



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DOCTORAL EN BIOLOGÍA

**“Cultivo de microalgas marinas para la
producción de ácidos grasos esenciales y otras
moléculas de interés acuícola y/o alimentario”**

María Delfina Almeyda

Bahía Blanca

Argentina

2022

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Biología de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semi-árida de Bahía Blanca dependiente de la Universidad Nacional del Sur (UNS) y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) durante el período comprendido entre el 05 de septiembre de 2017 y el 10 de diciembre de 2022, bajo la dirección de la Dra. Patricia I. Leonardi y la co-dirección de la Dra. Paola G. Scodelaro Bilbao.

10 de diciembre de 2022



María Delfina Almeysa

	<p>UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR Secretaría General de Posgrado y Educación Continua</p> <p>La presente tesis ha sido aprobada el/..../....., mereciendo la calificación de (.....)</p>
---	---

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

AGRADECIMIENTOS

A mis directoras, Dra. Patricia Leonardi y Dra. Paola Scodelaro por guiarme en mi formación profesional y darme la oportunidad de realizar mi doctorado. Agradezco particularmente la calidez humana en el trato y la predisposición en ayudarme y guiarme de la mejor manera durante todo el desarrollo del doctorado, con la exigencia justa y la libertad necesaria para desarrollar las distintas tareas.

A mi codirectora de beca doctoral Dra. Diana Constenla, por sus aportes y predisposición para enseñarme y guiarme con distintas técnicas empleadas en esta Tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haberme otorgado la beca para realizar mi doctorado y llevar a cabo la presente Tesis.

A la Dirección del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, de la Universidad Nacional del Sur, y del Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS) por brindarme los medios necesarios y el lugar de trabajo para el desarrollo de esta Tesis.

A la Dra. Cecilia Popovich por sus enseñanzas y aportes en relación a los primeros trabajos realizados en la presente tesis, relacionados con los aislamientos de las especies, así como distintas técnicas y metodologías asociadas a los cultivos.

A la Dra. Cecilia Damiani por su gran colaboración en la realización de muchos de los análisis realizados en esta tesis.

Al Dr. Federico Delucchi por la ayuda brindada para realizar los análisis de cromatografía.

A la Dra. Ana María Martínez, por permitirme realizar los análisis de nutrientes en su laboratorio.

A la Dra. María Virginia Sánchez Puerta por la gran ayuda y predisposición en la realización e interpretación de estudios de biología molecular.

Al personal del CERZOS, muy especialmente a Jorge que ha contribuido enormemente con su trabajo y colaboración, para que siempre disponga del material y las cosas necesarias para poder realizar mis ensayos.

A todos mis compañeros de laboratorio, Melanie, Fran, Lucas, Paolo y Anita por los momentos compartidos durante todo este tiempo.

A mi familia y amigos por el apoyo incondicional de siempre.

RESUMEN

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFAs) son nutrientes esenciales altamente demandados por las industrias acuícola, nutracéutica y alimentaria. Actualmente, el principal recurso que abastece de LC-PUFAs a la industria es el aceite de pescado. Sin embargo, las diversas problemáticas asociadas a su producción hacen necesaria la búsqueda de recursos alternativos. Ciertas microalgas marinas producen naturalmente estos compuestos por lo que surgen como una fuente alternativa prometedora de LC-PUFAs. Además, su síntesis puede modificarse manipulando las condiciones de crecimiento y, frente a condiciones de baja temperatura, ciertas especies responden sintetizando aún más LC-PUFAs. Sobre la base de estos antecedentes, el objetivo de esta Tesis fue aislar microalgas nativas del estuario de Bahía Blanca y desarrollar estrategias de cultivo que involucren el estrés por baja temperatura. Se plantearon como objetivos específicos aislar potenciales especies productoras de PUFAs e identificarlas morfológica y molecularmente; caracterizar su crecimiento a escala de laboratorio; cultivarlas en fotobiorreactor bajo condiciones óptimas y estresantes en términos de temperatura determinando su efecto sobre parámetros de crecimiento, producción de biomasa y cantidad, calidad y producción lipídica, con especial énfasis en LC-PUFAs, y de otros compuestos de alto valor como esteroides, pigmentos y/o proteínas. De las tres especies de diatomeas aisladas, se seleccionó a *Cylindrotheca closterium* por presentar los mejores resultados en cuanto crecimiento y producción de biomasa. Se corroboró la identidad de la cepa mediante análisis del gen cloroplástico *rbcL*. Se realizaron cultivos en fotobiorreactor de *C. closterium* a 20°C (control), y disminuyendo abruptamente la temperatura a 10°C durante la fase exponencial de crecimiento (EBTEx) y la fase estacionaria de crecimiento (EBTEs). La condición EBTEs, fue la estrategia de cultivo más adecuada para incrementar la producción de biomasa, lípidos y LC-PUFAs esenciales, particularmente en términos de ácidos eicosapentaenoico (EPA) y araquidónico (ARA). A su vez, la presencia de esteroides y aminoácidos esenciales para organismos acuáticos revelaron el valor de la biomasa para su posible uso en acuicultura. Por otra parte, otra especie aislada fue identificada como *Pavlova gyrams* (Haptophyta) a partir de sus

