0.002	0.196 ± 0.171	0.710
	<i>T. dictyotum</i>	-Si	20	25	0.065 ± 0.005	2.052 ± 0.390	5.039	0.200 ± 0.014	6.288 ± 0.783	15.443	0.017 ± 0.001	0.547 ± 0.096	1.344
	<i>T. dictyotum</i>	-Si	70	25	0.030 ± 0.005	1.041 ± 0.027	2.477	0.159 ± 0.026	5.545 ± 0.268	13.198	0.014 ± 0.002	0.481 ± 0.044	1.460
	<i>T. dictyotum</i>	-Si	120	25	0.080 ± 0.003	1.824 ± 0.194	2.753	0.323 ± 0.010	7.386 ± 0.658	11.146	0.027 ± 0.001	0.611 ± 0.083	0.922
Boelen et al. (2013)	<i>T. weissflogii</i>	C	75	16	-	-	-	0.119 ± 0.036	-	-	0.022 ± 0.007	-	-
Xia et al. (2014)	<i>O. aurita</i>	-Si	300	25	-	3.500	-	-	10.900	-	-	-	-
	<i>O. aurita</i>	C	300	25	-	4.200	-	-	9.700	-	-	-	-
Pasquet et al. (2014)	<i>O. aurita</i>	FE	300	8	-	-	-	-	-	38.910 ± 3.430	-	-	4.95 ± 0.87
	<i>O. aurita</i>	FE	300	16	-	-	1.090 ± 0.060	-	-	23.330 ± 1.740	-	-	2.85 ± 0.17
	<i>O. aurita</i>	FE	300	24	-	-	4.780 ± 0.480	-	-	18.310 ± 1.110	-	-	1.85 ± 0.37

N: nutrientes, I: irradiancia en $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, T: temperatura en °C, C: nutrientes completos del medio f/2 de Guillard, -Si: déficit de silicatos, -N: déficit de nitratos, FE: fase estacionaria. Valores promedios ± desviación estándar.

Al comparar la productividad de los ácidos grasos AA, EPA y DHA, se puede observar que el tratamiento adecuado para obtener altos valores de estos ácidos grasos es: cultivar con nutrientes completos e irradiancia de $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Con esta combinación de nutrientes e irradiancia se obtuvo alta productividad y concentración de los PUFA por *T. dictyotum*. De igual manera la productividad de pigmentos tanto fucoxantina como clorofilas también fueron altas en esas condiciones. Es importante recordar que también los cultivos con baja irradiancia y déficit de silicatos obtuvieron buenos resultados con respecto a la concentración de PUFA y pigmentos, sin embargo la disminución en la tasa de crecimiento afectó también a la productividad. Es decir en esas condiciones se requeriría de un menor gasto energético por iluminación y también un menor gasto en el suministro de los silicatos.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que *T. dictyotum* tiene un alto potencial biotecnológico como productora de PUFA y fucoxantina bajo las condiciones estudiadas, su tamaño y facilidad de cultivo son una ventaja para la cosecha que podría realizarse por decantación y filtración disminuyendo enormemente los costos de cosecha; además es posible que la productividad pueda incrementarse aún más, considerando las condiciones limitantes del medio f/2 y la carencia de un suministro continuo de carbono que, en este caso, se emplearon puesto que se pretendía iniciar el estudio formal de sus respuestas fisiológicas ante los estímulos aquí estudiados, así como buscar las mejores condiciones de cultivo con respecto a nutrientes e irradiancia para obtener la mayor cantidad de PUFA y fucoxantina.

9. CONCLUSIONES

Aunque hay muchos estudios que se pueden realizar aún con respecto al medio de cultivo adecuado y la fuente nitrógeno más adecuada (modificaciones a formulaciones ya existentes y diversas maneras de esterilizar y aplicar los nutrientes), para los fines de esta tesis se pudo establecer que el medio de cultivo óptimo para el desarrollo de *T. dictyotum* es el medio f/2 de Guillard con nitrato de sodio como fuente de nitrógeno.

