



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**MODIFICACIÓN DEL CONTENIDO BIOQUÍMICO
(CARBOHIDRATOS, LÍPIDOS, PROTEÍNAS) Y DEL PERFIL DE
ÁCIDOS GRASOS, EN DOS ESPECIES DE MICROALGAS,
MEDIANTE EL EMPLEO DE LUZ MONOCROMÁTICA
PRODUCIDA CON LEDES EN FOTOBIORREACTORES DE FLUJO
SEMI-CONTINUO.**

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

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

P r e s e n t a

Hamid Armando Tejas Álvarez

La Paz, Baja California Sur, marzo 2017.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12:00 horas del día 15 del Mes de febrero del 2017, 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:

"MODIFICACIÓN DEL CONTENIDO BIOQUÍMICO (CARBOHIDRATOS, LÍPIDOS, PROTEÍNAS) Y DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS, EN DOS ESPECIES DE MICROALGAS, MEDIANTE EL EMPLEO DE LUZ MONOCROMÁTICA PRODUCIDA CON LEDES EN FOTOBIORREACTORES DE FLUJO SEMI-CONTINUO."

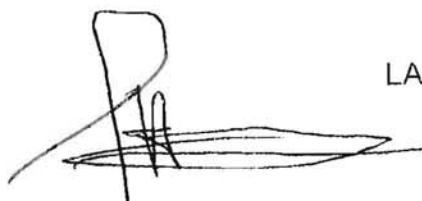
Presentada por el alumno:

Tejas Álvarez Hamid Armando

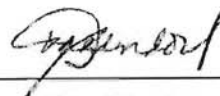
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Biotecnología.**

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.

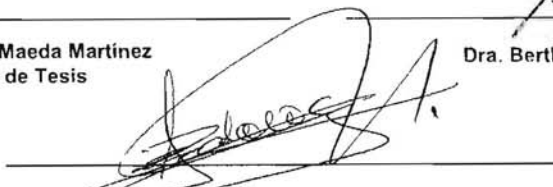
LA COMISIÓN REVISORA



Dr. Alfonso N. Maeda Martínez
Director de Tesis



Dra. Bertha O. Arredondo Vega
Co-Tutor



Dr. Teodoro Reynoso Granados
Co-Tutor



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

Comité tutorial

Dr. Alfonso Nivardo Maeda Martínez, Director de tesis.

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR)

Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega, Cotutor.

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR)

Dr. Teodoro Reynoso Granados, Cotutor.

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR)

Comité revisor de tesis

Dr. Alfonso Nivardo Maeda Martínez

Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega

Dr. Teodoro Reynoso Granados

Jurado de examen de grado

Dr. Alfonso Nivardo Maeda Martínez

Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega

Dr. Teodoro Reynoso Granados

Suplente

Dr. José Manuel Mazon Suastegui

Resumen

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la luz monocromática producida con diodos emisores de luz (ledes) a diferentes irradiancias, sobre el crecimiento y la calidad de las microalgas *Chaetoceros calcitrans* y *Tisochrysis lutea* cultivadas en fotobiorreactores de flujo semi-continuo de 180 L de capacidad. De manera preliminar se determinó el efecto de la irradiancia producida con ledes blancos ($\lambda_{nm} = 560$), sobre la concentración celular de *C. calcitrans* para descartar una posible fotoinhibición en el rango 300-1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Posteriormente se evaluó el efecto de la calidad (longitud de onda) de la luz monocromática producida con ledes blancos, azules y rojos, sobre la concentración celular, el tamaño y masa celulares, el contenido bioquímico, y el perfil de ácidos grasos, a 300 y 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los resultados indican que a 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ la concentración celular de *C. calcitrans* se duplica ($2.9 \times 10^6 \text{ cél mL}^{-1}$) con respecto a la obtenida a 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($1.4 \times 10^6 \text{ cél mL}^{-1}$). En cuanto a la calidad de luz, las concentraciones celulares promedio y máximas fueron más altas con ledes rojos ($\lambda_{nm} = 660$) en ambas especies, seguidas por azules ($\lambda_{nm} = 440$) y con blancos a la misma irradiancia. Sin embargo, no hubo efecto de los ledes de diferentes colores sobre el tamaño y masa celular de *C. calcitrans*, pero hubo una reducción de 9.1 a 4.5 pg cél^{-1} en *T. lutea* cuando se iluminó con ledes rojos a la máxima irradiancia. Además, con ledes rojos, no hubo un patrón de variación claro en el contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos de *C. calcitrans*, pero hubo un incremento significativo de los tres componentes celulares en *T. lutea*. En cuanto al perfil de lípidos, y particularmente sobre los ácidos grasos esenciales, no hubo efecto de la calidad de la luz sobre el contenido de EPA y DHA de *C. calcitrans* a la máxima irradiancia al día 20 de cultivo, pero hubo una reducción en el contenido de EPA con luz roja a 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La misma reducción en el contenido de EPA se registró en *T. lutea* con luz roja a 300 y 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, pero un resultado opuesto y consistente resultó en *T. lutea* sobre el contenido de DHA a ambas irradiancias. Las concentraciones de DHA se elevaron de 0.8 a 6.1 % del total de ácidos grasos a 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, y de 0.8 a 7.9 % a 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En conclusión, el presente estudio representa una mejora de la tecnología de producción de microalgas como alimento vivo de larvas y juveniles de moluscos. Con el empleo de ledes rojos a 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se incrementan las concentraciones celulares en ambas especies, pero además se incrementa la calidad de las células de *T. lutea* en cuanto al contenido bioquímico y de DHA. La baja concentración de EPA en *T. lutea*, se podría compensar suministrando *C. calcitrans*, la cual contiene altos niveles de EPA.

Palabras clave: ledes, ácidos grasos, *Chaetoceros calcitrans*, *Tisochrysis lutea*, fotobiorreactor.

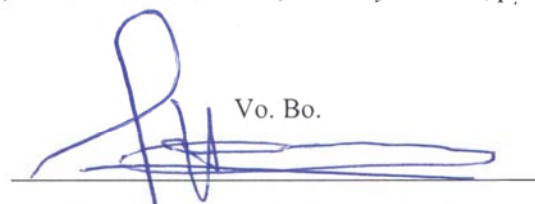

Vo. Bo.

Dr. Alfonso Nivardo Maeda Martínez
Director de Tesis

Summary

In the present work, it was evaluated the effect of monochromatic light produced with light emitting diodes (leds) at different irradiances, over growth and quality of the microalgae *Chaetoceros calcitrans* and *Tisochrysis lutea* cultivated on semicontinuous-flow photobioreactor of 180 L of capacity. In a preliminary way, it was determined the effect of the irradiance produced with white leds ($\lambda_{nm} = 560$) over the cellular concentration of *C. calcitrans* to reject a possible photoinhibition in the range of 300 and 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Later, it was evaluated the effect of the quality (wavelength) of monochromatic light produced with white, blue and red leds at 300 and 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ over the cellular concentration and mass, the biochemical content and fatty acids profile. The results indicate that at 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ the cellular concentration of *C. calcitrans* duplicates ($2.9 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$) with respect to that obtained at 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($1.4 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$). Concerning the light quality, the average and maximums cell concentrations were the highest with red leds ($\lambda_{nm} = 660$) in both species, followed by blue leds ($\lambda_{nm} = 440$) and finally white leds at the same irradiance. Nevertheless, there was no effect with none of the leds tested on cellular size and mass of *C. calcitrans* but there was a reduction of 9.1 to 4.5 pg cel^{-1} of cell size for *T. lutea* when it was exposed to red leds at the highest irradiance. Moreover, with red leds there wasn't a clear pattern of variation in the content of proteins, carbohydrates and lipids of *C. calcitrans*, but there was a statistically significant increment on the main three cellular component of *T. lutea*. Regarding the lipid profile and mainly the essential fatty acids, there was no effect of the light quality over the content of EPA and DHA in *C. calcitrans* at the highest irradiance at day 20 of the culture, but there was a reduction in the content of EPA in red light at 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The same reduction in the content of EPA was registered in *T. lutea* with red light at 300 y 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, but there was an opposite and consistent result in *T. lutea* over the content of DHA in both irradiances. DHA concentrations rose from 0.8 to 6.1 % of the total of fatty acids at 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, and from 0.8 to 7.9 % in 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. In conclusion, the present study represents an improvement of microalgae production as a live feed of larvae and juveniles of mollusks. With the use of red leds at 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ we will rise the cellular concentrations of both species, but in addition we will rise the quality of *T. lutea* cells, and its biochemical content and DHA. The low concentration of EPA in *T. lutea* could be compensate providing *C. calcitrans*, which has a high content of EPA.

Key Words: leds, fatty acids, *Chaetoceros calcitrans*, *Tisochrysis lutea*, photobioreactor.


 Vo. Bo.

 Dr. Alfonso Nivardo Maeda Martínez
 Director de Tesis

Dedicatoria

“A todos los que de manera directa e indirecta han estado presentes...

A los que se fueron y me dejaron valiosas lecciones...

Y a los que todavía queda por conocer...”

Agradecimientos

Al CIBNOR como institución receptora de los estudios de Posgrado y al CONACyT por la beca número 336527 otorgada.

A mi director de tesis, el Dr. Alfonso Nivardo Maeda Martínez por toda la sabiduría transmitida no solo académica si no personal, gracias por su paciencia y por dejarme ser a pesar de mis altibajos.

A mi comité tutorial, a la Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega por todos sus consejos, por todo el apoyo en la elaboración de los experimentos y por abrirme las puertas de su laboratorio el cual fue mi segundo hogar. Al Dr. Teodoro Reynoso por todos sus consejos durante las reuniones de comité las cuales me sirvieron mucho para poder terminar esta tesis, muchas gracias.

Al área de posgrados, a la Dra. Norma Yolnda Hernández Saavedra, Lic. Leticia González Rubio Vera, Lic. Claudia Elizabeth Olachea León, Lic. Osvelia Ibarra Morales, Tania Verónica Núñez Valdez por todo el apoyo administrativo y de manera particular al Lic. Horacio Sandoval Gómez por todo el apoyo técnico informático brindado.

Al M en C. Philippe Danigo, Director General de la empresa Marimex del Pacífico, S.A. de C.V. por permitir la realización de esta investigación en las áreas de producción de la empresa y a todos los técnicos que me apoyaron: Brenda Monroy, Araceli Pérez Bravo y Adalberto Parrales, así como en su momento al M. en C. Daniel Matus, a la Biol. Evelyn Rodríguez, M. en C. Víctor López y a la Ing. Verónica Mayer por todo el apoyo técnico, sin Ustedes esta tesis no se hubiera hecho.

A Jorge Cobos Anaya, Alfonso Álvarez Casillas, Guillermo García Cortéz y a Carlos Soto Carrasco por todo su apoyo técnico en el taller, por ayudarme a realizar el diseño de figuras y por apoyarme en cuestión de materiales, mi más grande agradecimiento.

A la Dra. María del Pilar Sánchez Saavedra del CICESE por el apoyo en la determinación de los espectros de luz producidos por los tres tipos de LEDS usados.

Al Laboratorio de Microalgas por todo su apoyo: a la Dra. Maria Concepción Lora Vilchis, a los técnicos Gabriela Mendoza Carrión, Julián Alfonso Garzón Fabela, Adriana Greene Yee y a Marte Felix Virgen.

Al M en C. Mario Osuna García, Técnico Titular del CIBNOR por el apoyo y orientación brindados, cuando se desempeñó como responsable de la producción de semilla de ostión japonés en el Laboratorio Innova 1 de la empresa Marimex del Pacífico, S.A. de C.V.

Al Laboratorio de Biotecnología de Microalgas: a la Dra. Laura Carreon Palaú por su enorme paciencia y todo el apoyo técnico brindado, Laura mil gracias. A mis compañeros y amigos de laboratorio por todo el apoyo técnico y moral, por las risas compartidas y los buenos momentos: Fredy, Araceli, Diana, Mónica, Rosalinda, Javier (el peruano-francés), Jessica C., Jessica (bebé), Alonso.

Al Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle por su apoyo en el uso de instrumentos de laboratorio, así como al técnico Arturo Sierra Beltrán del Laboratorio de Proteómica por su apoyo.

A la MGGI. Ileana Serrano Fraire por sus consejos y apoyo en la redacción de las patentes, muchas gracias.

A mis amigos y compañeros de maestría que hicieron de esta etapa de mi vida un recuerdo memorable, algo que me llevaré por siempre en el corazón, por todas las risas y llantos compartidos, las pláticas del universo y de banalidades. Ustedes saben quiénes son y no necesito decirlo.

De manera especial a mis dos peces favoritos, a la M. en C. Rubí Martínez y la M. en C. Ylenia Murillo, dos personas que no pensé que cambiarían mi manera de ver la vida, que me enseñaron a reírme de las cosas simples, a perdonar, a ser más paciente, a ser más perseverante y a conocer el verdadero significado de la amistad, muchas gracias por los viajes, las experiencias, las risas, los llantos, el aguantarme cuando andaba de insoportable, ustedes son la familia que yo escogería sin dudar si volviera a nacer, muchas gracias, y citando “ya casi las quiero”.

A mis amigos de toda la vida que, aunque pasen los años siempre estamos ahí el uno para el otro, dándonos consejos, echándonos buenas vibras, compartiendo risas y experiencias: Delia, Pilar, Ariana, Hector.

A la familia Salazar Rotunno, a Benjamín, Olivia, Elleonora y Jesús, por todos los buenos momentos, los consejos, que me vieron crecer y me dieron sus palabras de aliento cuando me vieron tirando la toalla en la realización de mi maestría, muchas gracias por compartir su tiempo conmigo, por dejarme vivir experiencias a su lado, gracias de corazón... “Tantos siglos, tantos mundos, tanto espacio y coincidir”.

A la familia Mendoza Muñoz a Héctor, Irene, Cecilia y Héctor (Jr.), Ustedes me vieron crecer durante muchos años y me da gusto haber podido compartir esta etapa tan importante de mi vida con ustedes, gracias por los consejos, por dejarme ser parte de su familia y abrirme las puertas de su casa, por compartir experiencias, por las risas, las palabras de aliento, por las deliciosas cenas y comidas, por todo, muchas gracias, no tengo palabras para expresar mi agradecimiento por ser seres humanos tan cálidos conmigo.

Y claro agradecer a las personas que me vieron crecer durante toda una vida, que me conocen a la perfección y que me apoyaron durante todo este gran trayecto, que me impulsaron a ser una mejor versión de mí todo el tiempo, que son mis pilares y mi inspiración, que no me dejan caer nunca, a mis padres Armando y Gloria, y a mi hermana Zulleth, ustedes saben lo importantes que son para mí a pesar de todo, los amo.

A mi compañero de vida, a ti que te debo la motivación extra para concluir este proyecto, tu que me has demostrado que el amor incondicional entre dos personas existe, que me has demostrado ser una persona con la que quiero envejecer, a ti Azael Enciso, gracias por todo.

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Lista de figuras	viii
Lista de tablas	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
3. JUSTIFICACIÓN	11
4. HIPÓTESIS	11
4.1 Pregunta científica	11
4.2 Hipótesis	11
5. OBJETIVOS	11
5.1 Objetivo general	11
5.2 Objetivos particulares	11
6. MATERIAL Y MÉTODOS	12
6.1 Selección y caracterización de los diodos emisores de luz	12
6.2 Materiales y métodos para cubrir el objetivo particular 1	14
6.3 Materiales y métodos para cubrir el objetivo particular 2	17
6.4 Materiales y métodos para cubrir el objetivo particular 3	23
6.5 Análisis estadísticos	25
7. RESULTADOS	25
7.1 Resultados del objetivo particular 1	25
7.1.1 Cultivos en diferentes irradiancias	25
7.2 Resultados del objetivo particular 2	27
7.2.1 Variables fisicoquímicas	27

7.2.2 Concentración celular	28
7.2.3 Contenido bioquímico	30
7.2.4 Perfil de ácidos grasos	35
7.3 Resultados del objetivo particular 3	41
7.3.1 Variables fisicoquímicas	41
7.3.2 Concentración celular y tamaño celular	42
7.3.3 Composición bioquímica de <i>C. calcitrans</i> y <i>T. lutea</i>	45
7.3.4 Ácidos grasos de <i>C. calcitrans</i> y <i>T. lutea</i>	48
8. DISCUSIÓN	52
8.1 Discusión del objetivo particular 1	52
8.2 Discusión del objetivo particular 2	53
8.3 Discusión del objetivo particular 3	56
8.4 Discusión general	56
9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	58
10. LITERATURA CITADA	60
11. ANEXOS	68

Lista de figuras

Figura 1. Espectro de emisión de un LED blanco	13
Figura 2. Espectro de emisión de un LED rojo	13
Figura 3. Espectro de emisión de un LED azul	14
Figura 4. Fotobiorreactor empleado en el cultivo semicontinuo de microalgas	15
Figura 5. Concentración celular de <i>C. calcitrans</i> cultivada en diferentes irradiancias	27
Figura 6. Concentraciones celulares de <i>C. calcitrans</i> cultivadas en luz blanca, azul y roja a 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$	29
Figura 7. Concentraciones celulares de <i>T. lutea</i> cultivada en luz blanca, azul y roja a 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$	30
Figura 8. Carbohidratos totales de <i>C. calcitrans</i> cultivada a 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$	32
Figura 9. Carbohidratos totales de <i>T. lutea</i> cultivada a 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$	32
Figura 10. Lípidos totales de <i>C. calcitrans</i> cultivada a 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$	33
Figura 11. Lípidos totales de <i>T. lutea</i> cultivada a 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$	33
Figura 12. Proteínas totales de <i>C. calcitrans</i> cultivada a 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$	34
Figura 13. Proteínas totales de <i>T. lutea</i> cultivada a 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$	35
Figura 14. Análisis de similitud de los ácidos grasos de <i>C. calcitrans</i> expuesta a luz azul y roja	40
Figura 15. Análisis de similitud de los ácidos grasos de <i>C. calcitrans</i> expuesta a luz blanca y roja	40
Figura 16. Concentraciones celulares registradas para <i>C. calcitrans</i> cultivada en luz blanca y roja a 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$	43
Figura 17. Concentraciones celulares registradas para <i>T. lutea</i> cultivada en luz blanca y roja a 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$	43
Figura 18. Tamaño celular registrado para <i>T. lutea</i> cultivada a 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$	44
Figura 19. Carbohidratos totales de <i>C. calcitrans</i> cultivada a 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$	46
Figura 20. Carbohidratos totales de <i>T. lutea</i> cultivada a 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$	46
Figura 21. Lípidos totales de <i>C. calcitrans</i> cultivada a 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$	47
Figura 22. Lípidos totales de <i>T. lutea</i> cultivada a 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$	47
Figura 23. Proteínas totales de <i>C. calcitrans</i> cultivada a 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$	49
Figura 24. Proteínas totales de <i>T. lutea</i> cultivada a 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$	49

Lista de tablas

Tabla I. Clasificación taxonómica de <i>Chaetoceros calcitrans</i>	6
Tabla II. Clasificación taxonómica de <i>Tisochrysis lutea</i>	7
Tabla III. Contenido bioquímico de <i>C. calcitrans</i> y <i>T. lutea</i> expresado en porcentaje del total de carbohidratos, lípidos y proteínas	7
Tabla IV. Efectos de la luz monocromática en diferentes especies de microalgas	10
Tabla V. Gradiente de irradiancias utilizadas en el cultivo de <i>C. calcitrans</i>	16
Tabla VI. Diseño experimental del objetivo particular 2	17
Tabla VII. Diseño experimental del objetivo particular 3	23
Tabla VIII. Parámetros fisicoquímicos registrados para <i>C. calcitrans</i> cultivada en diferentes irradiancias	26
Tabla IX. Concentración celular y productividad registrada para <i>C. calcitrans</i> en diferentes irradiancias	27
Tabla X. Variables fisicoquímicas registradas en los reactores de <i>C. calcitrans</i> y <i>T. lutea</i> cultivadas a 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$	28
Tabla XI. Contenido bioquímico de los inóculos de <i>C. calcitrans</i> y <i>T. lutea</i> empleados en el experimento	30
Tabla XII. Perfil de ácidos grasos de <i>C. calcitrans</i> cultivada a 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a diferentes tratamientos de luz, y a los 0, 4, 7 y 20 días de iniciado el experimento	37
Tabla XIII. Perfil de ácidos grasos de <i>T. lutea</i> cultivada a 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a diferentes tratamientos de luz, y a los 0, 4, 7 y 20 días de iniciado el experimento	40
Tabla XIV. Variables fisicoquímicas registradas en los fotobiorreactores de <i>C. calcitrans</i> y <i>T. lutea</i> a 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$	42
Tabla XV. Contenido bioquímico de <i>C. calcitrans</i> y <i>T. lutea</i> al tiempo 0	45
Tabla XVI. Perfil de ácidos grasos de <i>C. calcitrans</i> cultivada a 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$	50
Tabla XVII. Perfil de ácidos grasos de <i>T. lutea</i> cultivada a 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$	51

1. INTRODUCCIÓN.

La acuicultura es una de las actividades con mayor potencial y desarrollo en los últimos años en México, la cual arroja beneficios sociales y económicos que se traducen en una fuente de alimentación para la población con un elevado valor nutricional y costos accesibles (Norzagaray *et al.*, 2012). No obstante, este desarrollo ha sido insuficiente ya que el 80 % de los cultivos que se desarrollan en el país son de tipo extensivo y con rendimiento bajo (Álvarez *et al.*, 2012). Una de las alternativas actuales son los cultivos de tipo intensivo en donde se da un mayor control de las condiciones en las que crecen estos organismos. Estos cultivos tienen un impacto positivo sobre la biodiversidad, por ejemplo, el alimento que se cultiva puede reducir la presión sobre la sobreexplotación de los bancos naturales y a su vez aumentar las poblaciones agotadas. La acuicultura generalmente incrementa la producción natural, además de que su empleo puede sustituir el uso de recursos más destructivos (James, 2009). A pesar de todas las ventajas de este sistema de cultivo, existe el problema del abasto de juveniles (semilla) para la engorda, que garantice la continuidad de las actividades de los sistemas de producción, para su mejor éxito financiero y comercial. Es por este motivo que la extracción del medio natural es ahora una fuente menos importante de juveniles para los productores, mientras que va aumentando el porcentaje de las siembras con organismos cultivados en el laboratorio (Voltolina *et al.*, 2000). Dado estas necesidades, se ha creado en el sector acuícola un eslabón de la cadena dedicado específicamente a la producción y comercialización de juveniles, la cual se realiza en laboratorios donde se cultivan a gran escala las larvas de los organismos que se ofertan posteriormente al mercado para su siembra y engorda.

Para poder mantener la operación de un laboratorio especializado, es necesario contar con alimento de calidad adecuada y en la cantidad que es necesaria para el organismo que se está cultivando. Para el caso particular de los bivalvos filtradores, este alimento es denominado como microalimento vivo, el cual está constituido principalmente por microalgas, las cuales forman parte del fitoplancton y son parte de la base de toda la cadena trófica acuática (Muller-Feuga, 2000). La producción de microalgas en un laboratorio de juveniles de moluscos representa el 30 % del costo total de la producción (Rivero-Rodríguez

et al., 2007; Marshall *et al.*, 2010), por lo cual, es necesario el desarrollo de tecnologías de producción masiva de microalgas de alto valor nutricional y de alta eficiencia. Las microalgas más usadas en acuicultura pertenecen a los géneros *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Tisochrysis*, *Pavlova*, *Phaeodactylum*, *Cheatoceros*, *Nannochloropsis*, *Skeletonema*, y *Thalassiosira* (Liu *et al.*, 2014; Brown *et al.*, 1996; Spolaore *et al.*, 2006). El valor nutritivo de las especies de microalgas para los bivalvos, depende de su contenido bioquímico, del estadio de desarrollo del cultivo y de las condiciones de cultivo. Es por esto que las dietas microalgales para bivalvos se componen de dos o más especies de microalgales, y su selección es un reto importante y crucial para una producción masiva de juveniles de diferentes organismos usados en la acuicultura (Wikfors y Onho, 2001; Knuckey *et al.*, 2002; Muller-Feuga *et al.*, 2003; Robert *et al.*, 2004; Ponis *et al.*, 2006). Para ser satisfactoriamente utilizadas como alimento en la acuicultura, las microalgas deben tener un tamaño apropiado para ser ingeridas eficientemente, no deben de tener una cobertura celular que inhiba su digestión (e.g. pared celular muy gruesa), deben de tener un alto valor nutricional, particularmente un contenido adecuado de ácidos grasos altamente insaturados (AGAI) y ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y deben de ser fáciles de cultivar en distintos sistemas de producción y a distintas escalas. Comercialmente, las especies de mayor uso en los criaderos para la alimentación de larvas o juveniles, incluyen la flagelada *Tisochrysis lutea* y la diatomea *Chaetoceros calcitrans* (O'Connor y Heasman, 1997) las cuales cumplen con las propiedades nutricionales para ser utilizadas como alimento en la acuicultura (Gouda *et al.*, 2006).

