

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua,
UNAN-León
Facultad de Ciencias y Tecnología
Departamento de Biología
Maestría en Salud de los Cuerpos de Agua



Memoria de investigación para optar al título de Magister Scientiae en Salud de los Cuerpos de Agua.

“Ritmo de crecimiento de *Nannochloropsis oculata* usando diferentes concentraciones de salinidad y F/2 Guillard en 10 y 23 días de cultivo”.

Autor

Karen Mercedes Palacios Sánchez

Tutor

Dr. Ariel José Aguilar

Asesor

M.Sc. Po-Yuan Hsieh

León, 2022

“A la libertad por la Universidad”



CERTIFICADO

ARIEL JOSÉ AGUILAR, Profesor Titular del Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Tecnología de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León (UNAN-León).

CERTIFICA QUE:

La presente memoria titulada *“Ritmo de crecimiento de *Nannochloropsis oculata* usando diferentes concentraciones de salinidad y F/2 Guillard en 10 y 23 días de cultivo”* presentada por la Lic. Karen Mercedes Palacios Sánchez para optar al grado de Magister Scientiae en Salud de los Cuerpos de Agua, por la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León, ha sido realizada bajo nuestra dirección y que hallándose concluida.

AUTORIZO

Su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.
Dado en la ciudad de León, Departamento de León, el 18 de noviembre, 2022.

Dr. Ariel José Aguilar
Profesor Titular
Departamento de Biología
Facultad de Ciencias y Tecnología
UNAN- León



FINANCIACIÓN

El presente trabajo de investigación ha sido realizado en el Laboratorio de Investigaciones Marinas y Acuícolas (LIMA), Departamento de Biología, Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, bajo la dirección del Dr. Ariel José Aguilar. La investigación desarrollada en esta Tesis, ha sido realizada con el apoyo de:

1. Instituto Nicaragüense de la Pesca y Acuicultura (INPESCA) a través del Proyecto de Maricultura con el que se acondicionó y amplió la infraestructura del LIMA para reproducir al pargo lunarejo. Asimismo, se fortalecieron las áreas de investigación con equipos y reactivos.
2. Laboratorio de Semillas Acuáticas por el apoyo brindado al proyecto de reproducción de pargo lunarejo en condiciones de laboratorio que desarrolla INPESCA y UNAN-León.
3. Grupo CAMANICA-PESCANOVA por apoyarnos con el mantenimiento del sistema de bombeo.



DEDICATORIA

Le dedico este trabajo investigativo a:

A Dios:

Mi padre celestial, quien al darme su amor infinito me concedió la dicha de coronar mi segundo trabajo de posgrado.

A mi hija Kaled de los Ángeles Lacayo Palacios:

Por ser la personita más importante en mi vida y por llenar mis días de amor y alegría. Porque por ti desee ser mejor persona y por ti fue que no me rendí, aún en los momentos más difíciles, al tenerte a mi lado me diste el valor para continuar. Gracias por tu amor, paciencia y por comprender mi ausencia en los años de preparación profesional. Te amo mi Hermosa Princesa.

A mi madre Mercedes Valentina Sánchez Saavedra:

Por su amor, apoyo incondicional y por ser un ejemplo de lucha para obtener en la vida éxitos como persona y como profesional.

A mi esposo Josué Illich Hernández Torrez:

Por sus oraciones y todo su apoyo incondicional para iniciar y concluir esta etapa

Familiares y amigos

Por estar conmigo en todo momento, porque sin importar nada, nunca me han dejado sola y sé que nunca lo harán. Gracias por creer en mí, incluso cuando ni yo creía.

Lic. Karen Mercedes Palacios Sánchez



AGRADECIMIENTO

Doy gracias a mi Padre Celestial por darme la vida, sabiduría, la inteligencia y la bendición de haberme permitido culminar una meta más en mi vida.

Mil gracias a mi tutor el **Dr. Ariel José Aguilar**, por haberme dado la oportunidad de ser parte del grupo de investigación del Laboratorio de Fisiología Animal y del Laboratorio de Investigaciones Marinas y Acuícola, gracias por ser mi tutor y amigo, por sus palabras de ánimo, optimismo, por trasmitirme sus conocimientos, gracias por formar parte de esta etapa de mi formación profesional que, pese a todas las vicisitudes que se presentaron la he culminado con mucho éxito y continuo confiando en Dios que lo mejor está por venir.

Y, por último, pero no menos importante quiero agradecerle a mi **madre, hija, esposo**, mis familiares y amigos que me han acompañado en este proceso de forma incondicional, comprendiéndome, apoyándome, alentándome a seguir adelante en los buenos y malos momentos

¡A todos muchísimas Gracias!



ABREVIATURAS

ANOVA: Análisis de varianza con un factor

ATP: Adenosina 5´trifosfato

mg: Miligramos

mL: Mililitros

N: Número de organismos

n: Normalidad

µl: Microlitros

°C: Temperatura

‰: Salinidad

NADPH: Nicotinamida-adenín-dinucleotido fosfato

TAGS: Triaglicérido

PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados

RuBisCo: enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Nannochloropsis oculata</i> . (LIMA 2020).	- 22 -
Figura 2. Espectro de absorción de los pigmentos fotosintéticos Geraldo y Guevara (2021).....	- 23 -
Figura 3: Curva de crecimiento de cultivo de microalgas. Modificado de Fogg y Thake, (1987). Tomado de Zare Vergara (2018).	- 26 -
Figura 3. Esquema que describe la biosíntesis de lípidos en microalga. Figura tomada de Orduz Díaz (2015).....	- 32 -
Figura 4. Proceso de la fotosíntesis. Tomada de Menéndez Valderrey (2015)..	- 33 -
Figura 5. Estructura que comparada con la clorofila a y b, la que se diferencia en el radical aldehído (CHO). Tomada de Ezquerro-Brauer y Chan-Higuera (2021)...	- 34 -
Figura 6. Estructura química del betacaroteno, equinenon, cantazantina, astaxantina y Zeaxantina. Algunos carotenoides comunes en peces. Tomado de Meyers, (2000).	- 36 -
Figura 7. Carotenoides y pigmentación en especies acuáticas. Tomado de Meyers, (2000).....	- 37 -
Figura 8. Reacciones de la Rubisco. A: carboxila RuBP en presencia de CO ₂ . B: catalización de la oxigenación de RuBP. Tomada de García Murria (2006)	- 38 -
Figura 9. Metabolismo de la RuBP. Tomada de Marin-Navarro (2004).....	- 39 -
Figura 10. Laboratorio de Investigaciones Marinas y Acuicola de la UNAN-León (LIMA)	- 43 -
Figura 11. Baterías experimentales de <i>Nannochloropsis oculata</i>	- 44 -
Figura 12. Cuadrícula de Hematocitómetro. A- Reglilla de Fuchs-Rosenthal. B- Reglilla de Neubauer (Arredondo, 2007).....	- 45 -



Capacidad reproductiva de Nannochloropsis oculata en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guillard.

Figura 13. Conteo celular de *Nannochloropsis oculata*. A: toma de muestra, B: se deposita la muestra en una cámara Neubauer y D: observación al microscopio. . - 46 -

Figura 14. Ritmo de reproducción de *Nannochloropsis oculata*, cultivada con 0.32 ‰ F/2 Guillard y diferentes concentraciones salinas, en un período de 10 días. - 48 -

Figura 15. Ritmo de reproducción de *Nannochloropsis oculata*, cultivada con 1 ‰ F/2 Guillard y diferentes concentraciones salinas en un período de 10 días. - 49 -

Figura 16. Cantidad de células por ml de *Nannochloropsis oculata*, cultivada con 0.32 ‰ y 1 ‰ de F/2 Guillard a diferentes concentraciones salinas (33 ‰, 25 ‰, 20 ‰, 15 ‰, 10 ‰, 5 ‰), 8 días de cultivo. Letras diferentes indican diferencias significativas, de manera individual, para cada batería experimental. *: Indica diferencias significativas entre los tratamientos con 0.32 ‰ y 1 ‰ de F/2 Guillard en una misma concentración salina - 50 -

Figura 17. Ritmo de reproducción de *Nannochloropsis oculata*, cultivada en diferentes concentraciones salinas. Período de 23 días con 0.32 ‰ F/2 Guillard. - 51 -

Figura 18. Ritmo de reproducción de *Nannochloropsis oculata*, cultivada en diferentes concentraciones salinas. Período de 23 días con 1 ‰ F/2 Guillard. ... - 52 -

Figura 19. Cantidad de células por ml de *Nannochloropsis oculata*, cultivada con 0.32 ‰ y 1 ‰ de F/2 Guillard a diferentes concentraciones salinas (33 ‰, 25 ‰ y 20 ‰), 23 días de cultivo. - 53 -



LISTA DE TABLAS

Tabla 4. Comportamiento reproductivo de *Nannochloropsis. oculata* en diferentes concentraciones de salinidad y dos concentraciones de F/2 Guillard (0.32 ‰ y 1 ‰), en 10 y 23 días de cultivo. - 54 -



ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the reproductive rhythm of *Nannochloropsis oculata* using two experimental batteries and applying single doses of 0.32 ‰ and 1 ‰ of F/2 Guillard, respectively; in salinities of 33 ‰, 25 ‰, 20 ‰, 15 ‰, 10 ‰ and 5 ‰, periods of 10 and 23 days and temperature of 25 °C. In a first experiment, with 0.32 ‰ of F/2 Guillard, *N. oculata* presented a higher number of cel/ml in salinities of 33 ‰ and 25 ‰, after 8 days of study, denoting the affinity of *N. oculata* to reproduce with higher speed in that salinity range. The importance of the use of F/2 Guillard was observed using 1 ‰ because the microalgae has a similar number of cel/ml ($P \leq 0.05$) in saline concentrations of 33 ‰, 25 ‰, 20 ‰ and 15 ‰ and similar concentration to microalgae grown with 0.32 ‰ F/2 Guillard in salinities of 33 ‰ and 25 ‰. The ability of *N. oculata* to reproduce in saline concentrations of 33 ‰, 25 ‰ and 20 ‰ and low levels of nutrients was tested in a second experiment which the results show a similar number of cel/ml between the saline treatments, in both batteries, after 23 days of cultivation. Our results suggest that *N. oculata* can reproduce with a low concentration of nutrients and that its metabolism may be mediated by the catalysis of some proteins such as rubisco that serves as an important reserve of nitrogen, sulfur and carbon.

Keywords: Battery, Salinity; Temperature; *Nannochloropsis*; Nutrient; Aquaculture Bioeconomy



RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el ritmo reproductivo de *Nannochloropsis oculata* usando dos baterías experimentales y aplicando dosis únicas de 0.32 ‰ y 1 ‰ de F/2 Guillard, respectivamente; en salinidades de 33 ‰, 25 ‰, 20 ‰, 15 ‰, 10 ‰ y 5 ‰, periodos de 10 y 23 días y temperatura de 25 °C. En un primer experimento, con 0.32 ‰ de F/2 Guillard, *N. oculata* presentó mayor número de cel/ml en salinidades de 33 ‰ y 25 ‰, a los 8 días de estudio, denotando la afinidad de *N. oculata* de reproducirse con mayor velocidad en ese rango de salinidad. La importancia del uso de F/2 Guillard fue observada usando 1‰ debido a que la microalga presenta similar número de cel/ml ($P \leq 0.05$) en concentraciones salinas de 33 ‰, 25 ‰, 20 ‰ y 15 ‰ y similar concentración a las microalgas cultivadas con 0.32 ‰ de F/2 Guillard en salinidades de 33 ‰ y 25 ‰. La capacidad de *N. oculata* de reproducirse en concentraciones salinas de 33 ‰, 25 ‰ y 20 ‰ y niveles bajos de nutrientes fue testado en un segundo experimento donde los resultados muestran similar número de cel/ml entre los tratamientos salinos, en ambas baterías, a los 23 días de cultivo. Nuestros resultados sugieren que *N. oculata* puede reproducirse con escasa concentración de nutrientes y que su metabolismo puede estar siendo mediado por la catálisis de algunas proteínas como rubisco que sirve como una importante reserva de nitrógeno, azufre y carbono.

Palabras claves: Batería, Salinidad, Temperatura, *Nannochloropsis*, Nutriente, Bioeconomía Acuícola



ÍNDICE

CERTIFICADO	- 1 -
FINANCIACIÓN	- 2 -
DEDICATORIA	- 3 -
AGRADECIMIENTO	- 4 -
ABREVIATURAS	- 5 -
LISTA DE FIGURAS.....	- 6 -
LISTA DE TABLAS	- 8 -
ABSTRACT.....	- 9 -
RESUMEN.....	- 10 -
ÍNDICE	- 11 -
1. INTRODUCCIÓN.....	- 14 -
2. OBJETIVOS	- 17 -
2.1. General.....	- 18 -
2.2. Específicos	- 18 -
3. MARCO TEORICO	- 19 -
3.1. Generalidades de las microalgas	- 20 -
3.2. Genero <i>Nannochloropsis</i>	- 21 -
3.3. Clasificación taxonómica de <i>Nannochloropsis</i> sp.....	- 21 -



Capacidad reproductiva de Nannochloropsis oculata en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guíllar.

3.4.	<i>Nannochloropsis oculata</i>	- 21 -
3.5.	Captación de energía por las microalgas:	- 23 -
3.6.	Cultivos de microalga	- 23 -
3.7.	Fases del crecimiento de los cultivos de microalgas	- 24 -
3.8.	Nutrientes	- 27 -
3.9.	Parámetros de cultivo	- 29 -
3.10.	Ácidos grasos en las microalgas	- 30 -
3.11.	Fotosíntesis	- 33 -
3.12.	Pigmentos Clorofilianos.....	- 33 -
3.13.	Pigmentos Carotenoides	- 34 -
3.14.	La Ribulosa bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCo)	- 38 -
3.15.	Utilidad de las Microalgas.....	- 40 -
3.16.	Medio de cultivo Guillard	- 40 -
4	MATERIALES Y METODOS	- 42 -
4.1.	Microalga	- 43 -
4.2.	F/2 Guillard	- 43 -
4.3.	Diseño experimental	- 44 -
4.3.1.	Experimento 1. Tratamiento dosis dependiente de salinidad y F/2	- 44 -
4.3.2.	Experimento 2. Tratamiento tiempo dependiente de crecimiento.....	- 44 -
4.4.	Conteo celular	- 45 -



*Capacidad reproductiva de *Nannochloropsis oculata* en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guíllar.*

4.5.	Análisis estadísticos	- 46 -
5.	RESULTADOS	- 47 -
5.1.	Primer experimento.	- 48 -
5.2.	Segundo experimento.....	- 51 -
6.	DISCUSION	- 55 -
6.1.	Caracterización preliminar del estudio.....	- 56 -
6.2.	Efecto de la salinidad y concentración de F/2 Guíllar sobre el ritmo de crecimiento de <i>Nannochloropsis oculata</i>	- 56 -
6.3.	Importancia del tiempo de cultivo y la concentración de F/2 Guíllard aplicada en el cultivo de <i>Nannochloropsis oculata</i>	- 58 -
7.	CONCLUSIONES.....	- 61 -
8.	RECOMENDACIONES.....	- 63 -
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	- 65 -



*Capacidad reproductiva de *Nannochloropsis oculata* en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guíllar.*

1. INTRODUCCIÓN



Capacidad reproductiva de Nannochloropsis oculata en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guíllar.

En la actividad de reproducción de peces, es necesario ofrecer alimento con alto contenido de nutrientes que favorezcan el neuro desarrollo de las larvas para obtener alevines con una completa formación de los diferentes sistemas, incluido el sistema nervioso central, por ende, se garantiza mayor capacidad de sobrevivencia de los alevines a ofrecer a las diversas granjas de engorde. En nuestro caso, en el Laboratorio de Investigaciones Marinas y Acuícola (LIMA) de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León (UNAN-León), se investiga para reproducir al pargo lunarejo en condiciones de cautiverio, es una especie carnívora y en sus primeros días de vida necesita alimento con alto contenido de proteínas y ácidos grasos poliinsaturados para garantizar la completa formación de sus tejidos, órganos y sistemas. Es más, debido a su instinto de cazador se alimenta de microorganismos zooplanctónicos; por consiguiente, es importante producir alimento vivo zooplanctónico que se alimenten con microalgas que sean capaces de producir esos nutrientes. Algunas microalgas aportan polisacáridos, aminoácidos y proteínas que varían en cantidad según la especie, por lo que son implementadas como mezcla para satisfacer todos los requerimientos nutricionales de organismos en cultivo (Lubzens et al., 1995). *Nannochloropsis oculata* es una microalga que pertenece a la clase Eustigmatophyceae, se caracteriza por ser unicelular, con formas sub-esféricas o cilíndricas y miden entre 2 y 4 μm , contiene clorofila "a" y otros pigmentos como astaxantina, zeaxantina y canthaxantina. Los cloroplastos, presentan coloración de amarillo al verde (Guiry, 2013). Este género agrupa especies que contienen la mayor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), especialmente ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido araquidónico (ARA), docosahexaenoico (DHA) de gran importancia en la nutrición y desarrollo de larvas de organismos marinos (Sánchez-Torres et al., 2008). El alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados que posee *N. oculata* y su tolerancia a los cambios ambientales, hace que esta especie sea ampliamente utilizada para nutrir rotíferos en las actividades de larvicultura de peces marinos. Se sabe que *Nannochloropsis oculata* cultivada en ambientes abiertos, con una temperatura entre 12-15 $^{\circ}\text{C}$ y concentración salina de 28-30 ‰ ha presentado concentraciones promedio de hasta 115×10^6 cel/ml, mientras que a temperatura mayor a 20 $^{\circ}\text{C}$ presenta valores de concentración entre 46 y 60 millones



*Capacidad reproductiva de *Nannochloropsis oculata* en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guíllar.*

de cel/ml (Persíco et al., 2011). En ambientes abiertos con temperatura de 31 °C y 25 ‰ de salinidad se han obtenido concentraciones de 75×10^6 cel/ml.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad reproductiva de *Nannochloropsis oculata* aplicando dosis únicas de 0.32 ‰ y 1 ‰ de F/2 Guíllard, en salinidades de 33 ‰, 25 ‰, 20 ‰, 15 ‰, 10 ‰ y 5 ‰, periodos de 10 y 23 días y temperatura de 25 °C.



*Capacidad reproductiva de *Nannochloropsis oculata* en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guíllar.*

2. OBJETIVOS



2.1. General

Evaluar el ritmo reproductivo de *Nannochloropsis oculata* usando concentraciones de 0.32 ‰ y 1 ‰ de F/2 Guíllard, en diferentes concentraciones salinas y periodos de tiempo.