El sistema de cultivo que permitió controlar las condiciones de crecimiento, ya fuera en condiciones control o de estrés nutricional, consistió en un sistema de dos etapas: la primera etapa permite incrementar la biomasa de la microalga y debe contar con las condiciones óptimas para su desarrollo, que incluyeron un suministro programado de silicatos, en la segunda etapa las células se colocan en medio fresco aplicando las condiciones de estrés correspondientes, lo que incluye agregar silicatos diariamente, de acuerdo a la tasa de consumo, a los cultivos que no se esté aplicando estrés por déficit de silicatos.

Con respecto a la hipótesis planteada, se observó que el déficit de nitratos después de tres días no induce a la producción de lípidos totales en *T. dictyotum* y contrario a lo planteado éstos disminuyen al compararlo con los resultados obtenidos cultivando con nutrientes completos. Los SFA y MUFA sí se incrementan tanto en baja como en alta irradiancia aunque los MUFA no incrementan con irradiancia media. Por otro lado no se incrementó la producción de PUFA o fucoxantina en ningún caso que incluyera el déficit de nitratos. Finalmente el crecimiento de la microalga se vio gravemente afectado, tal y como se esperaba. Este estrés tiene mejores aplicaciones en la producción de ácidos grasos saturados o monoinsaturados para la producción de biodiesel.

Para la segunda parte de la hipótesis se observó que el déficit de silicatos sí incrementó la concentración de lípidos totales y los SFA y MUFA se incrementan en mayor medida con alta irradiancia, mientras que los PUFA incrementan su

concentración tanto con alta como con baja irradiancia. La fucoxantina, tal y como se propuso en la hipótesis, aumentó su concentración solo al combinar el déficit de silicatos con baja irradiancia, aunque no ocurrió lo mismo con otros pigmentos antena, como la clorofila “c”, que se mantuvo sin cambios. El crecimiento de la microalga se vio afectado en menor medida que con déficit de nitratos, coincidiendo con lo descrito en la hipótesis, aun así se afectó negativamente la productividad final comparando con los cultivos sin estrés nutricional.

Cultivando a *T. dictyotum* con los nutrientes completos y combinado con una irradiancia media ($70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ aproximadamente) da como resultado una tasa de crecimiento alta y, aunque la concentración total de los PUFA no es tan alta como cuando sufre estrés, la productividad de AA, EPA y DHA es elevada al igual que la de los pigmentos fucoxantina, clorofila “a” y clorofila “c”. Así se concluye que éstas son las condiciones de cultivo apropiadas para alcanzar las productividades más altas de PUFA y pigmentos.

Las productividades de pigmentos y PUFA, principalmente fucoxantina y EPA, obtenidas en este trabajo son similares e incluso más altas que las reportadas para otras diatomeas.