Como se ha mencionado, la calidad nutricional de las microalgas depende principalmente de sus constituyentes bioquímicos (carbohidratos, lípidos, ácidos grasos, proteínas) (O'Connor y Heasman, 1997). Gracias a que su metabolismo es altamente manipulable, existen diferentes técnicas que permiten alterar su calidad ya sea mediante la modificación de parámetros químicos, como la adición o remoción de algún nutriente, o adición de una fuente de carbono, así como también la modificación de parámetros fisicoquímicos, tales como el fotoperiodo, el pH, la temperatura, la intensidad de la luz y la calidad de la luz (FAO, 2013).

A pesar de que la luz del sol es la fuente de energía más rentable para la producción de microalgas, la luz artificial sigue siendo económicamente factible cuando la biomasa se utiliza como materia prima para productos de alto valor comercial, como complementos alimenticios o nutracéuticos (Blanken *et al.*, 2013). Además, la luz artificial provee una mejor regulación de la densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD), el fotoperiodo y del espectro de luz, lo cual puede resultar en ganancias en la productividad y calidad de la biomasa, dos factores clave en el éxito de cualquier producto para la industria (Carvalho *et al.*, 2011). Sin embargo, el uso de luz artificial viene con altos costos, así que el mejoramiento en la selección de los dispositivos a utilizar es de vital importancia. La fuente luz artificial que tradicionalmente se ha empleado en la producción de microalgas han sido las lámparas fluorescentes, las cuales tienen un alto consumo de energía y producen un espectro de emisión tan amplio, que una parte de esta radiación tiene baja actividad fotosintética para ciertas microalgas (Olle y Virsile, 2013). Recientemente, el uso de diodos emisores de luz (ledes) permite contrarrestar estas desventajas, ya que gran parte de la energía consumida es luz en lugar de calor como en otras fuentes, tiene un promedio medio de vida de 50,000 horas, están libre de mercurio y sobre todo, pueden producir luz monocromática a las longitudes de onda requeridas específicamente para la fotosíntesis (Blanken *et al.*, 2013; Olle y Virsile, 2013; US DOE, 2013). Solamente la radiación PAR (Photosynthetically Active Radiation) entre los 400 y 700 nm puede ser utilizada por los organismos fotosintéticos (Hall y Rao, 1995; Kirk *et al.*, 1994). En el caso particular de las microalgas, el cloroplasto está adaptado para captar principalmente la luz azul ($\lambda \approx 420 - 470$ nm) o la luz roja ($\lambda \approx 660$ nm) (Keeling, 2013), y el número de fotones que capta el cloroplasto depende de la arquitectura celular, la composición de pigmentos y el arreglo de los cloroplastos. La manipulación de los parámetros de la luz (longitud de onda e intensidad), produce diferentes respuestas metabólicas en las microalgas tales como la producción de pigmentos, polisacáridos, ácidos grasos, ficobiliproteínas (Becker, 2008). Con estos fundamentos, recientemente se están probando ledes no solo para incrementar la biomasa sino también para modificar la composición bioquímica (Zhao *et al.*, 2013; Das *et al.*, 2011; Fu *et al.*, 2013; Lunka y Bayless, 2013; Yan *et al.*, 2013).

En el presente trabajo se pretende evaluar el efecto de la luz monocromática producida con diodos emisores de luz (ledes) y de su nivel de irradiancia, sobre la producción de biomasa, los cambios en la composición proximal y en el perfil de ácidos grasos en las cepas de microalgas *Chaetoceros calcitrans* y *Tisochrysis lutea* en fotobiorreactores de flujo semi-continuo.

2. ANTECEDENTES.

2.1. Las microalgas en la Acuicultura.

Las microalgas son un grupo de organismos unicelulares, extremadamente heterogéneos. Son organismos fotoautótrofos, comúnmente encontrados en cuerpos de agua marina o agua dulce, aunque su alta plasticidad les permite vivir en suelos, hielo, lagos, ríos, aguas termales y en el océano. Presentan tamaños que van desde unos cuantos micrómetros hasta unos cientos de micrómetros y se estima que existen desde 2 a 8×10^5 especies diferentes. Las microalgas no solo son diversas en formas y tamaños, también son consideradas como una fuente prometedora de varios compuestos de interés comercial, dado que su metabolismo es altamente manipulable, y tienen propiedades bioquímicas específicas, como una diversidad de pigmentos, productos de almacenamiento provenientes de la fotosíntesis, pared celular y mucílagos, ácidos grasos y lípidos, aceites, esteroides, compuestos bioactivos de almacenamiento, como los metabolitos secundarios (Cardozo *et al.*, 2007; Gouveia y Oliveira, 2009). Las tres clases más importantes de microalgas, en términos de abundancia, son: las diatomeas (Bacillariophyceae), las algas verdes (Chlorophyceae), y las algas doradas (Chrysophyceae). Las cianobacterias o algas verde-azules (Cyanophyceae) son también llamadas microalgas, e.g., *Spirulina*. Las microalgas han sido ampliamente usadas en varias aplicaciones, incluyendo la nutrición animal y humana, cosméticos, farmacéuticos, captura de CO₂, producción de bioenergía y remoción de nutrientes de aguas tratadas. En referencia al uso como alimento para animales, las microalgas han sido estudiadas por más de seis décadas y cientos de especies se han caracterizado con potencial para ser aplicadas en la industria alimentaria, sin embargo, pocas han sido utilizadas en la acuicultura, siendo esta una de las áreas de rápido desarrollo en el campo de la producción alimenticia. Los géneros

más usados son: *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Pavlova*, *Phaeodactylum*, *Cheatoceros*, *Nannochloropsis*, *Skeletonema*, y *Thalassiosira* (Liu y Benning, 2013; Brown *et al.*, 1997; Spolaore *et al.*, 2006). Su uso ha sido probado principalmente como aditivos alimentarios, tanto para moluscos bivalvos (ostras, vieiras, almejas y mejillones), como para larvas de crustáceos y algunas especies de peces (tilapia, carpa plateada); esto es debido a que durante las primeras etapas de desarrollo, estos organismos son micrófagos filtroalimentadores y requieren de una dieta de alta calidad nutricia para asegurar su supervivencia, la cual es completamente suministrada por las microalgas dada su composición de: carbohidratos, proteínas, vitaminas, lípidos, antioxidantes y otros elementos traza (Brown *et al.*, 1989; Yúfera y Lubián, 1990).

Para ser satisfactoriamente utilizadas como alimento en la acuicultura, las microalgas deben de cumplir con cuatro criterios:

- 1) Deben tener un tamaño apropiado para ser ingeridas eficientemente.
- 2) No deben de tener una cobertura celular que inhiba su digestión (e.g. pared celular muy gruesa).
- 3) Deben de tener un alto valor nutricional, particularmente un contenido adecuado de ácidos grasos altamente insaturados (AGAI) y ácidos grasos poliinsaturados (AGPI).
- 4) Deben de ser fáciles de cultivar en distintos sistemas de producción y a distintas escalas.

Sin embargo, entre las diferentes especies de microalgas, estas características pueden variar significativamente, en particular, su valor nutricional, ya que puede cambiar dependiendo de las condiciones de cultivo. Es por esto que la búsqueda de una dieta balanceada entre dos o más especies de microalgas es un reto importante y es crucial para una producción masiva de semilla o juveniles de diferentes organismos usados en la acuicultura (Wikfors y Onho, 2001; Knuckey *et al.*, 2002; Muller-Feuga *et al.*, 2003; Robert *et al.*, 2004; Ponis *et al.*, 2006). Comercialmente, las especies de mayor uso en los criaderos

para la alimentación de larvas o juveniles, incluyen la flagelada *Tisochrysis lutea* y la diatomea *Chaetoceros calcitrans* (O'Connor y Heasman, 1997) las cuales cumplen con las propiedades nutricionales para ser utilizadas como alimento en la acuicultura (Gouda *et al.*, 2006).

2.1.1. *Chaetoceros calcitrans* y *Tisochrysis lutea*.

C. es una microalga perteneciente al filo Heterokontophyta (Tabla I). Es una diatomea, la cual tiene como característica principal, una pared celular única hecha de sílice llamada frústula. Como se mencionó con anterioridad, *C. calcitrans* es una de las microalgas más comunes en criaderos de bivalvos (Tredici *et al.*, 2009). Se utiliza como alimento para reproductores (Pronker *et al.*, 2008), juveniles (Enright *et al.*, 1986) y larvas (Rico-Villa, 2006) de especies de mariscos comercialmente importantes. También se ha utilizado como alimento para varios grupos taxonómicos de importancia comercial, e.g., larvas de equinodermos (Asha y Muthiah, 2006; Carcamo *et al.*, 2005) y *Artemia* (De los Rios, 2001).

T. lutea (previamente clasificada como *Isochrysis galbana* [T-ISO] o *Isochrysis affinis galbana* [T-ISO]) (Tabla II), es una cepa aislada cerca de la costa de Tahití en el Pacífico Sur por Kennet Haines en 1977. Las células son de forma elipsoide, con dos flagelos más o menos iguales, lisos de aproximadamente 7µm de longitud. Carecen de pared celular (Zhu *et al.*, 1997) y solo poseen una membrana plasmática. Generalmente son solitarias, móviles, con un tamaño de 5 a 6µm de largo, 2 a 4µm de ancho y 2.5 a 3µm de grosor (Liu y Lin, 2001).

Tabla I. Clasificación taxonómica de *Chaetoceros calcitrans*.

Dominio:	Eukaryota
Filo:	Heterokontophyta
Clase:	Bacillariophyceae
Orden:	Centrales
Familia:	Chaetocerotaceae
Genero:	Chaetoceros
Especie:	<i>Chaetoceros calcitrans</i>

Tabla II. Clasificación taxonómica de *Tisochrysis lutea*.

Dominio:	Eukaryota
Filo:	Haptophyta
Clase:	Coccolithophyceae
Orden:	Isochrysidales
Familia:	Isochrysidaceae
Genero:	Tisochrysis
Especie:	<i>Tisochrysis lutea</i>

Esta reportado en la literatura que la combinación de diferentes especies de microalgas (flageladas y diatomeas) provee un mejor balance nutricional y mejora el crecimiento (e.g. desarrollo larvario, metamorfosis, etc.) a diferencia de una dieta monoalgal. Las dos cepas anteriormente descritas poseen un contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas adecuado para su uso, además de la producción de AGAI's: ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 ω 3), ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6 ω 3) y el ácido araquidónico (ARA, 20:4 ω 6) (Tabla III), los cuales han sido identificados como esenciales para varias larvas y juveniles de moluscos bivalvos, crustáceos y larvas de peces (Gouda *et al.*, 2006; Helm *et al.*, 2006).

Tabla III. Contenido bioquímico de *C. calcitrans* y *T. lutea* expresado en porcentaje del total de carbohidratos, lípidos y proteínas. Los ácidos grasos están expresados en el total de ácidos grasos.

	<i>C. calcitrans</i>	<i>T. lutea</i>
Carbohidratos	4 – 8 %	5 – 10 %
Lípidos	15 – 20 %	35 – 40 %
Proteínas	25 – 30 %	30 – 35 %
EPA (20:5 ω 3)	5 – 20 %	1 %
DHA (22:6 ω 3)	0.2 – 2 %	12 %
ARA (20:4 ω 6)	0.2 – 1 %	0 %

2.2. Mejoramiento de la calidad nutricional microalgal.

La calidad nutricional de las microalgas depende principalmente de sus constituyentes bioquímicos (carbohidratos, lípidos, ácidos grasos, proteínas) (O'Connor y Heasman, 1997). Gracias a que su metabolismo es altamente manipulable, existen diferentes técnicas que permiten obtener un enriquecimiento en la calidad del alimento vivo, esto puede ser mediante la modificación de parámetros químicos, como la adición o remoción de algún nutriente, o adición de una fuente de carbono, así como también la modificación de parámetros fisicoquímicos, tales como el fotoperiodo, el pH, la temperatura, la intensidad de la luz y la calidad de la luz (FAO, 2013).

Los cultivos de microalgas que tienen un crecimiento fotoautotrófico requieren de CO₂, un medio de cultivo con los nutrientes necesarios (nitrógeno, fósforo, etc.) y una fuente de luz acoplada al cultivo, la cual puede ser natural o artificial. A pesar de que la luz del sol es la fuente de energía más rentable para la producción de microalgas, la luz artificial sigue siendo económicamente factible cuando la biomasa se utiliza como materia prima para productos de alto valor comercial, como complementos alimenticios o nutracéuticos (Blanken *et al.*, 2013). Además, la luz artificial provee una mejor regulación de la densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD), el fotoperiodo y del espectro de luz, lo cual puede resultar en ganancias en la productividad y calidad de la biomasa, dos factores clave en el éxito de cualquier producto para la industria (Carvalho *et al.*, 2011). Sin embargo, el uso de luz artificial viene con altos costos, así que el mejoramiento en la selección de los dispositivos a utilizar es de vital importancia. La luz artificial utilizada en la investigación sobre las microalgas involucra el uso de lámparas fluorescentes, las cuales tienen un espectro de emisión amplio, que incluye longitudes de onda con baja actividad fotosintética para ciertas microalgas (Olle y Virsile, 2013). Alternativamente el uso de diodos emisores de luz (ledes) puede contrarrestar estas desventajas, ya que tiene un promedio medio de vida de 50 000 horas, están libres de mercurio y pueden producir luz monocromática a varias longitudes de onda (Blanken *et al.*, 2013; Olle y Virsile, 2013; US DOE, 2013). Los ledes se han aplicado para ajustar la composición bioquímica de la biomasa microalgal mediante el uso de

longitudes de onda específica, así como a distintas intensidades de luz (Zhao *et al.*, 2013; Das *et al.*, 2011; Fu *et al.*, 2013; Lunka y Bayless, 2013; Yan *et al.*, 2013).

2.3. Efecto de la longitud de onda sobre el crecimiento microalgal.

La luz afecta el crecimiento y la morfogénesis de los organismos autótrofos como las microalgas. Como se mencionó anteriormente, el sol es la fuente de luz más económica para los cultivos de microalgas, sin embargo, la gama de longitudes de onda de la radiación solar es muy amplia, y solo la radiación entre los 400 y 700 nm puede ser utilizada por los organismos fotosintéticos. A esta parte del espectro solar se le llama radiación fotosintéticamente activa o PAR (por sus siglas en inglés: Photosynthetically Active Radiation) (Hall y Rao, 1995; Kirk, 1994). El número de fotones a las longitudes de onda del azul o del rojo que pueden ser capturados por una molécula de clorofila en un alga, depende de la arquitectura celular, composición de pigmentos y el arreglo de los cloroplastos. La evolución de las microalgas sugiere que estas crecen tanto con luz azul ($\lambda \approx 420 - 470$ nm) o luz roja ($\lambda \approx 660$ nm) (Keeling, 2013).

Muchos de los estudios en organismos autótrofos en donde se utilizan diferentes irradiancias de luz o longitudes de onda, se han realizado principalmente en plantas vasculares, dado que la fotomorfogénesis está relacionada con cambios bioquímicos causados por la luz (Whitelam y Halliday, 2007). Por ejemplo, se conoce que la luz monocromática (de cierta longitud de onda) regula un número de rasgos como la germinación de la semilla, la altura de la planta, el área de la hoja, su capacidad fotosintética, biomasa y producción (Briggs, 2006). Por otro lado, la experimentación con cultivos de microalgas, modificando los parámetros de la luz, han dado lugar a la caracterización de algunas respuestas metabólicas como: la producción de pigmentos, polisacáridos, ácidos grasos, ficobiliproteínas (Becker, 2007).

Algunos de estos ejemplos se observan en la tabla IV, donde se muestran los múltiples efectos de las longitudes de ondas producidas con ledes, sobre la composición bioquímica y producción de biomasa de diferentes especies de microalgas.

Tabla IV. Efectos de la luz monocromática en diferentes especies de microalgas.

Autor	Microalga	Condiciones de cultivo y efecto:
Wang <i>et al.</i> , 2007	<i>Spirullina platensis</i>	Mayor producción de biomasa bajo ledes monocromáticos rojos.
Koc <i>et al.</i> , 2013	<i>Chlorella kessieri</i>	Expuesta a ledes azules presentó mayor tamaño celular; expuesta a ledes rojos presentó mayor densidad celular, así como una mayor producción de PUFAs.
Das <i>et al.</i> , 2011	<i>Nannochloropsis sp.</i>	Menos contenido de EPA y ácido palmitoleico en luz azul (470 nm) comparado con ledes rojos.
Das <i>et al.</i> , 2011	<i>Nannochloropsis sp.</i>	Expuesta a ledes monocromáticos azules produce mayor biomasa comparada con ledes blancos.
Pazos e Izquierdo, 2011	<i>Chlorella sp.</i>	Luz azul (500 nm) induce levemente el contenido lipídico.
Shu <i>et al.</i> , 2012	<i>Chlorella sp.</i>	Alto contenido de lípidos con luz azul (440 - 470) que con luz roja (650 - 680 nm), usando ledes.
Yoshioka <i>et al.</i> , 2012	<i>Isochrysis galbana</i>	Alto contenido de DHA y fosfolípidos comparado con ledes rojos bajo condiciones de luz intermitentes.
Chen <i>et al.</i> , 2013	<i>Nannochloropsis oceanica</i>	Luz azul y roja mostraron un mayor contenido de EPA comparado con lamparas fluorescentes.
Marchetti <i>et al.</i> , 2013	<i>Isochrysis T-ISO</i>	Alto contenido de proteína, y menor contenido de carbohidratos por célula, comparado con lampas fluorescentes.
Abiusi <i>et al.</i> , 2014	<i>Tetraselmis suecica</i>	Alto contenido de EPA cuando fue cultivada en luz roja (680 nm), comparada con azul y blanca.

3. JUSTIFICACIÓN.

El desarrollo de una tecnología eficiente para la producción de microalgas es un factor preponderante en la producción de invertebrados marinos de interés comercial. Por lo tanto, es necesario contar con un sistema de producción de microalgas de alta calidad nutrimental, capaz de cubrir la alta demanda a bajo costo.

4. HIPÓTESIS.

4.1. Pregunta científica.

¿El uso de la luz continua roja ($\lambda_{nm} = 660$), azul ($\lambda_{nm} = 440$) o blanca producida con diodos emisores de luz (ledes) a una alta irradiancia, será propicia para la obtención de cultivos de microalgas con alto valor nutrimental?

4.2. Hipótesis.

Las longitudes de onda de la luz roja y azul, así como la irradiancia tienen un efecto positivo en la cantidad y la calidad de biomasa de las cepas de microalgas *C. calcitrans* y *T. lutea*, entonces habrá variaciones en la composición proximal y contenido de ácidos grasos esenciales de ambas cepas, haciéndolas una mejor alternativa como fuente de alimento vivo para diversos organismos utilizados en la acuicultura.

5. OBJETIVOS.

5.1 Objetivo general.

Evaluar el efecto de la luz monocromática producida con diodos emisores de luz (ledes) y la irradiancia sobre la producción de biomasa, cambios en la composición proximal y en el perfil de ácidos grasos en las cepas de microalgas *C. calcitrans* y *T. lutea* en fotobiorreactores de flujo semi-continuo.

5.2 Objetivos particulares

1. Determinar la irradiancia óptima para el crecimiento de *C. calcitrans* en reactores de flujo semicontínuo con ledes de color blanco.

2. Evaluar el efecto de la calidad de la luz producida con diodos emisores de luz (ledes) blancos, azules y rojos sobre la concentración celular, el contenido bioquímico y el perfil de ácidos grasos de las microalgas *C. calcitrans* y *T. lutea*, a una irradiancia de $300 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

3. Evaluar el efecto de la calidad de la luz producida con diodos emisores de luz (ledes) blancos y rojos sobre la concentración y tamaño celular, la composición bioquímica y el perfil de ácidos grasos de las microalgas *C. calcitrans* y *T. lutea*, a una irradiancia de $1500 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Selección y caracterización de los diodos emisores de luz.

Dada la revisión de literatura realizada para este proyecto, se construyeron diodos emisores de luz (ledes) de 3 watts para usarlos como fuente de luz continua acoplada al cultivo microalgal. Estos ledes fueron fabricados por la compañía Wuhan Co-Shine Technology Co., Ltd. (<http://co-shine.en.alibaba.com/>). Se utilizaron ledes blancos los cuales emiten luz desde $\lambda_{\text{nm}} = 430 - 750$, siendo su pico máximo de emisión a los $\lambda_{\text{nm}} = 560$ (Fig. 1); ledes rojos los cuales emiten luz desde $\lambda_{\text{nm}} = 600 - 700$, siendo su pico máximo de emisión a los $\lambda_{\text{nm}} = 660$ (Fig. 2) y ledes color azul, los cuales emiten luz desde $\lambda_{\text{nm}} = 400 - 500$, siendo su pico máximo de emisión a los $\lambda_{\text{nm}} = 440$ (Fig. 3). La determinación del espectro de luz para cada led se determinó con un espectroradiómetro International Light ILT900W entre los 350 y 750 nm, con una resolución de 1nm. Los ledes utilizados fueron de 3 watts cada uno, siendo las lámparas del primer y segundo experimento de 9 watts y para el experimento 3 se utilizaron ledes de 21 watts.

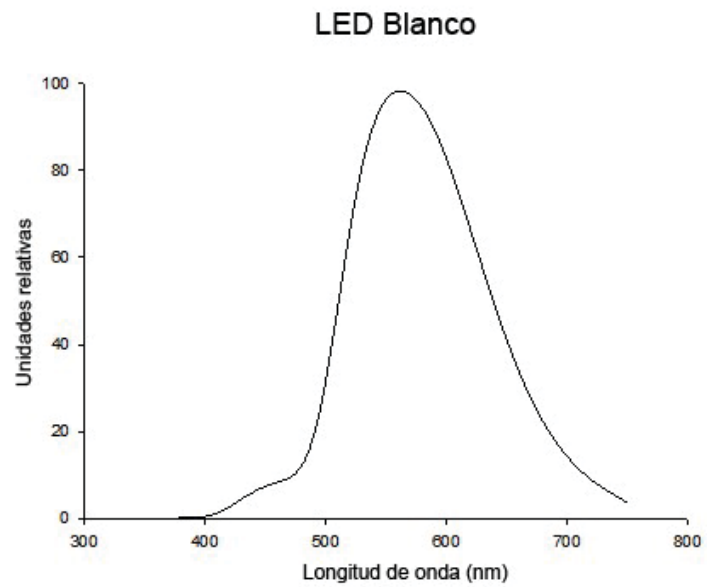


Figura 1. Espectro de emisión de un LED blanco.

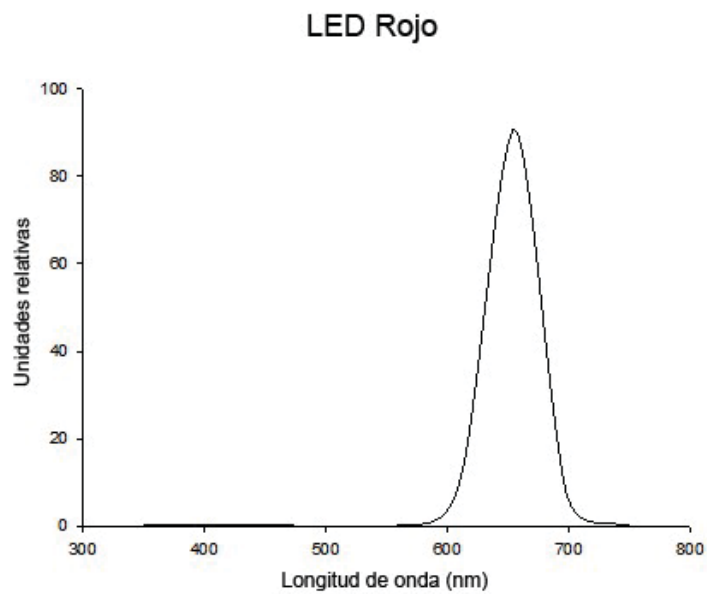


Figura 2. Espectro de emisión de un LED rojo.