2.2. Específicos

1. Analizar el ritmo reproductivo de *Nannochloropsis oculata* usando concentraciones de 0.32 ‰ y 1 ‰ de F/2 Guíllard en salinidades de 33 ‰, 25 ‰, 20 ‰, 15 ‰, 10 ‰ y 5 ‰, durante un periodo de 10 días a temperatura de 25 °C y luminosidad constante de aproximadamente 250 $\mu\text{mol E/m}^2 \text{/s}$.
2. Determinar el ritmo reproductivo de *Nannochloropsis oculata* usando concentraciones de 0.32 ‰ y 1 ‰ de F/2 Guíllard en salinidades de 33 ‰, 25 ‰, 20 ‰ durante un periodo de 23 días a temperatura de 25 °C y luminosidad constante de aproximadamente 250 $\mu\text{mol E/m}^2 \text{/s}$.
3. Comparar el comportamiento reproductivo de *Nannochloropsis oculata* entre los medios que contienen diferentes concentraciones de salinidad, F/2 Guíllard y durante los periodos de 10 y 23 días de cultivo.



Capacidad reproductiva de Nannochloropsis oculata en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guíllar.

3. MARCO TEORICO



3.1. Generalidades de las microalgas

Las microalgas son organismos fotosintéticos que aportan polisacáridos, aminoácidos, enzimas y proteínas para satisfacer todos los requerimientos nutricionales de organismos en cultivo como peces y crustáceos (Barrera et al., 2003). Estos microorganismos contribuyen en los ecosistemas acuáticos porque son el primer eslabón de la cadena alimentaria. Por tal razón, son el inicio del flujo energético en los ecosistemas. Además, juegan un papel importante en el equilibrio oxígeno-carbono a nivel mundial debido a su alta eficiencia fotosintética (Hernández Reyes et al., 2012).

Los cultivos de las microalgas se ven afectados por nutrientes, la intensidad de la luz, oxígeno, el pH, dióxido de carbono la salinidad, la temperatura y la presencia de depredadores; siendo la luz, el factor principal debido a que activa las diversas rutas metabólicas para la formación de nutrientes debido a la presencia de clorofila, razón por la cual deben distribuirse en la zona fóticas. Por lo tanto, se establecen patrones de productividad primaria que varían por la disponibilidad de luz y nutrientes (Hernández-Pérez y Labbé, 2014).

Los nutrientes varían según la especie. Pueden ser macronutrientes como el carbono (C), oxígeno (O), hidrógeno (H), fósforo (P) y nitrógeno (N) o micronutrientes como el hierro (Fe), cobre (Cu), zinc (Zn), cobalto (Co) y manganeso (Mn) y vitaminas (Ortiz-Moreno et al., 2012).

Según la clasificación taxonómica, se han identificado las siguientes especies de fitoplancton: Cyanophyta (cianobacterias), Pyrrophyta (dinoflagelados), Rhodophyta (algas rojas), Euglenophyta, Xanthophyta, Raphidophyta, Chlorophyta (algas verdes), Cryptophyta, Chrysophyta, Eustigmatophyta, Tribophyta, Phaeophyta, Prasinophyta, Glaucophyta y Bacillariophyta (diatomeas) (Volkman, 2016). Estos también se pueden clasificar según el tamaño en picoplancton (0,2-2 μm), nanoplancton (2-20 μm) y microplancton (>20 μm) (López-Fuerte et al., 2015; Ruíz, 2016), siendo el nanoplancton el principal productor primario en los ambientes marinos, (Moreno et al., 2012; Navarro-Vargas et al., 2014). Otros aspectos son la forma, tamaño, color y



*Capacidad reproductiva de *Nannochloropsis oculata* en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guíllar.*

motilidad y la presencia y ubicación de estructuras celulares como flagelos, pared celular, núcleo, cloroplastos y tipo de pigmento que contengan dependiendo del grupo taxonómico al que pertenecen (Bux, 2013).

3.2. Genero *Nannochloropsis*

Se diferencian del resto de las microalgas debido a que poseen clorofila a y carecen de clorofila b y clorofila c. Estas microalgas pueden acumular altas concentraciones de pigmentos como astaxantina, zeaxantina y cantaxantina (Lubián et. al., 2000). Se caracterizan por ser microalgas unicelulares, poseen formas sub-esféricas o cilíndricas que miden de 2 a 4 micras de diámetro (μm). No tienen flagelos y son fácilmente adaptables a condiciones ambientales diferentes y sus cloroplastos van del color amarillo al verde, (Guiry et al., 2013).

3.3. Clasificación taxonómica de *Nannochloropsis* sp.

Hibberd (1981), fue el primero en clasificar este género:

- Reino: Chromista
- Phylum: Heterokontophyta
- Clase: Eustigmatophyceae
- Familia: Monopsidaceae
- Género: *Nannochloropsis*
- Especie: *Nannochloropsis oculata*

3.4. *Nannochloropsis oculata*

Es una microalga alga verde unicelular que se puede encontrar tanto en el ambiente marino como en ambiente de agua dulce (Hibberd, 1981).

N. oculata presenta cloroplasto, este presenta laminillas paralelas que están formadas por tres tilacoides. Contiene una fuente de clorofila a y pigmentos como: zeaxantina, cataxantina y astaxantina (Lubián et. al., 2000). Otros investigadores consideran que el principal pigmento que posee es la Violaxantina (Whittle et al., 1975). Su envoltura está formada por cuatro membranas, de las cuales 2 exteriores



Capacidad reproductiva de Nannochloropsis oculata en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guillar.

corresponden al retículo endoplásmico (Lubián, 1982). *Nannochloropsis oculata* tiene la capacidad de convertir una porción significativa de su biomasa (hasta 60% en peso seco) en lípidos (Van Vooren et al., 2012).

N. oculata es muy importante para la acuicultura porque se reproducen muy rápido contienen proteínas, varios pigmentos y poseen ácidos grasos que no se encuentran en otros tipos de fitoplancton (Fawley, 2007). La mayor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), especialmente ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido araquidónico (ARA), docosahexaenoico (DHA), que son de gran importancia en la nutrición de animales marinos, especialmente para el crecimiento y desarrollo de larvas de peces, moluscos y crustáceos (Sánchez-Torres et al., 2008; Otero et al., 1997; Brown et al., 1999; Volkman et al., 1993).

En la acuicultura *N. oculata* es cultivada debido a su alto contenido y producción de lípidos, por ser una de las pocas especies cultivadas a gran escala, por su alto rendimiento y bajo costo. Esta microalga es ofrecida como fuente de alimento al rotífero (*Brachionus plicatilis*) para su enriquecimiento, el cual transfiere los ácidos grasos poliinsaturados a larvas de peces marinos (Sukenik, et al., 1993; Hoshida et al., 2005) a través de la alimentación con rotíferos (Cheng-Wu et al., 2001).

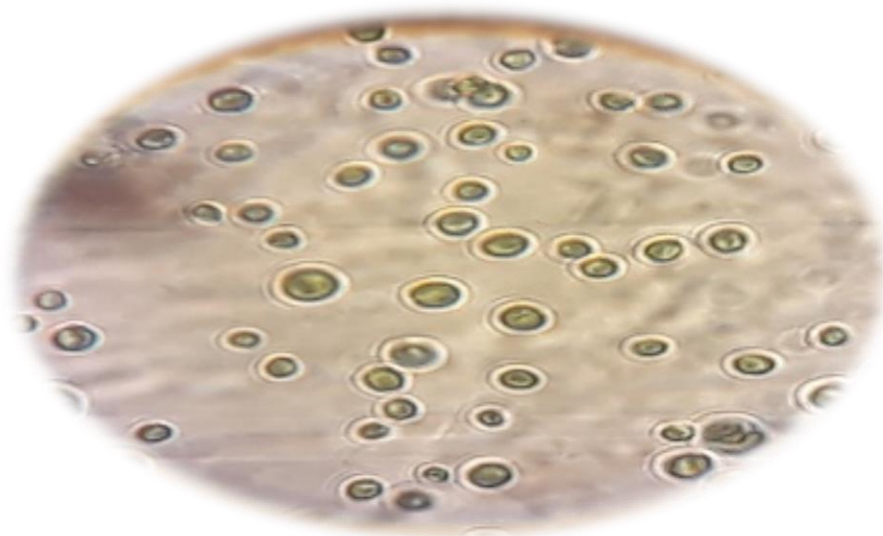


Figura 1. *Nannochloropsis oculata*. (LIMA 2020).



3.5. Captación de energía por las microalgas:

Las microalgas tienen la capacidad de absorber energía de la luz solar y es capaz de transformarla en energía química (ATP y NADP). En las microalgas estas reacciones ocurren en los fotosistemas. (Kim et al., 2013).

Las microalgas para realizar el proceso de fotosíntesis utilizan longitudes de ondas entre 400 y 700 nm. Las microalgas de color verde a través de la clorofila absorben rangos de entre 450 a 475 nm y 630 a 675 nm, y entre 400 a 550 nm para los carotenoides. La luz roja (600-700 nm) y la luz azul (400-500 nm) son longitudes que estimulan el crecimiento y el contenido de lípidos en las microalgas y pueden llegar a variar dependiendo de la intensidad de la luz. (Kim et al., 2013).

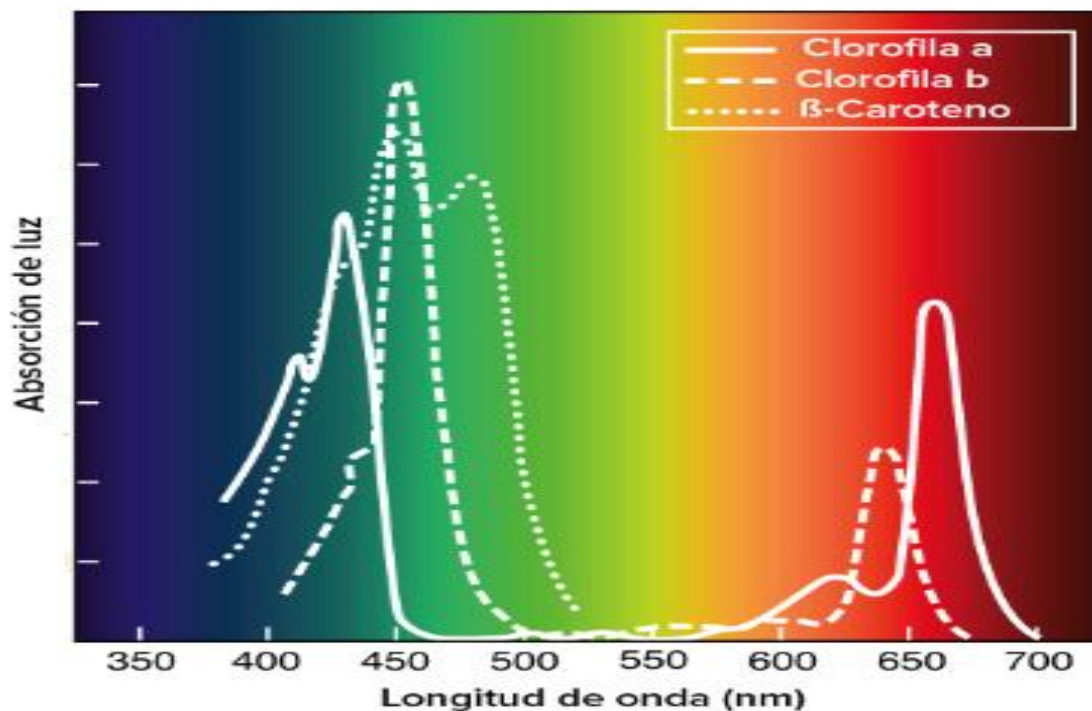


Figura 2. Espectro de absorción de los pigmentos fotosintéticos Geraldo y Guevara (2021).

3.6. Cultivo de microalga

Para cultivar microalgas se debe contar con un sistema a pequeña escala previamente preparado donde se establezcan condiciones óptimas de crecimiento según la especie, para que crezcan de manera exponencial (Das et al., 2015).



*Capacidad reproductiva de *Nannochloropsis oculata* en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guíllar.*

Las microalgas por ser organismos fotosintéticos dependen directamente de las variaciones en la intensidad de luz. La presencia de luz y nutrientes en cantidades suficientes favorece la fotosíntesis y permite el desarrollo de biomasa. Por consiguiente, en dependencia de las condiciones ambientales, en los cultivos algales se pueden activar diversas rutas metabólicas que propician la producción de pigmentos, lípidos, carbohidratos, proteínas, minerales y vitaminas, así como compuestos de interés económico para las industrias. Estos compuestos, incluidos ácidos grasos, enzimas, β -carotenos, flavonoides, ficobilinas, polisacáridos, tocoferol, astaxantina y otros pigmentos; se utiliza en las industrias farmacéutica, cosmética y la industria alimentaria para la nutrición humana y animal (Hernández-Pérez y Labbé, 2014; Trentacoste et al., 2015).

Los cultivos de las microalgas no presentan grandes dificultades, pero si requieren de una serie de factores que deben tomarse en cuenta debido a que son organismos vivos que deben ser, analizados y/o evaluados. Por tanto, las condiciones principales que influyen en la productividad de biomasa y lípidos son la temperatura (Sukenik et al. 2009), la salinidad (Pal et al. 2011, Su et al. 2011), la disponibilidad de nutrientes (Rezanka et al. 2011, Yeesang y Cheirsilp 2011, Yuan et al. 2011) y la intensidad de la luz (Simionato et al. 2011).

3.7. Fases del crecimiento de los cultivos de microalgas

Las microalgas se reproducen principalmente por división celular, en la mayoría binaria, a partir de la cual crecen rápidamente cuando se inoculan en un medio de cultivo, en condiciones ambientales adecuadas (Arredondo y Voltolin, 2007). Para evaluar el crecimiento de las microalgas se utilizan criterios poblacionales como la tasa de crecimiento, por tanto, las fases de crecimiento para las microalgas inciden en el contenido de células de microalgas, la biomasa y la composición bioquímica.

a) **Fase de adaptación:** En esta fase el número de células no aumenta por lo que podría hasta llegar a reducirse en número con respecto al inóculo inicial (Romo,



Capacidad reproductiva de Nannochloropsis oculata en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guíllar.

2002; Fogg y Thake, 1987). Este retraso en el crecimiento puede deberse a un período de adaptación fisiológico debido a cambios en las condiciones de nutrición o cultivo (Lee y Shen, 2004). Por lo tanto, las microalgas requieren de aclimatación para adaptarse a su nuevo entorno acuático antes de que comiencen a multiplicarse nuevamente (Rodríguez, 2006; Morales y De Velotti, 1990; Richmond, 1986).

b) **Fase exponencial:** Durante la fase de crecimiento, las células crecen y se dividen exponencialmente en función de los nutrientes, intensidad de luz y temperatura (Lee y Shen, 2004). Esta fase puede ocurrir del segundo al tercer día después de la inoculación y durar hasta el cuarto día (Rodríguez, 2006; Coll, 1991; Morales y De Velotti, 1990).

c) **Fase de retardo de crecimiento:** A medida que el cultivo va creciendo, empieza el agotamiento de los nutrientes, el pH y otros factores cambian como resultado del crecimiento exponencial de la densidad celular de las microalgas, lo que ralentiza la tasa de división celular (Rome, 2002; Fogg, y Thake, 1987). En esta fase, la densidad de cultivo alcanza su pico máximo de crecimiento. Esto se debe a la disminución de nutrientes, el aumento de las concentraciones de metabolitos y la reducción de la actividad fotosintética debido a la disponibilidad de luz por el crecimiento de la densidad celular. Por consiguiente, en esta etapa, las microalgas alcanzan la mayor densidad poblacional, disminuye la síntesis de proteínas y aumenta la síntesis de productos de reserva como carbohidratos y lípidos. Por tanto, alcanza el mayor valor nutricional para ofrecer a las larvas de peces u otros organismos acuáticos. (Chinchayán 1996; Hoff kaj Snell, 1993).

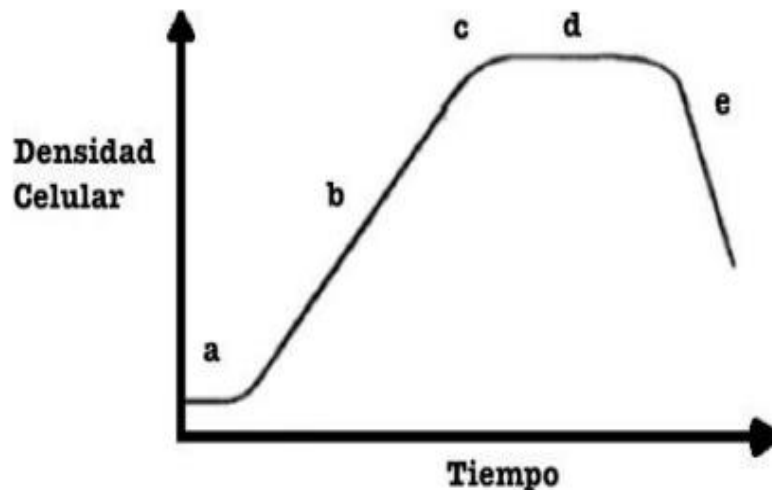
d) **Fase estacionaria:** Durante esta fase, el número de células alcanzadas se mantiene constante en el tiempo, el crecimiento celular y muerte se equilibran en el cultivo de las microalgas. Esta etapa puede durar semanas o meses (Roma, 2002; Fogg y Thake, 1987). En el medio de cultivo, los nutrientes prácticamente están agotados y hay un aumento del pH (8-9). Se acumulan sustancias tóxicas como el NH_3 y no pueden captar los fosfatos (por el alto pH). Por otro lado, al incrementar la



Capacidad reproductiva de Nannochloropsis oculata en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guíllar.

concentración de microalgas disminuye el valor de turbidez llegando menos luz a las microalgas, por ende, la división celular es menor, el crecimiento poblacional no ocurre debido a cambios fisicoquímicos en el medio, y la tasa de crecimiento es compensada por la muerte celular (Richmond, 1986).

e) **Fase de muerte:** En la fase de muerte se produce una degradación de la calidad del agua debido al aumento de los desechos metabólicos, el agotamiento de los nutrientes, la falta de O₂ y los cambios en el pH que hacen que las células y los pigmentos fotosintéticos envejeczan, lo que lleva a la muerte celular. Bajo estas condiciones, las células de microalgas tienen muy poco valor nutricional para larvas de peces y zooplancton. (Arredondo y Voltolina, 2007; Chinchayán 1996; Hoff y Snell, 1993; Richmond, 1986).



- (a) - Fase de Adaptación
- (b) - Fase de Crecimiento Exponencial
- (c) - Fase de Declinación Relativa de Crecimiento
- (d) - Fase Estacionaria
- (e) - Fase de Muerte

Figura 3: Curva de crecimiento de cultivo de microalgas. Modificado de Fogg y Thake, (1987). Tomado de Zare Vergara (2018).