Estos resultados indican que *T. dictyotum* es un organismo candidato a ser utilizado como fuente de compuestos bioactivos como fucoxantina y EPA.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Adenan, N. S., F. M. Yusoff, M. Shariff. 2013. Effect of salinity and temperature on the growth and diatoms and green algae. *J. Fish. Aquatic Science*. 8(2): 397- 404. Andersen, R. A. 1992. Diversity of eukaryotic algae. *Biodiv. Conserv.* 1: 267-292.
2. Arias-Peñaranda, M. T., R. O. Cañizares-Villanueva, A. J. Martínez-Roldán. 2013. Producción de biodiesel a partir de microalgas: parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. *A. Biol. Col.* 18(1): 43-68. Disponible en: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/32832/40207>.
3. Blankenship, R. E. 2002. *Molecular Mechanisms of photosynthesis*. Blackwell Science. Ltd. Segunda edición. Malden, U.S.A. 321 p.
4. Carrillo, W. 2013. Lisozima: Actividad antibacteriana y alergenicidad. *Actual. Nutr.* 14(4): 314-326.
5. Boelen, P., R. Van-Dijk, J. S. Sinninghe-Damsté, C. I. C. Rijpstra, A. G. J. Buma. 2013. On the potential application of polar and temperate marine microalgae for EPA and DHA production. *AMB Express* 3: 26.
6. Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Advan.* 25: 294-306.
7. Clesceri, L. S., A. E. Greenberg, A. D. Eaton. 1998. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. American Public Health Association. Vigésima edición. Washington, DC. 1220 p.
8. Costard, G. S., R. R. Machado, E. Barbarino, R. C. Martino, S. O. Lourenço. 2012. Chemical composition of five marine microalgae that occur on the Brazilian coast. *Int. J. Fish. Aquacult.* 4(9): 191-201.
9. Dever, L. A. y T. S. Dermody. 1991. Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics. *Arch. Intern. Med.* 151(5): 886-895.
10. Fidalgo, J. P., A. Cid, E. Torres, A. Sukenik, C. Herrero. 1998. Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. *Aquaculture* 166(1-2): 105-116.

11. Folch, J., M. Lees, G. H. Sloane-Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497–509.
12. Guedes, A. C., H. M. Amaro, F. X. Malcata. 2011. Microalgae as sources of carotenoids. *Mar. Drugs* 9: 625-644.
13. Guihéneuf, F., M. Fouqueray, V. Mimouni, L. Ulmann, B. Jacquette y G. Tremblin. 2010. Effect of UV stress on the fatty acid and lipid class composition in two marine microalgae *Pavlova lutheri* (Pavlovophyceae) and *Odontella aurita* (Bacillariophyceae). *J. Appl. Phycol.* 22(5): 629-638.
14. Guillard, R. R. L. 1972. Culture of the phytoplankton for feeding marine invertebrates. En: Smith, W. L., Chanley, M. H. (eds.) *Culture of marine invertebrate animals*. Springer Science & Business Media. Primera edición. New York, U.S.A. pp. 29-60.
15. Guiry, W. 2016. *Triceratium dictyotum* P.A.Sims & R.Ross (1990). En: Guiry, M. D., Guiry, G. M. (eds.) *AlgaeBase*. World-wide electronic publication. National University of Ireland, Galway. Consultado el 20 de marzo de 2016. Disponible en:
http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=40859.
16. Griffiths, M. J., R. P. Van Hille, S. T. L. Harrison. 2014. The effect of nitrogen limitation on lipid productivity and cell composition in *Chlorella vulgaris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98: 2345–2356.
17. Haimeur, A., L. Ulmann, V. Mimouni, F. Guéno, F. Pineau-Vincent, N. Meskini, G. Tremblin. 2012. The role of *Odontella aurita*, a marine diatom rich in EPA, as a dietary supplement in dyslipidemia, platelet function and oxidative stress in high-fat fed rats. *Lipids Health Dis.* 11(1): 147.
18. Healey, F. P., J. Coombs, B. E. Volcani. 1967. Changes in pigment content of the diatom *Navicula pelliculosa* (Bréb.) Hilse in silicon-starvation synchrony. *Archiv für Mikrobiol.* 59(1): 131-142.
19. Hockin, N. L., T. Mock, F. Mulholland, S. Kopriva, G. Malin. 2012. The response of diatom central carbon metabolism to nitrogen starvation is