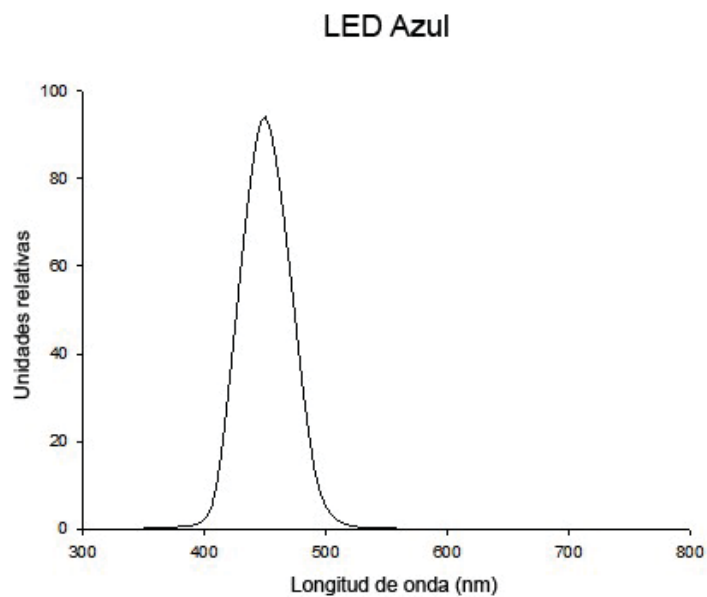


Figura 3. Espectro de emisión de un LED azul.

6.2. Materiales y métodos para cubrir el objetivo particular 1.

6.2.1. Cultivo de microalgas.

Para lograr el objetivo particular 1, se utilizó la microalga *C. calcitrans* donadas por el cepario de la Universidad Autónoma de Baja California Sur. Como parte de la obtención de inóculos para el cultivo se usó un sistema discontinuo o *batch*, el cual consistió en mantener a las células microalgales en medio de cultivo *f/2* de Guillard (Guillard y Ryther, 1962; Guillard, 1975) hasta su fase media exponencial, evitando así el envejecimiento del cultivo. Posteriormente se transfirió la biomasa a un volumen superior. El escalamiento del cultivo comprendió desde 500 mL, pasando por 2 L hasta llegar a 6 L. Los matraces con el cultivo de microalgas se inocularon al mismo tiempo, y se cosecharon para su escalamiento al mismo tiempo. Esta sincronización permitió obtener un inóculo homogéneo. La cámara de cultivo en donde se realizaron estas actividades, cuenta con un sistema de control de temperatura (22 ± 0.1 °C) e iluminación continua que fue provista por lámparas fluorescentes a diferentes irradiancia de 150 a 200 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Paralelo a la obtención del inóculo en sus últimas etapas, se montaron los fotobiorreactores, los cuales están basados en los descritos por McKeon (1984) (Fig. 4); estos consistieron en un cilindro de malla de acero recubierto con vinil de 172.96 cm de altura y 38.30 cm de diámetro, con una luz de malla de 5cm. Esto se montó sobre una base hecha de fibra de vidrio en forma de “V” para evitar la sedimentación de las microalgas. Dentro de esta estructura se colocaron las bolsas de polietileno con un volumen de 180 L, que correspondió al cultivo de microalgas. La agitación del cultivo fue provista con una mezcla de CO₂ y O₂ mediante burbujeo.

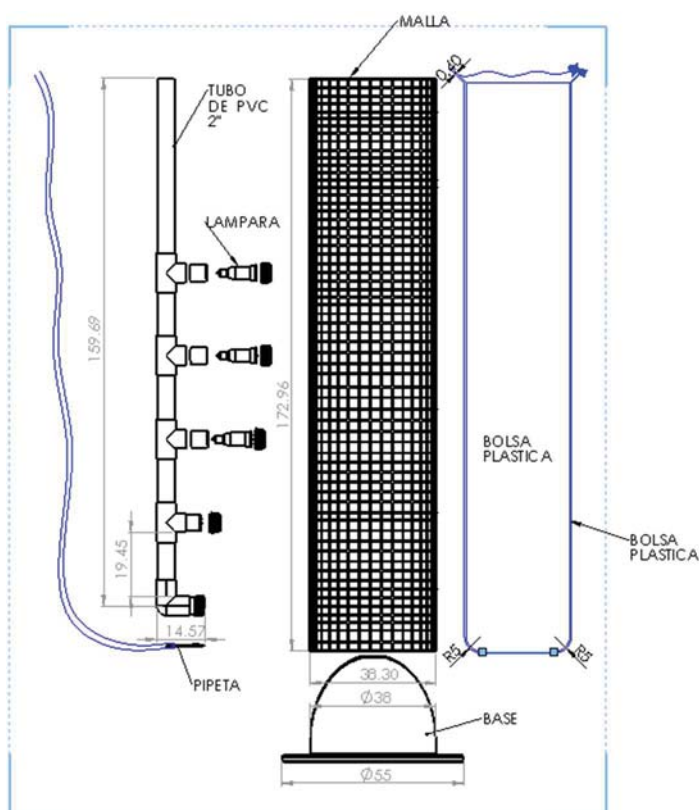


Figura 4. Fotobiorreactor empleado en el cultivo semicontinuo de microalgas.

La fuente de luz consistió en luminarias fabricadas con PVC, que contaron con 5 lámparas de 3 watts cada una a lo largo de la malla del biorreactor, y una separación de 20 cm aproximadamente entre cada lámpara, esto fue con la finalidad de cubrir la mayor área

de iluminación en el biorreactor. Las irradiancias utilizadas fueron desde 300 hasta 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tabla V).

Tabla V. Gradiente de irradiancias utilizadas en el cultivo de *C. calcitrans*.

Irradiancia ($\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Número de luminarias
300	2
500	4
1000	8
1500	12

Previo al desarrollo del cultivo en el fotobiorreactor, las bolsas de polietileno se sellaron en las esquinas inferiores izquierda y derecha con una selladora industrial marca M.R. Sellado de 120 watts, esto con el fin de evitar daños estructurales en las mismas debido al manejo. Una vez colocadas dentro de la malla de metal recubierta con vinilo, en la parte inferior se colocaron dos líneas de aireación que, para su inserción, se acoplaron a una pipeta Pasteur y posteriormente se insertaron en la bolsa plástica. Debido a la presión del cultivo y a la elasticidad del polietileno el sellado que se logró fue eficiente. Colocadas las líneas de aireación, se procedió a llenar con aire la bolsa, y se realizó una ranura en una esquina superior por donde se vació el inóculo. Posterior a la inoculación, sobre esa abertura se colocó un tubo de vidrio de 10 cm de largo y 3 cm de diámetro, el cual sirvió para suministrar los nutrientes de manera manual durante todo el experimento. Una manguera se colocó en la parte superior para suministrar el flujo continuo de agua de mar pasteurizada.

A lo largo del experimento se registraron los parámetros fisicoquímicos diarios de salinidad, pH y temperatura con un medidor multiparamétrico marca YSI® (modelo 556 MPS), y el registro de la concentración celular en un contador de partículas Multisizer 4 Coulter Counter®.

6.3. Material y métodos para cubrir el objetivo particular 2.

6.3.1. Diseño experimental.

El experimento se realizó bajo el diseño experimental que se muestra en la tabla VI. Cuatro fotobiorreactores de cada especie se iluminaron con ledes de color blanco, azul y rojo a $300 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y se tomaron muestras a los 4, 7 y 20 días de cultivo.

Tabla VI. Diseño experimental del objetivo particular 2.

Factor 1		Tiempo (días)		
Factor 2	Niveles	4	7	20
Longitud de onda	Luz Blanca	$n = 4$	$n = 4$	$n = 4$
	Luz Azul	$n = 4$	$n = 4$	$n = 4$
	Luz Roja	$n = 4$	$n = 4$	$n = 4$

6.3.2. Cultivo de microalgas.

Los cultivos de microalgas se realizaron bajo la misma metodología descrita en el apartado 6.2.1, desde la obtención del inóculo, hasta el cultivo en biorreactor; se utilizaron dos cepas de microalgas: *C. calcitrans* y *T. lutea*; la iluminación acoplada al biorreactor consistió de ledes azules ($\lambda_{nm} = 440$), (rojos ($\lambda_{nm} = 660$) y blancos ($\lambda_{nm} = 560$). En este experimento se utilizó una irradiancia de $300 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se realizó un registro diario de los parámetros fisicoquímicos: salinidad, pH y temperatura, así como las concentraciones celulares.

6.3.3. Determinación del contenido bioquímico y perfil de ácidos grasos.

6.3.3.1. Preparación y liofilización de las muestras.

Para este experimento, se tomaron muestras de los cultivos de microalgas para la determinación del contenido bioquímico y perfil de ácidos grasos. Los tiempos a los que se tomaron las muestras correspondieron a los días: cero (inóculo), 4, 7 y 20 (fotobiorreactor).

La muestra consistió en tomar un volumen determinado del matraz o fotobiorreactor, el cual fue inversamente proporcional a la concentración celular registrada, es decir, a mayor concentración celular, menor volumen fue centrifugado; posterior a la colecta del cultivo, las muestras se centrifugaron en una centrífuga refrigerada Beckman GS-GR a $698 \times g$ durante 15 min, se retiró el sobrenadante y se lavaron con formato de amonio 0.5 M (NH_4COOH , Spectrum[®]) para eliminar las sales del agua de mar, y se congelaron a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ en tubos de tipo Falcon de 50 mL sellados con Parafilm M[®]. Estas muestras congeladas se liofilizaron en una liofilizadora marca LABCONCO modelo 77400 con capacidad de 1 L, para remover el agua de las muestras, tener una mejor preservación de las mismas y minimizar la oxidación de las biomoléculas. Dada la capacidad de la liofilizadora, el tiempo de liofilización utilizado fue de 36 h a una presión de 0.050 mbar y temperatura de $-50\text{ }^\circ\text{C}$. Los tiempos de liofilización variaron dependiendo del tamaño de la muestra y del contenido de agua.

Una vez que la biomasa estaba liofilizada, se determinó a partir de ella el contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas totales, así como el perfil de ácidos grasos para cada tratamiento de luz anteriormente descrito. Todo el material utilizado en estos experimentos fue lavado con el detergente Micro 90, enjuagado con agua destilada, alcohol etílico y finalmente con cloroformo. En cada etapa de lavado se dejó secar a temperatura ambiente antes de volverlo a lavar.

6.3.3.2. Determinación del contenido total de carbohidratos.

Para la determinación del contenido de carbohidratos totales, se utilizó el método descrito por Dubois *et al.*, (1956). Este ensayo nos permitió cuantificar las hexosas, disacáridos, oligosacáridos, polisacáridos y derivados metilados que tienen un grupo reductor libre o potencialmente libre. El método consistió, primeramente, en pesar 5 mg de biomasa liofilizada y colocarla en un tubo con tapón de rosca, donde se le agregó 1 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1.0 M (Whyte, 1987). Los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente hasta haber agregado el H_2SO_4 a todas las muestras. Posterior a esto, las muestras se sonicaron en un sonicador (marca VWR[®], modelo 97043-664), durante 5 min, esto permitió que la disgregación y ruptura de las células. Se agregaron 4 mL más de H_2SO_4 1.0M, teniendo

un total de 5 mL. Los tubos se sellaron con papel aluminio y se colocaron en un termo-baño (Marca TERLAB®) a 100 °C durante 1 h. Pasado el tiempo se retiraron los tubos del baño y se dejaron reposar hasta que estuvieron a temperatura ambiente, que posteriormente se centrifugaron (Centrífuga marca Beckman®) a 1788 x g a 10 °C durante 15 min. Una vez centrifugados, se separó el extracto ácido con una pipeta Pasteur limpia, procurando no resuspender la pastilla celular del fondo del tubo. Se midió el volumen total y se transfirió a otro tubo limpio. De este extracto se tomó 1 mL, se le agregó 1 mL de fenol (C₆H₆O) al 5 %, se homogenizó, y se dejó reposar durante 40 min. Concluido el tiempo, se agregaron 5 mL de H₂SO₄ concentrado con el tubo inclinado, deslizándolo por las paredes del mismo. Éste proceso se realizó en una campana de extracción ya que es una reacción que libera vapores. Se enfrió a temperatura ambiente y se leyó en un espectrofotómetro (Marca Spectronic® 20 Genesys™, modelo 4001/4) a 485 nm, previo a esto se calibró el espectrofotómetro con un blanco que se preparó de la misma manera, sustituyendo el extracto ácido de la muestra con 1 mL de H₂SO₄ 1.0 M. Estas lecturas determinaron la concentración de carbohidratos totales en la muestra de microalgas, siguiendo la siguiente ecuación y utilizando la curva de calibración previamente establecida en el laboratorio de Biotecnología de Microalgas:

$$\% \text{ Carbohidratos} = [[(A_{485\text{nm}}/m) / V_m] \cdot V_E] / P_s \cdot 100 \quad (1)$$

Donde m es la pendiente, A_{485nm} la absorbancia, V_m el volumen de muestra, V_E el volumen del extracto ácido, y P_s el peso seco de la biomasa liofilizada.

6.3.3.3. Determinación del contenido total de lípidos.

La determinación de lípidos totales se obtuvo por dos procesos: la extracción y la cuantificación. Al finalizar el proceso de extracción, el extracto obtenido se utilizó para la esterificación (derivatización) catalizada por ácidos, para la determinación del perfil de ácidos grasos.

La extracción se basó en la utilización del sistema cloroformo/metanol/agua propuesto por Folch *et al.*, (1956) y mejorado por Bligh y Dyer (1959), ajustado para microalgas. Ésta técnica se basa en la formación de una mezcla monofásica de cloroformo,

metanol y agua ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$) con la que se asegura la extracción de la mayoría de los lípidos incluyendo aquellos que se encuentran ligados a otras moléculas. Primero se pesó entre 5 y 50 mg de microalgas liofilizadas en un tubo de vidrio de 15 mL, en cual se señala como tubo 1. Se adicionó 3 mL de una mezcla de solventes cloroformo:metanol (1:2) sin agua, y se sonicó por 15 min en frío en un baño de agua con hielo. Los tubos se incubaron al menos 24 h a 4 °C, protegidos de la luz, para favorecer la extracción completa de los lípidos. Posterior al tiempo de incubación, se sonicaron las muestras por segunda ocasión, 15 min en frío antes de ser centrifugadas a $2795 \times g$ por 20 min a 5 °C. El extracto se recuperó con una pipeta Pasteur y se pasó a un tubo de vidrio de 15 mL, el cual se señala como tubo 2. Se agregó 1.5 mL de $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:2) a la biomasa residual y se centrifugó nuevamente a $2795 \times g$ por 20 min a 5 °C, recuperando el extracto (tubo 2). Se agregaron 2 mL de agua destilada al tubo 2, y se agitó en un vortex marca Scientific Industries (modelo G560). Se eliminó el exceso de agua de la capa superior y se centrifugó a $2795 \times g$ por 10 min a 5 °C, para poder separar la fase inferior formada de cloroformo y lípidos. Se agregó 1 mL de cloroformo y se separó la fase inferior (CHCl_3 :lípidos), introduciendo con cuidado una pipeta Pasteur y burbujeando aire hasta el fondo del tubo. Se colocó la fase CHCl_3 :lípidos en un tubo de 10 mL, el cual se señaló como tubo 3. Se lavó la fase acuosa con un 1 mL de CHCl_3 , se homogenizó en un vortex y se centrifugó nuevamente a $2795 \times g$ durante 10 min, con lo cual se recuperó la fase inferior (CHCl_3 :lípidos) y se colocó en el tubo 3. En una campana de extracción se secó la fase CHCl_3 :lípidos con nitrógeno gaseoso. Una vez terminado este proceso se realizó la cuantificación de lípidos totales.

La metodología que se utilizó para la cuantificación de lípidos se basó en el método de calcinación propuesto por Marsh y Weinstein (1996). Este método además de ser sencillo, tiene la ventaja de tener una alta reproducibilidad y la utilización de un reactivo simple y estable como H_2SO_4 concentrado. Primeramente, se resuspendieron los lípidos totales en 1 mL de cloroformo y se pasó una alícuota de 100 μL a otro tubo. Se concentró a sequedad la muestra con nitrógeno gaseoso, posteriormente se le agregaron 2 mL de H_2SO_4 concentrado, y se selló el tubo con papel aluminio, con el fin de evitar contaminación y un mejor sellado de la tapa. Se calentó a 200 °C en una estufa marca Terlab[®] por 15 min. Al finalizar el tiempo,

se dejó reposar la muestra durante 5min a temperatura ambiente, se homogenizó en un vortex y se leyó a 375 nm en un espectrofotómetro. El porcentaje de lípidos se calculó utilizando la fórmula:

$$\% \text{ Lípidos} = 100 \times [[(A_{375\text{nm}}/m)/V_m] \times V_e / (P)] \times P \quad (2)$$

Donde A = Absorbancia a 375nm, m = pendiente de la curva de calibración, V_m y V_e = Volumen de la muestra y del extracto (mL), y P = Peso de la muestra liofilizada (en mg).

6.3.3.4. Determinación del perfil de ácidos grasos por cromatografía de gases – espectrofotometría de masas.

Como se mencionó antes, para la determinación de ácidos grasos, se utilizó el extracto obtenido en el paso anterior que contiene los lípidos totales. El procedimiento para la esterificación (derivatización) catalizada por ácidos es el propuesto por Sato y Murata (1988). El extracto de lípidos totales se secó con nitrógeno gaseoso y posteriormente se le adicionó 2.5 mL de una mezcla de ácido clorhídrico:metanol (HCl:CH₃OH) (5 %, v/v), para ser incubado a 85 °C por 2.5 h en un termobañero. Los metil-ésteres obtenidos de la reacción de metanólisis se extrajeron con 1.5 mL de hexano, repitiendo este paso dos veces. El hexano recuperado se lavó con 2 mL de agua destilada 3 veces, procurando que al recuperar el hexano éste fuera mediante burbujeo con una pipeta Pasteur. Después del tercer lavado se recuperó el hexano en un tubo limpio y se secó con nitrógeno gaseoso. Este extracto se resuspendió en un volumen de hexano calculado para que la concentración de cada ácido graso de la muestra quedara dentro del rango de concentración de la curva de calibración previamente inyectada en el equipo cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas GCMS. Se tomaron 250 µL del extracto de ácidos grasos y se colocó en un vial con tapa de teflón, el cual se selló, y se inyectó a un cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas marca Hewlett Packard, modelo G1800B. Los espectros de masas fueron analizados con el software informático WSearch32 versión 1.6.2005 liberado gratuitamente por la Universidad de Australia en el 2005, el cual es compatible con el programa del equipo del laboratorio.

6.3.3.5. Determinación del contenido total de proteínas.

El método utilizado para la determinación de proteínas totales fue el descrito por Lowry *et al.*, (1951), el cual se basa en la determinación espectrofotométrica de la intensidad de color obtenido con el reactivo de Folin-Ciocalteu (ácido fosfomolibdico-tungstico: FMT), después de un tratamiento con una solución alcalina de cobre. El FMT oxida los aminoácidos aromáticos como la tirosina y el triptófano presentes en la mayoría de las proteínas, reduciéndose a heteromolibdeno azul. Esta reacción es catalizada por el cobre, y da como resultado un color azul, cuya intensidad depende del contenido de tirosina y/o triptófano en la muestra (Peterson, 1979). Primeramente, se pesaron 5 mg de biomasa liofilizada por muestra, a la cual se le agregó 5 mL de NaOH 0.1N. Esta mezcla se sometió a una hidrólisis alcalina en un termo-baño a 100 °C durante 1 h y posterior a esto se centrifugó a 447 x g por 15 min a 10 °C. Se observó si la pastilla era rígida, y si se encontró esta característica, se decantó el sobrenadante para recuperar el extracto alcalino que se colocó en otro tubo limpio. Durante este proceso, fue necesario medir y anotar el volumen del extracto, para realizar los cálculos para la cuantificación de proteínas. Si al observar que el paquete celular presentaba una coloración amarillenta se realizó una segunda extracción. Una vez terminada la extracción, el extracto alcalino se colocó en el tubo de la primera extracción y se agitó en un vortex. Del extracto total obtenido, se tomó un volumen calculado para que el contenido de proteínas de la muestra quedara dentro del rango de concentración de la curva de calibración previamente realizada. Se prepararon dos soluciones, una de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 2 % (p/v) en hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N, la cual se denominó solución A, y una segunda solución que consistió en una mezcla 1:1 de sulfato de cobre (CuSO_4) al 5 % y tartrato de potasio ($\text{KOCO}(\text{CHOH})_2\text{COOK}$) al 1 %, la cual se denominó solución B. Se realizó una mezcla de 5 mL de solución A + 1 mL de solución B en una proporción 50:1, la cual se denominó solución C, y se le agregó al extracto alcalino. Posterior a la preparación de esta solución, se agregaron 500 μL de la solución 1:1 de Folin: H_2O destilada (solución D), se agitó en el vortex y se incubó en oscuridad por 40 min. Pasado el tiempo, se leyó en el espectrofotómetro a 750 nm, calibrando el equipo con un blanco tratado de la misma

manera, pero utilizando 1 mL de NaOH 0.1 N. La ecuación para la cuantificación de proteínas fue:

$$\% \text{ proteínas} = [[(A_{750\text{nm}}/m) / V_m] * V_E] / P_s * 100 \quad (3)$$

En donde A es la absorbancia a 750 nm, m es la pendiente de la curva de calibración, V_m es el volumen de la muestra, V_E es el volumen del extracto alcalino, y P_s es el peso seco (en mg).

6.4. Material y métodos para cubrir el objetivo particular 3.

6.4.1 Diseño experimental

El experimento se realizó bajo el diseño experimental que se muestra en la tabla VI. Cuatro fotobiorreactores de cada especie se iluminaron con ledes de color blanco y rojo a $1500 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, y se tomaron muestras a los 5 y 15 días de cultivo.

Tabla VII. Diseño experimental del objetivo particular 3.

Factor 1		Tiempo (días)	
Factor 2	Niveles	5	15
Longitud de onda	Luz Blanca	$n = 4$	$n = 4$
	Luz Roja	$n = 4$	$n = 4$

6.4.2. Cultivo de microalgas.

Los cultivos de microalgas siguieron la misma metodología descrita en el apartado 6.2.1, desde la obtención del inóculo, hasta el cultivo en fotobiorreactor. Se utilizaron dos especies de microalgas: *C. calcitras* y *T. lutea*. La iluminación acoplada al fotobiorreactor consistió de ledes blancos ($\lambda_{nm} = 560$) y rojos ($\lambda_{nm} = 660$). Se registraron diariamente los variables fisicoquímicas de temperatura, pH y salinidad, así como las concentraciones celulares y el tamaño celular en las diferentes condiciones de luz. Además, se obtuvo muestra para determinar el peso seco y el peso de cenizas.

6.4.3. Determinación del peso seco y peso ceniza.

Para la determinación del peso seco y ceniza se usaron filtros de fibra de vidrio GF/C, con un tamaño de poro de 1.2 μm . Estos se lavaron con agua destilada, y se colocaron en un sobre de papel aluminio previamente numerado, para así ser prequemados en una mufla TERLAB modelo TE-M12D, a 490 °C por 6 h. Posterior a este tratamiento, se colocaron los filtros prequemados en un desecador durante 1 h 30 min y se pesaron hasta verificar que el peso permaneciera constante.