características morfológicas y estudios moleculares en base al gen nuclear 18s rARN. *P. gyrans* mostró ser robusta para el crecimiento bajo las condiciones empleadas en el laboratorio. Se ensayaron cultivos en fotobiorreactor a una temperatura óptima (20°C) y bajo EBTEs. Ésta última condición demostró ser efectiva para incrementar la producción de biomasa y LC-PUFAs, particularmente los ácidos grasos EPA y docosapentaenoico (DPA). Además, la presencia de fitoesteroles y pigmentos otorgaron aún más valor a la biomasa. Finalmente, se analizó la calidad de los lípidos teniendo en cuenta indicadores de calidad nutricional de los mismos. *P. gyrans* mostró valores similares a los reportados para diferentes aceites de pescado por lo que puede considerarse una especie para uso alimentario. En conjunto, estos resultados evidencian el potencial de las cepas nativas *C. closterium* y *P. gyrans* como una posible fuente alternativa de LC-PUFAs.

ABSTRACT

Long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA) are essential nutrients highly demanded by aquaculture, nutraceutical and food industries. Currently, the main source that supplies LC-PUFAs to the industry is fish oil. However, various problems associated with its production make it necessary to search for alternative resources. Certain marine microalgae naturally produce these compounds, emerging as promising alternative sources of LC-PUFA. Furthermore, its synthesis can be modified by manipulating their growth conditions and faced with low temperature conditions, certain species respond by synthesizing even more LC-PUFA. Based on this background, the objective of this Thesis was to isolate native microalgae from the Bahía Blanca Estuary and develop culture strategies involving low temperature stress. The specific objectives were to isolate possible PUFA-producing species and identify them morphologically and molecularly; characterize their growth on a laboratory scale; cultivate them in a photobioreactor under optimal and stressful conditions in terms of temperature, determining their effect on growth parameters, biomass production and quantity, quality and lipid production, with special emphasis on LC-PUFA, and other high-value compounds such as sterols, pigments and/or proteins. Of the three isolated diatom species, a *Cylindrotheca closterium* was selected as it showed the best results in terms of growth and biomass production. The identity of the strain was confirmed by analysis of the *rcb1* chloroplast gene. *C. closterium* cultures were performed in a photobioreactor at 20°C (control), and the temperature was abruptly decreased to 10°C during the exponential growth phase (EBTEx) and the stationary growth phase (EBTEs). The EBTEs condition was the most suitable culture strategy to increase the production of biomass, lipids and LC-PUFAs, particularly in terms of eicosapentaenoic (EPA) and arachidonic (ARA) acids. In turn, the presence of sterols and essential amino acids for aquatic organisms revealed the value of the biomass for its possible use in aquaculture. On the other hand, another isolated species was identified as *Pavlova gyrans* (Haptophyta) based on its morphological characteristics and molecular studies based on the nuclear 18S rRNA gene. *P. gyrans* was shown to be robust for growth under laboratory conditions. Cultures were also performed in a photobioreactor at optimal temperature (20°C) and

under EBTEs. This last condition proved to be effective in increasing the production of biomass and LC-PUFAs, particularly EPA and docosapentaenoic (DPA) fatty acids. In addition, the presence of phytosterols and pigments added even more value to the biomass. Finally, lipids were analyzed taking into account indicators of nutritional quality. *P. gyrans* showed similar values to those reported for different fish oils, so it can be considered a species for food use. Taken together, these results show the potential of two native strains, *C. closterium* and *P. gyrans*, as alternative sources of LC-PUFAs.