- different from that of green algae and higher plants. *Plant Physiol.* 158: 299–312.
20. Hunter, E. O. Jr., I. McVeigh. 1961. The effects of selected antibiotics on pure cultures of algae. *Am. J. Bot.* 48(2): 179-185.
21. Karp, G. 2009. *Biología celular y molecular*. Mc Graw Hill Interamericana. Quinta edición. México, D.F. 927 p.
22. Karthikeyan, P., K. Manimaran, P. Sampathkumar, L. Rameshkumar. 2013. Growth and nutrient removal properties of the diatoms, *Chaetoceros curvisetus* and *C. simplex* under different nitrogen sources. *Appl. Water Sci.* 3:49–55
23. Keerthi, S., A. Sujatha, K. Uma-Devi y N. S. Sarma. 2013. Bioprospecting for nutraceutically useful marine diatom, *Odontella aurita* in the South-East Coast of India and medium optimization. *Int. J. Curr. Sci.* 6: E 22-28.
24. Kester, D. R., I. W. Duedall, D. N. Connors, R. M. Pytkowicz. 1967. Preparation of artificial seawater. *Limn. & Ocean.* 12(1):176-179.
25. Lananan, F., A. Jusoh, N. Ali, S. S. Lam, A. Endut. 2013. Effect of Conway medium and f/2 medium on the growth of six genera of South China sea marine microalgae. *Biores. Tech.* 141: 75-82.
26. Lewin, J. C. 1985. Heterotrophy in diatoms. *J. Gen. Microbiol.* 9: 305-313.
27. Levitan, O., J. Dinamarca, G. Hochman, P. G. Falkowski. 2014. Diatoms: a fossil fuel of the future. *Trends in Biotechnol.* 32(3): 117-120.
28. Massol-Deyá, A. y F. Fuentes. 2002. *Ecología de microorganismos. Manual de Laboratorios*. Disponible en:
<http://www.uprm.edu/biology/profs/massol/manual>
29. McFadden, G. I. 2001. Primary and secondary endosymbiosis and the origin of plastids. *J. Phycol.* 37: 951-959.
30. Min-Hyuk, O., H. K. Yun, L. Choon-Hwan, K. C. Ik. 2005. Effects of Six Antibiotics on the Activity of the Photosynthetic Apparatus and Ammonium Uptake of Thallus of *Porphyra yezoensis*. *Algae* 20(2): 121-125.

31. Moreno, J.L., S. Licea, H. Santoyo. 1996. Diatomeas del Golfo de California. Universidad Autónoma de Baja California Sur. Primera edición. La Paz, B.C.S. 272 p.
32. Ortiz-Moreno, M. L., C. E. Cortés-Castillo, J. Sánchez-Villarraga, J. Padilla, A. M. Otero-Paternina. 2012. Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas. *Orinoquia* 16(1): 11-20.
33. Park, S., J. E. W. Polle, A. Melis, T. K. Lee, E. S. Jin. 2006. Up-regulation of photoprotection and PSII-repair gene expression by irradiance in the unicellular green alga *Dunaliella salina*. *Mar. Biotechnol.* 8(2):120-128.
34. Pasquet, V., L. Ulmann, V. Mimouni, F. Guihéneuf, B. Jacquette, A. Morant-Manceau, G. Tremblin. 2014. Fatty acids profile and temperature in the cultures marine diatom *Odontella aurita*. *J. Appl. Phycol.* 26: 2265-2271.
35. Peng, J., J. Yuan, C. Wu, J. Wang. 2011. Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: metabolism and bioactivities relevant to human health. *Mar. Drugs* 9: 1806-1828.
36. Pérez-García, O., F. M. E. Escalante, L. E. de-Bashan, Y. Bashan. 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Res.* 45: 11-36.
37. Perille-Collins, M. L., M. Salton. 1979. Solubility characteristics of *Micrococcus lysodeikticus* membrane components in detergents and chaotropic salts analyzed by immunoelectrophoresis. *BBA* 553: 40-53.
38. Pahl, S. L., D. M. Lewis, K. D. King, F. Chen 2012. Heterotrophic growth and nutritional aspects of the diatom *Cyclotella cryptica* (Bacillariophyceae): effect of nitrogen source and concentration. *J. Appl. Phycol.* 24: 301–307.
39. Prieto, M. J., M. J. Mogollon, A. L. Castro, L. A. Sierra. 2005. Efecto del medio y condiciones de cultivo en la productividad de tres diatomeas marinas con potencial acuícola. *Rev. MVZ-Córdoba* 10(1): 544-554.
40. Pulz, O., W. Gross. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65: 635-648.