*Capacidad reproductiva de *Nannochloropsis oculata* en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guíllar.*

Las diferentes etapas de la curva de crecimiento, representan el comportamiento de cultivo de las microalgas a las condiciones ambientales a las que son sometidas. Con la ayuda de esta curva, facilita calcular la tasa de crecimiento, tiempo de reproducción de las microalgas, número de superposiciones por unidad de tiempo y productividad de los cultivos. Sin embargo, es posible que, en algunos casos, dependiendo de las condiciones de cultivo, no sea posible distinguir las fases. (Barsanti y Gualtieri, 2014).

3.8. Nutrientes

Desde mediados del siglo XX se sabe que las microalgas son eficientes en la remoción de nitrógeno y fósforo en aguas residuales (Hammouda O, 1995; Abdel-Raouf N, 2012; Park, 2010). Esto se debe a que son nutrientes esenciales en la formación de biomasa (Georgakakis, 2011). Por tanto, en los cultivos en laboratorios se aplican fertilizantes en donde los nutrientes influyen en la composición bioquímica de las células y la velocidad de crecimiento del cultivo. Estos nutrientes importantes son:

- a) **El carbono (C):** es el macronutriente más importante, forma parte de la estructura de los carbohidratos que pueden ser estructurales (pared celular) y de reserva (cloroplastos) en condiciones de limitación de nutrientes o de saturación de luz (León-Saiki, 2018). Las microalgas pueden emplearse como fuente de carbono: tomando los iones bicarbonato (HCO_3^-) con la ayuda de la anhidrasa carbónica, enzima que tiene la función de acumular hasta 20 veces más del carbono inorgánico que se encuentra en el medio y el CO_2 presente en la atmósfera. Por consiguiente, constituye el 50% de la biomasa microalgal. El CO_2 que se ofrece en los cultivos mediante aireación facilita la mezcla del cultivo, impide la sedimentación celular, favorece la exposición de las células a la luz y a los nutrientes y mejora el intercambio de gas entre el medio de cultivo y el aire (Olivares, 2010).



*Capacidad reproductiva de *Nannochloropsis oculata* en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guíllar.*

- b) **El nitrógeno (N):** después del carbono es considerado un nutriente muy importante para las microalgas. Las microalgas pueden tomar nitrógeno del medio en forma de urea, amonio, nitrato, nitrito, nitrógeno molecular y óxidos de nitrógeno (NO_x) (Ruiz, 2011). El nitrógeno contribuye a la producción de biomasa microalgal. Cuando el nitrógeno se agota o deja de suministrarse, el crecimiento celular disminuye debido a que no se almacena en el interior celular, siendo un componente esencial para la regulación del contenido lipídico, proteínas, enzimas, clorofilas, moléculas de transferencia de energía, material genético y otros constituyentes celulares (Sánchez-Varo, 1995; Barsanti y Gualtieri 2014). Sin embargo, en exceso puede también disminuir el crecimiento celular (Park, 2010).
- c) **El fósforo (P):** Juega un papel fundamental en la formación de ácidos nucleicos y transferencia de energía, en la biosíntesis de las membranas celulares constituidas por fosfolípidos, por lo que se requiere para la división celular (Butusov y Jernelöv, 2013). El suministro de fosforo influye en la composición de la biomasa producida, especialmente en el contenido de lípidos y carbohidratos. (Richmond, 2004). Existen factores que pueden influir en la captación de fosfatos por parte de las algas como son: ausencia potasio, magnesio o sodio y un pH alto o bajo. La limitación de fósforo puede afectar importantemente en el desarrollo de las microalgas (Ruiz, 2011).
- d) **Oxígeno (O₂):** La aplicación de oxígeno a los cultivos debe ser controlada, debido a que altas concentraciones de oxígeno pueden inhibir la fijación de carbono por parte del enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCo). Esta inhibición puede ser influenciada por alta incidencia solar, temperatura y CO₂. La producción fotosintética de oxígeno en cultivos de alta densidad puede alcanzar hasta 40 mg L⁻¹, de modo que mediante la radiación adecuada pueden llegar a desarrollarse radicales libres de oxígeno, los que serían tóxicos para las células y provocar daños en



*Capacidad reproductiva de *Nannochloropsis oculata* en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guíllar.*

sus membranas. Mediante el aumento de turbulencia y burbujeo de aire se puede disminuir la presión parcial del oxígeno en el cultivo (Ruiz, 2011).

Además del C, N y P, hay otros elementos que son necesarios en el cultivo de microalgas como son los macronutrientes (S, K, Na, Fe, Mg, Ca) y los micronutrientes o elementos traza (B, Cu, Mn, Mo, Zn, V y Se). Los elementos traza son muy importantes en las reacciones enzimáticas y en la biosíntesis de compuestos para el metabolismo celular. Similar al Fósforo, muestran una afinidad por otros compuestos del medio y precipitan. Para evitar este problema, están incluidos en los medios de cultivo agentes quelantes de metales como el EDTA (Cota, 2019). Algunos investigadores afirman que la captación de nutrientes por parte de las microalgas se ve influida por la relación N: P, lo que producirá un mayor crecimiento y toma de nutrientes (Ruiz, 2011). Asimismo, se ha reportado que en escases de nutrientes los cultivos de microalgas tienden a la acumulación de lípidos, siempre que haya luz y CO₂ disponible (Khozin-Goldberg y Cohen, 2006; Rodolfi y Zittelli, 2009).

3.9. Parámetros de cultivo

a) Temperatura: Es un factor importante que debe ser controlado constantemente, puesto que puede afectar a la composición bioquímica de las células y a la cantidad de lípidos (Suh y Lee, 2003). Por consiguiente, se debe establecer rangos de temperatura óptima, entre 16 y 27 °C favorables a la especie de microalga que se esté cultivando, para favorecer la tasa de crecimiento. Dependiendo de la especie a cultivar, este intervalo de temperatura puede ser modificado, existiendo especies mucho más tolerantes a este factor que otras (Desmidt et al., 2015).

b) Iluminación: Parámetro esencial para el crecimiento de las microalgas. Las microalgas utilizan un rango de luz conocido como radiación fotosintética activa (PAR), longitud de onda entre 300 y 700 nm, correspondiendo al 40% de la radiación total del sol para el proceso de la fotosíntesis. Esto nos indica que el



*Capacidad reproductiva de *Nannochloropsis oculata* en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guíllar.*

crecimiento de los microorganismos fotosintéticos es proporcional a la intensidad de luz recibida. Este valor máximo es característico de cada especie de microalga (Wehr, 2007).

- c) **pH:** El rango de pH depende para cada especie de microalga, el cual influye en su metabolismo. Existen microorganismos neutrófilos, se denominan así, porque el valor de pH apenas se encuentra por encima de la neutralidad. Sin embargo, en sistemas de cultivo cerrados, puede ser variable por el consumo de nutriente y CO₂. En dichas circunstancias, y para evitarlo, ya que valores de pH altos inhiben el crecimiento celular, se suele emplear disoluciones tampón tal como el fosfato, que funcionan en el rango de valores de pH próximos a 7 (Qiu et al., 2017).

- d) **Agitación:** Con una adecuada aireación y agitación se evita que las microalgas se adhieran a las paredes del recipiente y sedimenten. Asimismo, facilita la homogenización de los nutrientes, una correcta exposición a la luz, control del pH y la eliminación de gradientes térmicos. Sin embargo, es necesario tener en cuenta la agitación, ya que está relacionada con la productividad microalgal. Una excesiva agitación, ya sea con agitadores o con burbujeo, podría provocar un 25% de estrés hidrodinámico, lo que conllevaría a una gran disminución en la tasa de crecimiento (Suh y Lee, 2003).

- e) **Salinidad:** La salinidad es un parámetro muy importante en los cultivos de microalgas debido a que influye en la acumulación de algunos productos, como el glicerol y el β-caroteno. Las concentraciones altas de salinidad pueden aumentar el contenido de β-caroteno en *D. salina* y los aminoácidos esenciales de metionina y fenilalanina en las cianobacterias *Aphonethece halophytica* (Brown et al., 1989). Otros investigadores han reportado que la salinidad también puede inhibir el crecimiento de *Nannochloropsis sp.* (Pal et al. 2011).

3.10. Ácidos grasos en las microalgas



*Capacidad reproductiva de *Nannochloropsis oculata* en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guíllar.*

En las microalgas encontramos lípidos que son ésteres de glicerol que se obtienen a partir de ácidos grasos de cadenas de 14-20 carbonos (C), Estos juegan un papel muy importante de señalización intracelular y almacenamiento de energía. Su composición y cantidad de lípidos dependen directamente de las especies microalgas y sus condiciones de cultivo. La biosíntesis de ácidos grasos en las microalgas es similar al de las plantas superiores, por presentar características similares como genes y enzimas de origen vegetal y algal. (Safi et al., 2014). Los lípidos se dividen en lípidos neutros (triacilglicéridos, colesterol) y lípidos polares (fosfolípidos, galactolípidos). (Huang et al., 2010; Hu et al., 2008) Los triacilglicéridos (TAGs) son un tipo de lípido de tres ácidos grasos unidos a un esqueleto de glicerol. (Huang et al., 2010; Hu et al., 2008; (Maity et al., 2014). Para el caso de algunas especies de microalgas como *Chlorella vulgaris* y *N. oculata*, los TAGs son almacenados en una gota densa en el citoplasma y en el espacio inter-tilacoide del cloroplasto. (Safi et al., 2014)

Nannochloropsis oculata, contiene ácidos grasos poliinsaturados tales como EPA, DHA y ARA, ácidos grasos importantes para la nutrición de animales y humanos (Drevon et al., 1993; Simopoulos, 1999), esta microalga es una fuente alternativa que genera estabilidad por sus compuestos antioxidantes a través de los carotenoides y vitaminas en comparación con las fuentes de pescado, además, los lípidos en las microalgas están bioencapsulados por sus paredes celulares lo cual ayuda a prevenir su oxidación (Patil et al., 2007).



*Capacidad reproductiva de *Nannochloropsis oculata* en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guillar.*

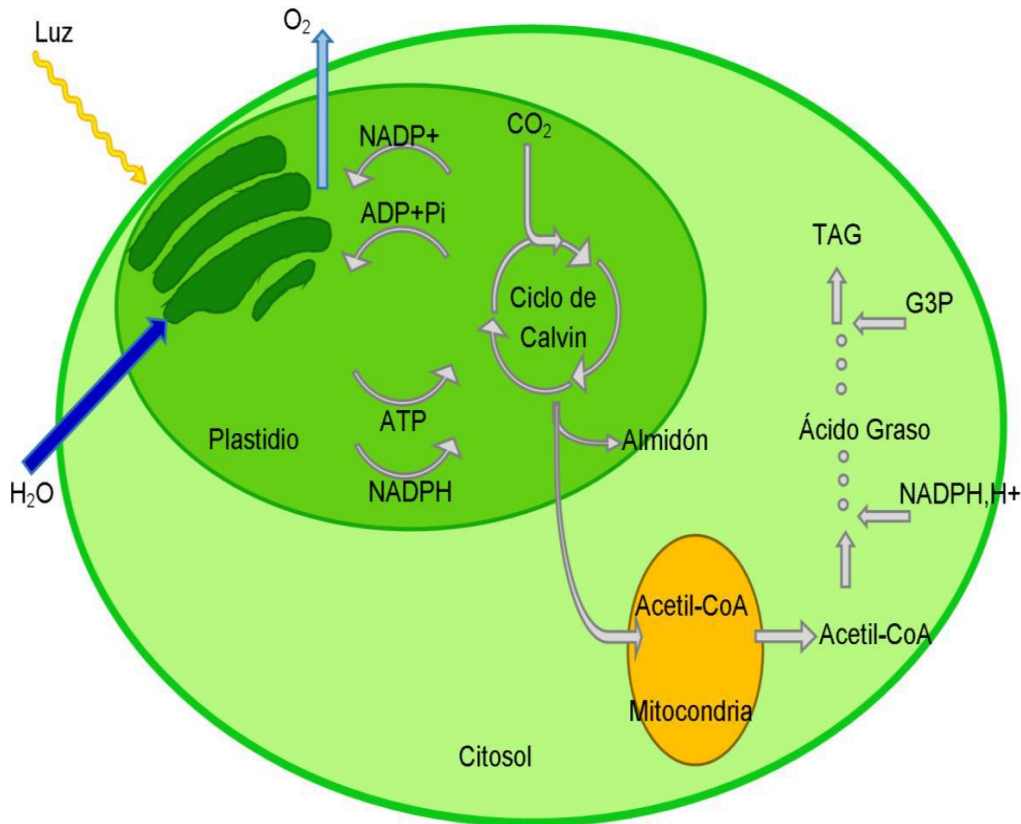


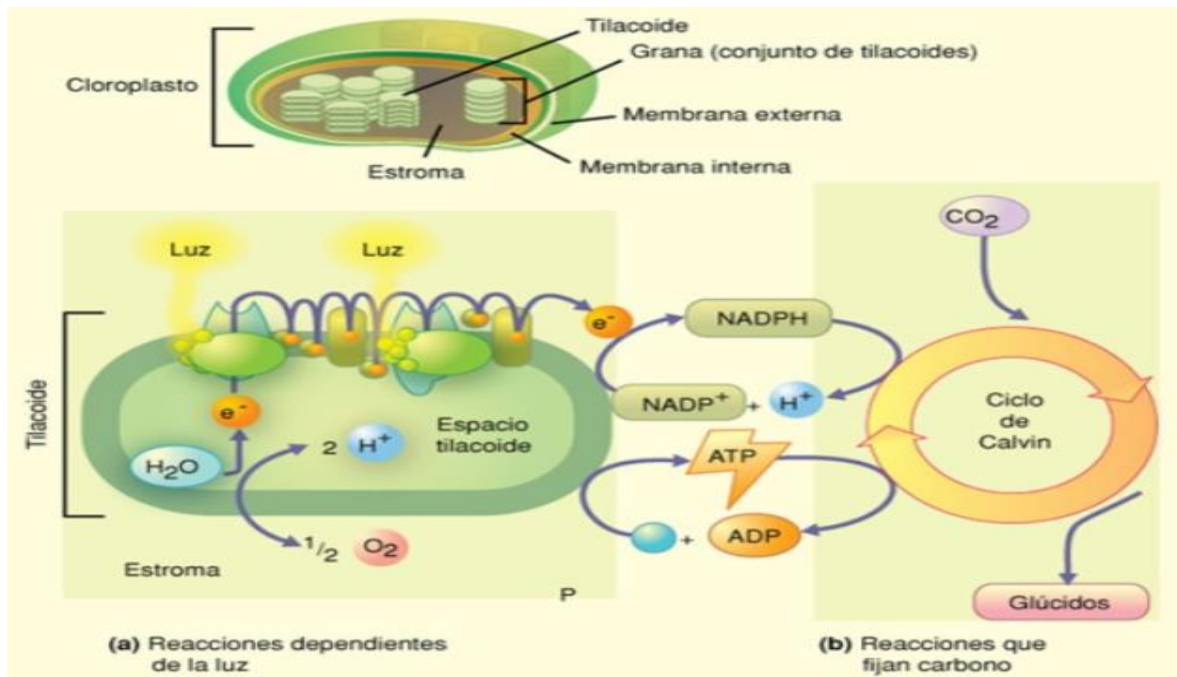
Figura 3. Esquema que describe la biosíntesis de lípidos en microalga. Figura tomada de Orduz Díaz (2015)

La energía que contienen los fotones presentes en el flujo luminoso permite que se realiza la oxidación catalítica de la molécula de agua en donde se separa para liberar O_2 , y además se obtienen como producto ATP y NADPH. El CO_2 es fijado como proteínas, carbohidratos y lípidos. En los lípidos de las microalgas, las moléculas de carbono son transformadas para producir almidón y acetil-CoA en el cloroplasto, las moléculas de acetil-CoA son carboxiladas y son sometidas a ciclos de adición descarboxilativa y β -reducción para realizar la síntesis de los ácidos grasos. Posteriormente, los ácidos grasos son secuencialmente transferidos con acción de gliceraldehído-3-fosfato (G3P) para la posterior formación de triacilglicerol (TAG). (Hu et al., 2008; Fischer et al 2008).



3.11. Fotosíntesis

La fotosíntesis es el proceso donde se capta energía luminosa del sol y la transforma en energía química, siendo el adenosin trifosfato (ATP) la primera molécula donde se almacena la energía (Krause y Weis, 1991). Este proceso se realiza en los cloroplastos, los cuales están formados por estroma y es el sitio donde se alojan las enzimas que se encargan de transformar al CO₂ que obtiene del ambiente, en materia orgánica. Los cloroplastos tienen estructuras cilíndricas aplanadas que se les llama tilacoides, que al acumularse son llamados granas (conjunto de tilacoides). La membrana de los tilacoides contiene: cadenas transportadoras de electrones, una ATP sintetasa y un sistema fotosintético de absorción de la luz con sus pigmentos fotosintéticos (pigmentos Clorofilianos y pigmentos carotenoides). (Prince y Kheshgi,



2005).

Figura 4. Proceso de la fotosíntesis. Tomada de Menéndez Valderrey (2015).

3.12. Pigmentos Clorofilianos

La clorofila es un pigmento fotosintético primario, se encarga de captar la luz emitida por el sol, absorbiendo las longitudes de ondas del violeta, azul, anaranjado-rojizo, rojo y pocas radiaciones de las longitudes de onda intermedias, verde-amarillo-



*Capacidad reproductiva de *Nannochloropsis oculata* en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guíllar.*

anaranjado (Prince y Khesghi, 2005). La clorofila es un tetrapirrol, estos están formados por un anillo de porfirina que se enlaza a una cadena larga de hidrocarburos. Se diferencian de los citocromos por el ion Mg^{+2} que lleva en el centro de su estructura (figura 5) (en lugar de un átomo de Fe) y que tiene un anillo adicional de cinco CH_3 (Lodish et al., 2000).

Existen clorofilas a, b, c, d y e, siendo la clorofila “a” y “b” los dos pigmentos fotorreceptores mas importantes. Por su estructura estos captan la emisión luminosa de la región del rojo y el azul; por tal razón, algunas microalgas y las plantas son de color verde. Las clorofilas presentan una estructura de dobles enlaces conjugados. La presencia de estos sistemas conjugados es lo que permite a este pigmento la capacidad de absorber luz visible. (Ascon y Talon, 2008).

Existe una diferencia entre la clorofila “a” y “b” por el grupo de carbono tres (C3); para clorofila “a” la estructura presenta metilo ($-CH_3$) y para clorofila “b” tiene aldehído ($-CHO$) (Salisbury y Ross, 2000).