Una vez que las membranas estaban a peso constante, en cada día de cosecha de tomó un volumen conocido del cultivo de microalgas (homogenizando bien la muestra antes de proceder) y se filtró en un filtro de peso conocido. Las muestras filtradas se lavaron con 10 mL de formato de amonio al 3 % (0.5 M) y se guardaron en los sobres de papel aluminio. El siguiente paso fue colocar los sobres (entreabiertos) en una estufa a 70 °C durante 12 h. Posterior a este tiempo, se pasan los filtros a un desecador verificando que el gel de sílice esté libre de humedad. Se aplicó vacío y se dejó en el desecador durante 1 h 30 min. Los filtros se pesaron rápidamente, uno por uno, en una balanza analítica OHAUS[®] PA114, para evitar que se humedecieran con el ambiente y que esto afectara el peso constante de la muestra. Se regresaron los filtros a la estufa y se repitió la operación los dos días siguientes o hasta que se logró el peso constante. La determinación del peso seco total fue por la diferencia entre el peso del filtro sin muestra (a peso constante) y el filtro con la muestra seca y esto se puede obtener en mg/mL. El filtro con la biomasa seca y pesada se incineró en la mufla a 490 °C durante 6 h, se colocó en un desecador durante 1 h 30 min y se pesaron de la misma manera, esto así durante dos ocasiones más o hasta encontrar un peso constante. Por diferencia el peso entre el filtro vacío y el filtro con las cenizas se obtiene el peso inorgánico o peso cenizas, y por diferencia entre el peso del filtro con la muestra seca y el filtro con cenizas, se obtiene el peso orgánico.

6.4.4. Determinación del contenido proximal y perfil de ácidos grasos.

Las muestras que se obtuvieron de este experimento, correspondieron a los días cero (inóculo), 5 y 15 (biorreactor). Como se describió en el apartado **6.3.3**, las muestras tuvieron

el mismo tratamiento antes de ser liofilizadas y con la biomasa obtenida se realizaron los métodos para la determinación de carbohidratos, lípidos, proteínas y el perfil de ácidos grasos.

6.5. Análisis estadísticos.

Todos los experimentos realizados en esta tesis se realizaron por cuadruplicado. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando el complemento PERMANOVA+ para el software PRIMER versión 7.0, y se utilizó un análisis de distancia euclídea, suma de cuadrados de Tipo III, y 9999 permutaciones de los residuales bajo un modelo reducido para calcular la significancia de la pseudo-F. Las diferencias significativas se determinaron por una prueba de Monte Carlo (p MC). También se utilizó un análisis SIMPER (porcentajes de similitud) con el índice de Bray-Curtis. Además, se utilizó el software SigmaPlot versión 12.0 para realizar análisis de varianza de 1 vía (ANOVA), y las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba de Tukey.

7. RESULTADOS

7.1. Resultados del objetivo particular 1.

7.1.1. Cultivos en diferentes irradiancias.

En este experimento se cultivó a la microalga *C. calcitrans* a diferentes irradiancias. El objetivo de este experimento fue determinar la irradiancia que nos permitiera una mayor concentración celular, y por ende una mayor productividad. Los valores promedio registrados de temperatura, pH, y salinidad corresponden a 15 días de duración del experimento (Tabla VII). Los datos registrados en los reactores de *C. calcitrans* mostraron que la temperatura media registrada no tuvo diferencias significativas cuando se utilizó 300 y 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiancia. Las diferencias se identificaron en los cultivos con 1000 y 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiancia, siendo la diferencia de 0.8 °C. Los valores de pH y salinidad se mantuvieron estables en todas las irradiancias probadas y sin diferencias significativas durante el experimento. Se registró un valor promedio de pH de 7.8 y 35.1 UPS para la salinidad.

Tabla VIII. Parámetros fisicoquímicos registrados para *C. calcitrans* cultivada en diferentes irradiancias. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0.05$) Prueba de Tukey. $n = 15$.

Irradiancia ($\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)		pH		Salinidad (UPS)	
	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.
300	20.9	0.2	7.8	0.1	35.1	0.1
500	20.9	0.2	7.8	0.1	35.1	0.1
1000	22.1*	0.7	7.8	0.1	35.1	0.1
1500	22.9*	1.0	7.8	0.1	35.1	0.1

Respecto a la concentración celular (Tabla VIII), se utilizó un inóculo de 6.5×10^6 cél mL^{-1} . Acorde a las irradiancias utilizadas, es decir, desde 300 hasta 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, las concentraciones celulares promedio fueron: 1.43×10^6 , 1.88×10^6 , 1.91×10^6 , 2.17×10^6 , 2.29×10^6 , y 2.91×10^6 cél mL^{-1} respectivamente. La mejor irradiancia para obtener cultivos de microalgas con altas concentraciones fue 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, ya que tuvo una mayor duración y presentó un aumento en la concentración celular (Fig. 5). La mayor productividad se registró cuando se utilizó la irradiancia de 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Tabla VIII), lo cual representó un aumento del 110% respecto al uso de 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en los cultivos. Estos resultados fueron altamente significativos, acorde a los análisis estadísticos realizados.

En este experimento no se estudió el efecto de la irradiancia en *T. lutea*, por tratarse de un experimento preliminar exploratorio, teniendo como propósito descartar una posible fotoinhibición. Dado nuestros resultados en este experimento, en los experimentos 2 y 3 se evaluó el efecto de la calidad de la luz, a los valores extremos de irradiancia de 300 y 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Tabla IX. Concentración celular y productividad registrada para *C. calcitrans* en diferentes irradiancias. Se muestra el número de luminarias utilizadas en el experimento y el equivalente en irradiancia, así como las concentraciones celulares obtenidas y la productividad en cada condición de luz. Los (**) significan diferencias altamente significativas ($P < 0.001$).

No. Luminarias	Irradiancia $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Concentración celular Cél mL ⁻¹	Productividad mg L ⁻¹ d ⁻¹
2	300	1.4×10^6	16.7
4	500	1.9×10^6	23.7
8	1000	2.2×10^6	24.6
12	1500	$2.9 \times 10^{6**}$	35.1**

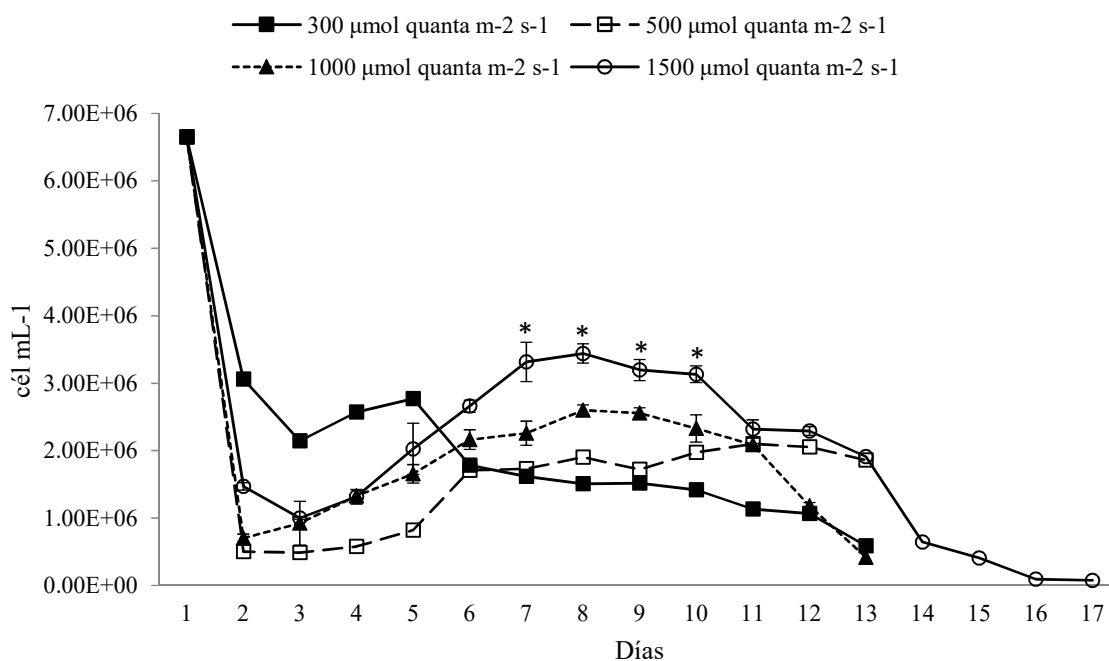


Figura 5. Concentración celular de *C. calcitrans* cultivada en diferentes irradiancias. Los (*) indican diferencias significativas ($P < 0.05$) Prueba de Tukey. $n = 4$.

7.2. Resultados del objetivo particular 2.

7.2.1. Variables fisicoquímicas.

Los datos registrados en los reactores de *C. calcitrans* (Tabla X) mostraron un ligero incremento de temperatura en la luz azul y roja con respecto a la luz blanca. En luz blanca la

temperatura fue de 22.8 °C, 23.5 °C en azul y 24.3 °C en el tratamiento de luz roja. Lo mismo sucedió en los reactores de *T. lutea*. Estas variaciones de aproximadamente 1 °C fueron significativas acorde a la prueba de Tukey sin embargo, su efecto sobre el crecimiento y la calidad de los cultivos se considera despreciable. Los valores de pH y salinidad se mantuvieron estables en las tres condiciones de luz, y no existieron diferencias significativas entre tratamientos, registrándose valores promedio de pH de 7.8 y 35.1 UPS de salinidad.

Tabla X. Variables fisicoquímicas registradas en los reactores de *C. calcitrans* y *T. lutea* cultivadas a 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0.05$) Prueba de Tukey. $n = 20$.

	Temperatura (°C)		pH		Salinidad (UPS)	
	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.
Luz blanca <i>Cc</i> ¹	22.8	0.4	7.8	0.1	35.1	0.1
Luz azul <i>Cc</i> ¹	23.5*	0.5	7.8	0.1	35.1	0.1
Luz roja <i>Cc</i> ¹	24.3*	0.6	7.8	0.1	35.1	0.1
Luz blanca <i>Tl</i> ²	22.4	0.4	7.8	0.1	35.1	0.1
Luz roja <i>Tl</i> ²	23.6*	0.4	7.8	0.1	35.1	0.1
Luz azul <i>Tl</i> ²	24.2*	0.7	7.8	0.1	35.1	0.1

Notas: ¹*C. calcitrans*; ²*T. lutea*.

7.2.2. Concentración celular.

En la figura 6 se muestran las variaciones en la concentración celular de *C. calcitrans* durante los 20 días de cultivo. Los resultados indican un mejor crecimiento en luz roja que en los dos tratamientos restantes, ya que desde el día 5 hasta el día 15, en los días efectivos de cosecha se pudo obtener una concentración promedio de 1.5×10^6 cél mL⁻¹, a diferencia 0.9×10^6 cél mL⁻¹ en luz azul y 0.7×10^6 cél mL⁻¹ en luz blanca. Para poder tener una idea más clara sobre las diferencias en las concentraciones celulares registradas, se calculó el rendimiento diario del cultivo. Respecto a la luz roja, se obtuvo el mayor rendimiento con

18.24 mg L⁻¹ d⁻¹, seguido por la luz azul con 11.48 mg L⁻¹ d⁻¹, y luz blanca con 8.92 mg L⁻¹ d⁻¹.

Como ocurrió con *C. calcitrans* en los cultivos de luz roja, *T. lutea* (Fig. 7) mostró una mayor concentración celular durante los días efectivos de cosecha, siendo que en luz roja se obtuvo un total de 2,373,870 cél mL⁻¹, 942,413 cél mL⁻¹ en luz azul y 537,163 cél mL⁻¹ en luz blanca. En cuanto a la productividad diaria del cultivo en los diferentes reactores, entre el día 5 hasta el día 20, en luz roja fue de 17.0 mg L⁻¹ d⁻¹, mientras que en luz azul fue de solamente 7.7 mg L⁻¹ d⁻¹ y 3.5 mg L⁻¹ d⁻¹ en luz blanca.

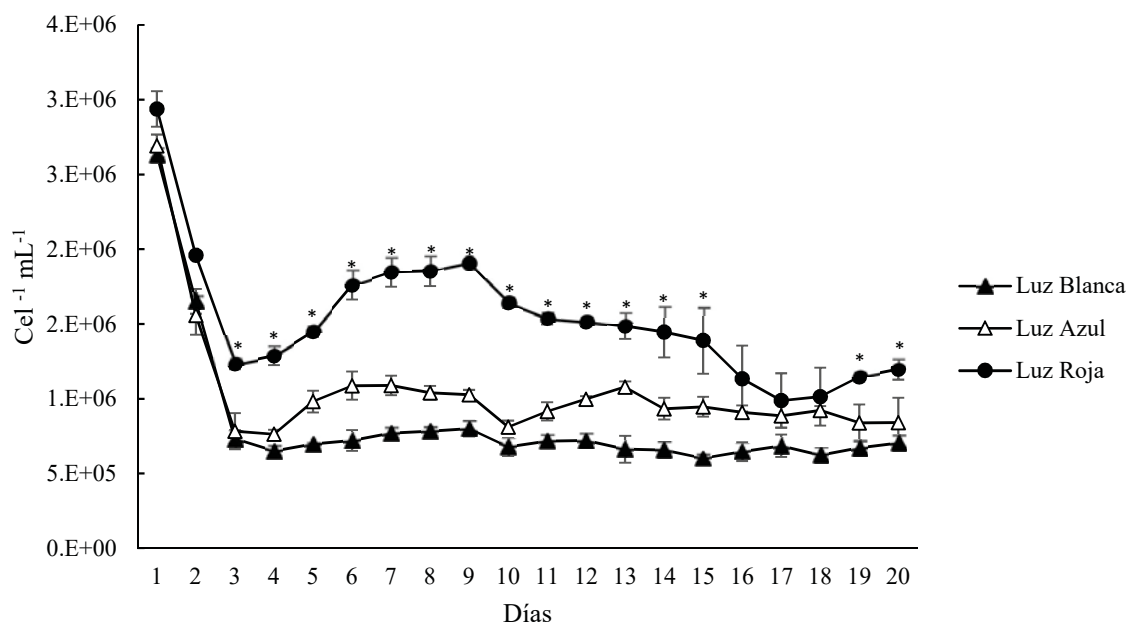


Figura 6. Concentraciones celulares de *C. calcitrans* cultivada en luz blanca, azul y roja a 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las barras muestran el error estándar de la media ($n = 12$). Los (*) indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

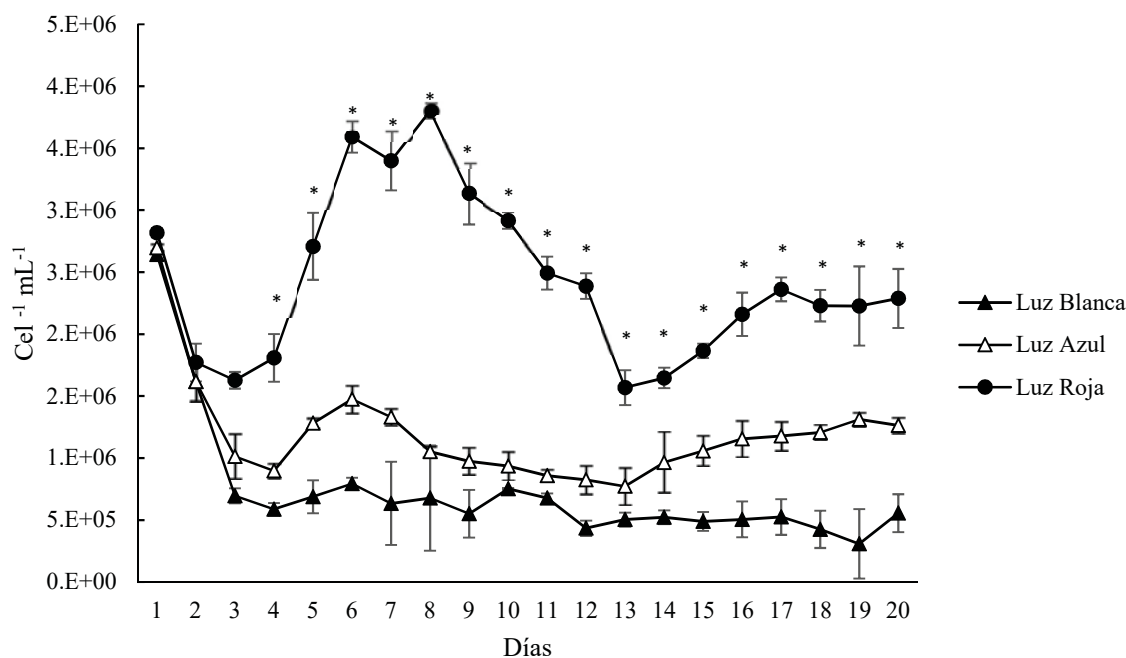


Figura 7. Concentraciones celulares de *T. lutea* cultivada en luz blanca, azul y roja a 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las barras muestran el error estándar. ($n = 12$). Los (*) indican diferencias significativas mediante la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

7.2.3. Contenido bioquímico.

En la tabla XI se muestran los valores promedio del contenido inicial de carbohidratos, lípidos y proteínas de *C. calcitrans* y *T. lutea* de los inóculos empleados en el experimento, como referencia para la interpretación de los resultados.

Tabla XI. Contenido bioquímico de los inóculos de *C. calcitrans* y *T. lutea*, empleados en el experimento.

	<i>Chaetoceros calcitrans</i>		<i>Tysochrisis lutea</i>	
	Media (%)	D.E. (%)	Media (%)	D.E. (%)
Carbohidratos	2.3	0.0	7.8	0.0
Lípidos	12.5	1.7	19.0	8.2
Proteínas	11.4	0.0	26.4	0.0

Una vez inoculados los cuatro reactores por especie y por tratamiento de calidad de luz, ($n = 12$ por especie) el experimento se llevó a cabo durante 20 días a $300 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, tomando muestras para las determinaciones bioquímicas los días 4, 7 y 20 de iniciado el experimento.

Los resultados del contenido bioquímico se presentan en las figuras 8 a 13, en las cuales se podrá apreciar el profundo efecto de la luz monocromática la composición bioquímica de las células microalgales para las especies estudiadas. Con respecto al contenido de carbohidratos, *C. calcitrans* (Fig. 8) no mostró cambios significativos durante los días 4 y 7 con respecto a la concentración del inóculo de 2.3 %. Sin embargo, el día 20, se observó un incremento significativo que alcanzó 8.6 % en luz blanca, 7.1 % en luz azul y 4.9 % en luz roja. En contraste, los valores de carbohidratos en *T. lutea* declinaron durante los 7 primeros días (Fig. 9) (2 y 4.5 %) en relación a la concentración inicial del inóculo (7.8 %), pero posteriormente hubo un incremento significativo superior al 11 %, únicamente en el tratamiento de luz roja al día 20 de cultivo.

El mismo patrón se obtuvo en cuanto al contenido de lípidos totales en ambas especies. Durante los primeros 7 días, los lípidos constituyeron entre el 12 y 13 % de la composición celular de *C. calcitrans* (Fig. 10) y entre el 15 y 20 % e, *T. lutea*. Estos valores son similares a los del inóculo (Tabla XI). Sin embargo, en el día 20, la concentración de total de lípidos se incrementó significativamente solamente en el tratamiento de luz roja y en ambas especies, alcanzando valores de 19.2 % comparado con 12.5 del inóculo en *C. calcitrans*, y a más del doble en *T. lutea* con respecto al inóculo, de 40 % vs. 19 % del inóculo.

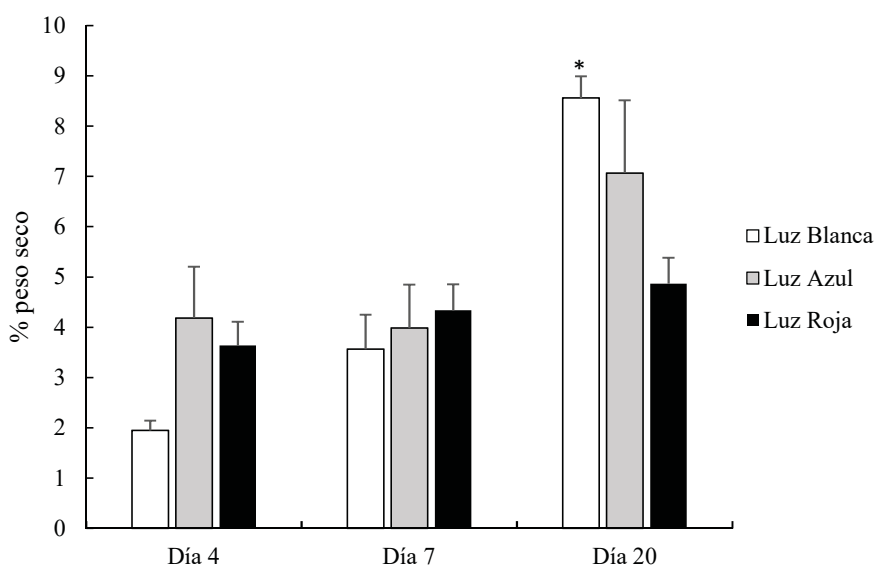


Figura 8. Carbohidratos totales de *C. calcitrans* cultivada a $300 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los (*) indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

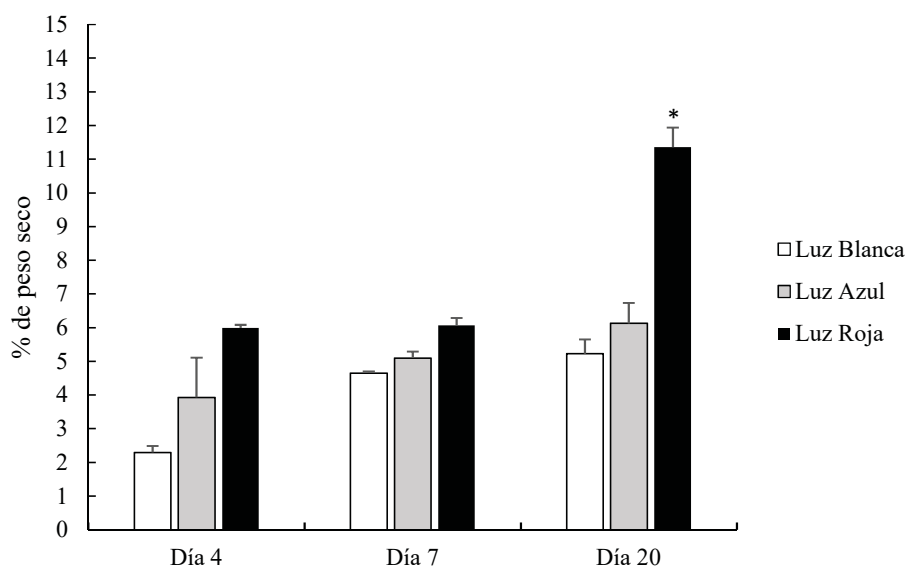


Figura 9. Carbohidratos totales de *T. lutea* cultivada a $300 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los (*) indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

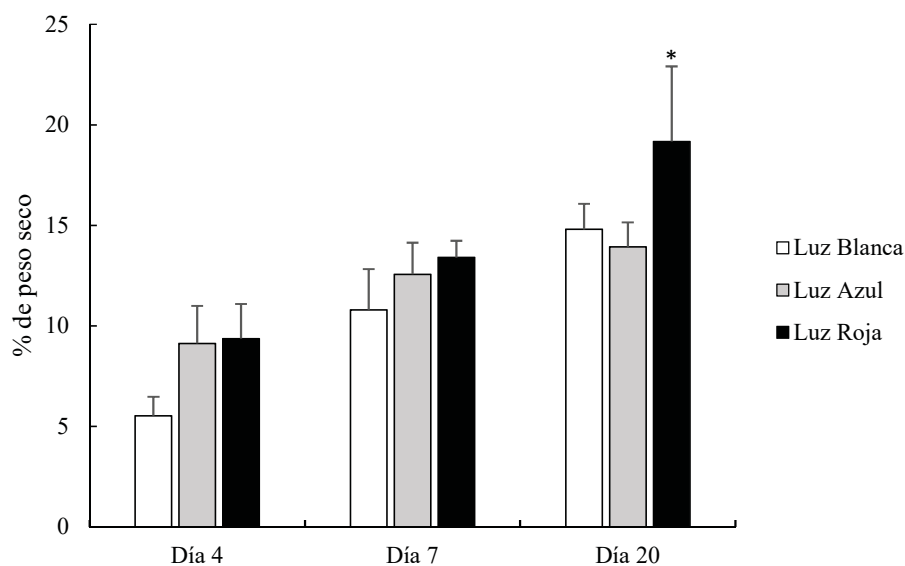


Figura 10. Lípidos totales de *C. calcitrans* cultivada a $300 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los (*) indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

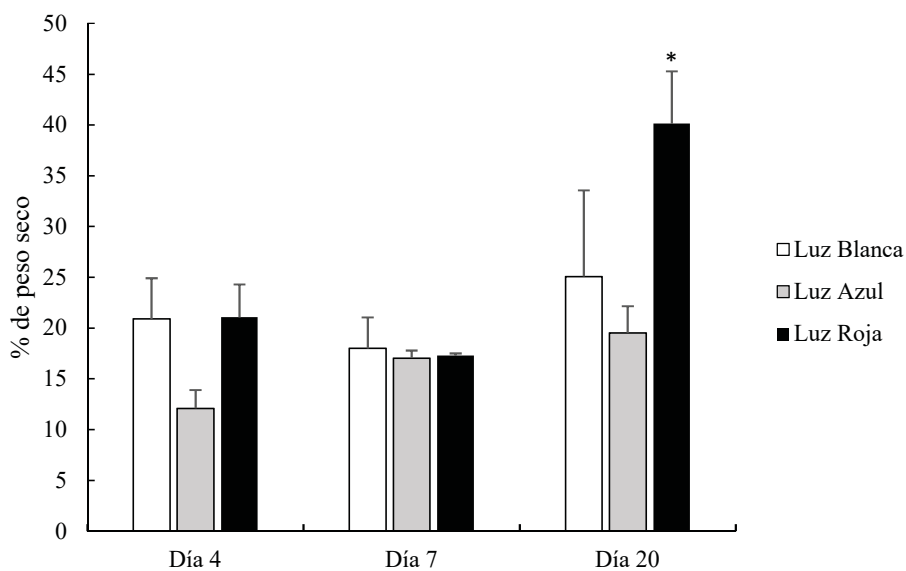


Figura 11. Lípidos totales de *T. lutea* cultivada a $300 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los (*) indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

En cuanto al contenido de proteínas, se observó una tendencia al incremento con respecto al tiempo en ambas especies. Las concentraciones de *C. calcitrans* (Fig. 12) al día 4, son similares a las del inóculo (11.4 %) en tres tratamientos. Sin embargo, a partir del día 7, las concentraciones se incrementaron gradualmente, hasta alcanzar entre el 15 y 20 % de la composición celular, siendo significativamente más elevado el incremento en luz roja. En *T. lutea*, los valores de proteínas fueron más bajos (Fig. 13) (8-21 %) que el inóculo (26.4 %) durante los 7 primeros días, pero posteriormente se observó un incremento en los tratamientos de luz azul y roja, pero fue estadísticamente significativo ($P < 0.05$) en luz roja, rebasando el 33 %.