41. Qu, L., R. Wang, P. Zhao, R. Chen, W. Zhou, L. Tang, X. Tang. 2014. Interaction between *Chlorella vulgaris* and bacteria: interference and resource competition. *Acta Oceanol. Sin.* 33(1): 135–140.
42. Rishiram, R., K. Byung-Hyuk, C. Dae-Hyun, O. Hee-Mock, K. Hee-Sik. 2016. Algae–bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications. *Biotech. Adv.* 34(1): 14-29.
43. Ramaraj, S., S. Hemaiswarya, R. Raja, V. Ganesan, C. Anbazhagan, I. S. Carvalho, N. Juntawong. 2015. Microalgae as an attractive source for biofuel production. En: Thangavel, P., Sridevi, G. (eds.) *Environmental sustainability: Role of green technologies*. Springer. Primera edición. India, pp: 129-158.
44. Raven, J. A., M. C. W. Evans, R. E. Korb. 1999. The role of the trace metals in photosynthetic electron transport in O₂-evolving organisms. *Photosynth. Res.* 60: 111-149.
45. Rivero-Rodríguez, S., A. R. Beaumont, M. C. Lora-Vilchis. 2007. The effect of microalgal diets on growth, biochemical composition, and fatty acid profile of *Crassostrea corteziensis* (Hertlein) juveniles. *Aquacult.* 263: 199-210.
46. De la Rocha, C. L., U. Passow. 2004. Recovery of *Thalassiosira weissflogii* from nitrogen and silicon starvation. *Limnol. Oceanogr.* 49(1): 245–255.
47. Roessler, P. G. 1988. Effects of silicon deficiency on lipid composition and metabolism in the diatom *Cyclotella Cryptica*. *J. Phycol.* 24: 394-400.
48. Round, F. E., R. M. Crawford, D.G. Mann. 1990. *The Diatoms*. Cambridge University Press. Primera edición. Cambridge, UK. 747 p.
49. Silva, S., G. Turchini, D. Francis. 2012. Nutrition. En: Lucas, J. S., Southgate. P. C. (eds.) *Aquaculture: Farming aquatic animal and plants*. Wiley-Blackwell publications. Segunda edición. Oxford, U. K., pp: 164-187.
50. Sims, P. A., R. Ross. 1990. *Triceratium pulvinar* and *T. unguiculatum*, two confused species. *Diat. Res.* 5(1): 155-169.
51. Solomon, E. P., I. R. Berg, D. M. Martin, C. Villee. 2001. *Biología*. Mcgraw-Hill interamericana. Quinta edición. México, D. F. 876p.