ESTRUCTURA DE LA TESIS

En el **Capítulo 1** se realiza una introducción general del tema a desarrollar, donde se describe la estructura y función de los ácidos grasos poliinsaturados, nutrientes esenciales para el organismo humano y diversos organismos acuáticos. Se introduce acerca de la problemática actual asociada al uso del aceite de pescado como recurso de estos nutrientes y cómo las microalgas surgen como una alternativa sustentable de éstos y otros compuestos de alto valor agregado. Se abordan diferentes aspectos relacionados a las distintas metodologías de cultivos de microalgas y cómo el estrés constituye una herramienta efectiva para incrementar la síntesis de moléculas de interés. Finalmente, se plantea el objetivo general de esta Tesis.

En el **Capítulo 2** se detallan los materiales y métodos comunes al desarrollo integral de la Tesis. Ciertos protocolos y procedimientos específicos de cada capítulo, así como los análisis estadísticos, se describen en cada uno de ellos según corresponda.

En el **Capítulo 3** se describe el aislamiento de diferentes diatomeas del estuario de Bahía Blanca y se comparan en términos de crecimiento y producción de biomasa. Se selecciona la especie *Cylindrotheca closterium* y se efectúa la identificación de la cepa a nivel molecular mediante el análisis del gen cloroplástico *rbcL*. Se realiza un ensayo de cultivo de esta especie en fotobiorreactor en condiciones de crecimiento óptimas. A partir del mismo se evalúa su crecimiento, producción de biomasa y disponibilidad de nutrientes a lo largo del cultivo. Además, se estudia el contenido de lípidos y la composición de ácidos grasos esenciales de la biomasa obtenida.

En el **Capítulo 4** se evalúan dos estrategias para el cultivo de *C. closterium* bajo estrés por disminución de la temperatura. Estos resultados se comparan con aquellos presentados en el capítulo 3 (condición Control). Se evalúan parámetros de crecimiento, producción de biomasa, contenido y composición de lípidos neutros y esteroides. Se determina el contenido de proteínas y se analiza la composición de la biomasa en términos de aminoácidos esenciales. Finalmente, los valores obtenidos para *C. closterium* se comparan con aquellos establecidos para diferentes aceites de pescado.

En el **Capítulo 5**, se evalúa el uso de un fertilizante agrícola como medio de cultivo alternativo para *C. closterium*. Se ensayan distintas concentraciones de fertilizante a escala de laboratorio para determinar la mejor opción en términos de producción de biomasa y lípidos a partir de *C. closterium*. Estos resultados se consideran para iniciar una experiencia en fotobiorreactor. Finalmente, se describen distintos estadios sexuales de *C. closterium* observados durante el cultivo en el fotobiorreactor.

En el **Capítulo 6** se aísla la haptófita *Pavlova gyrans* del estuario de Bahía Blanca y se caracteriza su crecimiento a escala de laboratorio. Se la identifica a nivel molecular mediante el análisis del gen nuclear que codifica para el 18S rARN. Se realizan cultivos de *P. gyrans* en fotobiorreactor en condiciones óptimas de crecimiento, según lo determinado en los ensayos iniciales, y aplicando estrés térmico, siguiendo la estrategia seleccionada en el Capítulo 4. Se evalúan parámetros de crecimiento, producción de biomasa, contenido de lípidos neutros, esteroides y pigmentos. Además, se analiza la composición de la biomasa en términos de ácidos grasos, esteroides y pigmentos. Por último, se estima la calidad de los lípidos obtenidos desde el punto de vista de la salud humana, mediante el cálculo de índices lipídicos.

Finalmente se presentan las **Conclusiones Generales** donde se destacan los hallazgos más relevantes que se desprenden de los resultados, y se plantean estudios futuros a partir de los nuevos interrogantes surgidos a lo largo de la Tesis.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Publicaciones

- **Almeyda M.D.**, Scodelaro Bilbao P.G, Popovich C., Constenla D.T, Leonardi P.I. (2020) Enhancement of polyunsaturated fatty acid production under low-temperature stress in *Cylindrotheca closterium*. *Journal of Applied Phycology*, 32(2), 989-1001. doi:10.1007/s10811-020-02047-x.
- **Almeyda, M.D.**, Scodelaro Bilbao, P.G., Sánchez Puerta M.V., Constenla, D.T, Leonardi, P.I. (2022). *Pavlova gyrans* as a potential source of essential fatty acids, sterols and pigments: culture under low temperature. Bajo revisión en la revista *Journal of Applied Phycology*.