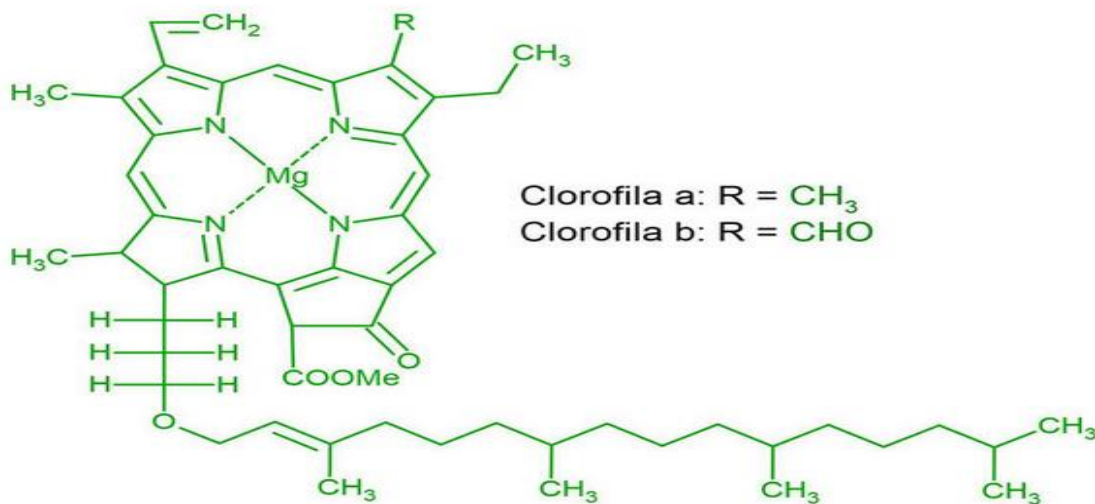


Figura 5. Estructura que comparada con la clorofila a y b, la que se diferencia en el radical aldehído (CHO). Tomada de Ezquerra-Brauer y Chan-Higuera (2021)

3.13. Pigmentos Carotenoides

Los carotenoides son pigmentos que producen los organismos fotosintéticos, así como algunas especies de hongos, bacterias y levaduras. Los pigmentos



*Capacidad reproductiva de *Nannochloropsis oculata* en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guillar.*

carotenoides pueden ser sintetizados solamente por levaduras, fitoplancton y las plantas, en el caso de los peces los consumen a través de la cadena trófica.

Los pigmentos carotenoides son compuestos liposolubles, derivados del licopeno. Se caracterizan por presentar cadenas insaturadas de 40 carbonos (C40) en su estructura (Martínez, 2010). Se distinguen por presentar en los extremos anillos en los carbonos. Los carotenoides obedecen a la clasificación de tetra-terpenoides, que contienen dobles enlaces conjugados (Sy y col., 2015). Las características estructurales de los carotenoides les confieren atributos de versatilidad en su funcionalidad y aplicación (Sy y col., 2015). Existen dos tipos de carotenoides:

- a) **Carotenos:** son carotenoides hidrogenados porque están formados por carbono e hidrogeno (β -caroteno, licopeno, etc.) y su fórmula empírica $C_{40}H_{56}$ (Martínez, 2010)
- b) **Xantófilos:** son carotenoides que contienen funciones oxigenadas como (aldehído, ácido carboxílico, hidroxilo y otros), puede ser acíclicos o contener un anillo de seis carbonos, cinco, a uno o ambos extremos de su estructura molecular (Martínez, 2010).

Dentro de las xantofilas tenemos los pigmentos Zeaxantina, Astaxantina, Cantaxantina y Violaxantina. (Goodwin, 1960; Bjerkeng et al. 1992). La función fotosintética principal de los carotenoides es proteger el aparato fotosensible mediante dispositivos de disipación y extinción de energía (Ascon-Bieto y Talon, 2008).

Los carotenoides principales de origen marino con la función de actuar como antioxidante son la astaxantina (3.3'-dihidroxi-4.4'-diceto-(caroteno), cantaxantina (4.4'-diceto-(caroteno) y el β -caroteno. También es posible encontrar, aunque en menores concentraciones zeaxantina, luteína y otros compuestos carotenoides (Hata y Hata, 1973). La Astaxantina es el pigmento considerado el más potente antioxidante, en comparación con otros carotenoides (Gammone et al., 2015). La



*Capacidad reproductiva de *Nannochloropsis oculata* en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guíllar.*

cantaxantina actúa como un intermediario en la síntesis de astaxantina, también es utilizado como suplemento alimenticio y como aditivo, por su actividad antioxidante. La Zeaxantina es un pigmento que su función es la de proteger a la planta contra la radiación solar; esta misma propiedad resulta útil para proteger la retina humana de las radiaciones ultravioleta del sol y enfermedades oculares (Ziegler, 1991; Mayne, 1996), por su actividad antiinflamatoria y antioxidante. (Olmedilla-Alonso et al. 2007).

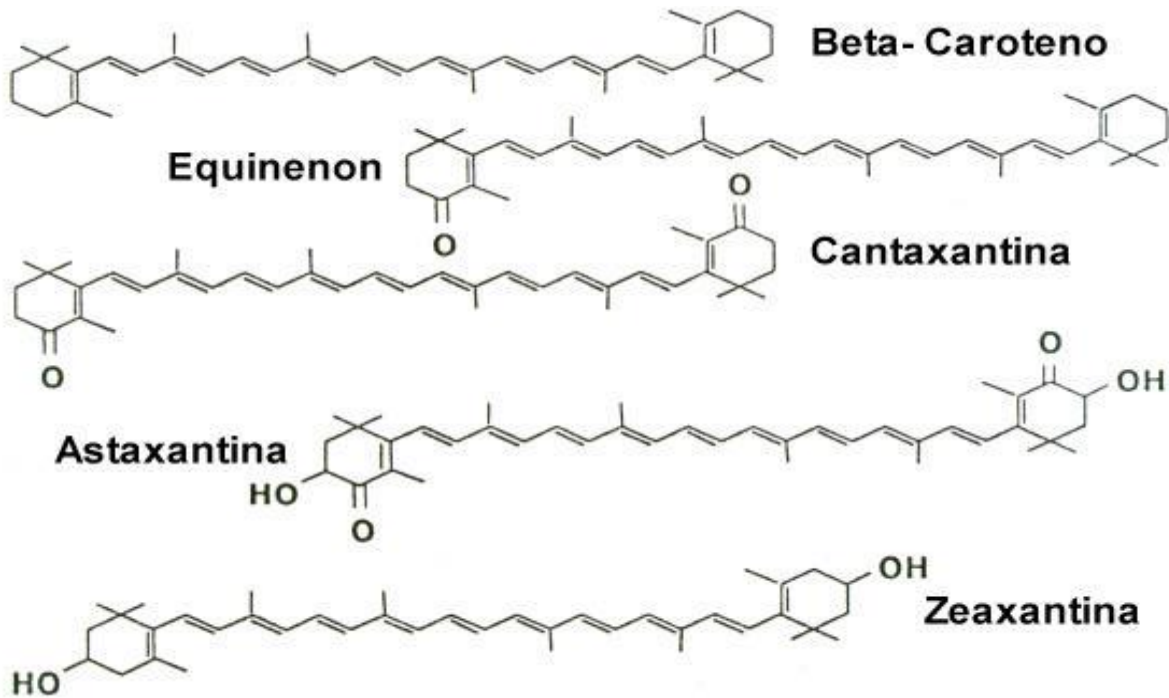


Figura 6. Estructura química del betacaroteno, equinenon, cantaxantina, astaxantina y Zeaxantina. Algunos carotenoides comunes en peces. Tomado de Meyers, (2000).

Algunos animales marinos son asociados a coloraciones naranjas intensas en sus músculos (salmónidos) o en sus exoesqueletos (crustáceos), debido a que presenta pigmentos Xantofilos característico tales como la cantaxantina y astaxantina (Bjerkeng et al. 1992; Storebakken y No 1992). Asimismo, hay organismos incapaces de sintetizar carotenoides, por tanto, estos pigmentos son ingeridos en las dietas ofrecidas (obtenidos de organismos productores en la cadena trófica) y almacenados para su posterior utilización. La capacidad para convertir los carotenoides dietarios en astaxantina por los organismos acuáticos se da por tres categorías generales (Meyers y Chen 1982).



Capacidad reproductiva de Nannochloropsis oculata en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guíllar.

1. Los *salmónidos* o del tipo "sea bream" (salmón, trucha, sea bream, red sea bream) son organismo que no tienen la capacidad de poder oxidar el anillo β -ionone y deben consumir derivados oxigenados específicos como astaxantina en dietas preparadas.
2. Del tipo *carpa* (goldfish, carpa roja, fancy red carp, golden-yellow carp). Son organismos que si son capaces de oxidar las posiciones 4 y 4' del anillo β -ionone y pueden convertir la zeaxantina de la dieta ofrecida astaxantina.
3. Los *crustáceos* (camarones) son organismos que tienen la capacidad de oxidar las posiciones 3 y 3' y 4 y 4' del anillo β -ionone del β -caroteno y pueden convertir β -caroteno, zeaxantina o intermedios a astaxantina.

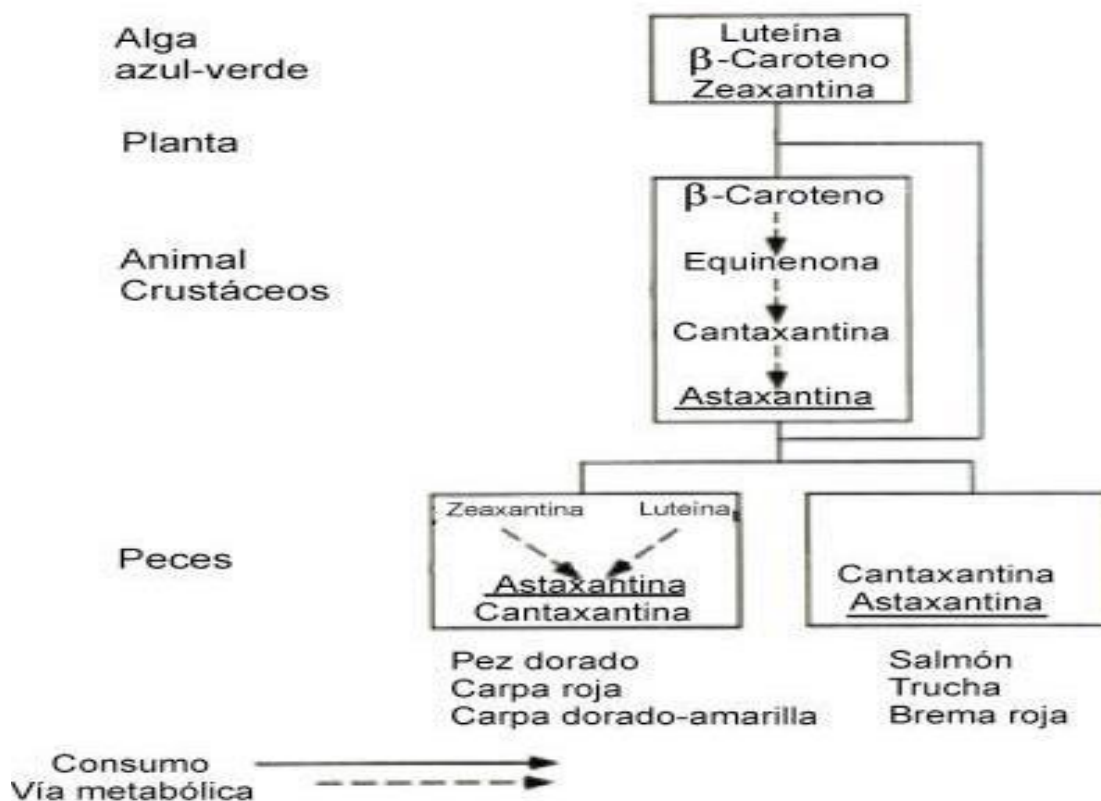


Figura 7. Carotenoides y pigmentación en especies acuáticas. Tomado de Meyers, (2000).



Capacidad reproductiva de Nannochloropsis oculata en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guíllar.

Algunos autores, han demostrado que astaxantina tiene propiedades de prevención del cáncer y promueve el incremento de la respuesta inmune e inhibición de los radicales libres. Por lo tanto, es usada en la industria alimenticia y farmacéutica. La concentración media de carotenoides en las algas oscila entre el 0.1-2% de su peso seco; sin embargo, algunas especies acumulan cantidades mucho más altas bajo ciertas condiciones. Un ejemplo de esto es *Dunaliella salina*, que acumula hasta un 14% de B-caroteno bajo ciertas condiciones de estrés nutricional, alta salinidad y alta luminosidad (Borowitzka et al., 1984).

3.14. La Ribulosa bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCo)

RuBisCo es una enzima responsable de la conversión de CO₂ inorgánico en carbono orgánico, es probablemente la proteína más abundante de la Tierra (Ellis, 1979). Se encuentra distribuida entre casi todos los organismos fotosintéticos, incluyendo bacterias quimioautótrofas, cianobacterias, algas y las plantas superiores. En los organismos eucariotas se localiza en el estroma del cloroplasto, y en organismos procariotas en el citoplasma (Ferreira y Teixeira, 1992).

La enzima RuBisCo, cataliza en la primera reacción del ciclo de Calvin (figura 9), siendo la responsable del proceso de la asimilación fotosintética y de la incorporación de carbono del medio ambiente (Ferreira et al., 2000). La Rubisco carboxila RuBP (azúcar de 5 C) con dióxido de carbono (CO₂) atmosférico produce 2 moléculas de un ácido carboxílico de 3 C [3-fosfoglicerato (PGA)]. Este ácido carboxílico se reduce para formar carbohidratos y una parte del esqueleto carbonado se usa para regenerar RuBP. Además de la carboxilación, la Rubisco también es capaz de catalizar la oxigenación de RuBP (Calvin, 1956).

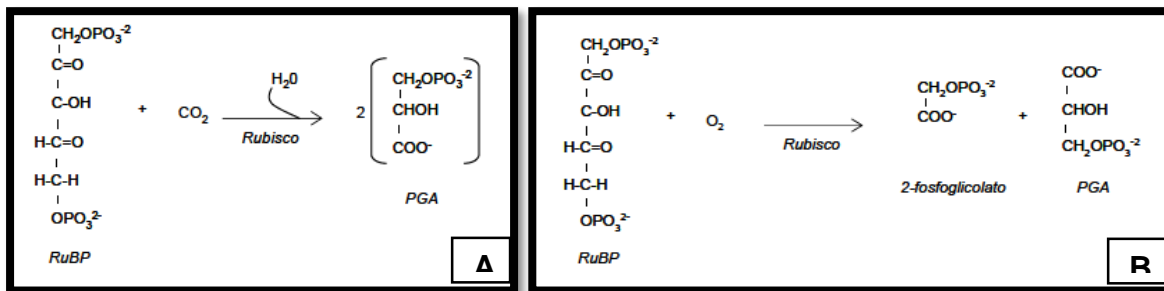


Figura 8. Reacciones de la Rubisco. A: carboxila RuBP en presencia de CO₂. B: catalización de la oxigenación de RuBP. Tomada de García Murria (2006)



Capacidad reproductiva de *Nannochloropsis oculata* en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guíllar.

En plantas superiores, la Rubisco se acumula en los cloroplastos durante el crecimiento y desarrollo de los órganos fotosintéticos sin sufrir cambio. Asimismo, durante el envejecimiento o bajo estrés ambiental la Rubisco sufre una degradación favoreciendo la movilización de nitrógeno hacia tejidos de reserva u órganos en crecimiento (Ferreira et al., 2000; Ferreira y Teixeira, 1992). En el caso de organismos unicelulares, como pueden ser las microalgas, la degradación de la Rubisco permite que el crecimiento celular se prolongue en condiciones de estrés (García-Ferris y Moreno, 1994).

La RuBisCo tiene baja relación con el CO₂ y una baja celeridad de catálisis, por lo que las células de organismos fotosintéticos, acumulan grandes cantidades de la enzima (Andrews y Lorimer, 1987). Los bioelementos invertidos en su síntesis pueden ser recuperados cuando las rutas catabólicas de la Rubisco se activan cuando se produce el envejecimiento funcional durante el envejecimiento natural o inducida por estrés, o por carencia de nutrientes (Ferreira et al., 2000). Por lo antes mencionado, es que la Rubisco presenta una la función muy importante de reserva de nitrógeno, azufre y carbono, elementos esenciales que las células pueden utilizarlos en situaciones críticas por estrés, o por carencia de nutrientes (Ferreira et al., 2000).

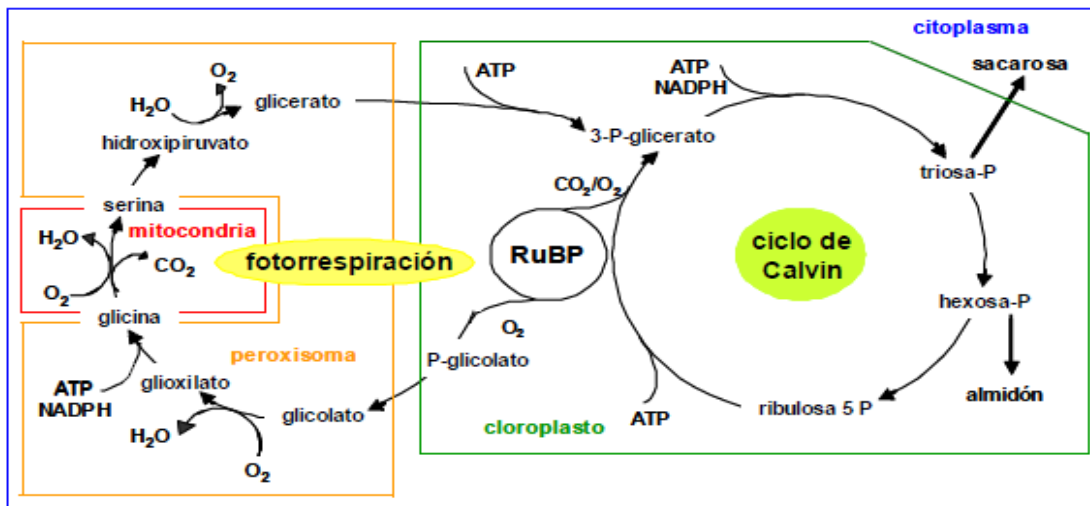


Figura 9. Metabolismo de la RuBP. Tomada de Marin-Navarro (2004)



3.15. Utilidad de las Microalgas

El género *Nannochloropsis* tienen la capacidad de crecer en diferentes ambientes por la capacidad de su robustez y plasticidad celular (Simionato et al. 2011). Sus cultivos son considerados un potencial en los mercados de producción de energía (biocombustible), industrias farmacéutica y alimentaria (Leu y Boussiba 2014).

Las microalgas pueden ser utilizadas para tratamientos de aguas residuales con el objetivo de remover NH_4^+ , NO_3^- y PO_4^{3-} , siendo éstos contaminantes de su fuente de nutrientes. (Rawat et al., 2013; Mata et al., 2010; Demirbas 2011).

Una de las ventajas de los cultivos de microalgas que por tener fuente de carbono ellas tienen la capacidad de fijar el CO_2 . Pueden fijar 1,83 kg CO_2 /día/kg de masa seca producida, por medio de la biofijación reduciendo así los gases invernadero (Rawat et al., 2013; Mata et al., 2010; Demirbas 2010).