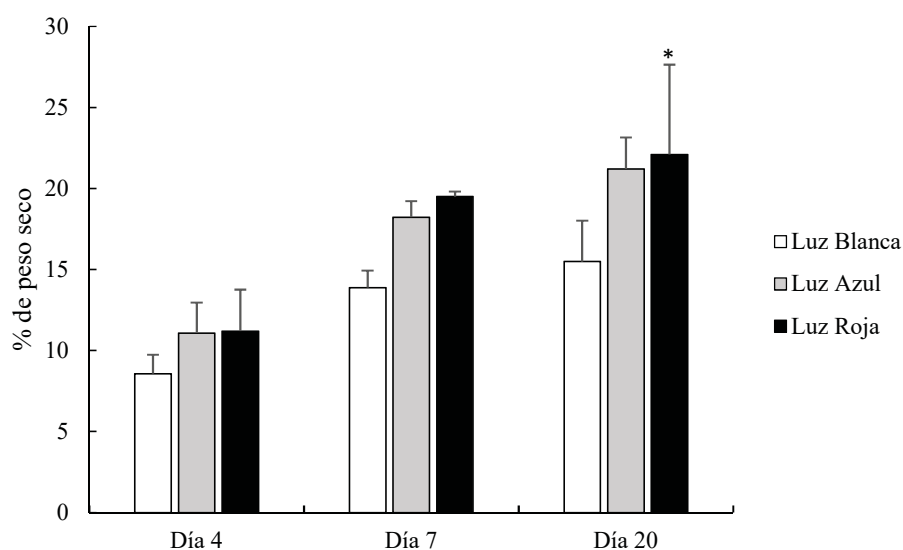


Figura 12. Proteínas totales de *C. calcitrans* cultivada a $300 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los (*) indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

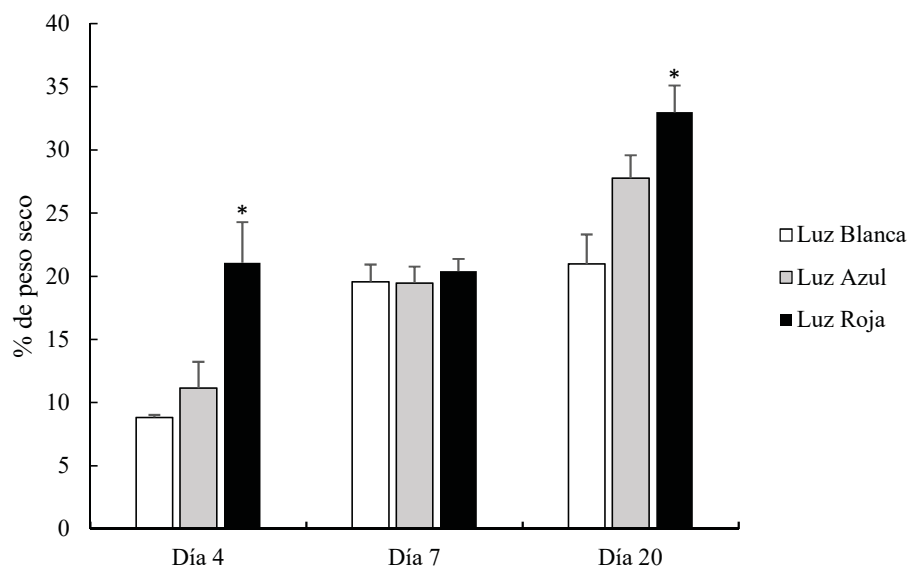


Figura 13. Proteínas totales de *T. lutea* cultivada a $300 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los (*) indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

7.2.4. Perfil de ácidos grasos.

En este apartado se describe y se discuten los cambios en el perfil de ácidos grasos de *C. calcitrans* y *T. lutea* en los tres tratamientos de luz. Uno de los objetivos principales del estudio era estimular la producción de ácidos grasos poliinsaturados y altamente insaturados pertenecientes a la familia ω -3 y ω -6, y particularmente el ácido α -linoleico (ALA, $18:3\omega$ 3), ácido linoleico (LA, $18:2\omega$ 6), ácido araquidónico (ARA, $20:4\omega$ 6), ácido eicosapentaenoico (EPA, $20:5\omega$ 3), y ácido docosahexaenoico (DHA, $22:6\omega$ 3), dado que estos ácidos grasos han sido identificados como esenciales para larvas y juveniles de muchas especies utilizadas en la acuicultura (Sargent *et al.*, 1999; Glencross, 2009; Guimarães, 2010).

El análisis del perfil de ácidos grasos de *C. calcitrans* se muestra en la tabla XII. Aquí se puede observar que las proporciones de los ácidos grasos $18:3\omega$ 3, $18:2\omega$ 6, $20:4\omega$ 6, $20:5\omega$ 3 y $22:6\omega$ 3 no se modificaron en ninguno de los tres tratamientos durante los 20 días de cultivo. Se observó una tendencia hacia el incremento en los AGPIs en los tratamientos de luz roja y azul, y algunos ácidos grasos si mostraron variaciones menores incluyendo al ácido

palmitoléico (16:1 ω 7), 16:1 ω 5, ácido hexadecadienoato (16:2 ω 6), el ácido hexadecatrienoico (16:3 ω 3) y el ácido octadecatetraenoico (18:4 ω 3). De estos ácidos grasos, el único que mostró diferencias significativas fue el ácido hexadecatrienoico, ya que en luz roja se encontró en mayor concentración (1.1 % TAG). En cuanto a la relación ω 3/ ω 6 se encontró mayor contenido de ω 3 que de ω 6 en los tratamientos de luz azul y roja.

Con el fin de analizar detalladamente las diferencias entre los perfiles de ácidos grasos de *C. calcitrans* por efecto de la calidad de la luz, se realizó un análisis de similitud (SIMPER) el cual indica la contribución de cada ácido graso a las diferencias entre tratamientos. El nivel de significancia de las diferencias se determinó mediante el índice de Bray-Curtis. En la figura 14 se muestran los resultados de la comparación de los tratamientos azul vs. roja, y en la figura 15 el de blanca vs. roja. Los resultados de similitud entre azul vs. roja (Fig. 14) indican que existen diferencias significativas ($P = 0.026$) siendo en la luz azul, donde se observó un aumento en el total de los ácidos grasos ω 3, en los ácidos grasos altamente insaturados (AGAI), y un incremento en el ácido graso 16:3 ω 3, 14:0 y 20:4 ω 6 (ARA). Con respecto a luz roja, se encontró un aumento en el total de los ácidos grasos ω 6 y ω 7, en los ácidos grasos monoinsaturados, en los ácidos grasos poliinsaturados, así como también en los ácidos grasos 16:2 ω 6, 16:1 ω 7, 16:2 ω 4 y 16:0.

Tabla XII. Perfil de ácidos grasos de *C. calcitrans* cultivada a 300 μmol quanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a diferentes tratamientos de luz, y a los 0, 4, 7 y 20 días de iniciado el experimento. Los datos se expresan en porcentaje del total de ácidos grasos (TAG).

Ácidos Grasos	Día 0	Día 4			Día 7			Día 20		
	Luz Fluorescente	Luz Blanca	Luz Azul	Luz Roja	Luz Blanca	Luz Azul	Luz Roja	Luz Blanca	Luz Azul	Luz Roja
12:0	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	0.0
14:0	17.3	19.3	17.2	15.9	18.2	15.7	14.2	17.2	21.2	18.4
15:0	0.4	0.5	0.4	0.4	0.4	0.4	0.3	0.3	0.4	0.5
16:0	10.4	9.7	8.7	10.5	7.6	6.9	8.2	10.7	8.9	9.6
16:1 ω 7	37.6	37.6	32.7	32.9	26.8	23.9	25.3	20.1	28.0	29.8
16:1 ω 5	0.7	1.1	1.4	0.8	0.7	1.3	0.7	12.5	1.4	0.9
16:2 ω 6	3.1	3.3	3.7	6.4	4.1	4.2	7.8	3.0	2.3	8.8
16:2 ω 4	2.4	4.0	5.4	7.7	9.8	6.6	7.7	5.7	4.1	3.7
16:3 ω 3	4.1	5.0	7.5	3.5	7.1	10.6	5.7	6.8	8.1	3.1
16:4 ω 3	1.2	1.0	1.4	2.3	2.6	1.7	2.0	0.7	0.5	0.5
18:0	0.5	0.8	0.8	0.6	0.7	0.6	1.1	0.5	0.6	0.6
18:1 ω 11	1.8	2.0	2.2	2.6	1.4	1.8	2.1	3.3	3.2	2.8
18:1 ω 9	0.5	0.8	0.7	0.6	0.5	0.8	0.6	0.8	1.2	0.8
18:2	0.2	0.2	0.2	0.4	0.2	0.2	0.4	0.3	0.2	0.2
18:2 ω 6	1.2	0.9	0.9	0.7	0.8	1.0	1.0	0.7	0.9	2.2
18:3 ω 6	0.5	0.4	0.4	0.5	0.3	0.6	0.7	0.2	0.6	0.6
18:3 ω 3	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.0	2.2
18:4 ω 3	0.2	0.2	0.3	0.4	0.4	0.4	0.6	0.1	0.1	2.4
20:4 ω 6	6.4	4.0	4.5	3.1	4.1	6.8	6.5	3.6	8.0	5.0
20:5 ω 3	10.6	7.9	10.2	9.1	13.0	15.1	13.9	10.2	9.7	7.0
22:0	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.1	2.9	0.0	0.1
22:1 ω 9	0.0	0.4	0.4	0.3	0.4	0.5	0.3	0.1	0.5	0.0
22:6 ω 3	0.3	0.2	0.2	0.4	0.3	0.4	0.4	0.1	0.0	0.7
24:0	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2	0.3	0.2	0.0	0.0	0.1
Σ -AGSs	29.2	30.9	27.7	28.0	27.3	24.2	24.3	31.6	31.3	29.3
Σ -AGMIs	40.6	41.9	37.5	37.3	29.9	28.2	29.0	36.8	34.2	34.3
Σ -AGPIs	12.9	15.1	19.9	22.1	25.5	25.4	26.0	17.7	16.8	23.7
Σ -AGAIIs	17.3	12.1	14.9	12.6	17.4	22.2	20.7	13.9	17.7	12.7
Σ - ω 9	0.5	0.8	0.7	0.6	0.5	0.8	0.6	0.8	1.2	0.8
Σ - ω 7	37.6	37.6	32.7	32.9	26.8	23.9	25.3	20.1	28.0	29.8
Σ - ω 6	11.1	8.5	9.5	10.8	9.4	12.6	15.9	7.6	11.9	16.6
Σ - ω 3	16.5	14.5	19.7	15.8	23.5	28.2	22.7	17.9	18.3	15.9
ω 3/ ω 6	5.3	5.9	10.3	5.1	14.1	15.7	6.8	10.3	6.5	-0.7

Notas: AGSs = Ácidos grasos saturados; AGMIs = Ácidos grasos monoinsaturados; AGPIs = Ácidos grasos poliinsaturados; AGAIIs = Ácidos grasos altamente insaturados.

El análisis de similitud de los perfiles de ácidos grasos de *C. calcitrans* entre los tratamientos de luz blanca vs. roja (Fig. 15), también indicó diferencias altamente significativas ($P = 0.007$). En el tratamiento de luz blanca, se observó un incremento en el contenido de ácidos grasos de la familia $\omega 3$, así como en los ácidos grasos monoinsaturados, en los ácidos grasos saturados, y en los ácidos grasos 14:0, 16:1 $\omega 5$ y 20:5 $\omega 3$. En contraste, el tratamiento de luz roja mostró incrementos en el total de ácidos grasos de las familias $\omega 6$ y $\omega 7$, además de un incremento en el total de los ácidos grasos poliinsaturados y altamente insaturados, así como también un incremento en los ácidos grasos 16:1 $\omega 7$, 16:2 $\omega 6$ y 20:4 $\omega 6$.

Por otra parte, en la tabla XIII se presentan los perfiles *T. lutea* cultivada a 300 μmol quanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a los diferentes tratamientos de luz y a los 0, 4, 7 y 20 días de iniciado el experimento. Como se puede apreciar, los resultados indican que si hubo un efecto de la calidad de la luz sobre el contenido de ácidos grasos.

Las células cultivadas en luz roja presentaron un mayor contenido (14.8 % del total de ácidos grasos TAG) de ácido linoleico al día 20 ($P < 0.05$), en comparación al 5 % del TAG en luz azul, y 1.9% del TAG en luz blanca. También el ácido α -linoleico tuvo un incremento ($P < 0.05$) en los cultivos de luz roja al día 20 con 8.1 % del TAG, contra los registrados en luz azul (7.2 % del TAG), y en luz blanca (1.2 % del TAG). De igual forma el DHA se incrementó significativamente ($P < 0.05$) a 6.1 % del TAG en el tratamiento de luz roja, seguido por el 4.5 % del TAG en luz azul y 0.8 % del TAG en luz blanca en el día 20 de cultivo. En cuanto a la composición de ácidos grasos de la familia $\omega 9$, $\omega 7$ y $\omega 3$ (Tabla XIII), el ácido palmitoléico ($\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$) se incrementó en el tratamiento de luz azul pero las diferencias no fueron significativas con respecto a lo obtenido en los otros tratamientos. No hubo diferencias significativas en las concentraciones de ácido hexadecatrienico y el ácido octadecanoico (18:0). En cuanto a los ácidos grasos de la familia $\omega 9$, la luz blanca estimuló significativamente ($P < 0.05$) la producción de ácido oleico (18:1 $\omega 9$) a 5.3% del TAG, a diferencia de los cultivos con luz azul (1.3% del TAG) y luz roja (1.8% del TAG).

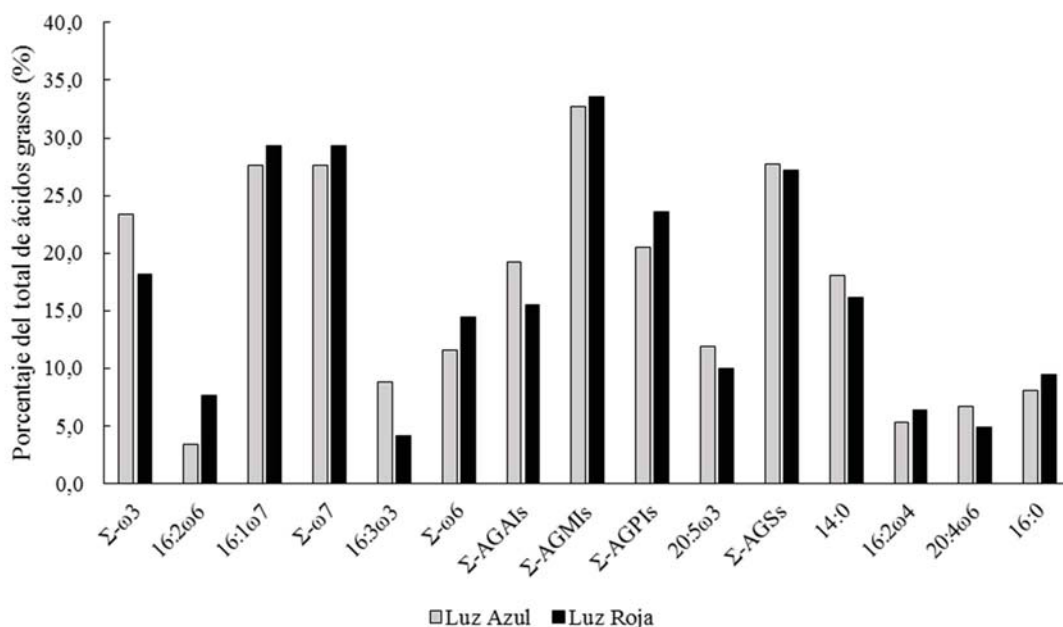


Figura 14. Análisis de similitud de los ácidos grasos de *C. calcitrans* expuesta a luz azul y roja. Los datos mostrados son significativos ($P = 0.026$).

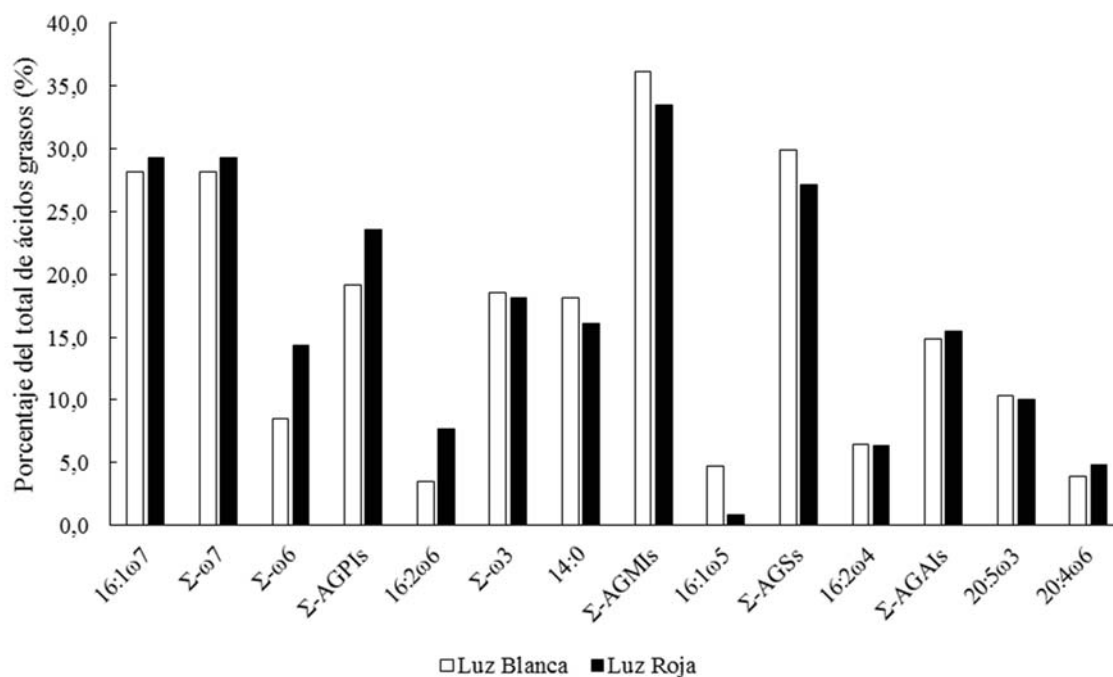


Figura 15. Análisis de similitud de los ácidos grasos de *C. calcitrans* expuesta a luz blanca y roja. Los datos mostrados son significativos ($P = 0.007$).

Tabla XIII. Perfil de ácidos grasos de *T. lutea* cultivada a 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a los diferentes tratamientos de luz y a los 0, 4, 7 y 20 días de iniciado el experimento. Los datos se expresan en porcentaje del total de ácidos grasos (TAG).

Ácidos Grasos	Día 0	Día 4			Día 7			Día 20		
	Luz Fluorescente	Luz Blanca	Luz Azul	Luz Roja	Luz Blanca	Luz Azul	Luz Roja	Luz Blanca	Luz Azul	Luz Roja
12:0	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1
14:0	23.3	25.0	25.5	27.2	14.9	19.2	23.0	16.5	19.4	21.5
15:0	0.4	0.4	0.5	0.4	0.4	0.6	0.6	0.9	0.3	0.3
16:0	11.7	11.9	14.3	15.1	10.0	12.1	16.7	21.6	11.1	11.3
16:1 ω 7	9.7	10.6	11.5	8.6	16.4	14.1	15.4	10.8	14.8	7.5
16:1 ω 5	0.6	0.4	1.1	0.5	0.5	2.0	0.6	0.9	1.5	0.2
16:2 ω 6	1.1	1.0	1.3	1.8	6.3	3.1	3.3	2.8	2.4	1.0
16:2 ω 4	1.4	1.4	1.4	1.1	6.0	2.3	1.0	1.9	2.7	0.9
16:3 ω 4	1.3	1.2	1.7	1.2	2.7	5.8	1.0	7.3	4.5	0.3
16:3 ω 3	0.4	0.1	0.1	0.1	0.3	0.2	0.3	1.1	0.2	0.2
16:4 ω 3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.5	0.3	0.0	0.0	0.0
17:1 ω 7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.7	0.9	0.0	0.0	0.0
18:0	0.8	0.7	1.4	1.4	0.5	1.2	1.4	9.8	0.9	1.3
18:1 ω 11	12.6	14.3	12.5	14.9	4.4	5.0	7.9	6.8	5.9	11.3
18:1 ω 9	1.7	2.0	2.7	1.7	1.6	3.8	3.7	5.3	1.2	1.8
18:2 ω 6	3.7	7.0	4.4	4.8	3.7	2.6	5.0	1.9	5.0	14.8
18:3 ω 6	0.3	0.3	0.3	0.4	0.9	0.5	0.7	0.2	0.7	0.7
18:3 ω 3	9.4	7.2	6.7	4.8	5.2	4.3	3.7	1.2	7.2	8.1
18:4 ω 3	10.1	7.8	6.8	8.1	7.9	7.9	7.2	1.4	8.3	9.4
18:5 ω 3	2.0	1.2	1.1	0.8	0.9	1.5	0.5	0.0	1.7	0.4
20:4 ω 6	0.2	0.2	0.2	0.2	2.8	0.4	0.3	0.1	1.6	0.4
20:5 ω 3	2.0	1.7	1.5	1.3	8.9	7.1	2.3	3.6	5.2	1.2
22:0	0.2	0.2	0.3	0.3	0.2	0.3	0.3	0.2	0.2	0.1
22:1 ω 9	0.2	1.2	2.0	1.7	0.7	1.0	1.2	4.8	0.2	0.3
22:5 ω 3	0.6	0.4	0.3	0.4	0.4	0.3	0.2	0.0	0.4	0.5
22:6 ω 3	6.4	3.4	2.3	3.1	3.9	2.9	1.9	0.8	4.5	6.1
24:0	0.0	0.2	0.2	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0	0.0	0.1
Σ -AGSs	36.3	38.5	42.3	44.5	26.1	33.6	42.5	49.2	32.0	34.7
Σ -AGMIs	24.8	28.6	29.7	27.3	23.7	26.7	29.6	28.6	23.5	21.2
Σ -AGPIs	29.7	27.3	23.8	23.1	34.2	28.8	23.1	17.8	32.8	35.8
Σ -AGAIIs	9.2	5.6	4.2	5.0	16.0	10.8	4.8	4.4	11.7	8.3
Σ - ω 9	1.9	3.2	4.7	3.4	2.3	4.8	4.9	10.1	1.3	2.2
Σ - ω 7	9.7	10.6	11.5	8.6	16.5	14.9	16.3	10.8	14.8	7.5
Σ - ω 6	5.3	8.7	6.2	7.2	13.8	6.6	9.4	5.0	9.7	17.0
Σ - ω 3	30.9	21.7	18.6	18.6	27.7	24.9	16.4	8.0	27.6	25.9
ω 3/ ω 6	25.6	13.0	12.4	11.4	13.9	18.2	7.1	3.0	17.9	8.9

Notas: AGSs = Ácidos grasos saturados; AGMIs = Ácidos grasos monoinsaturados; AGPIs = Ácidos grasos poliinsaturados; AGAIIs = Ácidos grasos altamente insaturados.