Congresos y Reuniones científicas

- **Almeyda, M.D.**, Scodelaro Bilbao, P.G., Constenla, D.T, Popovich C.A., Leonardi, P.I. (2018). Cultivo de *Cylindrotheca closterium* (Pennales, Bacillariophyceae) en fotobiorreactor: evaluación de la biomasa obtenida como fuente de ácidos grasos omega-3 y fitoesteroles. X Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar. Buenos Aires.
- **Almeyda, M.D.**, Scodelaro Bilbao, P.G., Martín, L.L., Popovich, C.A., Constenla, D.T y Leonardi, P.I. (2019). Producción y caracterización lipídica de dos diatomeas marinas. XVIII Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar. Mar del Plata.
- **Almeyda, M.D.**, Scodelaro Bilbao, P.G., Popovich, C.A., Constenla, D.T y Leonardi, P.I. (2019). *Cylindrotheca closterium*: fuente potencial de ácidos grasos esenciales. XVIII Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar. Mar del Plata.
- **Almeyda, M.D.**, Scodelaro Bilbao, P.G., Constenla, D.T., Leonardi, P.I. (2021). Cultivo de una criptófita aislada del Estuario de Bahía Blanca para la producción de lípidos. XXXVIII Jornadas Argentinas de Botánica. Entre Ríos.
- **Almeyda M.D.**, Scodelaro Bilbao, P.G., Constenla, D.T., Leonardi, P.I. (2021). Low temperature induces pufas production in a native-microalga cryptophyte *Plagioselmis* sp. LVII SAIB Meeting - XVI SAMIGE Meeting, online.

- **Almeyda M.D.**, Scodelaro Bilbao, P.G., Constenla, D.T., Leonardi, P.I. (2022). Microalgas marinas de la costa argentina como potencial recurso de LC-Pufas y esteroides. VII Congreso Latinoamericano de Biotecnología Algal (CLABA) y V Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal (SOLABIAA). México.

Trabajos en colaboración relacionados con el tema de tesis

- Scodelaro Bilbao, P.G, Martin, L.L., Popovich, C.A, **Almeyda, M.D.**, Chamorro, E., Leonardi, P.I. (2020). Assessment of *Halamphora coffeaeformis* growth and biochemical composition for aquaculture purposes. *Journal of Marine Science and Engineering*. 8(4), 1-12. doi.org/10.3390/jmse8040282
- Scodelaro Bilbao, P.G, **Almeyda, M.D.**, Bolletta, M., Leonardi, P.I. (2021). Co-cultivo de *Haematococcus pluvialis* y *Chlorella* sp. para la producción de Biomasa y biomoléculas de interés comercial. XXXVIII Jornadas Argentinas de Botánica. Entre Ríos.
- Scodelaro Bilbao, P.G, **Almeyda, M.D.**, Bolletta, M, Leonardi, P.I. (2021). Co-cultivation of *Haematococcus pluvialis* and *Chlorella* sp. as a novel strategy for microalgal-based biotechnology. LVII SAIB Meeting - XVI SAMIGE Meeting, online
- Scodelaro Bilbao, P.G., **Almeyda, M.D.**, Bolletta, M, Leonardi, P. I. (2022). Evaluación del crecimiento y la producción de moléculas bioactivas de dos especies de microalgas dulceacuícolas de Argentina cultivadas en fotobiorreactor. VII Congreso Latinoamericano de Biotecnología Algal (CLABA) y V Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal (SOLABIAA). México.

ÍNDICE

Capítulo 1. Introducción General	1
1.1. Ácidos grasos: estructura y función.....	1
1.2. Importancia de los PUFAs en acuicultura.....	4
1.3. Recursos de PUFAs en la actualidad y problemáticas asociadas.....	6
1.4. Las microalgas como recurso alternativo de LC-PUFAs.....	8
1.4.1 Cultivo de microalgas	8
1.4.2 Biosíntesis de LC-PUFAs en microalgas.....	12
1.4.3. Selección de cepas.....	14
1.5. Las microalgas como productoras de moléculas de alto valor agregado.....	14
1.6. El estrés como herramienta para la síntesis de moléculas de alto valor agregado.....	17
1.7 Objetivos	18
Capítulo 2. Materiales y Métodos	19
2.1. Medio de cultivo	19
2.1.1. Acondicionamiento del agua de mar.....	19
2.1.2 Soluciones de nutrientes.....	19
2.1.3 Preparación del medio de cultivo f/2.....	20
2.2. Acondicionamiento del material de laboratorio.....	21
2.3. Obtención de cultivos unialgales.....	21
2.4 Cultivos en fotobiorreactor.....	23
2.4.1 Características del fotobiorreactor.....	23
2.4.2. Obtención del inóculo.....	25
2.4.3. Cosecha de biomasa.....	26
2.5. Parámetros de crecimiento.....	27
2.5.1. Densidad celular.....	27
2.5.2. Velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación.....	28
2.5.3. Peso seco.....	28
2.6. Determinación del contenido y la composición lipídica de la biomasa.....	29
2.6.1. Estimación del contenido de lípidos neutros.....	29
2.6.2. Extracción de lípidos.....	29
2.6.3. Determinación de lípidos totales mediante gravimetría.....	31
2.6.4. Fraccionamiento lipídico.....	31
2.6.5. Cuantificación de triglicéridos (TAG) y esteroides.....	32
2.6.5.1. Separación y elución.....	33
2.6.5.2. Cuantificación mediante espectrofotometría.....	34
2.7. Identificación lipídica mediante cromatografía gaseosa.....	35