En la acuicultura se emplean especies del género *Nannochloropsis oculata* para alimentación de larvas de peces, crustáceos y para enriquecimiento de rotíferos y artemia, para ofrecer ácido eicosapentaenoico (EPA) y vitamina B12 a las larvas (Renaud et al. 1991; Sukenik et al. 1993; Volkman et al. 1993; Ferreira et al. 2009).

En la industria de la biorrefinería, las especies de *Nannochloropsis* tienen un excelente potencial para la elaboración de biocombustibles por tener la capacidad de almacenar grandes cantidades de ácidos grasos saturados y monoinsaturados en los lípidos neutros, hasta 65% de su peso seco (Sukenik et al. 1989; Griffiths et al., 2009; Rodolfi et al. 2009; Bondioli et al. 2012; Leu y Boussiba 2014).

3.16. Medio de cultivo Guillard

Los requerimientos nutricionales de los cultivos de microalgas comprenden macronutrientes como nitrógeno y fósforo, micronutrientes y vitaminas. Existen formulaciones o recetas para preparar cada uno de los diferentes tipos de medios de cultivo comerciales y su utilización dependerá de los requerimientos de cada especie. Entre estos medios se encuentra el medio Walne (Walne, 1970) y el Guillard F/2



Capacidad reproductiva de Nannochloropsis oculata en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guillard.

(Guillard, 1975), el cual es uno de los medios más ampliamente utilizados en el cultivo de microalgas, ya que contiene todos los elementos necesarios para el crecimiento de las mismas. En el caso del cultivo de diatomeas, es necesario tener en cuenta que se deben adicionar silicatos en caso de que el medio de cultivo no los contenga, o bien, aumentar la concentración debido a que son indispensables para la formación de la pared celular (Faé Neto et al., 2018; Malakootian et al., 2015; Mooij et al., 2016).



*Capacidad reproductiva de *Nannochloropsis oculata* en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guíllar.*

4 MATERIALES Y METODOS



*Capacidad reproductiva de *Nannochloropsis oculata* en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guíllar.*

4.1. Microalga

Se utilizó una cepa de *Nannochloropsis oculata* del ceparió del Laboratorio de Investigaciones Marinas y Acuícolas (LIMA), Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León (UNAN-León), ubicado en las Peñitas, León. En el desarrollo del trabajo de investigación se realizaron dos experimentos, cada uno estuvo estructurado por dos baterías experimentales con medios de cultivo con volúmenes de 250 ml y 33 ‰, 25 ‰, 20 ‰, 15 ‰, 10 ‰ y 5 ‰ de salinidad. Las baterías experimentales contenían concentraciones de 0.32 ‰ y 1 ‰ de F/2 Guíllard, respectivamente. Ambos experimentos se realizaron con temperatura de 25 °C y luminosidad constante de aproximadamente 250 $\mu\text{mol E/m}^2/\text{s}$.



Figura 10. Laboratorio de Investigaciones Marinas y Acuícola de la UNAN-León (LIMA)

4.2. F/2 Guíllard

Tiene una composición final por litro:

75 mg KNO_3 , 5.65 mg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4.360 mg $\text{EDTA} \cdot \text{Na}_2$, 3.150 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,010 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,022 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,010 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.180 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,006 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2 μg cianocobalamina cristalina (B12), 0.100 mg tiamina clorhídrica (B1), 0,001 mg biotina cristalina.



4.3. Diseño experimental

4.3.1. Experimento 1. Tratamiento dosis dependiente de salinidad y F/2

Se formaron 2 baterías experimentales compuestas por seis concentraciones salinas (33 ‰, 25‰, 20‰, 15‰, 10‰, y 5 ‰) y volúmenes de 250 ml, cada una, para evaluar la capacidad reproductiva de *Nannochloropsis oculata* en concentraciones de F/2 Guíllard (batería 1: 1 ‰ y batería 2: 0.32 ‰). Previo al ensayo experimental, el agua de mar se pasó por un filtro UV y otro de papel de paso lento, para finalmente ser esterilizada. A partir del agua marina se realizaron las diluciones usando agua destilada. El tiempo de duración del experimento fue de 10 días. Temperatura e irradiación fue como se describe anteriormente. El valor de salinidad se midió diario y se corregía con agua destilada.

4.3.2. Experimento 2. Tratamiento tiempo dependiente de crecimiento

Se formaron 2 baterías experimentales compuestas por 3 concentraciones salinas (33 ‰, 25‰, 20‰), cada una, para evaluar el ritmo de crecimiento de *Nannochloropsis oculata* en concentraciones de F/2 Guíllard (batería 1: 1 ‰ y batería 2: 0.32 ‰). Tiempo de duración del experimento fue de 23 días. El procedimiento experimental fue similar al descrito en el experimento 1.



Figura 11. Baterías experimentales de *Nannochloropsis oculata*



4.4. **Conteo celular**

Las densidades celulares se determinaron cada 24 horas mediante conteo en hemocitómetro o cámara de Neubauer de 0.1 mm de profundidad, expresándolas como número de células por mililitro (cel/ml). Se tomó 1 ml de muestra, se introdujo en la cámara y se contó el número de cel/ml. Las lecturas se realizaron por triplicado, se sumó el número de células contadas en los cuatro cuadrantes externos de la cámara y se dividió entre 2500 para determinar la densidad celular. Este procedimiento se usó para contar el número de cel/ml en los tratamientos salinos definidos en las dos baterías.

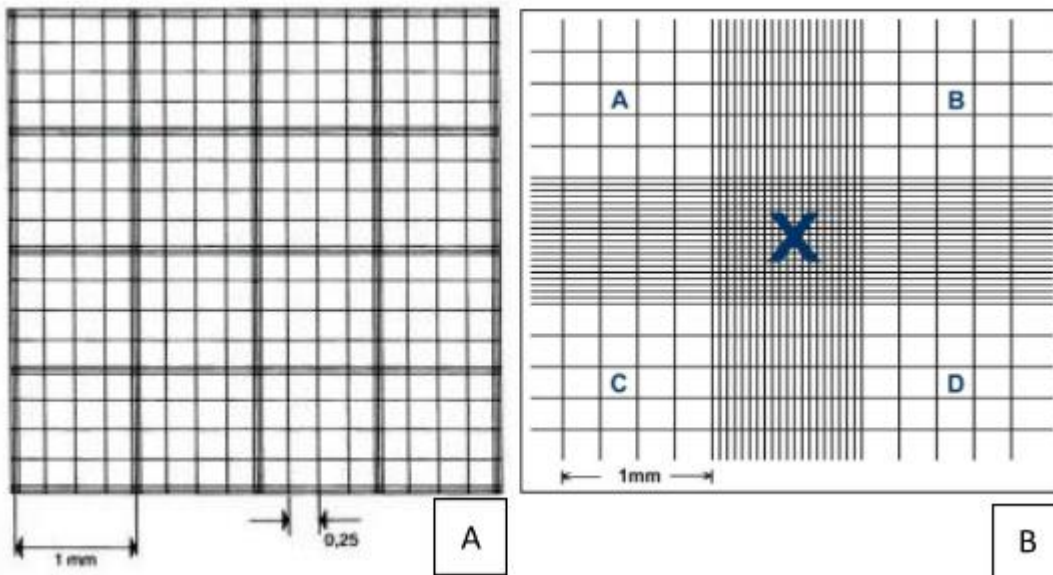


Figura 12. Cuadrícula de Hematocitómetro. A- Reglilla de Fuchs-Rosenthal. B- Reglilla de Neubauer (Arredondo, 2007)



*Capacidad reproductiva de *Nannochloropsis oculata* en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guillar.*

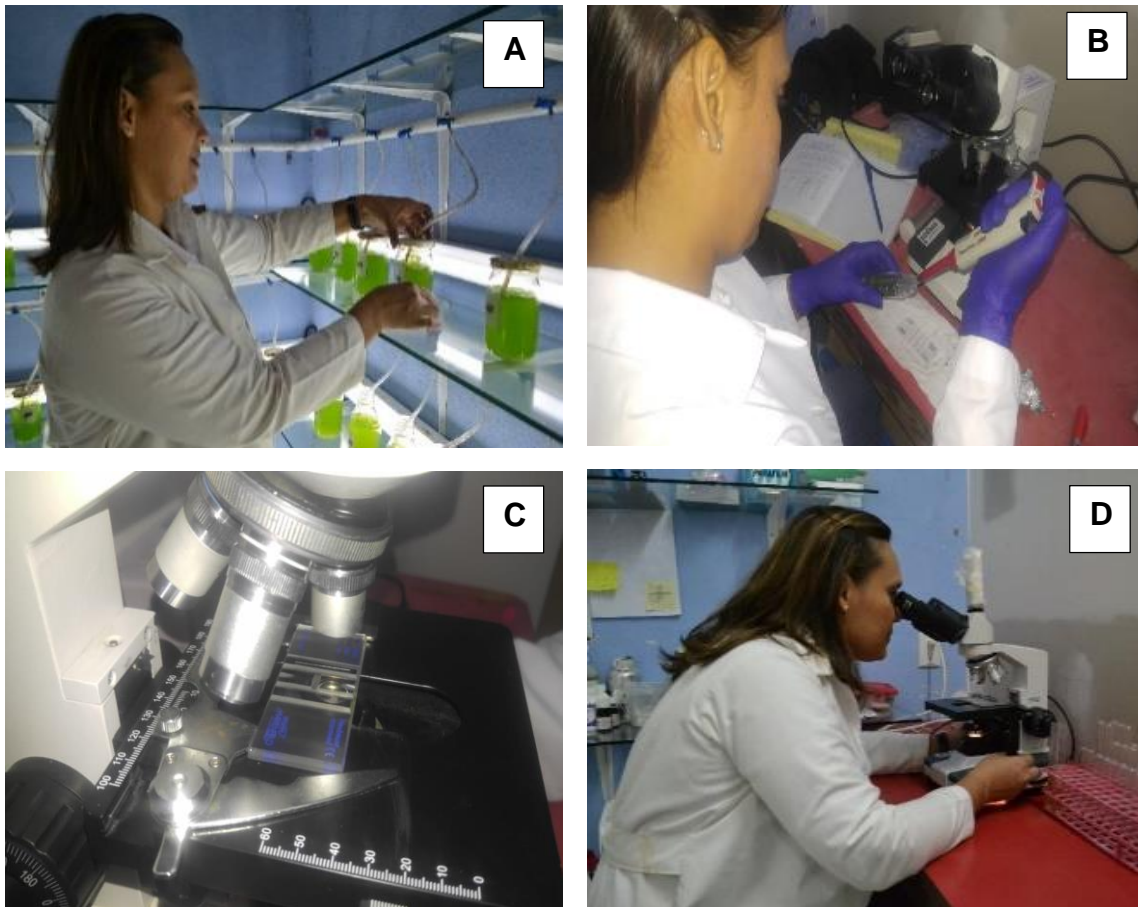


Figura 13. Conteo celular de *Nannochloropsis oculata*. A: toma de muestra, B: se deposita la muestra en una cámara Neubauer y D: observación al microscopio.

4.5. Análisis estadísticos

Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante ANOVA de dos vías (SigmaStat; SPSS Inc., Chicago, IL). Previo al análisis de varianza, los datos fueron analizados mediante una prueba de normalidad (Shapiro-Wilks) y de homogeneidad de varianzas (prueba C de Cochran). Las comparaciones post hoc se realizaron mediante una prueba de Student-Newman-Keuls. Los datos se muestran como media \pm E.E.M. de cada grupo y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a $P < 0,05$.



*Capacidad reproductiva de *Nannochloropsis oculata* en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guíllar.*

5. RESULTADOS



5.1. Primer experimento.

5.1.1. Ritmo de crecimiento de *Nannochloropsis oculata* usando 0.32 ‰ de F/2 Guíllard en 10 días de cultivo.

La figura 14 muestra el ritmo de crecimiento de *Nannochloropsis oculata*, tras 10 días de estudio, en concentraciones salinas de 33 ‰, 25 ‰, 20 ‰, 15 ‰, 10 ‰ y 5 ‰ y concentración de 0.32 ‰ de F/2 Guíllard. De manera general, nuestros resultados muestran que *N. oculata* alcanza mayor concentración en salinidades de 25 ‰ y 33 ‰ y que las concentraciones de 20 ‰, 15 ‰, 10 ‰ y 5 ‰ presentan niveles similares de concentración.

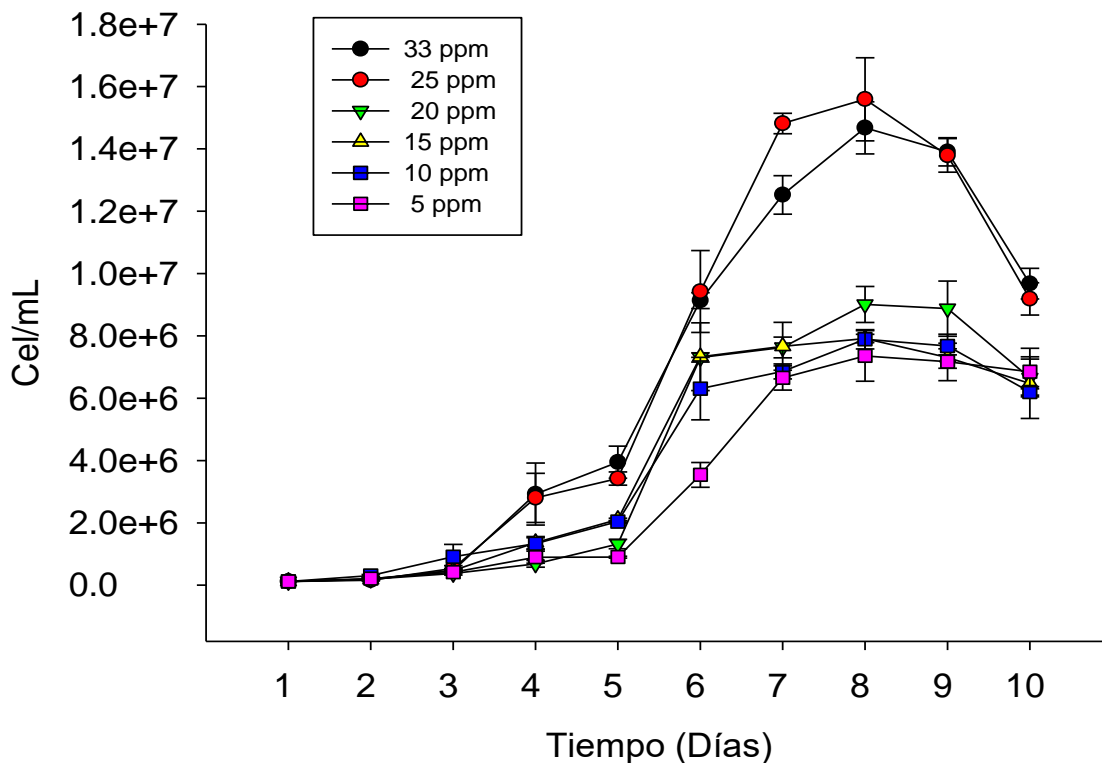


Figura 14. Ritmo de reproducción de *Nannochloropsis oculata*, cultivada con 0.32 ‰ F/2 Guíllard y diferentes concentraciones salinas, en un período de 10 días.



5.1.2. Ritmo de crecimiento de *Nannochloropsis oculata* usando 1 ‰ de F/2 Guillard en 10 días de cultivo.

La figura 15 muestra mayor amplitud del rango de salinidad para cultivar *Nannochloropsis oculata*. Se observan similares resultados a los obtenidos cuando la microalga se cultivó en concentración de 0.32 ‰ de F/2 Guillard. No obstante, en este experimento las microalgas cultivadas en salinidad de 20 ‰ presentaron similar comportamiento reproductivo que las cultivadas en salinidad de 25 ‰ y 33 ‰.

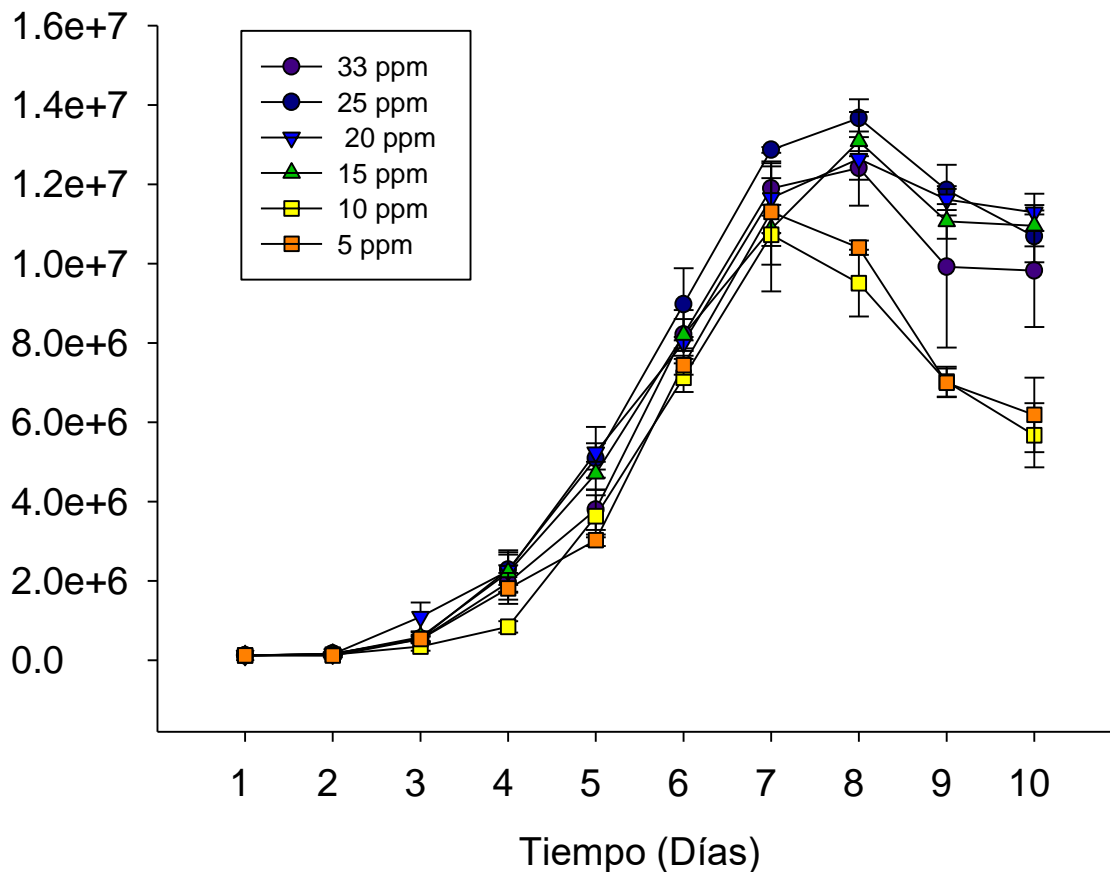


Figura 15. Ritmo de reproducción de *Nannochloropsis oculata*, cultivada con 1 ‰ F/2 Guillard y diferentes concentraciones salinas en un período de 10 días.