La sumatoria de AGMIs no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos en los tres días de muestreo. En cambio, la sumatoria de los AGPIs se incrementaron significativamente ($P < 0.05$) en los tratamientos de luz azul y roja (32.8 % y 35.8 % del TAG respectivamente), a comparación de los cultivos con luz blanca (17.8 % del TAG). No, hubo

una diferencia significativa ($P>0.05$) de la sumatoria de AGPIs en luz azul y roja. Los AGAIs no mostraron diferencias entre los tratamientos, en ninguno de los tres días de muestreo. Como parte del análisis, se consideró determinar el contenido de ácidos grasos por familia ($\omega 9$, $\omega 7$, $\omega 6$, $\omega 3$), y se observó que los ácidos grasos de la familia $\omega 9$, al día 4, fueron más abundantes en luz azul con un 4.7 % del TAG ($P<0.05$); al día 20 estos fueron más abundantes en luz blanca con 10.1 % del TAG ($P<0.05$). Los ácidos grasos de la familia $\omega 7$, fueron más abundantes en luz azul y blanca al día 4 ($P<0.05$) con 11.5 % y 10.6 % del TAG respectivamente, a comparación de la luz roja (8.6 % del TAG). En no se encontraron diferencias significativas en los días 7 y 20. Los ácidos grasos de la familia $\omega 6$ estuvieron en mayor concentración ($P<0.05$) en luz roja al día 20, en donde se encontró un 17% del TAG, a comparación del tratamiento con luz azul (9.7 % del TAG) y luz blanca (5 % del TAG). Los ácidos grasos de la familia $\omega 3$ también estuvieron en mayor concentración ($P<0.05$) en los cultivos de luz azul y roja al día 20, con 27.6 % y 25.9 % del TAG respectivamente, a comparación de los cultivos en luz blanca en donde se obtuvo 8 % del TAG. Dado este aumento significativo, la relación $\omega 6/\omega 3$ fue de 3.0 en el tratamiento de luz blanca, 17.9 en luz azul, y de 8.9 en luz roja.

7.3. Resultados del objetivo particular 3.

7.3.1. Variables fisicoquímicas.

Los valores registrados de temperatura, pH y salinidad durante los 17 días que duró el experimento se presentan en la tabla XIV. La temperatura media registrada en luz blanca para *C. calcitrans* fue de 22.6°C, mientras que en luz roja se registró una temperatura de 23.7 °C, lo cual fue un aumento significativo según las pruebas estadísticas.

El pH también mostró un aumento en el cultivo de luz roja con un valor de 9, a diferencia de 8.6 para el cultivo de luz blanca, este aumento también fue significativo. En el caso de la salinidad, el valor se mantuvo estable y no hubo diferencias significativas. Para *T. lutea* (Tabla XIV) se obtuvo un comportamiento similar, ya que los cultivos en luz roja mostraron un aumento significativo de 0.7 °C; el pH mostró una diferencia significativa entre

tratamientos, ya que el valor en luz blanca fue de 8.5, mientras que en luz roja se registró un valor de 8.8. La salinidad se mantuvo estable, con un valor de 36.0 ± 0.1 UPS.

Tabla XIV. Variables fisicoquímicas registradas en los fotobiorreactores de *C. calcitrans* y *T. lutea* a $1500 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los (*) indican diferencias significativas ($P < 0.05$) Prueba de Tukey. $n = 15$.

	Temperatura (°C)		pH		Salinidad (UPS)	
	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.
Luz blanca <i>Cc</i> ¹	22.6	0.2	8.6	0.2	35.8	0.5
Luz roja <i>Cc</i> ¹	23.7*	0.5	9.0*	0.2	36.0	0.3
Luz blanca <i>TP</i> ²	22.6	0.1	8.5	0.2	36.0	0.4
Luz roja <i>TP</i> ²	23.3*	0.4	8.8*	0.2	36.1	0.4

Notas: ¹*C. calcitrans*; ²*T. lutea*.

7.3.2. Concentración celular y tamaño celular.

En las figuras 16 y 17 se presenta la variación en la concentración celular de *C. calcitrans* y *T. lutea* durante los 17 días de experimentación respectivamente. La concentración del inóculo inicial fue de 6.1×10^6 cel mL⁻¹. Durante los primeros 5 días las concentraciones celulares de *C. calcitrans* tuvieron un incremento exponencial en ambos tratamientos de luz, hasta que se alcanzó el volumen máximo del reactor (180 L). Posteriormente al día 8 se registró la mayor concentración celular en el tratamiento de luz roja con un valor de 5.4×10^6 cél mL⁻¹, siendo mayor a la máxima concentración obtenida con luz blanca (4.1×10^6 cél mL⁻¹) al noveno día. En ambas especies se observó una disminución en la concentración celular del día 10 al 17 (Figs. 16 y 17), probablemente por el incremento del pH en los cultivos. Las concentraciones promedio obtenidas durante los días efectivos de cosecha fue de 4.6×10^6 cél mL⁻¹ en luz roja, y de 3.2×10^6 cél mL⁻¹ en luz blanca. Las diferencias en el número de células cosechadas en luz roja fueron altamente significativas ($P < 0.001$) con respecto a las cosechadas en los fotobiorreactores iluminados con luz blanca.

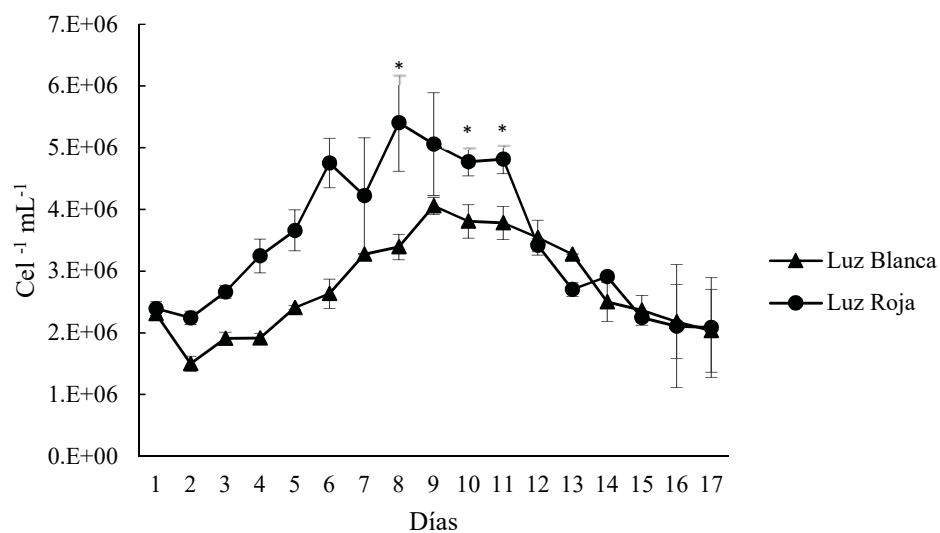


Figura 16. Concentraciones celulares registradas para *C. calcitrans* cultivada en luz blanca y roja a $1500 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las barras de error muestran el error estándar con una $n = 12$. Los (*) indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

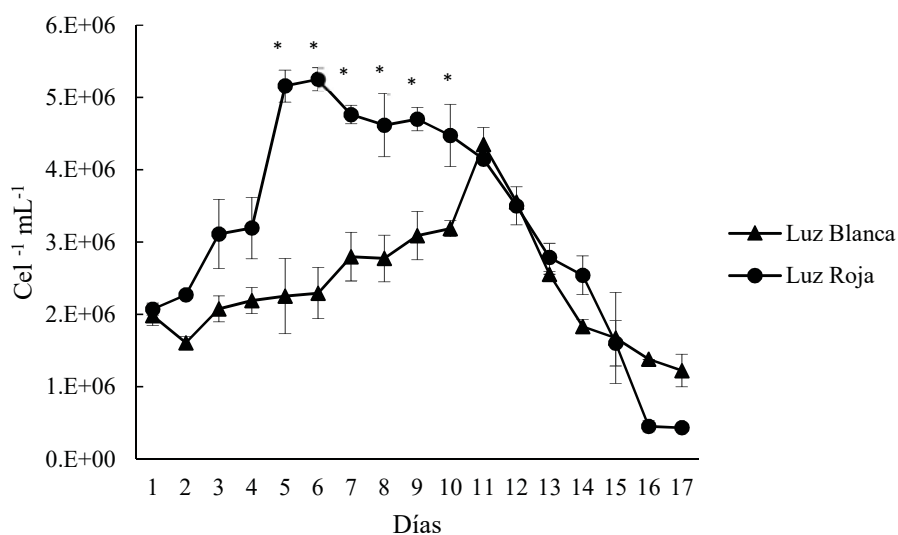


Figura 17. Concentraciones celulares registradas para *T. lutea* cultivada en luz blanca y roja a $1500 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las barras de error muestran el error estándar con una $n = 12$. Los (*) indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Una de las variables adicionales que se midieron para evaluar el efecto de la calidad de la luz fue el tamaño celular. En *C. calcitrans*, no hubo diferencias significativas en el tamaño celular ni en la masa promedio ($12.61 \text{ pg}^{-1} \text{ cél}$) registrado a lo largo del experimento. Sin embargo, se registró una disminución en el tamaño y masa celular de *T. lutea* en el tratamiento de luz roja (Fig. 18). Las células cultivadas en luz blanca tuvieron una masa de $9.11 \text{ pg}^{-1} \text{ cél}$ vs. $4.54 \text{ pg}^{-1} \text{ cél}$ en luz roja.

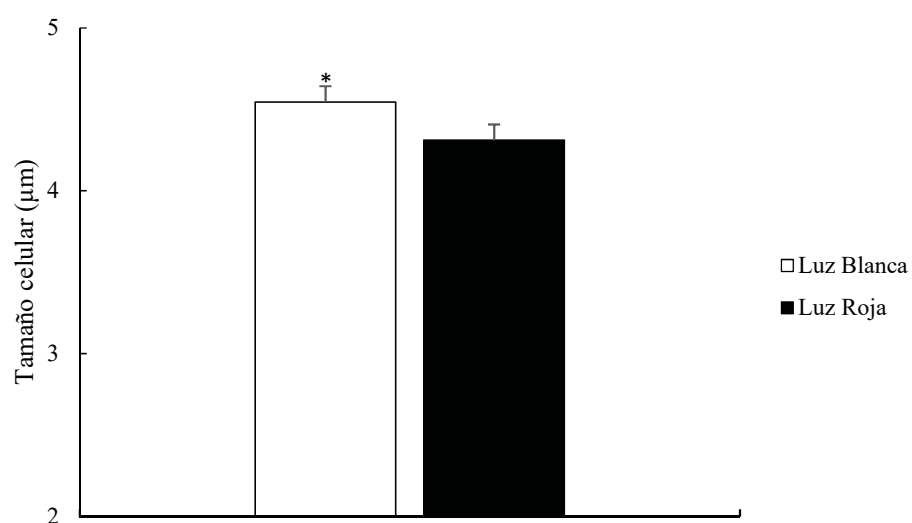


Figura 18. Tamaño celular registrado para *T. lutea* cultivada a $1500 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Los valores son promedios, $n = 17$. (*) Diferencias significativas ($P < 0.05$), t de Student.

7.3.3. Composición bioquímica de *C. calcitrans* y *T. lutea*.

En la tabla XV se muestra el contenido bioquímico de los inóculos empleados en el presente experimento.

Tabla XV. Contenido bioquímico de *C. calcitrans* y *T. lutea* al tiempo 0.

	<i>C. calcitrans</i>		<i>T. lutea</i>	
	Media (%)	D.E. (%)	Media (%)	D.E. (%)
Carbohidratos	7.9	0.9	8.1	0.7
Lípidos	17.3	0.4	13.5	0.0
Proteínas	30.8	0.5	27.5	0.2

La composición de carbohidratos de *C. calcitrans* y *T. lutea* cultivadas en luz blanca y roja a 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se presenta en las figuras 19 y 20 respectivamente. *C. calcitrans* presentó un contenido de carbohidratos significativamente mayor bajo el tratamiento de luz blanca que en luz roja a los 5 y 15 días de cultivo (Fig.19). Sin embargo, el efecto opuesto fue obtenido en *T. lutea* (Fig. 20), siendo mayor el contenido de carbohidratos en luz roja que en blanca en ambos días de cultivo.

El mismo patrón que en los carbohidratos, fue obtenido en cuanto a la composición de lípidos totales de *C. calcitrans* y *T. lutea* cultivadas en luz blanca y roja a 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figs. 21 y 22, respectivamente). El contenido de lípidos de *C. calcitrans* fue más elevado en luz blanca que en roja a los 5 y 15 días de cultivo (Fig. 21), pero estas diferencias fueron significativas a los 15 días, siendo del 40.7 % en luz blanca respecto a 29.7 % en luz roja. En contraste, los lípidos totales en *T. lutea* (Fig. 22) fueron significativamente más altos en luz roja que en luz blanca a los 5 y 15 días de cultivo. Al día 5 de cultivo, los lípidos constituyeron el 40.7 % de la composición celular de *T. lutea* en luz roja, mientras que cultivada en luz blanca, fue del 30.9 %. Asimismo, al día 15 el contenido total de lípidos se elevó aún más hasta alcanzar el 45.9 % en luz roja, a diferencia de los cultivos en luz blanca, en donde solamente se obtuvo el 26.7 %. Este incremento representa una elevación altamente significativa del doble en el contenido de lípidos totales.

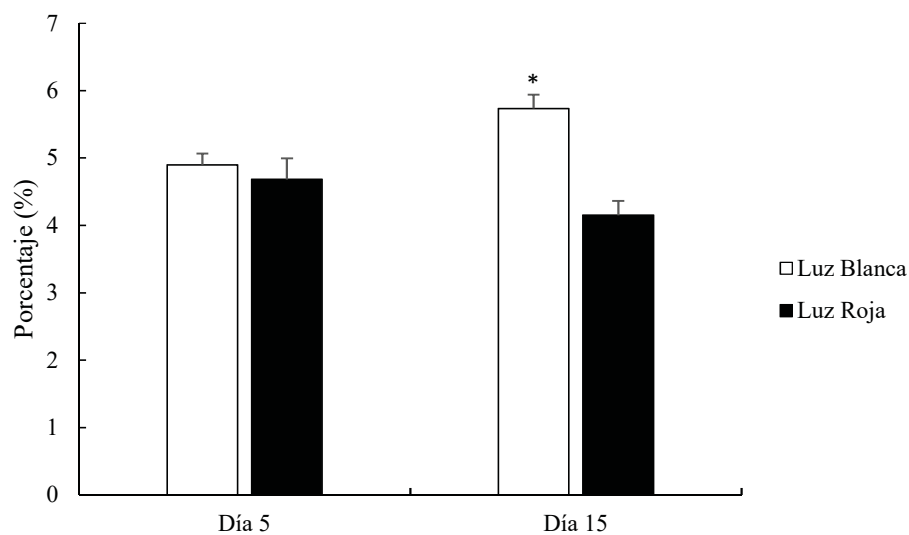


Figura 19. Carbohidratos totales de *C. calcitrans* cultivada a $1500 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a los días 5 y 15. Los (*) indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

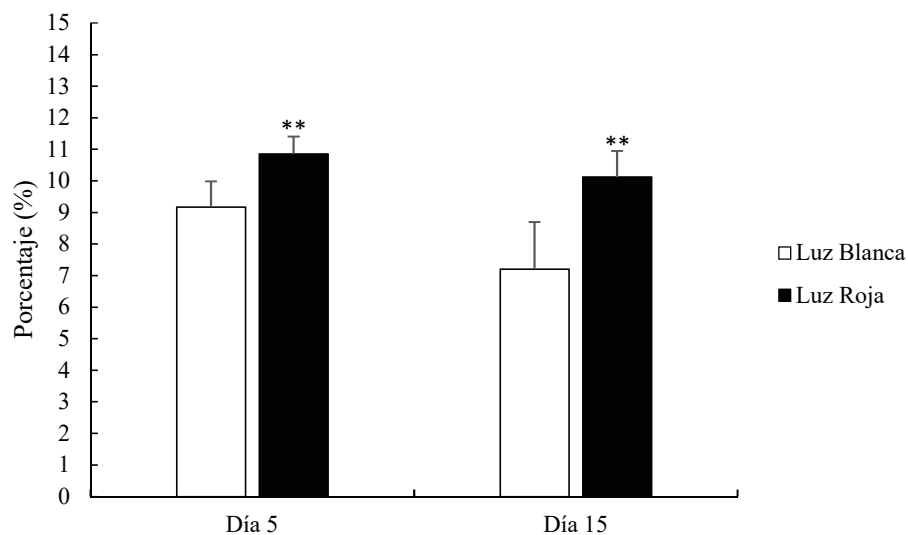


Figura 20. Carbohidratos totales de *T. lutea* cultivada a $1500 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los (**) indican diferencias altamente significativas ($P < 0.001$).

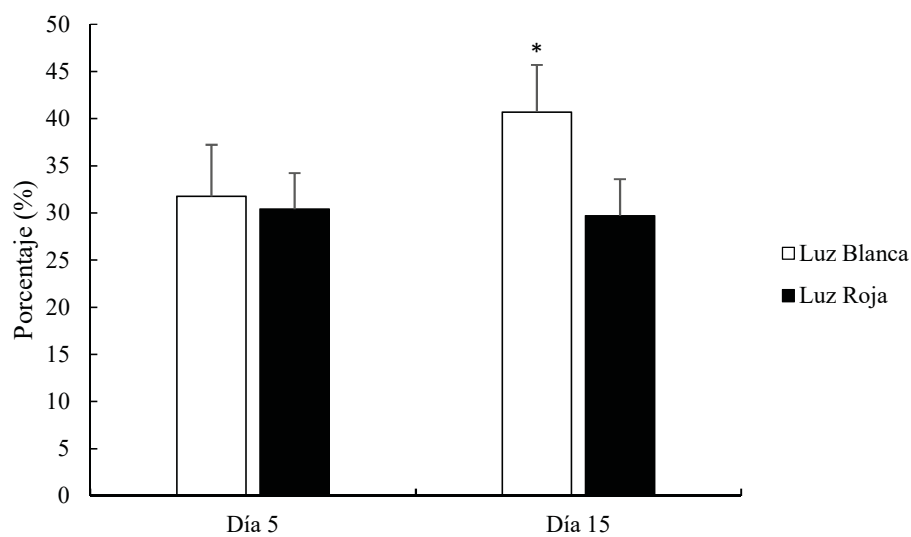


Figura 21. Lípidos totales de *C. calcitrans* cultivada a $1500 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a los días 5 y 15. Los (*) indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

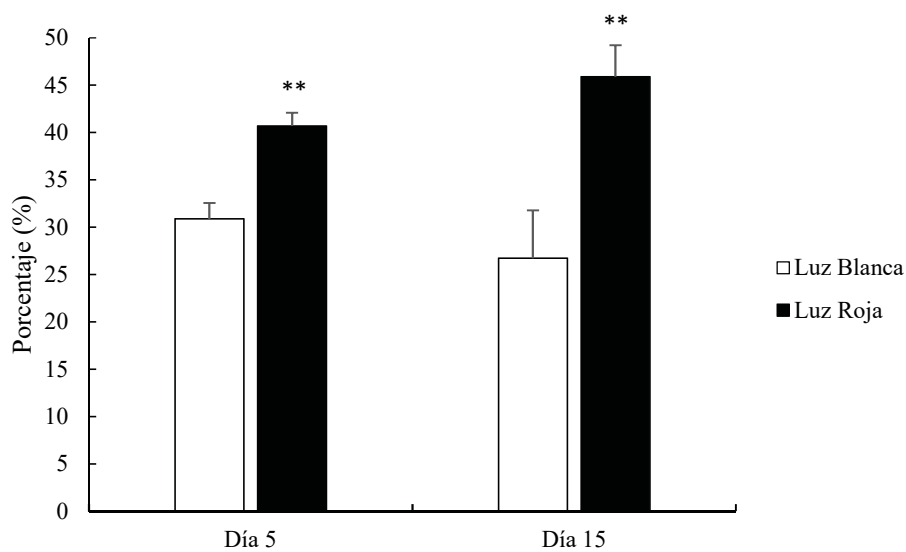


Figura 22. Lípidos totales de *T. lutea* cultivada a $1500 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los (**) indican diferencias altamente significativas ($P < 0.001$).

El contenido de proteínas totales en *C. calcitrans* fue modificado por la calidad de luz (Fig. 23), siendo mayor en luz blanca que en roja a los 5 y 15 días de cultivo. Esta diferencia fue significativamente mayor a los 15 días. Por otra parte, el contenido total de proteínas no fue modificado en *T. lutea* durante todo el experimento (Fig. 24).

7.3.4. Ácidos grasos de *C. calcitrans* y *T. lutea*.

El perfil de ácidos grasos para *C. calcitrans*, se muestra en la tabla XVI. Dado los resultados obtenidos, en esta especie no hubo cambios en el perfil de ácidos grasos. Los análisis estadísticos mostraron que no hubo diferencias significativas en los contenidos de DHA, ARA y EPA en los dos al día 5 y 15. Así mismo, no se detectaron diferencias significativas en el contenido de ácidos grasos saturados, monoinsaturados, poliinsaturados y altamente insaturados. Los ácidos grasos de las familias $\omega 9$, $\omega 7$, $\omega 6$ y $\omega 3$ no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos y días. Sin embargo, se pudo observar que esta cepa presentó un mayor contenido de ácidos grasos de luz de $\omega 6$ en los dos tratamientos, ya que la relación $\omega 6/\omega 3$ fue negativa para los dos días, en las dos condiciones. El contenido de ALA fue significativamente mayor en luz roja y el LA fue significativamente mayor en los cultivos de luz blanca al día 20 ($P < 0.05$).

El perfil de ácidos grasos para *T. lutea* se muestra en la tabla XVII. Los resultados indican modificaciones en el contenido de ciertos ácidos grasos por efecto de la calidad de la luz. Primeramente, los ácidos grasos esenciales ALA, LA y ARA no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos y los días. Por otro lado, el ácido graso DHA (22:6 $\omega 3$) fue significativamente abundante en las microalgas cultivadas con luz roja al día 20 ($P < 0.05$), en donde se encontró en una concentración de 7.9 % del TAG, contra 0.8 % encontrado en los cultivos de luz blanca. Otros ácidos grasos que se encontraron en mayor concentración en los cultivos de luz blanca fueron el 16:2 $\omega 6$ (6.3 % del TAG) y el 16:3 $\omega 6$ (2.8 % del TAG).