52. Solovchenko, A. E. 2013. Physiology and adaptative significance of secondary carotenogenesis in green microalgae. *Rus. J. Plant Physiol.* 60(1): 1-13.
53. Taguchi, S., J. A. Hirata, E. A. Laws 1987. Silicate deficiency and lipid synthesis of marine diatoms. *J. Phycol.* 23: 267-273.
54. Tidwell, W. L., C. D. Heather, C. Merkle. 1955. An autoclave-sterilized medium for the detection of urease activity. *J. Bacteriol.* 69(6): 701–702.
55. Thamatrakoln, K., M. Hildebrand. 2008. Silicon uptake in diatoms revisited: A model for saturable and nonsaturable uptake kinetics and the role of silicon transporters. *Plant. Phys.* 146: 1397-1407.
56. Simopoulos, A. P. 2008. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp. Biol. Med.* 233: 674-688.
57. Strickland, J. D. H., T. R. Parsons. 1972. A practical handbook of seawater analysis. Alger Press Ltd. Segunda edición. Ontario, Canada. 327p.
58. Tompkins, J., M. M. Deville, J. G. Day, M. F. Turner. 1995. Catalogue of strains. Culture collection of algae and protozoa. Sexta edición. Cumbria, U. K. 204p.
59. Valenzuela, A., R. Valenzuela, J. Sanhueza, F. de la Barra, G. Morales. 2014. Fosfolípidos de origen marino: una nueva alternativa para la suplementación con ácidos grasos omega-3. *Rev. Chil. Nutr.* 41(3): 433-438.
60. Vidussi, F., H. Claustre, J. Bustillos-Guzmán, C. Cailliau, J. C. Marty. 1996. Determination of chlorophylls and carotenoids of marine phytoplankton: separation of chlorophyll a from divinyl-chlorophyll a and zeaxanthin from lutein. *J. Plank. Res.* 18(12): 2377-2382.
61. Watanabe, M. M. 2005. Freshwater culture media. En: Andersen, R. A. (ed.) *Algal culturing techniques*. Elsevier Academic Press. Primera edición. China. Pp: 13-20
62. Wijendran, V., K. C. Hayes. 2004. Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health. *ANNU. Rev. Nutr.* 24: 597-615.

63. Wilkie, A. C., S. J. Edmundson, J. G. Duncan. 2011. Indigenous algae for local bioresources production: Phycoprospecting. *Ener. Sust. Develop.* 15: 365-371.
64. Wright, S. W., S. W. Jeffrey, R. F. C. Mantoura, C. A. Llewellyn, T. Bjornland, D. Repeta, N. Welschmeyer. 1991. Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 77: 183-196.
65. Xia, S., K. Wang, L. Wan, A. Li, Q. Hu, C. Zhang. 2013. Production, characterization, and antioxidant activity of fucoxanthin from the marine diatom *Odontella aurita*. *Mar. Drugs* 11: 2667-2681.
66. Xia, S., B. Gao, A. Li, J. Xiong, Z. Ao, C. Zhang. 2014. Preliminary characterization, antioxidant properties and production of chrysolaminarin from marine diatom *Odontella aurita*. *Mar. Drugs* 12(9): 4883-4897.
67. Yang, Z., Y. Ma, J. Zheng, W. Yang, J. Liu, H. Li. 2014. Proteomics to reveal metabolic network shifts towards lipid accumulation following nitrogen deprivation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Appl. Phycol.* 26: 73-82.

11. ANEXOS

ANEXO 1. Formulación del Medio f/2 de Guillard

Las siguientes soluciones stock se añaden al agua de mar filtrada y estéril en relación de 1 mL de solución por cada L de agua.

Compuesto	Fórmula	Cantidad (g/L en soluciones stock)
Nitrato de sodio	NaNO ₃	75
Fosfato de sodio dibásico	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	5
Metasilicato de sodio	Na ₂ SiO ₃	30
Solución Stock de metales traza		
EDTA	-	4.36
Cloruro férrico hexahidratado	FeCl ₃ ·6H ₂ O	3.15
Cloruro de manganeso tetrahidratado	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.18
Sulfato de zinc	ZnSO ₄	0.022
Cloruro cobaltoso hexahidratado	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.01
Sulfato cúprico pentahidratado	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0098
Molibdato de sodio dihidratado	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.0063
Solución Stock de Vitaminas		
Tiamina	-	0.2
Cianocobalamina	-	0.01
Biotina	-	0.1

ANEXO 2. Formulación del Medio Conway

Las siguientes soluciones stock se añaden al agua de mar filtrada y estéril en relación de 1 mL de solución por cada L de agua.