*Capacidad reproductiva de *Nannochloropsis oculata* en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guillard.*

5.1.3. Densidad poblacional de *Nannochloropsis oculata* cultivada en concentraciones salinas de 33 ‰, 25 ‰, 20 ‰, 15 ‰, 10 ‰ y 5 ‰ en medios con 0.32 ‰ y 1 ‰ de F/2 Guillard, en 10 días de cultivo.

Nuestros resultados muestran que *N. oculata* alcanza similares valores de concentración cuando se encuentra en medios con salinidades de 25 ‰ y 33 ‰, usando una concentración de 0.32 ‰ de F/2 Guillard y en salinidades subsecuentes las concentraciones de microalgas disminuyen significativamente. No obstante, cuando la microalga se cultiva en medio con 1 ‰ de F/2 Guillard las concentraciones máximas permanecen similares entre 15 ‰ y 33 ‰ de salinidad; por consiguiente, incrementa su rango de salinidad óptima para su crecimiento. Asimismo, se observa que cultivar esta microalga con concentraciones de 0.32 ‰ o 1 ‰ de F/2 Guillard en medios salinos de 25 ‰ o 33 ‰ tenemos resultados similares en tiempo de duplicación y concentraciones de cel/L.

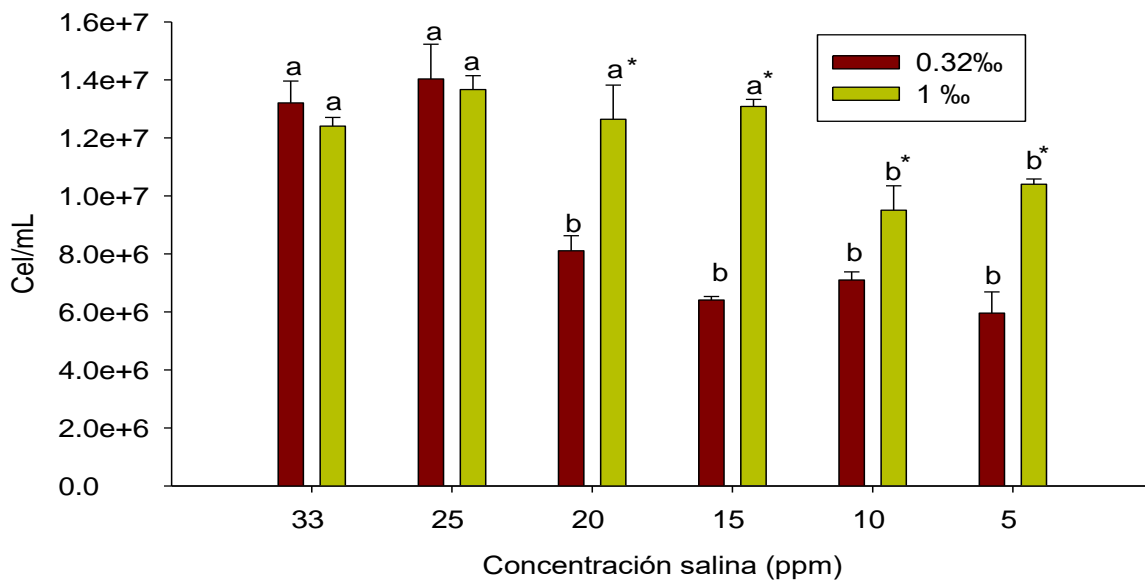


Figura 16. Cantidad de células por ml de *Nannochloropsis oculata*, cultivada con 0.32 ‰ y 1 ‰ de F/2 Guillard a diferentes concentraciones salinas (33 ‰, 25 ‰, 20 ‰, 15 ‰, 10 ‰, 5 ‰), 8 días de cultivo. Letras diferentes indican diferencias significativas, de manera individual, para cada batería experimental. *: Indica diferencias significativas entre los tratamientos con 0.32 ‰ y 1 ‰ de F/2 Guillard en una misma concentración salina



5.2. Segundo experimento

5.2.1. Ritmo de crecimiento de *Nannochloropsis oculata* usando 0.32 ‰ de F/2 Guillard en 23 días de cultivo

La figura 17. El presente diseño experimental se realizó en base al comportamiento reproductivo de *Nannochloropsis oculata* observado en el primer experimento cuando se cultivó en salinidades de 20 ‰, 25 ‰ y 33 ‰. De manera general, los resultados muestran similares concentraciones de cel/l a los 12 días de estudio, con el subsecuente similar comportamiento hasta los 23 días de estudio.

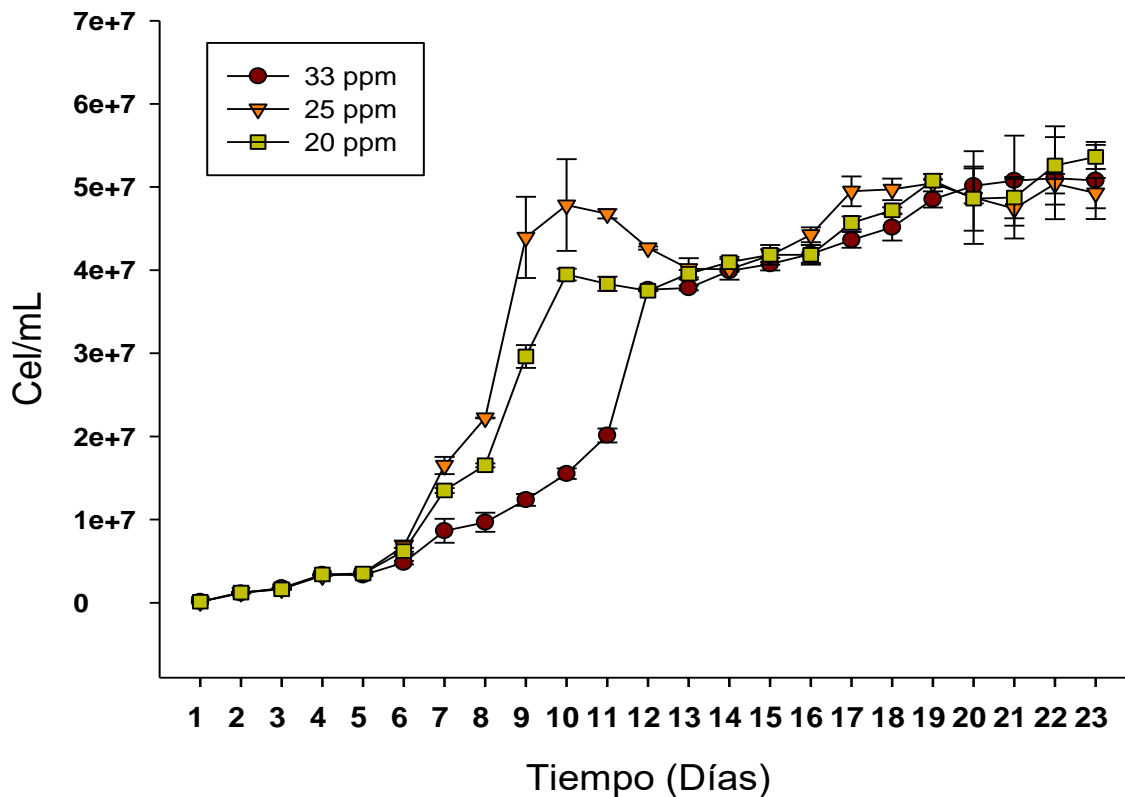


Figura 17. Ritmo de reproducción de *Nannochloropsis oculata*, cultivada en diferentes concentraciones salinas. Período de 23 días con 0.32 ‰ F/2 Guillard.



*Capacidad reproductiva de *Nannochloropsis oculata* en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guillard.*

5.2.2. Ritmo de crecimiento de *Nannochloropsis oculata* usando 1 ‰ de F/2 Guillard en 23 días de cultivo

Es importante señalar en estos resultados, el nivel de precisión observado entre los valores de la concentración de cel/l de *Nannochloropsis oculata* cuando se cultiva por 23 días en un medio enriquecido con 1 ‰ de F/2 Guillard y medio salino de 20 ‰, 25 ‰ y 33 ‰. Lo cual valida los resultados obtenidos en el experimento 1 (ver figura 18).

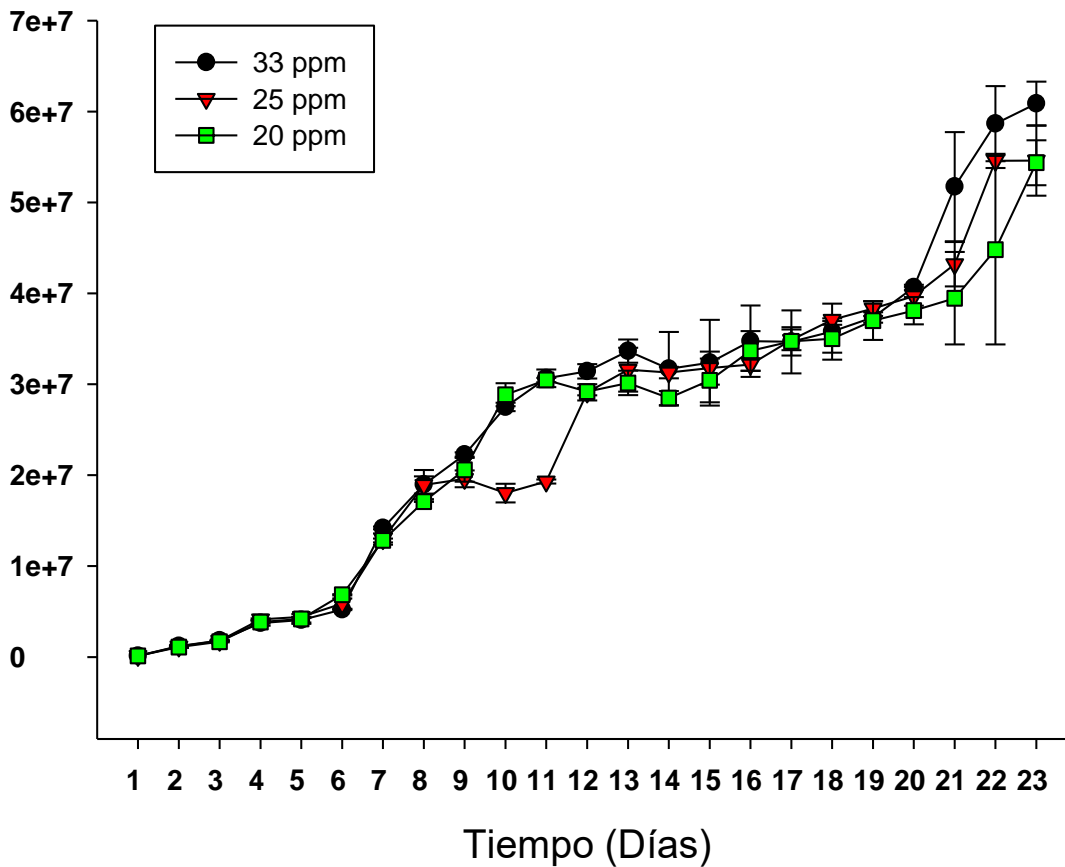


Figura 18. Ritmo de reproducción de *Nannochloropsis oculata*, cultivada en diferentes concentraciones salinas. Período de 23 días con 1 ‰ F/2 Guillard.



5.2.3. Densidad poblacional de *Nannochloropsis oculata* cultivada en concentraciones salinas de 33 ‰, 25 ‰ y 20 ‰ en medios con 0.32 ‰ y 1 ‰ de F/2 Guíllard, en 23 días de cultivo.

De manera general, estos resultados validan lo observado en el experimento 1 donde los máximos valores de la densidad poblacional alcanzados por *Nannochloropsis oculata* fueron similares cuando se encontraba en salinidades de 25 ‰ y 33 ‰, independientemente que la concentración de F/2 Guíllard fuese de 0.32 ‰ o 1 ‰. No obstante, en este experimento se suma el comportamiento reproductivo de las microalgas cultivadas en medio de 20 ‰ al obtenido en medios de 25 ‰ y 33 ‰. Por tanto, estos resultados muestran que, bajo estas condiciones experimentales, cuando la microalga se cultiva por largos periodos de tiempo se pueden obtener similares concentraciones con una probabilidad de un 95 % (ver figura 19).

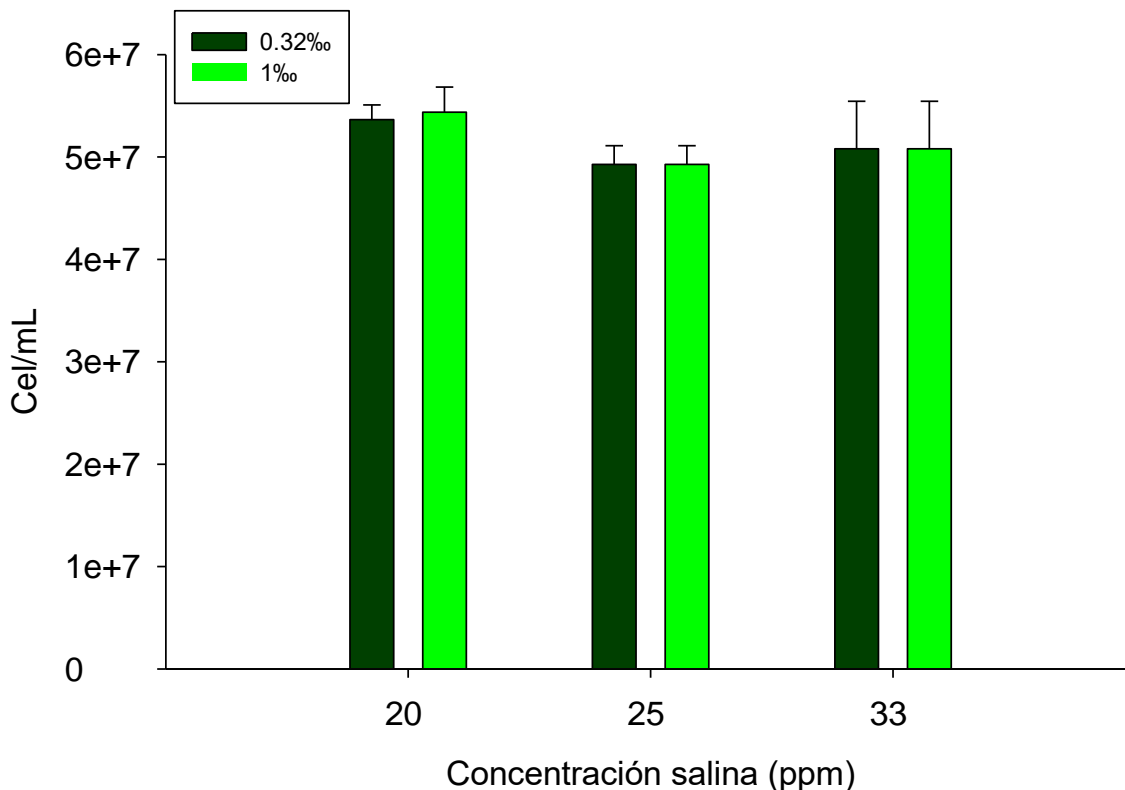


Figura 19. Cantidad de células por ml de *Nannochloropsis oculata*, cultivada con 0.32 ‰ y 1 ‰ de F/2 Guíllard a diferentes concentraciones salinas (33 ‰, 25 ‰ y 20 ‰), 23 días de cultivo.



5.2.4. Comportamiento reproductivo de *Nannochloropsis oculata* cultivada en diferentes concentraciones de salinidad y F/2 de Guillard; así como diferentes periodos de tiempo.

De manera general, nuestros resultados muestran que cuando *Nannochloropsis oculata* se cultiva en medios salinos de 25 ‰ y 33 ‰, y con 0.32 ‰ y 1 ‰ de F/2 Guillard por un periodo de 10 días se obtienen similares concentraciones de cel/l. En contraste, cuando esta microalga se cultiva en concentraciones salinas inferiores la concentración de microalgas es mayor en los medios de cultivo con 1 ‰ de F/2 Guillard.

No obstante, cuando la microalga se cultiva por mayor tiempo (23 días) se obtienen similares valores de concentración (cel/l) en salinidades de 20 ‰, 25 ‰ y 33 ‰, cuando se cultiva en 0.32 ‰ o 1 ‰ de F/2 Guillard. En consecuencia, se amplía el rango de salinidad idóneo para el cultivo.

Tabla 4. *Comportamiento reproductivo de *Nannochloropsis. oculata* en diferentes concentraciones de salinidad y dos concentraciones de F/2 Guillard (0.32 ‰ y 1 ‰), en 10 y 23 días de cultivo.*

1er experimento(10 Días de cultivo)			
Concentración salina (‰)	Dosis F/2 Guillard (‰)		0.32 vrs 1
	0.32	1	
33	a *	a*	=
25	a *	a *	=
20	b	a *	≠ ⁺
15	b	a*	≠ ⁺
10	b	b	≠ ⁺
5	b	b	≠ ⁺

2do experimento(23 Días de cultivo)			
33	a	a	=
25	a	a	=
20	a	a	=

Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (salinidades) de cada una de las baterías experimentales (0.32 ‰ y 1 ‰ de F/2 Guillard). *: Indica mayor concentración de cel/ml, solo entre tratamiento de la misma batería. =: Indica similar concentración de cel/ml entre los tratamientos con concentraciones de 0.32 ‰ y 1 ‰ de F/2 Guillard, en una misma salinidad. +: Indica que la concentración de cel/ml en el medio con 1 ‰ > 0.32 ‰ de F/2 Guillard en la misma salinidad.



Capacidad reproductiva de Nannochloropsis oculata en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guíllar.

6. DISCUSION



6.1. Caracterización preliminar del estudio

El objetivo del presente estudio, consistió en evaluar la capacidad reproductiva de *Nannochloropsis oculata* usando dosis únicas de 0.32 ‰ y 1 ‰ de F/2 Guillard, respectivamente; en salinidades de 33 ‰, 25 ‰, 20 ‰, 15 ‰, 10 ‰ y 5 ‰ en periodos de 10 y 23 días, en el área de cultivo de microalgas del Laboratorio de Investigaciones Marinas y Acuícola de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León (UNAN-León), para estimar el ritmo reproductivo de *Nannochloropsis oculata* y obtener concentraciones necesarias (cel/l) para alimentar y nutrir a los rotíferos que se ofrecen como alimento a larvas de pargo lunarejo y, por ende, realizar el levantamiento larval de forma eficiente.