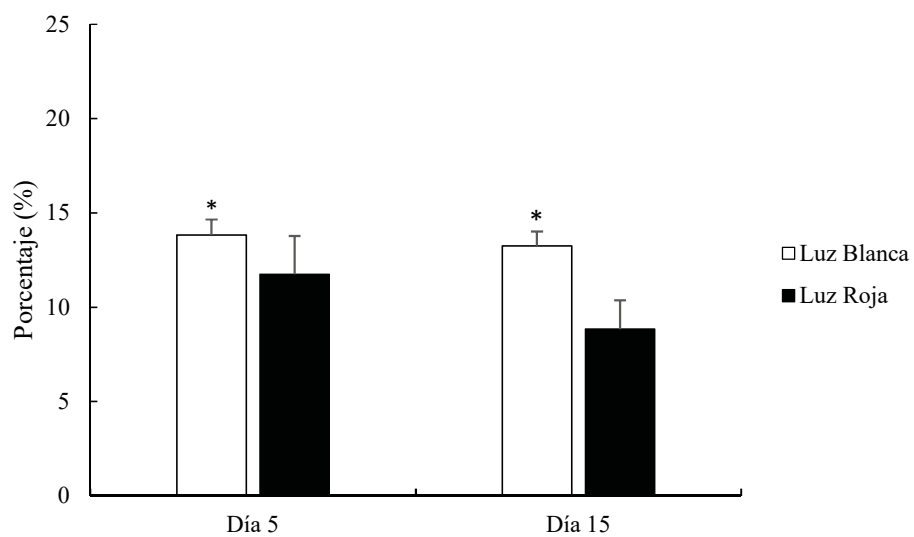


Figura 23. Proteínas totales de *C. calcitrans* cultivada a $1500 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a los días 5 y 15. Los (*) indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

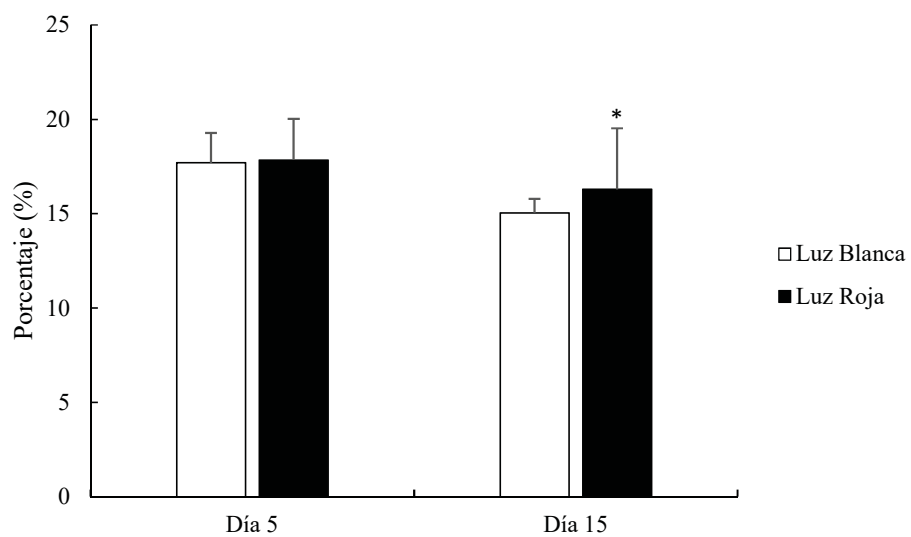


Figura 24. Proteínas totales de *T. lutea* cultivada a $1500 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a los días 5 y 15. El (*) indica diferencias significativas ($P < 0.05$).

Tabla XVI. Perfil de ácidos grasos de *C. calcitrans* cultivada a $1500 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se muestra el perfil de ácidos grasos, a los diferentes tiempos (día 0, día 5, y día 15) en los diferentes tratamientos de luz. Los datos están expresados en porcentaje del total de ácidos grasos (TAG).

Ácidos Grasos	Día 0	Día 5		Día 15	
	Luz Fluorescente	Luz Blanca	Luz Roja	Luz Blanca	Luz Roja
12:0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
14:0	24.2	24.3	22.4	20.1	20.8
14:1 ω 5	0.3	0.5	0.4	0.5	0.3
15:0	0.6	0.3	0.5	0.4	0.4
16:0	0.0	6.5	8.1	8.3	7.1
16:1 ω 11	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
16:1 ω 9	0.0	35.2	34.8	29.6	28.1
16:1 ω 7	15.2	0.0	0.0	0.0	0.0
16:1 ω 5	34.7	0.5	0.5	0.5	0.4
16:1 ω ?	0.7	1.0	0.8	0.6	0.8
16:2 ω 6	2.2	9.1	9.2	9.6	8.4
16:2 ω 4	2.1	2.0	2.2	3.0	4.9
16:3 ω 6	2.7	4.8	3.2	5.5	5.7
16:4 ω 3	0.5	0.4	0.4	1.1	1.5
17:0	0.0	0.1	0.1	0.1	0.0
18:0	0.9	1.0	0.9	1.2	0.6
18:1 ω 11	1.5	1.6	0.9	1.4	0.6
18:1 ω 9	1.3	1.0	1.1	1.4	1.3
18:1 ω 7	0.0	0.1	0.1	0.1	0.0
18:2 ω 6 <i>cis</i>	1.0	0.6	0.5	0.8	0.4
18:3 ω ?	0.0	0.2	0.3	0.7	0.4
18:3 ω 6	0.5	0.2	0.3	0.3	0.3
18:4 ω 3	0.0	0.1	0.1	0.1	0.2
20:0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
20:3 ω 6	0.2	0.0	0.1	0.0	0.0
20:4 ω 6	4.4	2.0	4.5	2.2	3.9
20:5 ω 3	6.0	7.5	7.6	11.4	12.8
22:0	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
22:1 ω 9	0.0	0.1	0.1	0.0	0.0
22:6 ω 3	0.3	0.0	0.1	0.3	0.3
24:0	0.7	0.4	0.5	0.6	0.4
Σ -AGSs	26.7	32.9	32.9	31.1	29.6
Σ -AGMIs	53.6	40.1	38.7	34.1	31.5
Σ -AGPIs	8.9	17.5	16.2	21.0	21.8
Σ -AGAIIs	10.8	9.5	12.3	13.9	17.0
Σ - ω 9	1.3	36.4	36.0	31.0	29.4
Σ - ω 7	15.2	0.1	0.1	0.1	0.0
Σ - ω 6	10.9	16.8	17.7	18.4	18.7
Σ - ω 3	6.7	8.0	8.3	12.8	14.8
ω 3/ ω 6	-4.1	-8.8	-9.4	-5.5	-3.9

Notas: (AGSs = Ácidos grasos saturados; AGMIs = Ácidos grasos monoinsaturados; AGPIs = Ácidos grasos poliinsaturados; AGAIIs = Ácidos grasos altamente insaturados).

Tabla XVII. Perfil de ácidos grasos de *T. lutea* cultivada a $1500 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se muestra el perfil de ácidos grasos, a los diferentes tiempos (día 0, día 5, y día 15) en los diferentes tratamientos de luz. Los datos están expresados en porcentaje del total de ácidos grasos (TAG).

Ácidos Grasos	Día 0	Día 5		Día 15	
	Luz Fluorescente	Luz Blanca	Luz Roja	Luz Blanca	Luz Roja
12:0	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1
14:0	26.3	36.1	24.8	22.1	16.7
14:1 ω 5	0.8	0.7	0.6	0.7	0.4
15:0	0.6	0.6	0.6	0.4	0.6
16:0	12.7	18.3	14.3	6.9	10.3
16:1 ω 11	0.2	0.1	0.2	10.9	0.2
16:1 ω 9	5.9	5.9	5.5	17.7	6.4
16:1 ω 7	0.1	0.1	0.1	0.3	0.1
16:1	0.0	0.1	0.3	2.0	0.0
16:2 ω 6	0.3	0.1	0.3	6.3	0.3
16:2 ω 4	1.0	1.0	0.9	1.8	1.0
16:3 ω 6	0.1	0.0	0.1	2.8	0.1
16:4 ω ?	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
17:0	0.1	0.1	0.2	0.3	0.0
17:1 ω 7	0.3	0.1	0.3	0.3	0.3
17:2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
17:2 ω 6	0.0	0.2	0.3	0.6	0.4
18:0	1.8	1.5	2.0	0.9	0.5
18:1 ω 11	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1
18:1 ω 9	17.7	8.8	13.4	8.3	15.0
18:1 ω 7	0.0	1.0	2.4	1.3	1.5
18:2 ω ?	0.0	0.0	0.1	0.1	0.1
18:2 ω 6 <i>cis</i>	5.8	6.1	5.0	3.9	3.0
18:2 ω 6 <i>trans</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
18:3 ω ?	0.0	0.1	0.9	0.8	0.2
18:3 ω 6	0.7	0.6	0.5	0.3	0.3
18:3 ω 3	6.2	6.9	5.9	4.3	6.8
18:3	0.0	0.0	0.0	0.7	7.0
18:4 ω 3	13.8	11.4	12.5	2.9	25.3
18:5 ω 3	0.0	0.5	0.0	0.0	0.5
20:0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0
20:2	0.0	0.2	0.2	0.1	0.1
20:4 ω 6	0.1	0.1	0.1	2.0	0.1
20:5 ω 3	0.3	0.2	0.2	10.4	0.3
22:0	0.0	0.3	0.7	0.3	0.6
22:1 ω 9	0.4	0.2	0.4	0.2	0.5
22:5 ω 3	0.3	2.2	0.9	0.2	0.0
22:6 ω 3	4.2	2.0	4.6	0.8	7.9
24:0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0
24:2	0.0	0.3	0.1	0.0	0.0
25:0	0.0	4.2	1.3	0.4	0.1
Σ -AGSs	41.7	61.2	44.3	31.9	28.9
Σ -AGMIs	25.4	17.0	23.3	41.9	24.4
Σ -AGPIs	27.9	26.8	26.5	24.5	44.9
Σ -AGAIIs	4.9	4.9	6.1	13.6	8.4
Σ - ω 9	24.0	14.8	19.2	26.2	21.9
Σ - ω 7	0.4	1.2	2.9	1.9	1.8
Σ - ω 6	6.9	7.0	6.1	13.2	4.1
Σ - ω 3	24.8	23.1	24.2	18.7	40.8
ω 3/ ω 6	17.8	16.1	18.1	5.5	36.7

Notas: AGSs = Ácidos grasos saturados; AGMIs = Ácidos grasos monoinsaturados; AGPIs = Ácidos grasos poliinsaturados; AGAIIs = Ácidos grasos altamente insaturados.

Dentro de la clasificación de los ácidos grasos por su número de insaturaciones, se encontró que los ácidos grasos saturados y altamente insaturados no presentaron diferencias significativas en su contenido en los dos días de muestreo, ni en las dos condiciones. En el caso de los ácidos grasos monoinsaturados, al día 5 se encontraban en mayor proporción en los cultivos de luz roja, con un 23.3 % del TAG; al día 15 se observó que la concentración de AGMIs fue significativamente mayor en los cultivos con luz blanca (41.9 % del TAG), siendo el ácido graso 16:1 ω 9 el más abundante (17.7 % del TAG). Los ácidos grasos poliinsaturados fueron significativamente abundantes en los cultivos con luz roja, con un total de 44.9 % del TAG, a diferencia de los cultivos en luz blanca con un total de 24.5% del TAG; el AGPI que estuvo significativamente en mayor concentración fue el 18:4 ω 3 o ácido estearidónico (SDA) ($P < 0.001$), el cual es un producto de la desaturación del ácido α -linoléico (ALA, 18:3 ω 3), precursor del ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 ω 3). En cuanto al contenido total (Σ) de ácidos grasos de las diferentes familias (ω 9, ω 7, ω 6 y ω 3) se pudo determinar que, en los cultivos de luz blanca, al día 20, el contenido de ácidos grasos ω 6 fue significativamente mayor respecto a los cultivos en luz roja, 13.2 % y 4.1 % del TAG respectivamente. Los ácidos grasos de la familia n3 fueron más abundantes en los cultivos con luz roja, con 40.8 % del TAG, respecto a los cultivos con luz blanca (18.7 % del TAG), esta diferencia fue altamente significativa ($P < 0.001$).

8. DISCUSIÓN

8.1. Discusión del objetivo particular 1.

Dado que la luz generalmente es uno de los limitantes en los sistemas de cultivo de microalgas, es importante usarla tan eficientemente como sea posible. De manera general, la fotosíntesis es el proceso por el cual un organismo puede producir energía química y biomasa usando la luz solar y CO_2 . Este proceso se lleva a cabo en dos fases, las cuales se conocen como fase luminosa y fase oscura. En la fase luminosa, la energía de la luz es absorbida por la maquinaria fotosintética, el O_2 se libera de una molécula de agua, y la energía química se produce (NADPH y ATP); posteriormente esta energía es utilizada en la fase oscura en donde el CO_2 se reduce para la formación de carbohidratos. Sin embargo, es necesario mencionar

que los procesos de la fase oscura no requieren estrictamente estar en una condición sin luz, como se puede ver en nuestros experimentos, en donde el suministro de luz es continuo. En algunas revisiones (Al-Qasmi *et al.*, 2012) se ha tratado el tema de usar luz continua, ya que la relación que tiene el incremento de la irradiancia con la manera en la que las microalgas aprovechan la luz está estrechamente relacionado. Sin embargo, aunque se ha reportado un decremento en la concentración celular para múltiples microalgas en una condición de luz alta y continua (Mata *et al.*, 2012), también se ha sugerido que el diseño del biorreactor, así como la agitación, aireación y otros factores, juegan un papel importante en un rendimiento óptimo de los cultivos (Posten, 2009). Esto queda evidenciado en este experimento, en donde no se vio una inhibición del crecimiento o una baja de la productividad en esta cepa de microalga, al ser expuesta a $1500 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ya que se obtuvo una productividad de hasta $35.1 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, a diferencia de $16.7 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ en los cultivos con $300 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Los efectos de una alta irradiancia en *T. lutea* se explican en la discusión del objetivo 3, sin embargo, es importante mencionar que muchos de los experimentos que se realizan en microalgas, en donde se prueban condiciones de “luz baja o luz alta”, varían acorde al criterio de los grupos de investigación, ya que en algunos una condición de luz baja (e.g. $100 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) puede ser una condición de luz alta en otros experimentos. Además, los sistemas de cultivo varían ampliamente, ya que van desde cultivos *batch* en matraces con diferentes volúmenes, hasta cultivos en sistemas continuos en fotobiorreactores de diferentes volúmenes. Debido a esto, las comparaciones deben de tomarse con precaución.

8.2. Discusión del objetivo particular 2.

La luz emitida por los ledes ha sido estudiada dada su aplicación en los cultivos de microalgas, ya que permiten la selección de longitudes de onda específicas que tienen un mayor uso en la fotosíntesis y por ende estos organismos pueden aprovecharla favorablemente (Shu *et al.*, 2012). Sin embargo, el número de fotones a una cierta longitud de onda que pueden ser capturados por una molécula de clorofila en un alga, depende de la arquitectura celular, la composición de pigmentos, y el arreglo de los cloroplastos (Schulze *et al.*, 2014). De manera general, los fotones con longitudes de onda de 660 – 680 nm

producen la mayor eficiencia cuántica en la mayoría de las plantas y algas que contienen clorofila *a* ($\lambda_{a_rojo}= 680\text{nm}$) y/o *b* ($\lambda_{a_rojo}= 660\text{nm}$) (Blanken *et al.*, 2013; Pilon *et al.*, 2011) Se ha evidenciado que esta induce altas tasas de crecimiento mediante la aceleración del ciclo celular en diversas microalgas (Lee y Palsson, 1996; Saavedra *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2010; Stadnichuk *et al.*, 2011; Shu *et al.*, 2012; Koc *et al.*, 2013). Otros autores como Marchetti *et al.*, (2013), determinaron que el uso de luz azul (420–500 nm) no afecta la producción de biomasa de *T. lutea*, así como la producción de múltiples diatomeas (Aidar *et al.*, 1994; Mercado *et al.*, 2004).

En nuestro trabajo se evidenció que en los fotobiorreactores con una fuente de luz roja (660 nm) acoplada al cultivo, se puede obtener una mayor concentración celular y la mayor productividad, es decir, una mayor biomasa en ambas cepas de microalgas, en comparación con la luz blanca y la luz azul.

En algunos estudios realizados en *I. galbana* e *I. galbana* (T-ISO) por Marchetti *et al.*, (2013) y Yoshioka *et al.*, (2012), encontraron un aumento en el contenido de proteínas totales cuando las microalgas fueron cultivadas con luz azul (fotoperiodo 12:12 L/O y pulsos de luz azul a $300 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Los contenidos reportados van desde el 3 hasta el 10 % de proteínas totales. Otro estudio realizado en la macroalga *Porphyra leucosticta* (Rodophyta) por Korbee *et al.*, (2005), demostró que la luz azul promueve la acumulación de metabolitos derivados del metabolismo del nitrógeno, entre ellos las proteínas.

En este trabajo se evidenció que la luz azul no tuvo ese efecto sobre estas dos microalgas ya que la luz roja estimuló una mayor síntesis de proteínas totales. Es necesario hacer énfasis que en nuestros resultados obtuvimos desde un 18 % hasta un 30 % de proteínas totales, además de que las condiciones de cultivo fueron completamente diferentes a las mencionadas en estos y otros trabajos, por lo que no se puede hacer una comparación directa con este experimento. Es necesario realizar estudios posteriores para elucidar los mecanismos de síntesis de proteínas de estas microalgas al ser cultivadas en luz roja.

Estos efectos pueden ir desde cambios en el contenido de pigmentos, alteraciones en la tasa de fotosíntesis, influir en el desarrollo vegetativo, inducir la reproducción, modificar

la tasa de crecimiento y producir cambios en la composición bioquímica (Figueroa *et al.*, 1995; Sánchez-Saavedra, 1996). Dado que las vías metabólicas de moléculas ricas en energía (e.g., carbohidratos y lípidos) están cercanamente relacionadas, algunos estudios han demostrado la competencia que existe entre la síntesis de lípidos y carbohidratos, ya que el mayor precursor para la síntesis de triglicéridos es el glicerol-3-fosfato (G3P), el cual es producido vía catabolismo de la glucosa (glicólisis) (Rismani-Yazdi *et al.*, 2011; Ho *et al.*, 2012). Por lo que al haber una reducción en el contenido de carbohidratos se esperaría un incremento en el contenido de lípidos. En nuestros resultados *Chaetoceros calcitrans* mostró este comportamiento, en donde los tratamientos con luz blanca y azul mostraron un mayor contenido de carbohidratos, y un menor contenido de lípidos respecto a la luz roja, en donde se observó el efecto contrario. Para *T. lutea*, en los tratamientos de luz blanca y azul los contenidos de carbohidratos y lípidos se encontraron dentro de lo reportado en la literatura, sin embargo, hubo un efecto de aumento de carbohidratos y lípidos en el tratamiento con luz roja. En la literatura se puede encontrar múltiples ejemplos de cultivos con luz monocromática y el aumento en el contenido de lípidos totales, sin embargo, la mayoría de estos efectos se ve reflejado en el uso de luz azul o luz roja en microalgas verdes (Chlorophyta), como lo son los estudios de Pérez-Pazos y Fernández-Izquierdo (2011) y Shu *et al.*, (2012), donde una cepa de *Chlorella* sp., mostró un incremento en el contenido de lípidos al ser cultivada bajo luz azul; esto puede deberse de un efecto directo de la luz, dado el contenido de pigmentos. Algo más cercano a nuestro estudio, fue el realizado por Kim *et al.*, (2014), donde utilizó *Nannochloropsis gaditana* (Heterokontophyta), y demostró que el uso de luz monocromática roja no presenta cambios en el contenido de lípidos totales al ser usada como fuente de luz artificial, sin embargo, si se encontraron diferencias en el perfil de ácidos grasos, lo cual fue evidenciado en nuestros resultados y se discutirán en el siguiente subcapítulo. En cuanto a *C. calcitrans*, en la literatura se reporta que los lípidos son el metabolito principal de las fotosíntesis en diatomeas (Chen, 2007), por lo que se ha caracterizado tanto el perfil de ácidos grasos como el contenido de lípidos totales. Chen (2012), determinó el contenido de lípidos totales 12 diatomeas marinas, en donde determinó que una diatomea del género *Chaetoceros* presentó el mayor contenido de lípidos cuando fue cultivada en luz roja.

8.3. Discusión del objetivo particular 3.

De los ácidos grasos analizados durante este experimento el que tuvo mayor relevancia fue el ácido estearidónico (SDA, 18:4 ω 3) en *T. lutea* ya que al ser un precursor del DHA, puede ser un ácido graso de interés. Lo que se encontró fue que esta cepa al ser cultivada en luz roja presentó 25.4 % de SDA (del total de ácidos grasos) respecto a los cultivos en luz blanca en donde se encontró 2.9 % de SDA. Esto es de especial importancia ya que revisiones como la de Ruiz-López *et al.*, (2012) mencionan que la producción de SDA ha atraído la atención de compañías biotecnológicas como Monsanto y Solae LLC ya que se han producido plantas transgénicas de soya las cuales producen desde un 15 a un 30 % de SDA del total de ácidos grasos. Además, estudios como el de Ursin (2003) y Maki y Rains (2012) han demostrado que la ingesta de aceites enriquecidos con SDA incrementan los niveles de EPA en el plasma y las membranas celulares de las células rojas sanguíneas.

8.4. Discusión general.

De acuerdo a los resultados del presente trabajo, se puede concluir que los fotobiorreactores empleados presentan un excelente diseño que permite hacer investigación científica aplicada a la misma escala que la empleada en el laboratorio de producción. Adicionalmente, el diseño de las luminarias es práctico porque permitió incrementar la irradiancia con tan solo incrementar el número de luminarias por fotobiorreactor. También, los leds de diferentes colores permitieron probar de manera efectiva el efecto de la luz monocromática, según se confirmó con los espectros de emisión obtenidos (Figs. 2, 3 y 4).

En cuanto a la irradiancia, los resultados de los tres experimentos permiten concluir que la irradiancia más alta (1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) produce una mayor concentración celular independientemente de la especie y de la longitud de onda de que se trate. Las concentraciones celulares prácticamente se duplican al incrementar de 300 a 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Sin embargo, de acuerdo a los resultados del experimento 3, las variaciones de las concentraciones celulares a lo largo del tiempo a irradiancias elevadas, son irregulares de tal forma que se incrementan rápidamente durante los primeros 5-7 días, para declinar gradualmente durante los 10-12 días restantes. En el caso de *T. lutea*, las densidades declinan

más allá de 0.5×10^6 cél mL⁻¹ al día 16 de cosecha, por lo que se considera el fin de la vida útil del reactor. En cambio, a menor irradiancia, las concentraciones celulares son más estables independientemente de la longitud de onda de la luz que se emplee (Figs. 5 y 6). Aunque no se determinó la vida útil de los reactores a diferentes irradiancias, los resultados sugieren menor vida útil a mayor irradiancia. Por otra parte, la irradiancia no afecta la composición proximal (proteínas, carbohidratos y lípidos) en *T. lutea*, pero duplica la composición de lípidos en *C. calcitrans* cuando la irradiancia se eleva de 300 a 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Esto demuestra las respuestas metabólicas por efecto de la luz, son distintas en cada especie microalgal (Becker, 2007).

En cuanto a la longitud de onda, en el presente trabajo se ha demostrado el profundo efecto que tiene el color de la luz monocromática sobre las densidades de cultivo, el tamaño celular y sobre la composición bioquímica de las microalgas, independientemente de la irradiancia empleada. En ambas especies, la concentración máxima y las concentraciones promedio, son dos o más veces superiores cuando se emplean ledes rojos en comparación de los ledes blancos.