2.7.1. Identificación de ácidos grasos.....	35
2.7.2 Identificación de esteroides.....	36
2.8. Estimación de la producción de ácidos grasos.....	37
Capítulo 3. Diatomeas nativas como potencial recurso de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.....	39
3.1 Introducción.....	39
3.2 Materiales y métodos.....	41
3.2.1. Obtención de cultivos unialgales.....	41
3.2.2. Cultivos a escala de laboratorio de las diatomeas aisladas.....	41
3.2.2.1. Parámetros de crecimiento y producción de biomasa.....	42
3.2.3. Cultivo de diatomeas en fotobiorreactor.....	43
3.2.3.1. Caracterización morfológica y análisis filogenético de la cepa seleccionada.....	44
3.2.3.2. Parámetros de crecimiento y producción de biomasa.....	44
3.2.3.3. Análisis de la concentración de nutrientes en el medio de cultivo.....	45
3.2.3.4. Determinación del contenido y la composición lipídica de la biomasa.....	47
3.2.4. Análisis estadístico.....	47
3.3. Resultados.....	47
3.3.1. Comparación del crecimiento de las diatomeas aisladas.....	47
3.3.2. Caracterización morfológica y molecular de <i>Cylindrotheca closterium</i>	50
3.3.3. Cultivo de <i>Cylindrotheca closterium</i> en fotobiorreactor.....	53
3.4. Discusión.....	58
3.5. Conclusiones.....	61
Capítulo 4. El estrés por baja temperatura como una herramienta para mejorar la producción de ácidos grasos poliinsaturados en <i>Cylindrotheca closterium</i>.....	63
4.1. Introducción.....	63
4.2. Materiales y Métodos.....	66
4.2.1 Cultivos de <i>C. closterium</i> en fotobiorreactor: estrés por baja temperatura.....	66
4.2.2. Parámetros de crecimiento y producción de biomasa.....	66
4.2.3. Determinación del contenido y composición lipídica de la biomasa.....	66
4.2.3.1. Estimación del contenido de lípidos neutros.....	66
4.2.3.2. Determinación del contenido de lípidos totales y de las fracciones lipídicas de <i>C. closterium</i>	67
4.2.3.3. Cuantificación de TAGs y esteroides.....	67

4.2.3.4. Identificación de ácidos grasos y esteroides mediante cromatografía gaseosa.....	67
4.2.3.5. Estimación de la producción de ácidos grasos.....	67
4.2.4. Determinación del contenido proteico y caracterización de la composición de aminoácidos de la biomasa.....	67
4.2.4.1. Cuantificación de proteínas.....	68
4.2.4.2. Análisis de la composición de aminoácidos.....	68
4.2.5. Análisis estadístico.....	69
4.3. Resultados.....	69
4.3.1. Crecimiento y producción de biomasa.....	69
4.3.2. Lípidos totales y fraccionamiento lipídico.....	71
4.3.3. Composición de ácidos grasos.....	74
4.3.4. Producción de ácidos grasos.....	75
4.3.5. Producción y composición de esteroides.....	78
4.3.6. Análisis de proteínas y aminoácidos.....	80
4.4. Discusión.....	82
4.5. Conclusiones.....	87
Capítulo 5. Evaluación de un fertilizante agrícola como medio de cultivo para <i>Cylindrotheca closterium</i>.....	88
5.1. Introducción.....	88
5.2. Materiales y métodos.....	89
5.2.1. Medios de cultivos.....	89
5.2.2. Cultivos a escala de laboratorio.....	90
5.2.3. Parámetros de crecimiento.....	91
5.2.4. Producción de biomasa.....	92
5.2.5. Estimación del contenido de lípidos neutros.....	92
5.2.6. Cultivo en fotobiorreactor.....	92
5.2.7. Análisis estadístico.....	92
5.3. Resultados.....	93
5.3.1. Cultivos a escala de laboratorio.....	93
5.3.2. Cultivo en fotobiorreactor.....	95
5.4. Discusión.....	99
5.5 Conclusiones.....	100
Capítulo 6. <i>Pavlova gyrams</i> como recurso alternativo de ácidos grasos esenciales.....	102
6.1. Introducción.....	102
6.2. Materiales y Métodos.....	104
6.2.1. Obtención de cultivos uniales.....	104
6.2.2. Crecimiento y producción de biomasa a escala de laboratorio.....	104
6.2.3. Identificación molecular y análisis filogenético.....	105
6.2.4. Cultivos en fotobiorreactor.....	105