Se realizó un primer experimento para evaluar las concentraciones salinas que permitieran una mejor producción en cel/l, o sea que presentará un mayor ritmo de crecimiento cuando se usan 0.32 ‰ o 1 ‰ de F/2 Guillard. Tras encontrar, que en las concentraciones salinas de 33 ‰, 25 ‰ los resultados eran similares se optó por realizar un segundo experimento con un rango entre 20 ‰, 25 ‰ y 33 ‰ de salinidad, a más largo plazo (23 días), para evaluar el ritmo de crecimiento con el uso de dosis únicas de F/2 (0.32 ‰ y 1 ‰) con los siguientes resultados.

6.2. Efecto de la salinidad y concentración de F/2 Guillard sobre el ritmo de crecimiento de *Nannochloropsis oculata*

Se sabe que *Nannochloropsis oculata* tiene alta afinidad por los medios de cultivos con salinidades entre 28 ‰ a 30 ‰ y que puede crecer en cultivos masivos bajo condiciones de invernadero, denotando que en periodos de mayor temperatura ambiental el tiempo de duplicación de esta microalga es mayor (Persico et al., 2011). Bajo este contexto, nuestros resultados coinciden con lo reportado por Persico y colaboradores (2011) debido a que las mayores concentraciones de *N. oculata* las obtuvimos en salinidades de 25 ‰ y 33 ‰, independientemente de si la concentración de F/2 Guillard fuese de 0.32 ‰ o 1 ‰, a los 8 días de estudio (figura 14). Es más, nuestros resultados presentan estrecha relación con lo reportado por otros autores donde muestran excelente crecimiento de *Nannochloropsis oculata* en salinidades de 25 ‰ 20 ‰, denotando la afinidad de *Nannochloropsis oculata* de reproducirse con



*Capacidad reproductiva de *Nannochloropsis oculata* en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guillard.*

mayor velocidad cuando se encuentra en ese rango de concentración salina (Álvarez-Langocherie et al. 1996).

Por lo tanto, el observar que, en nuestros resultados, en el primer experimento la concentración salina idónea fue 25 ‰ y 33 ‰ permite sugerir que la concentración de nutrientes esenciales para el crecimiento reproductivo de esta microalga, es suficiente con 0.32 ‰ de F/2 Guillard, concordando con los resultados obtenidos en otros experimentos (Álvarez-Langocherie et al. 1996; Persico et al., 2011).

Hemos demostrado que el tratamiento salino tiene efecto sobre el comportamiento reproductivo de *N. oculata* y que coincide con otros estudios (Álvarez-Langocherie et al. 1996; Persico et al., 2011). Por lo tanto, estos resultados permiten sugerir que el ritmo de crecimiento podría ser dependiente de la concentración salina en el medio de cultivo. En el presente estudio observamos que el tratamiento con F/2 Guillard indujo cambios en el ritmo de crecimiento de las microalgas cultivadas entre las diferentes concentraciones de salinidad cuando el medio de cultivo contiene concentraciones de 0.32 ‰. No obstante, cuando la concentración de F/2 Guillard se incrementó a 1 ‰ la variación de las concentraciones entre tratamientos salinos disminuyó debido a que en el rango de salinidad de 15 ‰ a 33 ‰ la concentración fue similar; en contraste, con lo observado cuando se usó 0.32 ‰ de F/2 Guillard donde el rango de mayor concentración de cel/l fue menor (25 ‰ y 33 ‰). Este resultado coincide con lo reportado en estudios recientes, donde usando fertilizante agrícola y vitaminas del complejo B se obtuvieron resultados similares a los nuestros, la fase de latencia se mantiene entre 3-4 días y la fase exponencial se prolonga hasta los ocho días (Pereira et al 2017). Es más, otros estudios muestran que *Nannochloropsis oculata* presenta comportamiento reproductivo similar al encontrado en nuestro estudio cuando se encuentra cultivada en medio con salinidad de 28-30 ‰ (Persico et al., 2011). Bajo este contexto, nuestros resultados muestran que *Nannochloropsis oculata* puede cultivarse con 0.32 ‰ de F/2 Guillard, en un volumen de 250 ml y obtener razonables rendimientos reproductivos, en concentraciones de 33 ‰ y 25 ‰ de salinidad y temperatura de 25 °C. Por otro lado, los efectos generalizados sobre el comportamiento reproductivo de *Nannochloropsis oculata*, en



*Capacidad reproductiva de *Nannochloropsis oculata* en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guillard.*

la batería experimental donde se agregó 1 ‰ de F/2 Guillard (figura 15), denotan la importancia de la aplicación de este fertilizante para la reproducción de esta microalga (Martínez et al., 2017) cuando es cultivada en concentraciones salinas menores a 25 ‰ (Sánchez-Torres et al., 2008).

Además, se observa igual periodo de tiempo para la reproducción de la microalga en la fase de adaptación (4 días) y exponencial (5-9 días), lo cual coincide con lo reportado por otros investigadores (Martínez et. al., 2017; Pereira et. al., 2017; Ra et. al., 2016). Cabe mencionar, que en nuestro experimento se agregó una sola dosis inicial de F/2 Guillard, a diferencia de lo realizado por Martínez et al., (2017) que agregó el fertilizante cada 4 días. Por lo tanto, nuestros resultados muestran que una sola dosis de 0.32 ‰ de F/2 Guillard es suficiente para tener una concentración de microalgas de 13×10^6 cel/ml, en un medio de cultivo con volumen de 250 ml en un periodo de 8 días, temperatura de 25 OC y concentración salina de 25 ‰ o 33 ‰, teniendo concentración inicial de 12×10^4 cel/ml de *Nannochloropsis oculata*. Por lo tanto, nuestros datos muestran que *Nannochloropsis oculata* puede ser cultivada en un amplio rango de salinidades, coincidiendo con lo reportado por otros investigadores (Álvarez-Langocherie et. al., 1986; Ra et. al., 2016).

6.3. Importancia del tiempo de cultivo y la concentración de F/2 Guillard aplicada en el cultivo de *Nannochloropsis oculata*

Se evaluó la capacidad reproductiva de *Nannochloropsis oculata*, en un periodo de 23 días, bajo las mismas condiciones experimentales descritas en el primer experimento, exceptuando que solo se evaluó el ritmo de crecimiento de *N. oculata* en salinidades de 33 ‰, 25 ‰ y 20 ‰ (figura 17y 18) y hemos demostrado que el ritmo reproductivo de *Nannochloropsis oculata* es similar cuando se encuentra cultivada en medio con 33 ‰ y 25 ‰ y usando 0.32 ‰ o 1 ‰ de F/2 Guillard (figura 17), denotando la afinidad a la concentración salina oceánica (Pereira et al., 2017) y a la capacidad de reproducción con escasa presencia de nitrógeno (Paez et al., 2016), quizás debido a mecanismos contrarreguladores como la catálisis de la enzima rubisco (ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa) para abastecer a la



*Capacidad reproductiva de *Nannochloropsis oculata* en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guíllar.*

célula de nitrógeno, azufre y carbono en momentos de carencia de nutrientes (Andrews y Lorimer, 1987; Ferreira et al., 2000). Por consiguiente, obtener igual densidad poblacional en los medios de cultivo con 0.32 ‰ y 1 ‰ de F/2 Guíllard en las concentraciones de 33 ‰ y 25 ‰ denotan la capacidad de reproducción de *Nannochloropsis oculata* bajo ese rango salino. Sin embargo, si se incrementa la concentración de fertilizante de 0.32 ‰ a 1 ‰, la reproducción de *Nannochloropsis oculata* no se ve afectada por la salinidad en un rango de 15 ‰ a 33 ‰; denotando que esta microalga tiene mayor nivel de tolerancia al estrés salino cuando se encuentra en un medio de cultivo con suficientes nutrientes. Es más, los medios de cultivo con 5 ‰, 10 ‰, 15 ‰ y 20 ‰ que contienen 1 ‰ de F/2 Guíllard presentan aproximadamente el doble de la concentración celular que los medios de cultivo con idénticas concentraciones salinas pero que contienen solamente 0.32 ‰ de F/2 Guíllard (figura 16). Situación que pudiese estar siendo mediada por los cofactores vitamínicos presente en F/2 Guíllard, similar a lo ocurrido en los experimentos presentados por otros investigadores (Pereira et al., 2017).

Se sabe, que *Nannochloropsis oculata* es capaz de reproducirse en un rango amplio de intensidades de luz, sin presentarse un efecto de foto inhibición por la irradiancia (Martínez et al., 2017; Renaud et. Al. 1991; Pal et. Al., 2011) y que aplicando F/2 Guíllard cada 4 días, a los 21 días, en niveles de irradiancia de 650 y 400 $\mu\text{mol E/m}^2/\text{s}$ y temperatura de 25 °C, la densidad celular de los cultivos alcanzó valores de hasta 175 ± 1.83 y $148 \pm 1.97 \times 10^6$ cel/ml, respectivamente. Mientras que en niveles de irradiancia de 80 y 200 $\mu\text{mol E/m}^2/\text{s}$ la densidad celular puede obtener valores de 21 ± 1.12 y $43 \pm 1.84 \times 10^6$ cel/ml, respectivamente (Martínez et al., 2017). Nuestro ensayo experimental se hizo bajo las mismas condiciones del estudio realizado por Martínez et al., (2017) con excepción de que nuestro nivel de irradiancia fue de aproximadamente 250 $\mu\text{mol E/m}^2/\text{s}$ y realizamos una sola aplicación de F/2 Guíllard a cada batería experimental (0.32 ‰ y 1 ‰), al inicio del experimento. No obstante, resulta interesante observar que, aunque el F/2 Guíllard solo se aplicó al inicio del experimento y que el volumen adicionado fue diferente en cada batería experimental (0.32 ‰ y 1 ‰), se logró obtener densidades de cel/ml similares en las tres concentraciones salinas en cada batería y entre baterías (tabla 1).



*Capacidad reproductiva de *Nannochloropsis oculata* en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guillard.*

Por lo tanto, observar rendimientos similares de la concentración de cel/ml y del comportamiento reproductivo, entre ambas baterías experimentales, a lo largo de 23 días de cultivo, los resultados invitan a sugerir que *Nannochloropsis oculata* puede ser cultivada con 0.32 ‰ de F/2 y que este volumen de fertilizante es suficiente para obtener rendimientos de hasta 50×10^6 cel/ml o, que independientemente del agotamiento del nitrógeno, la microalga continua reproduciéndose debido a la capacidad de protección celular frente al estrés que presenta la vía fotorrespiratoria (Xiao et. Al., 2013; Barclay y Apt, 2013) de organismos fotosintéticos que acumulan grandes cantidades del enzima rubisco y que los bioelementos invertidos en su síntesis pueden ser recuperados en situaciones de carencia de nutrientes (Ferreira et. al., 2000; Wei et. al., 2017). Por consiguiente, el aplicar una sola dosis del fertilizante F/2 Guillard al inicio del experimento y observar igual cantidad de cel/ml a los 23 días, entre las diferentes concentraciones salinas de cada batería (0.32 ‰ y 1 ‰) y entre las dos baterías experimentales, sugiere que independientemente del agotamiento de nitrógeno, *Nannochloropsis oculata* puede continuar reproduciéndose debido a la característica del enzima rubisco de servir como una importante reserva de nitrógeno, azufre y carbono; elementos esenciales que la célula puede redirigir hacia otros destinos en situaciones críticas, de manera similar a lo reportado por otros investigadores (Paez et al., 2016; Wei et. al., 2017).



Capacidad reproductiva de Nannochloropsis oculata en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guíllar.

7. CONCLUSIONES



*Capacidad reproductiva de *Nannochloropsis oculata* en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guillard.*

1. El ritmo reproductivo de *Nannochloropsis oculata* en concentración de 0.32 ‰ de F/2 Guillard es similar en salinidades de 33 ‰ y 25 ‰ y en estas 2 concentraciones de salinidad, la concentración de cel/l de *N. oculata* es significativamente mayor que las concentraciones de cel/l observadas en las concentraciones de salinidad de 20 ‰, 15 ‰, 10 ‰ y 5 ‰, durante un periodo de 10 días de cultivo a temperatura de 25 °C y luminosidad constante de aproximadamente 250 $\mu\text{mol E/m}^2 \text{ /s}$.
2. El ritmo reproductivo de *Nannochloropsis oculata* en concentración de 1 ‰ de F/2 Guillard es similar en salinidades de 33 ‰ y 25 ‰, 20 ‰, 15 ‰, y en estas 4 concentraciones de salinidad, la concentración de cel/l de *N. oculata* es significativamente mayor que las concentraciones de cel/l observadas en las concentraciones de salinidad de 10 ‰ y 5 ‰, durante un periodo de 10 días de cultivo a temperatura de 25 °C y luminosidad constante de aproximadamente 250 $\mu\text{mol E/m}^2 \text{ /s}$.
3. El incremento de la concentración de 0.32 ‰ a 1 ‰ permite la ampliación del rango de salinidad óptima para el cultivo de *Nannochloropsis oculata* cuando el periodo de cultivo es menor a los 10 días.
4. No hay diferencias significativas entre las concentraciones de *Nannochloropsis oculata* obtenidas en medios de cultivo de 0.32 ‰ y 1 ‰ cuando el periodo de cultivo es de 23 días, en salinidades de 20 ‰, 25 ‰ y 33 ‰. Probablemente por la capacidad de la enzima Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilaza/oxigenasa (RuBisCo) de proveer cuando las microalgas se encuentran en medios con escasa cantidad de nutrientes.



*Capacidad reproductiva de *Nannochloropsis oculata* en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guíllar.*

8. RECOMENDACIONES



*Capacidad reproductiva de *Nannochloropsis oculata* en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guíllar.*

1. Realizar investigaciones que permitan evaluar el efecto de los diferentes agentes estresantes para el cultivo de *Nannochloropsis oculata* y como favorece a las especies de importancia en la acuicultura de Nicaragua.
2. Divulgar los resultados denotando la importancia de trabajos investigativos de este tipo con un lenguaje coloquial, para que pueda ser fácilmente comprendido por los que se dedican a las actividades de acuicultura.



*Capacidad reproductiva de *Nannochloropsis oculata* en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guíllar.*

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



Capacidad reproductiva de Nannochloropsis oculata en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guíllar.

- Abdel-Raouf N., Al-Homaidan. A., Ibraheem. I. (2012). Microalgae an wastewater treatment. *Saud Journal of Biological Sciences* 19, 257-275. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005>
- Álvarez Lajonchère, L., Hernández, O., Comas, A., Martínez, V., y Lozano, B. (1981). Efecto de la reducción de salinidad sobre la tolerancia a altas temperaturas en la microalga *Nannochloropsis oculata*. *Hidrobiológica*, 6(1-2), 39-42.
- Andrews, T., y Lorimer, G. (1987). Rubisco: Structure, mechanisms and prospects for improvement. En *The Biochemistry of Plants, Vol. 10* (Hatch, M. D. and Boardman, N. K., Eds.) pp 131-218, Academic Press, San Diego.
- Arredondo, B., Voltolina, D. 2007. Método y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. (En línea). La Paz, México. p. 21-25. Visto 17oct17. Disponible en https://www.researchgate.net/profile/Domenico_Voltolina/publication/253237563_CONCENTRACION_RECUESTO_CELULAR_Y_TASA_DE_CRECIMIENTO/links/00b4953c92711ed8fb000000/CONCENTRACION-RECUESTO-CELULAR-Y-TASA-DE-CRECIMIENTO.pdf.
- Ascon Bieto, J., y Talon, M. (2008). Fundamentos de la Fisiología Vegetal. Aravaca: McGraw-Hill-Interamericana de España.
- Barclay, W., y Apt, K. (2013). The microalgae cell with reference to mass cultures: Strategies for bioprospecting microalgae for potential commercial applications. En: Richmond A, Hu Q, editores. *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology*. 2a ed. Wiley Blackwell, (2013) 69-79.
- Barrera, T., De Lara, R., Castro, G., Castro, J., y Malpica, A. (2003). Alimento vivo en la acuicultura. *ContactoS*, 48, 27-33.
- Barsanti, L. y Gualtieri, P. (2006). *Algae Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*. CRC Press. 301 p.
- Barsanti, L. y Gualtieri, P. (2014). *Algae: anatomy, biochemistry and biotechnology*. Florida: CRC press.



Capacidad reproductiva de Nannochloropsis oculata en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guíllar.

- Blanco, L.T. y Tacon, A.G. (1989). La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura. Programa Cooperativo Gubernamental FAO/ITALIA, Documento de campo, 12 GCP/RLA/075/ITA, 89pp
- Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.* 9 (15): 1551-1558.
- Bondioli P., Della Bella L., Rivolta G., Chini Zittelli G., Bassi N., Rodolfi L., Casini D., Prussi M., Chiaramonti D., Tredici M. R. (2012). Oil production by the marine microalgae *Nannochloropsis* sp. F y M-M24 and *Tetraselmis suecica* F y M-M33. *Biores. Technol.* 114: 567-672.
- Brown, M.R., Jeffrey, S.W. y Garland, C.D. 1989. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture: a literature review. *CSIRO Marine Reports*, nº 205.
- Brown M., Mular M., Miller I., Farmer C. y Trenerry C. (1999). The vitamin content of microalgae used in aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, 11: 247-255.
- Butusov, M. y Jernelöv, A. (2013) *Phosphorus in the Organic Life: Cells, Tissues, Organisms*. New York: Springer,
- Bux, F. (2013). *Biotechnological applications of microalgae: biodiesel and value added products*. CRC Press. https://books.google.co.cr/books?id=PHnNBQAAQBAJ&pg=PA7&dq=microalgae+morphology&hl=es419&sa=X&ved=0ahUKEwj6_jawsvTAhVF4iYKHZHYBSEQ6AEILzAC#v=onepage&q&f=false.
- Calvin, M. (1956). The photosynthetic carbon cycle. *J. Chem. Soc.* 1895-1915
- Cheng-Wu, Z., Zmora, O., Kopel, R. y Richmond, A. (2001). An industrial-size flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis* sp. *Eustigmatophyceae*. *Aquacult* 195:35 – 49 p.
- Chinchayan, M. 1996. Cultivo de la microalga *Nannochloropsis oculata* y su consumo por el rotífero *Brachionus plicatilis* (línea S). Tesis. Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima, Perú. p. 30-33
- Coll, J. 1991. *Acuicultura marina animal*. Edición MUNDI-PRENSA. Tercera Edición. España. p. 670.
- Cota, K. M. (2019). Efecto de la limitación de nutrientes en la composición bioquímica de *Ettlia oleabundans* y su potencial en la producción de compuestos de alto



Capacidad reproductiva de Nannochloropsis oculata en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guíllar.

valor agregado. [Tesis de Maestría, Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S.C.].