Compuesto	Fórmula	Cantidad (g/L en soluciones stock)
Nitrato de sodio	NaNO ₃	100
Fosfato de sodio dibásico	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	20
Metasilicato de sodio	Na ₂ SiO ₃	30
EDTA	-	45
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	33.6
Solución Stock de metales traza		
Cloruro férrico hexahidratado	FeCl ₃ ·6H ₂ O	1.3
Cloruro de manganeso tetrahidratado	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.36
Cloruro de zinc	ZnCl ₂	4.2
Cloruro cobaltoso hexahidratado	CoCl ₂ ·6H ₂ O	4
Sulfato cúprico pentahidratado	CuSO ₄ ·5H ₂ O	4
Molibdato de amonio tetrahidratado	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	1
Solución Stock de vitaminas		
Tiamina	-	0.2
Cianocobalamina	-	0.01
Biotina	-	10

ANEXO 3. Formulación del agua marina sintética

Sales	Fórmula	Cantidad (g/Kg de solución)
Cloruro de sodio	NaCl	23.926
Sulfato de sodio	Na ₂ SO ₄	4.008
Cloruro de potasio	KCl	0.677
Bicarbonato de sodio	NaHCO ₃	0.196
Bromuro de potasio	KBr	0.098
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	0.026
Fluoruro de sodio	NaF	0.003
Cloruro de magnesio hexahidratado	MgCl ₂ ·6H ₂ O	10.831
Cloruro de calcio dihidratado	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.518
Cloruro de estroncio hexahidratado	SrCl ₂ ·6H ₂ O	0.024

Para más detalles de la preparación del agua sintética consultar a Kester *et al.* (1967)

ANEXO 4. Procedimiento realizado para seleccionar un tratamiento para eliminar bacterias en los cultivos

Debido a la contaminación con un gran número de bacterias se tuvo que establecer una metodología que redujera el número de bacterias en el medio y que permitiera la omisión del uso de antibióticos (esto para evitar algunos efectos secundarios que se han observado).

Para reducir el número de bacterias en la cepa de *T. dictyotum* se experimentó con metodologías que implicaron el uso de las siguientes sustancias:

1. Triton X-100: detergente no iónico emulsificante. Este detergente rompe los conglomerados de proteínas para promover la actividad enzimática (Perille-Collins y Salton, 1979).
2. Lisozima: es una enzima que destruye las paredes celulares de ciertas bacterias Gram-positivas (Carrillo, 2013).
3. Ácido clorhídrico (HCl).

En la tabla XIV se detalla la metodología utilizada con cada una de las sustancias para tratar 10 mL de inóculo con densidad celular aproximada de $80000 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$:

Tabla XIV. Descripción de los tratamientos para reducir la contaminación por bacterias.

Sustancia	Concentración	Cantidad utilizada (ml)	Tratamientos adicionales
Tritón X-100	5%	10	2 lavados posteriores con agua marina estéril, sonicación por 30 s entre lavados
		5	
		2.5	
Lisozima	0.3 mg/ml	1	2 lavados con agua marina estéril previos a añadir la lisozima.
	0.5 mg/ml	1	
HCl	1 N	2.5	2 lavados posteriores con agua marina estéril, sonicación por 30 s entre lavados.
		1	
		0.5	

Los inóculos así tratados se llevaron a un volumen final de 25 mL con medio f/2 y después de 4 días de cultivo se escalaron a volumen de 500 mL.

Para comprobar la reducción de la población bacteriana se observó una muestra de cada cultivo tratado en microscopio óptico a 40x.

Resultados

Los resultados obtenidos de este experimento fueron cualitativos. Con esto se determinó que los tratamientos con Tritón X-100 y lisozima fueron ineficaces sin importar la concentración utilizada. En el caso del tratamiento con HCl 1N, se logró reducir la población de bacterias notablemente, sin embargo hubo gran mortalidad de la microalga, solo en el tratamiento con 0.5 mL de HCl 1N hubo suficientes células sobrevivientes para generar un cultivo y la obtención de un inóculo para el escalamiento del cultivo (Fig. 34 y 35).