6.2.4.1 Parámetros de crecimiento y producción de biomasa.....	106
6.2.4.2. Cuantificación de pigmentos fotosintéticos.....	106
6.2.4.3. Determinación del contenido y composición lipídica de la biomasa.....	106
6.2.4.3.1. Estimación del contenido de lípidos neutros.....	106
6.2.4.3.2. Determinación del contenido de lípidos totales y de las fracciones lipídicas.....	107
6.2.4.3.3. Cuantificación de TAGs y esteroides.....	107
6.2.4.3.4. Identificación de ácidos grasos y esteroides mediante cromatografía gaseosa.....	107
6.2.4.4. Cálculo de índices nutricionales de calidad lipídica..	108
6.2.5. Análisis estadístico.....	108
6.3. Resultados.....	108
6.3.1. Identificación de la especie y caracterización del crecimiento bajo condiciones de laboratorio.....	108
6.3.2. Crecimiento y producción de biomasa en el cultivo en fotobiorreactor.....	111
6.3.3. Estimación del contenido de lípidos neutros.....	113
6.3.4. Lípidos totales y fraccionamiento lipídico.....	114
6.3.5. Caracterización de ácidos grasos.....	115
6.3.6. Producción de ácidos grasos.....	118
6.3.7. Índices nutricionales de calidad lipídica.....	120
6.3.8. Análisis de esteroides.....	120
6.3.9. Análisis del contenido de pigmentos fotosintéticos.....	122
6.4. Discusión.....	123
6.5. Conclusiones.....	129
Síntesis y conclusiones generales.....	130
Bibliografía.....	134

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las microalgas constituyen un grupo de organismos con un gran potencial para la producción de diferentes compuestos de alto valor para la industria, como son los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, del inglés *polyunsaturated fatty acids*). Los PUFAs se consideran nutrientes esenciales para el organismo humano y diversos organismos acuáticos dada su incapacidad de sintetizarlos, por lo que deben ser incorporados con la dieta. En la actualidad la principal fuente de PUFAs es el aceite de pescado. Sin embargo, su producción implica prácticas no sustentables, por lo que resulta necesaria la búsqueda de recursos alternativos de PUFAs, cuya obtención sea más amigable con el medio ambiente. En este escenario, las microalgas surgen como una alternativa prometedora para la producción de PUFAs. Por ello, en las siguientes secciones, se brindarán los conceptos y fundamentos que sustentan esta afirmación.

1.1. Ácidos grasos: estructura y función

Los ácidos grasos (AGs) pueden definirse como compuestos orgánicos cuya estructura presenta una cadena alifática de longitud variable en cuyo extremo se encuentra un grupo funcional carboxilo (COOH) (Maltsev y Maltseva, 2021) (Fig. 1.1). Estos compuestos pueden ser clasificados de acuerdo a su grado de insaturación, es decir, considerando el número de dobles enlaces presentes en la cadena carbonada. Si ésta posee únicamente enlaces simples en su estructura, se habla de AGs saturados (SFAs, del inglés *saturated fatty acids*); mientras que la presencia de uno o más dobles enlaces da lugar a AGs insaturados. Éstos se denominan monoinsaturados (MUFAs, del inglés *monounsaturated fatty acids*) cuando poseen un único doble enlace y PUFAs cuando poseen dos o más insaturaciones (Lunn y Theobald, 2006). Además, los AGs pueden clasificarse de acuerdo a la posición de los dobles enlaces dentro de la cadena alifática. Una forma posible es el sistema de nomenclatura omega (ω) (Castro et al., 2016). El mismo establece la identificación de los AGs mediante la fórmula C:D ω x, siendo C equivalente al número total de carbonos presentes en la cadena alifática, D corresponde al número de

dobles enlaces y ω indica numéricamente la posición de la primera insaturación, asignando el número 1 al átomo de carbono correspondiente al metilo terminal de la cadena carbonada (Fig. 1.1).