- Das, P., Thaher, M. I., Hakim, M. A. Q. M. A., y Al-Jabri, H. M. S. J. (2015). Sustainable production of toxin free marine microalgae biomass as fish feed in large scale open system in the Qatari desert. *Bioresource Technology*, 192, 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.019>
- Demirbas, A. (2011). *Applied Energy*, 88, 3541–3547.
- Demirbas, A. (2010). *Energy Conversion and Management*, 51, 2738–2749
- Desmidt E., Ghyselbrecht K., Zhang Y., Pinoy L., Van der Bruggen B., Verstraete W., Rabaey K., Meesschaert B. (2015) Global Phosphorus Scarcity and Full-Scale P-Recovery Techniques: A Review, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 45 336–384. doi:10.1080/10643389.2013.866531.
- Drevon C.A., I. Baksaas, y H.E. Krokan, 1993. Omega-3 fatty acids: metabolism and biological effects En: Patil, V., T. Kallqvist, E. Olsen., G.Vogt, y H.R. Gislerod, 2007. Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Aquaculture International*.
- Ellis, R.J. (1979). The most abundant protein in the world. *Trends Biochem. Sci.* 4:241-244.
- Fawley, K. P. (2007). Observations on the diversity and ecology of freshwater *Nannochloropsis (Eustigmatophyceae)*, with descriptions of new taxa. *Protist*, 158(3), 325-336. doi: 10.1016/j.protist.2007.03.003
- Ferreira M., Coutinho P., Seixas P., Fábregas J., Otero A. (2009). Enriching rotifers with —premiumll microalgae. *Nannochloropsis gaditana*. *Mar. Biotechnol.* 11: 585-595.
- Ferreira, R., Esquivel, M., y Teixeira, A. (2000). Catabolism of ribulose bisphosphate carboxylase from higher plants. *Current Topics in Phytochemistry*, 3, 129-165.
- Ferreira, R.M., Franco, E., y Teixeira, A.R. 1996. Covalent dimerization of ribulose bisphosphate carboxylase subunits by UV radiation. *Biochem. J.* 318:227-234.



Capacidad reproductiva de Nannochloropsis oculata en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guíllar.

- Fogg, G., Thake, B. 1987. Algae cultures and phytoplankton ecology. The University of Wisconsin Press. Tercera edición. Estados Unidos de Norteamérica. p. 126.
- Fischer, C. R.; Klein-Marcuschamer, D.; Stephanopoulos, G. (2008). Metabolic Engineering, 10, 295–304
- Fulks, W., y Main, K. (1991). Rotifer and microalgae culture systems. Proceeding of a US-Asia Workshop. Honolulu, Hawaii: The Oceanic Institute, p.1-364.
- Gammone, M., Riccioni, G., and D'Orazio, N. (2015). Marine carotenoids against oxidative stress: effects on human health. Marine Drugs. 13(10): 6226-6246.
- García-Ferris, C. y Moreno, J. 1994. Oxidative modification and breakdown of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase induced in Euglena gracilis by nitrogen starvation. Planta 193:208-215.
- Goodwin, t., (1960). Chemistry, biogénesis and physiology of the carotenoids. In W. Ruhland (ed), Encyclopedia of plant physiology. Springer, Berlin. 5: Part 1, 394.
- Georgakakis, m. G. (2011). Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters. Applied Energy 88, 3389-3401.
- Guiry, M. (2013). AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway.
http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=44568; Recuperado en 04 Noviembre 2013
- Griffiths, M.J., Harrison, S.T.L. (2009). Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. J. Appl. Phycol. 21(5), 493–507
- Hammouda O, A. G.-R. (1995). Microalgae and wastewater treatment. Ecotoxicology and Environmental Safety 31, 205-210
- Hata, M. y Hata, M. (1973). Studies on astaxanthin formation in some fresh-water fishes. Tohoku J. Agric. Res., 24 (4):192.



Capacidad reproductiva de Nannochloropsis oculata en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guíllar.

- Hernández-Pérez, A., y Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. Revista de Biología Marina y Oceanografía, 49(2), 157–173. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>
- Hernández Reyes, B. M., Rodríguez Palacio, M. C., Lozano Ramírez, C., y Castilla Hernández, P. (2012). Remoción de nutrientes por tres cultivos de microalgas libres e inmovilizados. Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal, 3(1), 80–94. <https://www.researchgate.net/publication/260137177>
- Hibberd, DJ (1981). "Notas sobre la taxonomía y nomenclatura de las clases de algas Eustigmatophyceae y Tribophyceae (sinónimo Xanthophyceae)". Revista Botánica de la Sociedad Linneana. 82 (2): 93-119. doi : 10.1111 / j.1095-8339.1981.tb00954.x.
- Hoff, F., Snell, T. 1993. Plankton culture manual. Published Florida Aqua Farms. Ino. Florida. p. 579.
- Hoshida H., Ohira T., Minematsu A., Akada R. y Nishizawa Y. (2005). Accumulation of eicosapentaenoic acid in Nannochloropsis sp. in response to elevated CO₂ concentrations. Journal of Applied Phycology. 17: 29- 34.
- Hu, Q.; Sommerfeld, M.; Jarvis, E.; Ghirardi, M.; Posewitz, M.; Seibert, M.; Darzins, A. (2008). The Plant journal: for cell and molecular biology, 54, 621–639.
- Huang, G.; Chen, F.; Wei, D.; Zhang, X.; Chen, G. (2010). Applied Energy, 87,38–46.
- Kim, T.-H.; Lee, Y.; Han, S.-H.; Hwang, S.-J. (2013). Bioresource technology, 130, 75–80.
- Kozaki, A., y Takeba, G. (1996). Photorespiration protects C₃ plants from photooxidation. Nature 384, 557-560.
- Khozin-Goldberg, I. y Cohen, Z. (2006). The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry*, 67, 696-701. doi: 10.1016/j.phytochem.2006.01.010
- Krause, G.H., Weis, E. (1991). Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 42:313-349.
- Lee R.E. (2008). Phycology. Cambridge University Press, New York, pp 577



Capacidad reproductiva de Nannochloropsis oculata en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guillar.

- Lee, Y., Shen, H. 2004. Basic culturing techniques. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Science. p. 48-50.
- León-Saiki, G. M. L. (2018). Role of starch in *Tretradesmus obliquus*. [Tesis doctoral, Wageningen University].
- Leu, S., y Boussiba, S. (2014). Advances in the production of high-value products by microalgae. Ind. Biotechnol.10: 169-183.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L., Matsudaira, P., y Darnell, J. (2000). Molecular Cell Biology (Fifth Edit). New York: Media Connected.
- López-Fuerte, F., Siqueiros-Beltrones, D., y Yabur, R. (2015). First record of benthic diatoms (Bacillariophyceae and Fragilariophyceae) from Isla Guadalupe, Baja California, Mexico. Revista Mexicana de Biodiversidad, 86(2), 281–292. <https://doi.org/10.1016/J.RMB.2015.04.016>
- Lubian, L., Montero, O., Moreno-Garrido, I., Huerstas, I., Sobrino, C., González, M., y Pares, G. (2000). Nannochloropsis (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments. J. Appl. Phycol. 12, 249-255.
- Lubián, L. M. (1982). Ultraestructura y pigmentos de algunas Chlorophyceae y Eustigmatophyceae planctónicas de morfología similar. *Collectanea botánica*, 13(2), 873-880.
- Lubzens, E., Gibson, O, Mora, O., y Sukenic, A. (1995). Potential advantages of frozen algae (Nannochloropsis sp.) for rotifer (Brachionus plicatilis) culture. Aquaculture 133, 295-310.
- Maity, J. P.; Bundschuh, J.; Chen, C.-Y.; Bhattacharya, P. (2014). Energy, In Press, 1–10.
- Marín-Navarro, J. Contribución de residuos conservados de cisteína a la regulación redox del catabolismo de la Rubisco. 2004. Universidad de Valencia
- Martínez, M., Sanchez, R., Meza, E., Ulloa, R., y Saldivar, J. (2016). Síntesis de lípidos de la microalga *Nannochloropsis oculata* para su uso potencial en la producción de biodiesel. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 33(85-91). DOI: 10.20937/RICA.2017.33. esp02.08.



Capacidad reproductiva de Nannochloropsis oculata en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guíllar.

- Martínez, A (2010). Evaluación del crecimiento celular y de los pigmentos obtenidos de la microalga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta: volvocales) cultivada en diferentes medios.
- Mata, T. M.; Martins, A. a.; Caetano, N. S. (2010). Renewable and Sustainable Energy Reviews, 14, 217–232.
- Mayer MP, Hahn FM, Stillman DJ, Poulter CD. 1992. Disruption and mapping of IDI1, the gene for isopentenyl diphosphate isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 8:743-748
- Melendez, A., Vicario, I., y Heredia, F. (2007). Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y físicoquímicos. Scielo, 57. Recuperado de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S00040622200700020002
- Menéndez Valderrey, J. L. (2015). Cloroplastos. Funciones. Asturnatura.com (en línea) Num. 510, consultado 2/12/2022. Disponible en <https://www.asturnatura.com/articulos>.
- Meyers, S. P. .2000. Papel del carotenoide astaxantina en nutrición de especies acuáticas. pp 473-491 pp
- Morales, V., De Velotti, A. 1990. Fitoplacton. PRADEPESCA Unión Europea y OLDEPESCA. Cartilla (2): p. 1-21.
- Olivares, E. (2010). Producción de aceite para usos industriales a partir de la microalga "*Scenedesmus obliquus*". [Tesis de licenciatura, Universidad de El Salvador].
- Olmedilla-Alonso, B., Granado-Lorencio, F., Herrero-Barbudo, C., Blanco Navarro, I., Perez-Sacristan, B. y Blaquez-Garcia, S. (2007) In vitro bioaccessibility of carotenoids and tocopherols from fruits and vegetables. *Food Chem.* 102(3): 641-648.
- Ortiz-Moreno, M. L., Cortés-Castillo, C. E., Sánchez-Villarraga, J., Padilla, J., y OteroPaternina, A. M. (2012). Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas. Orinoquia., 16(1), 11–20.



Capacidad reproductiva de Nannochloropsis oculata en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guíllar.

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S012137092012000100002

- Otero A., García D. y Fabregas J. 1997. Factors controlling eico-sapentaenoic acid production in semicontinuous cultures of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 9: 465-469
- Paes, C., Faria, G., Tinoco, N., Castro, D., Barbarino, E., y Laurencó, S. (2016). Growth, nutrient uptake and chemical composition of *Chlorella sp.* and *Nannochloropsis oculata* under nitrogen starvation. *Lat. Am. J. Aquat. Res*, 44(2), 275-292. DOI: 10.3856/vol44-issue2-fulltext-9.
- Pal, D., Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z., y Boussiba, S. (2011). The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis sp.* *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90 (4), 1429-1441. DOI: 10.1007/s00253-011-3170-1
- Patil, V., T. Kallqvist, E. Olsen, G.Vogt y H.R. Gislerod. 2007. Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Aquaculture International*. 15: 1- 9.
- Park, J. C. (2010). Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology* (102), 35-42.
- Pereira, M., Jáuregui, G., Devia, A., y Rojas, J. (2017). Cultivo de microalgas *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis sp.* Para alimentación de larvas de peces marinos. *Mutis*, 7(2), 81-85, doi: <http://dx.doi.org/10.21789/22561498.1246>
- Pérsico, M., Moris, M., Tranier, E., Zanazzi, A., Saubidet, A., y Beligni, M. (2011). Evaluación de un sistema exterior de cultivo masivo de la microalga marina *Nannochloropsis oculata*, en una zona templada oceánica de Argentina. *Rev Lattiinoam Biiottecnoll Amb Allgall*. 2(1), 30—48.
- Prince, R.C., Kheshgi, H.S. (2005). The photobiological production of hydrogen: potential efficiency and effectiveness as a renewable fuel. *Critical Reviews in Microbiology*. 31:19-31.



Capacidad reproductiva de Nannochloropsis oculata en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guíllar.

- Qiu R., Gao S., Lopez P.A., Ogden K.L. (2017). Effects of pH on cell growth, lipid production and CO₂ addition of microalgae *Chlorella sorokiniana*, *Algal Res.* 28 192–199. Doi: 10.1016/J. ALGAL.2017.11.004.
- Ra, C., Kang, C., Jung, J., Jeong, G., y Kim, S. (2016). Effects of light-emitting diodes (LEDs) on the accumulation of lipid content using a two-phase culture process with three microalgae. *Bioresource Technology*, 212, 254–261.
- Rawat, I.; Ranjith Kumar, R.; Mutanda, T.; Bux, F. (2013). *Applied Energy*, 103, 444–467.
- Renaud, S., Parry, D., Thinh, L. Kuo, C., Padovan, A., y Sammy, N. (1991). Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis* sp. and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture. *J. Appl. Phycol.* 3 (1), 43-53. DOI: 10.1007/BF00003918
- Rezanka T., Lukavsky J., Nedbalova L. y Sigler K. (2011). Effect of nitrogen and phosphorus starvation on the polyunsaturated triacylglycerol composition, including positional isomer distribution, in the alga *Trachydiscus minutus*. *Phytochem.* 72 (18), 2342-2351. DOI: 10.1016/j.phytochem.2011.08.017.
- Richmond, A. (2004). *Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology*, Blackwell Science Ltd.
- Richmond, A. 1986. *CRC Handbook of microalgal mass culture*. Universidad de California. p. 117-144.
- Rodolfi, L. y Zittelli, G. (2009). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102, 100-112. doi: 10.1002/bit.22033
- Romo, A. 2002. *Manual para el cultivo de microalgas*. Universidad Autónoma de Baja California Sur. Mexico, La Paz. p. 5-7.
- Rodríguez, L. 2006. *Efecto de EM-Bokashi en el cultivo de la microalga Tetraselmis suecica*. Tesis de titulación. Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima, Perú. p. 11-18.



Capacidad reproductiva de Nannochloropsis oculata en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guíllar.

- Ruiz, A. (2011). Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. [Tesis de maestría, Universidad Politécnica de Valencia].
- Safi, C.; Zebib, B.; Merah, O.; Pontalier, P.-Y.; Vaca-Garcia, C. (2014). Renewable and Sustainable Energy Reviews, 35, 265–278.
- Salisbury, F., y Ross, C. (2000). Fisiología de las Plantas 2. Bioquímica Vegetal. Madrid: Paraninfo Thomson Editores.
- Sánchez-Torres, H., Juscamaita-Morales, J., Vargas-Cárdenas, J., y Oliveros-Ramos, R. (2008). Producción de la microalga *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd en medios enriquecidos con ensilado biológico de pescado. *Ecología Aplicada*, 7(1-2), 149-158.
- Sánchez-Varo, R. (1995). Biotecnología de microalgas. [Tesis de licenciatura, Universidad de California]
- Simionato D., Sforza E., Carpinelli E. C., Bertucco A., Giacometti G. M. y Morosinotto T. (2011). Acclimation of *Nannochloropsis gaditana* to different illumination regimes: Effects on lipids accumulation. *Biortech.* 102 (10), 6026-6032. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.02.100.
- Simopoulos A.P. 1999. Essential fatty acids in health and chronic disease. *American Journal Clinical Nutrition*, 70(3):560-569: 1-9.
- Su C. H., Chien L. J., Gomes J., Lin Y. S., Yu Y. K., Liou J. S. y Syu R. J. (2011). Factors affecting lipid accumulation by *Nannochloropsis oculata* in a two-stage cultivation process. *J. Appl. Phycol.* 23 (5), 903-908. DOI: 10.1007/s10811-010-9609-4
- Suh I. S., Lee C.G. (2003) Photobioreactor engineering: Design and performance, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 8 313–321. Doi: 10.1007/BF02949274.
- Sukenik, A., Beardall J., Kromkamp J. C., Kopecky J., Masojidek J., van Bergeijk S., Gabai S., Shaham E. y Yamshon A. (2009). Photosynthetic performance of outdoor *Nannochloropsis* mass cultures under a wide range of environmental conditions. *Aquat. Microb. Ecol.* 56 (2), 297-308. DOI: 10.3354/ame01309
- Sukenik, A. (1999). In: COHEN Z, (Ed). *Chemicals from Microalgae*. London: Taylor y Francis, pp. 41-56.



Capacidad reproductiva de Nannochloropsis oculata en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guíllar.

- Sukenik A., Zmorab O. y Carmeli Y. (1993). Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. II. Nannochloropsis sp. *Aquaculture*, 117: 313-326
- Sukenik A., Carmeli Y. (1989). Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the Eustigmatophyte Nannochloropsis sp. *J. Phycol.* 25: 686-692.
- Stein, J.R. (1973). *Handbook of Phycological Methods*. Cambridge University Press, Cambridge, 448pp.
- Sy, C., Dangles, O., Borel, P., and Caris-Veyrat, C. (2015). Interactions between carotenoids from marine bacteria and other micronutrients: impact on stability and antioxidant activity. *Marine Drugs*. 13(11): 7020-7039.
- Van Vooren, G., Le Grand, F., Legrand, J., Cuine, S., Peltier, G. y Pruvost, J. (2012). Investigation of fatty acids accumulation in *Nannochloropsis oculata* for biodiesel application. *Bioresource Technology*, 124, 421- 432. doi: 10.1016/j.biortech.2012.08.009
- Venugopalan, V., Tripathi, S., Nahar, P., Saradhi, P., Das, R., and Gautam, H. (2013). Characterization of canthaxanthin isomers isolated from a new soil Dietzia sp. and their antioxidant activities. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23(2): 237-245.
- Volkman, J.K., Brown, M.R., Dunstan, G.A., Jeffrey, S. (1993). The biochemical composition of marine microalgae from the class eustigmatophyceae. *J. Phycol.* 29(1), 69–78
- Wei, L., Wang, Q., Xin, Y., Lu, Y., y Xu, J. (2017). Enhancing photosynthetic biomass productivity of industrial oleaginous microalgae by overexpression of rubisco activase. *Algal Research*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.07.023>
- WEHR J.D. (2007) *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology* by Barsanti, L. y Gualtieri, P., *J. Phycol.* 43 412–414. doi:10.1111/j.1529- 8817.2007.00335.x.
- Whittle, S.J., Casselton, P.J. (1975). The chloroplast pigments of the algal classes eustigmatophyceae and xanthophyceae. I. Eustigmatophyceae. *Br. Phycol. J.* 10(2), 179–191



Capacidad reproductiva de Nannochloropsis oculata en diferentes concentraciones de salinidad y aplicación del Fertilizante F/2 Guillar.

- Xiao, Y., Zhang, J., Cui, J., Feng, Y., y Cui, Q. (2013). Metabolic profiles of *Nannochloropsis oceanica* IMET1 under nitrogen-deficiency stress. *Bioresource Technology* 130, 731–738
- Yeesang C. y Cheirsilp B. (2011). Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand. *Biortech.* 102 (3), 3034-3040. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.10.013
- Yuan X., Kumar A., Sahu A. K. y Ergas S. J. (2011). Impact of ammonia concentration on *Spirulina platensis* growth in an airlift photobioreactor. *Biortech.* 102 (3), 3234-3239. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.11.019.
- Ziegler RG. 1991. Vegetables, fruits and carotenoids and the risk of cancers. *Am. J. Clin. Nutr.* 53:251S-259S.