La explicación del efecto de la longitud de onda sobre el incremento en las densidades celulares y en la composición bioquímica de las microalgas escapa de los objetivos del presente trabajo. Sin embargo, se ha demostrado que es posible mejorar los rendimientos y manipular la composición bioquímica de las microalgas, dependiendo de la longitud de onda y de la especie de microalga de que se trate. Por ejemplo, de acuerdo a los resultados, *T. lutea* debería producirse con ledes rojos a 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ cuando se use como alimento de larvas y juveniles de moluscos, ya que además de mejorar los rendimientos celulares, se incrementa de manera muy importante la cantidad de ácidos grasos esenciales y particularmente de DHA, que son indispensables para el desarrollo de los moluscos en los estadios tempranos de desarrollo. La dieta a base de *T. lutea* deberá complementarse con *C. calcitrans* también producida con ledes rojos y a 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, ya que a pesar de que este tipo de luz inhibe la producción de EPA (20:5 ω 3) (otro de los ácidos grasos esenciales en el desarrollo de larvas y juveniles de moluscos) en *T. lutea*, la luz roja intensa incrementa su producción en *C. calcitrans*.

Con respecto a efecto de la longitud de onda sobre el tamaño celular, se encontró que la luz roja produce una reducción a la mitad en la biomasa celular de 9.11 a $4.5 \text{ pg}^{-1} \text{ cél}$ en *T. lutea* pero no hubo un efecto en *C. calcitrans*. No se conoce la causa que provoca la reducción en el tamaño celular en *T. lutea*, pero es evidente que esto representa una ventaja tecnológica si se considera que algunas larvas de moluscos como las de la almeja catarina (*Argopecten ventricosus-circularis*), son incapaces de ingerir células mayores a $2 \text{ }\mu\text{m}$ de diámetro durante los dos primeros días de formada la larva “D” (Lora-Vilchis y Maeda-Martínez, 1997). *T. lutea* cultivada en luz blanca mide entre 5 y $8 \text{ }\mu\text{m}$ de diámetro, mientras que con luz roja, el promedio se reduce a $4 \text{ }\mu\text{m}$. Este tema es de suma importancia ya que, en los laboratorios de producción de semilla, las larvas veliger más jóvenes que se cultivan carecen por lo tanto de alimento de calidad con un efecto deletéreo en el desarrollo. Esto ha motivado la búsqueda de otras especies de fitoplancton como alimento vivo para esa etapa del desarrollo (Lincicum, 2009). Se requiere, por lo tanto, verificar si las microcélulas de *T. lutea* producidas por efecto de la luz roja, pudiesen servir como alimento inicial de larvas veliger tempranas.

9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

En conclusión, el presente estudio representa una contribución importante a la tecnología de producción de microalgas. Sin embargo, es necesario comprobar en estudios posteriores el efecto que tendrían ambas especies de microalgas producidas con ledes rojos, en el crecimiento y supervivencia de larvas y juveniles de moluscos.

Acorde a la hipótesis planteada se concluye que la hipótesis es aceptada dado que la irradiancia y la longitud de onda de la luz roja tuvieron un efecto sobre en la cantidad y la calidad de la biomasa cultivada de *C. calcitrans* y *T. lutea*, además de que se produjeron modificaciones consistentes en la composición proximal y particularmente en la de los ácido grasos esenciales que pudiesen mejorar la cantidad y la calidad del alimento vivo requerido en el cultivo de las etapas tempranas de desarrollo de moluscos.

9.1. Recomendaciones.

- 1.- Se recomienda realizar un estudio para comparar el valor nutritivo de *T. lutea* combinada con *Chaetoceros calcitrans* producidas con ledes rojos a una irradiancia de $1500 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, vs. el valor nutritivo de las mismas microalgas producidas con ledes de luz blanca, en larvas y juveniles de algún molusco bivalvo.
- 2.- Se recomienda verificar si las microcélulas de *T. lutea* producidas por efecto de la luz roja, pudiesen servir como alimento inicial de larvas veliger tempranas de algunas especies de moluscos.
- 3.- Se recomienda realizar estudios para profundizar sobre el efecto de las diferentes longitudes de onda sobre las rutas metabólicas y en la fisiología general de las microalgas.

10. LITERATURA CITADA.

- Abiusi, F., G. Sampietro, G. Marturano, N. Biondi, L. Rodolfi, M. D'Ottavio, M. R. Tredici. 2014. Growth, photosynthetic efficiency, and biochemical composition of *Tetraselmis suecica* F&M-M33 grown with LEDs of different colors. *Biotechnol. Bioeng.* 111:956-964.
- Aidar, E., S. M. F. Ganesella-Galvão, T. C. S. Sigaud, C. S. Asano, T. H. Liang, K. R. V. Rezende, M. A. L. Sandes. 1994. Effects of light quality on growth, biochemical composition and photo synthetic production in *Cyclotella caspia* Grunow and *Tetraselmis gracilis* (Kyllin) Butcher. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 180:175-187.
- Al-Qasbi, M. N., S. Raut, S. Talebi, S. Al-Rajhi, T. Al-Barwani. 2012. A review of effect of light on microalgae growth. *Proceedings of the World Congress on Engineering 2012 Vol. I.* Londres, Reino Unido. 3p.
- Álvarez, T. P., F. Soto, Q. S. Aviles, L. C. Díaz, C. L. Treviño. 2012. Panorama de la investigación y su repercusión sobre la producción Acuícola en México. Secretaría de Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca – Instituto Nacional de la Pesca. pp. 30.
- Asha, P. S., P. Muthiah. 2006. Effects of single and combined microalgae on larval growth, development and survival of the commercial sea cucumber *Holothuria spinifera* Theel. *Aquacult. Res.* 37:113-118.
- Becker, E. W. 2007. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnol. Adv.* 25:207-210.
- Blanc, G., G. Duncan, I. Agarkova, M. Borodovsky, J. Gurnon, A. Kuo, J. L. Van Etten. 2010. The *Chlorella variabilis* NC64A Genome Reveals Adaptation to Photosymbiosis, Coevolution with Viruses, and Cryptic Sex. *Plant Cell.* 22:2943-2955.
- Blanken, W., M. Cuaresma, R. H. Wijffels, M. Janssen. 2013. Cultivation of microalgae on artificial light comes at a cost. *Algal Res.* 2:333-340.
- Bligh, G. E., J. W. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911-917.
- Briggs, W. R. 2006. Blue/UV-A Receptors: Historical Overview. En: Schäfer, E., F. Nagy (eds.). *Photomorphogenesis in plants and bacteria.* Springer Netherlands. Tercera Edición. 662p.
- Brown, M. R., S. W. Jeffrey, C. D. Garland. 1989. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture: a literature review. *CSIRO Marine Laboratories. Issue 205.* 44p.
- Brown, M. R., S. W. Jeffrey, J. K. Volkman, G. A. Dunstan. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture.* 151:315-331.
- Carcamo, C., A. S. Comesaña, F. M. Winkler, A. Sanjuan. 2005. Allozyme identification of mussels (*Bivalvia: Mytilus*) on the Pacific coast of South America. *J. Shellfish Res.* 24:1101-1115.

- Cardozo, K. H. M., T. Guaratini, M. P. Barros, V. R. Falcão, A. P. Tonon, N. P. Lopes, S. Campos, M. A. Torres, A. O. Souza, P. Colepicolo, E. Pinto. 2007. Metabolites from algae with economical impact. *CBP Part C: Toxicology & Pharmacology*. 146:60-78.
- Carvalho, A. P., S. O. Silva, J. M. Baptista, F. X. Malcata. 2011. Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89:1275-1288.
- Castruita, M., D. Casero, S. J. Karpowicz, J. Kropat, A. Vieler, S. I. Hsieh, S. S. Merchant. 2011. Systems biology approach in *Chlamydomonas* reveals connections between copper nutrition and multiple metabolic steps. *Plant Cell*. 23:1273-1292.
- Chen, C. Y., X. Q. Zhao, H. W. Yen, S. H. Ho, C. L. Cheng, D. J. Lee, J. S. Chang. 2013. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochem. Eng. J.* 78:1-10.
- Chen, C.Y., Y. C. Chen, H. C. Huang, C. C. Huang, W. L. Lee, J. S. Chang. 2013. Engineering strategies for enhancing the production of eicosapentaenoic acid (EPA) from an isolated microalga *Nannochloropsis oceanica* CY2. *Bioresour. Technol.* 147:160-167.
- Chen, H. B., J. Y. Wu, C. F. Wang, C. C. Fu, C. J. Shieh, C. I. Chen, Y. C. Liu. 2010. Modelling on chlorophyll a and phycocyanin production by *Spirulina platensis* under various light-emitting diodes. *Biochem. Eng. J.* 53:52-56.
- Chen, Y. C. 2007. Immobilization of twelve benthic diatom species for long-term storage and as feed for post-larval abalone *Haliotis diversicolor*. *Aquaculture*. 263:97-106.
- Chen, Y. C. 2012. The biomass and total lipid content and composition of twelve species of marine diatoms cultured under various environments. *Food Chem.* 131:211-219.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotech. Adv.* 25:294-306.
- Das, P., L. W. Lei, S. S. Aziz, J. P. Obbard. 2011. Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light. *Bioresour. Technol.* 102:3883-3887.
- De los Ríos, P. 2001. Crecimiento en poblaciones de *Artemia franciscana* y *A. persimilis* (Crustacea, Anostraca) en condiciones controladas. *Rev. Biol. Trop.* 49:629-634.
- Derelle, E., C. Ferraz, S. Rombauts, P. Rouze, A. Z. Worden, S. Robbens, H. Moreau. 2006. Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:11647-11652.
- Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.* 28:350-356.
- Enright, C. T., G. F. Newkirk, J. S. Craigie, J. D. Castell. 1986. Growth of juvenile *Ostrea edulis* L. fed *Chaetoceros calcitrans* Schütt of varied chemical composition. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 96:15-26.

- Fan, J., C. Andre, C. Xu. 2011. A chloroplast pathway for the de novo biosynthesis of triacylglycerol in *Chlamydomonas reinhardtii*. FEBS Letters. 585:1985–1991.
- Figuerola, F. L., J. Aguilera, F. X. Niell. 1995. Red and blue light regulation of growth and photosynthetic metabolism in *Porphyra umbilicalis* (Bangiales, Rhodophyta). Eur. J. Phycol. 30:11-18.
- Folch, J., M. Less, G. H. Stanley. 1956. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 226:497-509.
- Fu, W., O. Guðmundsson, G. Paglia, G. Herjólfsson, O. S. Andrésón, B. O. Palsson, S. Brynjólfsson. 2013. Enhancement of carotenoid biosynthesis in the green microalga *Dunaliella salina* with light-emitting diodes and adaptive laboratory evolution. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97:2395-2403.
- Glencross, B. D. 2009. Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. Rev. Aquac. 1:71-124.
- Goodson, C., R. Roth, Z. T. Wang, U. Goodenough. 2011. Structural correlates of cytoplasmic and chloroplast lipid body synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* and stimulation of lipid body production with acetate boost. Eukaryotic Cell. 10:1592-606.
- Gouda, R., E. Kenchington, B. Hatcher, B. Vercaemer. 2006. Effects of locally-isolated micro-phytoplankton diets on growth and survival of sea scallop (*Placopecten magellanicus*) larvae. Aquaculture. 259:169-180.
- Gouveia, L., A. C. Oliveira. 2009. Microalgae as a raw material for biofuels production. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 36:269-274.
- Guillard, R. R. L. 1975. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. En: Smith, W. L., M. H. Chanley (eds.). Cultures of marine invertebrate animals. Plenum Press, New York, U.S.A. 338p.
- Guillard, R. R. L., J. H. Ryther. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (cleve) Gran. Can. J. Microbiol. 8:229-239.
- Guimarães, A. S., P. Travassos, P. W. Souza Filho. 2010. Impact of aquaculture on mangrove areas in the Northern Pernambuco Coast (Brazil) using remote sensing and geographic information system. Aquac. Res. 41:828-838.
- Hall, D. O., K. K. Rao. 1995. Photosynthesis. University Press. Quinta Edición. Cambridge, Reino Unido. 211p.
- Helm, M., N. Bourne, A. Lovatelli. 2006. Cultivo de bivalvos en criadero, un manual práctico. FAO Documento Técnico de Pesca. 471:1-184.
- Ho, S. H., C. Y. Chen, D. J. Lee, J. S. Chang. 2011. Perspectives on microalgal CO₂-emission mitigation systems - A review. Biotechnol. Adv. 29:189-198.

- Ho, S. H., C. Y. Chen, J. S. Chang. 2012. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource Technol.* 113:244-252.
- James, S. D. 2009. Aquaculture Production and Biodiversity Conservation. *BioScience.* 59:27-38.
- Keeling, P.J. 2013. The number, speed, and impact of plastid endosymbioses in eukaryotic evolution. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 64:583-607.
- Kim, C. W., M. G. Sung, K. Nam, M. Moon, J. H. Kwon, J. W. Yang. 2014. Effect of monochromatic illumination on lipid accumulation of *Nannochloropsis gaditana* under continuous cultivation. *Bioresour. Technol.* 159:30-35.
- Kirk, J. T. O. 1994. *Light & Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*. Cambridge University Press. Segunda Edición. Cambridge, Reino Unido. 509p.
- Knuckey, R. M., M. R. Brown, S. M. Barrett, G. M. Hallegraeff. 2002. Isolation of new nanoplanktonic diatom strains and their evaluation as diets for juvenile Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture.* 211:253-274.
- Koc, C., G. Anderson, A. Kommareddy. 2013. Use of red and blue light-emitting diodes (LED) and fluorescent lamps to grow microalgae in a photobioreactor. *Isr. J. Aquacult. Bamid.* 65:1-8.
- Korbee, N., F. L. Figueroa, J. Aguilera. 2005. Effect of light quality on the accumulation of photosynthetic pigments, proteins and mycosporine-like amino acids in the red alga *Porphyra leucosticta* (Bangiales, Rhodophyta). *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 80:71-78.
- Lee, C.G., B.Ø. Palsson. 1996. Photoacclimation of *Chlorella vulgaris* to red light from light-emitting diodes leads to autospore release following each cellular division. *Biotechnol. Prog.* 12:249-256.
- Lincicum, R. B. 2009. The effect of picoplankton and nanoplankton food on growth and settlement of early D-shaped larvae of the scallop *Argopecten ventricosus*. Tesis de Maestría. California State University, Fullerton, 51p.
- Liu, B., C. Benning. 2013. Lipid metabolism in microalgae distinguishes itself. *Curr. Opin. Biotechnol.* 24:300-209.
- Liu, C. P., L. P. Lin. 2001. Ultrastructural study and lipid formation of *Isochrysis* sp. CCMP1324. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 42:207-214.
- Lora-Vilchis, M. C., A. N. Maeda-Martinez. 1997. Ingestion and digestión index of Catarina scallop *Argopecten ventricosus-circularis*, Sowerby II, 1842, veliger larvae with ten microalgae species. *Aquac. Res.* 28:905-910.

- Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-272.
- Lunka, A. A., D. J. Bayless. 2013. Effects of flashing light-emitting diodes on algal biomass productivity. *J. Appl. Phycol.* 25:1679-1685.
- Maki, K. C., T. M. Rains. 2012. Stearidonic acid raises red blood cell membrane eicosapentaenoic acid. *J. Nutr.* 142:626-629.
- Marchetti, J., G. Bougaran, T. Jauffrais, S. Lefebvre, C. Rouxel, B. Saint-Jean, J. P. Cadoret. 2013. Effects of blue light on the biochemical composition and photosynthetic activity of *Isochrysis* sp. (T-iso). *J. Appl. Phycol.* 25:109-119.
- Marsh, B. J., B. D. Weinstein. 1966. Simple charring method for determination of lipids. *J. Lipid Res.* 7: 574 – 576.
- Marshall, R., S. McKinley, C. M. Pearce. 2010. Effects of nutrition on larval growth and survival in bivalves. *Rev. Aquac.* 2:33-55.
- Mata T. M., A. C. Melo, M. Simoes, N. S. Caetano. Parametric study of a brewery effluent treatment by microalgae *Scenedesmus obliquus*. *Bioresour. Technol.* 107:151-158.
- McKeon, M. M. 1984. The hatchery and nursery stages of *Crassostrea gigas* cultivation at a location on Guernsey. Tesis (B. Sci.). Reino Unido. University of Southampton. 91p.
- Mercado, J. M., M. D. P. Sanchez-Saavedra, G. Correa-Reyes, L. Lubián, O. Montero, F. L. Figueroa. 2004. Blue light effect on growth, light absorption characteristics and photosynthesis of five benthic diatom strains. *Aquat. Bot.* 78:265-277.
- Merchant, S. S., S. E. Prochnik, O. Vallon, E. H. Harris, S. J. Karpowicz, G. B. Witman, A. R. Grossman. 2007. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science.* 318:245-250.
- Muller-Feugua, A., J. Moal, R. Kaas. 2003. The Microalgae of Aquaculture. En: Støttrup, J. G., L. A. McEvoy (eds.). *Live Feeds in Marine Aquaculture*. Blackwell Publishing, Oxford, Reino Unido. 252p.
- Muller-Feugua, A., R. Robert, C. Cahu, J. Robin, P. Divanach. 2007. *Live Feeds in Marine Aquaculture*. Eds J.G. Støttrup and L. A. McEvoy. Oxford, Reino Unido. 318p.
- Norzagary Campos, M., P. Muñoz Sevilla, L. Sánchez Velasco, L. Capurro Filograsso, O. Llánes Cárdenas. 2012. Acuicultura: estado actual y retos de la investigación en México. *AquaTIC.* 37:20-25.
- O'Connor, W., M. P. Heasman. 1997. Diet and feedings regimens for larval doughboy scallops, *Mimachlamys asperrima*. *Aquaculture.* 158:289-303.

- Olle, M., A. Virsile. 2013. The effects of light-emitting diode lighting on greenhouse plant growth and quality. *Agric. Food Sci.* 22:223-234.
- Pazos, J. V. P., P. F. Izquierdo. 2011. Synthesis of neutral lipids in *Chlorella* sp. under different light and carbonate conditions. *Cien. Tecnol. Fut.* 4:47-58.
- Pilon, L., H. Berberoğlu, R. Kandilian. 2011. Radiation transfer in photobiological carbon dioxide fixation and fuel production by microalgae. *J. Quant. Spectrosc. Radiat.* 112:2639-2660.
- Ponis, E., I. Probert, B. Véron, M. Mathieu, R. Robert. 2006. New microalgae for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Aquaculture.* 253:618-627.
- Posten, C. 2009. Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Eng. Life Sci.* 9:165-177.
- Pronker, A. E., N. M. Nevejan, F. Peene, P. Geijssen, P. Sorgeloos. 2008. Hatchery broodstock conditioning of the blue mussel *Mytilus edulis* (Linnaeus 1758). Part I. Impact of different microalgae mixtures on broodstock performance. *Aquacult. Int.* 16:297-307.
- Rico-Villa, B., J. R. Le-Coz, C. Mingrant, R. Robert. 2008. Influence of phytoplankton diet mixtures on microalgae consumption, larval development and settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture.* 256:377-388.
- Rismani-Yazdi, H., B. Z. Haznedaroglu, K. Bibby, J. Peccia. 2011. Transcriptome sequencing and annotation of the microalgae *Dunaliella tertiolecta*: Pathway description and gene discovery for production of next-generation biofuels. *BMC Genomics.* 12:148.
- Rivero-Rodriguez, S., A. R. Beaumont, M. C. Lora-Vilchis. 2007. The effect of microalgal diets on growth, biochemical composition, and fatty acid profile of *Crassostrea cortizensis* (Hertlein) juveniles. *Aquaculture.* 263:199-210.
- Robert, R., M. J. Chrétiennot-Dinet, R. Kaas, V. Martin-Jézéquel, J. Moal, J. R. Le Coz, J. L. Nicolas, E. Bernard, J. P. Connan, L. Le Dean, G. Gourrierec, B. Leroy, C. Quéré. 2004. Amélioration des productions phytoplanctoniques en éclosion de mollusques: caractérisation des microalgues fourrage. Report Ifremer. 150 p.
- Saavedra, M. P. S., C. Jiménez, F. L. Figueroa. 1996. Far-red light inhibits growth but promotes carotenoid accumulation in the green microalga *Dunaliella bardawil*. *Physiol. Plant.* 98:419-423.
- Sánchez-Saavedra, M. P., D. Voltolina. 2006. The growth rate, biomass production and composition of *Chaetoceros* sp. grown with different light sources. *Aquacult. Eng.* 35:161-165.
- Sánchez-Saavedra, P. M., D. Voltolina. 1996. Effect of blue-green light on growth rate and chemical composition of three diatoms. *J. Appl. Phycol.* 8:131-137.

- Sargent, J. R., G. Bell, L. Mcevoy, D. Tocher, A. Estevez. 1999. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture*. 177:191-199.
- Sato, N., N. Murata. 1988. Membrane lipids. *Methods Enzymol.* 167:251-259.
- Schulze, P. S. C., L. A. Barreira, H. G. C. Pereira, J. A. Perales, J. C. S. Varela. 2014. Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. *Trends Biotechnol.* 8:422-430.
- Shu, C. H., C. C. Tsai, W. H. Liao, K. Y. Chen, H. C. Huang. 2012. Effects of light quality on the accumulation of oil in a mixed culture of *Chlorella* sp. and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 87:601-607.
- Spolaore, P., C. Joannis-Cassan, E. Duran, A. Isambert. 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 101:87-96.
- Stadnichuk, I. N., A. A. Bulychev, E. P. Lukashev, M. P. Sinetova, M. S. Khristin, M. P. Johnson, A. V. Ruban. 2011. Far-red light-regulated efficient energy transfer from phycobilisomes to photosystem I in the red microalga *Galdieria sulphuraria* and photosystems-related heterogeneity of phycobilisome population. *Biochim. Biophys. Acta.* 1807:227-235.
- The state of world fisheries and aquaculture. (2007). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy. 180 pp.
- Tredici, M. R., N. Biondi, E. Ponis, L. Rodolfi, G. Chini Zittelli. 2009. Advances in microalgal culture for aquaculture feed and other uses. En: Burnell, G., G. Allan (eds). *New Technologies in Aquaculture: Improving Production Efficiency, Quality and Environmental Management*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 679p.
- Ursin, V. M. 2003. Modification of plant lipids for human health: Development of functional land-based omega-3 fatty acids. *J. Nutr.* 12:4271-4274.
- USDOE. 2013. Solid-State Lighting Research and Development. Multi- Year Program Plan, Office of Energy Efficiency & Renewable Energy, United States Department of Energy.
- Vieler, A., S. B. Brubaker, B. Vick, C. Benning. 2012. A lipid droplet protein of *Nannochloropsis* with functions partially analogous to plant oleosins. *Plant Physiol.* 158: 1562-1569.
- Voltolina, D., M. Nieves, P. Piña. 2000. Calidad de microalgas para la acuicultura. En: *Avances en Nutrición Acuicola, Simposium Internacional de Nutrición Acuicola (IV, 2000, La Paz, B.C.S., México)*. pp. 15-18.
- Wang, C. Y., C. C. Fu, Y. C. Liu. 2007. Effects of using light-emitting diodes on the cultivation of *Spirulina platensis*. *Biochem. Eng.* 37:21-25.
- Whitelam, G. C., K. J. Halliday. 2007. Light and plant development. *Annual Plant Reviews, Volume 30. Ann. Bot.* 101:480-481.

Whyte, J. N. C. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture*. 60:231-241.

Wikfors, G. H., M. Ohno. 2001. Impact of algal research in aquaculture. *J. Phycol.* 37:968-974.

Yan, C., L. Zhang, X. Luo, Z. Zheng. 2013. Effects of various LED light wavelengths and intensities on the performance of purifying synthetic domestic sewage by microalgae at different influent C/N ratios. *Ecol. Eng.* 51:24-32.

Yoshioka, M., T. Yago, Y. Yoshie-Stark, H. Arakawa, T. Morinaga. 2012. Effect of high frequency of intermittent light on the growth and fatty acid profile of *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*. 338:111-117.

Yúfera, M., L. M. Lubián. 1990. Effects of microalgal diet on growth and development of invertebrates in marine aquaculture. En: Akatsuka, I. (ed). *Introduction to applied phycology*. SPB Academic Publishing. University of California. 638p.

Zhao, Y., J. Wang, H. Zhang, C. Yan, Y. Zhang. 2013. Effects of various LED light wavelengths and intensities on microalgae-based simultaneous biogas upgrading and digestate nutrient reduction process. *Bioresour. Technol.* 136:461-468.

Zhu, C. J., Y. K. Lee, T. M. Chao. 1997. Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1. *J. Appl. Phycol.* 9:451-457.