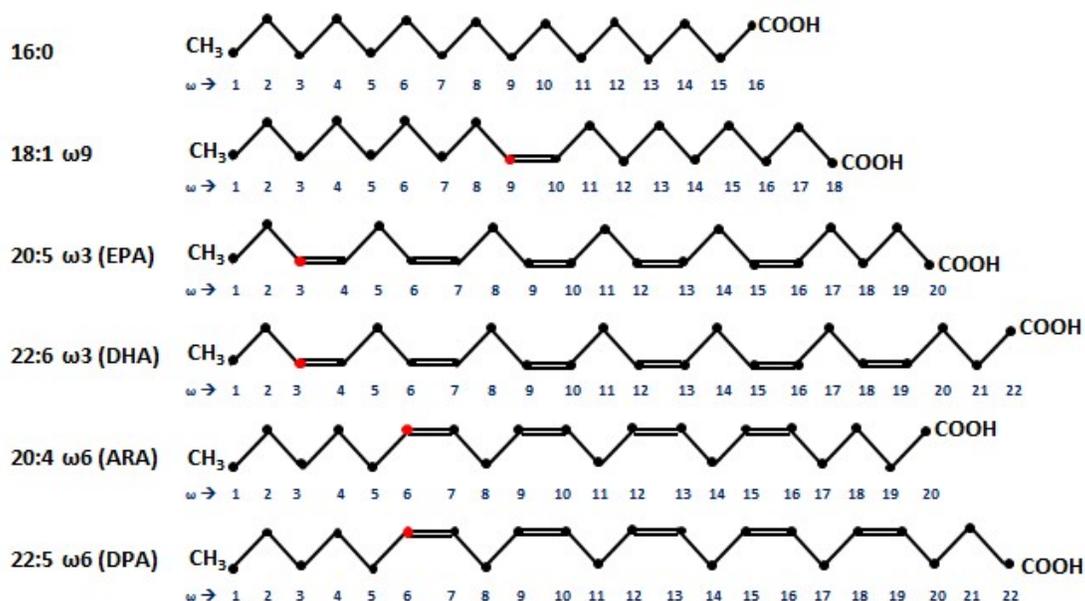


Figura 1.1. Sistema de nomenclatura ω de ácidos grasos. Se muestran los AGs palmítico (16:0), oleico (18:1 $\omega 9$) y los PUFAs eicosapentaenoico (EPA) (20:5 $\omega 3$), docosahexaenoico (DHA) (22:6 $\omega 3$), araquidónico (ARA) (20:4 $\omega 6$) y docosapentaenoico (DPA) (22:5 $\omega 6$). Los carbonos con la primera insaturación contando a partir del extremo metilo (CH_3) se indican con un círculo rojo.

Los PUFAs $\omega 3$ y $\omega 6$ representan los AGs más importantes en la salud de las personas debido a su función en enfermedades metabólicas, cardiovasculares e inflamatorias (Simonetto et al., 2019). Los AGs $\omega 3$, además de actuar como factores protectores frente a enfermedades como la obesidad, diabetes y trastornos metabólicos, tienen efectos anti rítmicos, mejoran la permeabilidad vascular y reducen la presión arterial, así como los niveles de triglicéridos (Von Schacky et al., 2007; Tortosa-Caparrós et al., 2016). A su vez, los PUFAs se encuentran involucrados en los procesos inflamatorios, aunque sus funciones parecerían ser opuestas. Mientras los $\omega 3$ ejercen una acción antiinflamatoria con efectos beneficiosos en la prevención de enfermedades cardiovasculares, los $\omega 6$ se consideran

proinflamatorios (Simopoulos, 2002; Saini y Keum, 2018; Simonetto et al., 2019). Debido a estos efectos antagónicos, se recomienda su consumo en proporciones equilibradas, respetando una relación $\omega 6/\omega 3$ de 1/1 a 2/1. Sin embargo, la proporción de $\omega 6/\omega 3$ en las dietas occidentales típicas es de $\approx 16/1$, asociándose este desequilibrio con una mayor frecuencia de enfermedades cardiovasculares (Dunbar et al., 2014; Saini y Keum, 2018; Patel et al., 2022). Por ello, existe un interés creciente por incrementar el consumo de PUFAs, principalmente de aquellos $\omega 3$.