Después de obtener cultivos con poblaciones bacterianas muy bajas se observaron algunas cosas interesantes que no se esperaban, como lo fue un crecimiento mucho más acelerado de lo observado anteriormente, y por lo tanto se generó mayor cantidad de biomasa en menor tiempo.

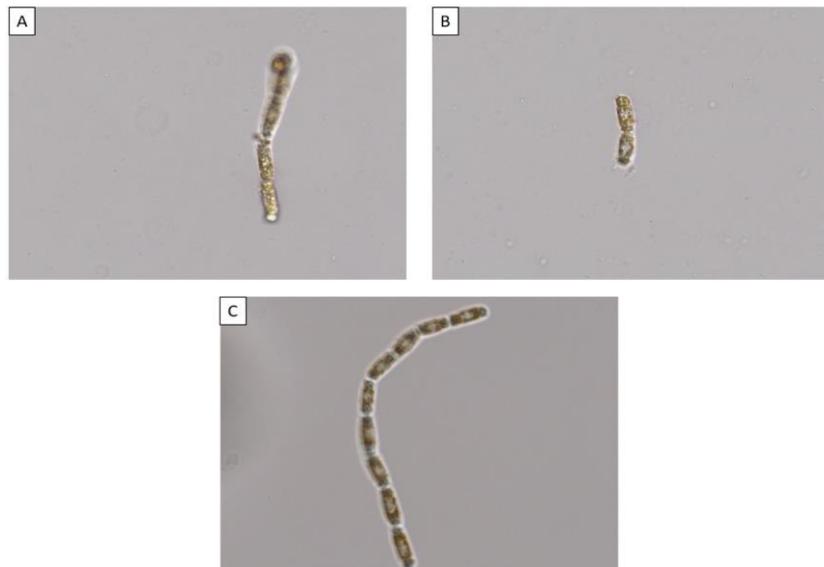


Figura 34. Fotografías de *T. dictyotum* observada al microscopio óptico con luz blanca, de cultivos tratados para reducir su población de bacterias. A) Tratamiento con Lisozima. B) Tratamiento con Tritón X-100. C) Tratamiento con 0.5ml de HCl 1N.

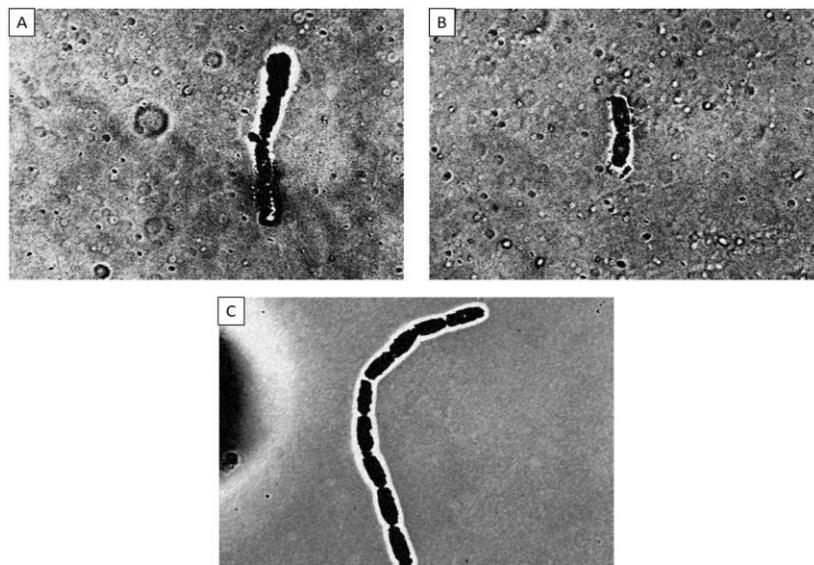


Figura 35. Fotografías en contraste de fases observadas al microscopio óptico, de cultivos tratados para reducir su población de bacterias. A) Tratamiento con Lisozima. B) Tratamiento con Tritón X-100. C) Tratamiento con 0.5ml de HCl 1 N.