Si bien es importante una dieta equilibrada en AGs $\omega 3$ y $\omega 6$, existen efectos específicos asociados a cada uno de ellos. Los AGs linoleico (LA; 18:2 $\omega 6$) y alfa linolénico (ALA; 18:3 $\omega 3$) se metabolizan actuando como sustratos de PUFAs $\omega 6$ y $\omega 3$ de más de 20 átomos de carbono, es decir, cadena larga (LC-PUFAs, del inglés *long chain polyunsaturated fatty acids*), y con un mayor grado de insaturación. Sin embargo, las tasas de conversión de LA y ALA a LC-PUFAs son muy bajas, por lo que la ingesta de LC-PUFAs se vuelve esencial para la salud (Kim y Park, 2021). Particularmente, los LC-PUFAs más interesantes desde el punto de vista de la salud humana, son los AGs eicosapentaenoico (EPA; 20:5 $\omega 3$), docosapentaenoico (DPA; 22:5 $\omega 3$) y docosahexaenoico (DHA; 22:6 $\omega 3$) derivados del ALA; y los AGs araquidónico (ARA; 20:4 $\omega 6$) y docosapentaenoico (DPA; 22:5 $\omega 6$) derivados de LA. El EPA y el DHA son componentes estructurales en las membranas sinápticas del cerebro y la retina, por lo que son esenciales para la función cognitiva y la visión. Por ello, el DHA ha evidenciado numerosos beneficios, desde el desarrollo de los embriones hasta mejoras en lo cognitivo y la salud ocular de adultos y ancianos (Li et al., 2021). Además, estos AGs pueden prevenir la obesidad, reducir los niveles de triglicéridos, regular las vías inflamatorias, siendo efectivos para el tratamiento de la enfermedad del hígado graso (Swanson et al., 2012; Remize et al., 2021). A su vez, terapias de administración de EPA purificado permitieron reducir la ocurrencia de eventos cardiovasculares (Toth et al., 2022). El DHA junto con el ARA son los principales LC-PUFAs en la leche materna humana y son necesarios para el crecimiento y desarrollo cerebral adecuado. En este sentido, los expertos recomiendan agregar ARA y DHA en las leches de fórmula para satisfacer las necesidades nutricionales y el correcto desarrollo de los bebés (Salem y Van Dael, 2020). El ARA posee

un potencial efecto protector contra la esquistosomiasis, así como en la iniciación, desarrollo y metástasis de tumores, inhibiendo por ejemplo el crecimiento *in vitro* de células de carcinoma de cuello uterino, la proliferación de cáncer de próstata y la supresión de células de carcinoma gástrico (Tallima y El Ridi, 2018). Además, los metabolitos derivados de la oxidación de ARA son de importancia crítica para la señalización de recompensa cerebral, los procesos motivacionales, las emociones, las respuestas al estrés, el dolor y el equilibrio energético (Tallima y El Ridi, 2018). Por su parte, inicialmente el consumo de DPA era contraindicado. Sin embargo, su hallazgo en el tejido cerebral humano y en la leche materna indujo un cambio de esta concepción (Bárceñas-Pérez et al., 2021). A diferencia de otros AGs $\omega 6$, se ha demostrado que, en ciertos modelos animales, el DPA posee efectos antiinflamatorios resolviendo positivamente los procesos de inflamación neuronal característicos de las etapas tempranas y tardías de la enfermedad de Alzheimer (Nauroth et al., 2010; Ma et al., 2020).

1.2. Importancia de los PUFAs en acuicultura

La acuicultura, entendida como el cultivo de peces, moluscos, crustáceos u otros organismos acuáticos bajo condiciones controladas, es el sector de producción de alimentos de más rápido crecimiento en el mundo (FAO, 2020; Thomas et al., 2021). Los peces y los mariscos son las principales fuentes de LC-PUFAs para consumo humano y se prevé que para el año 2030 alrededor del 60% del pescado disponible para el consumo humano proceda de la acuicultura (Barta et al., 2021). Los PUFAs, en acuicultura, cumplen un rol fundamental, no sólo porque son nutrientes esenciales que afectan diversidad de funciones de los organismos acuáticos en cultivo, sino que también mejoran el valor nutricional de los productos obtenidos destinados a consumo humano, impactando positivamente en la salud (Tocher et al., 2019) (Fig. 1.2).

En nuestro país, las especies que más se producen mediante acuicultura son el Pacú (*Piaractus mesopotamicus*) y la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), representando el 40,98 % y 46,34 % de las especies cultivadas, respectivamente (FAO, 2020). En términos generales, los peces de agua dulce cuentan con la capacidad enzimática de sintetizar EPA,

DHA y ARA a partir de la elongación y desaturación de ALA y LA. Por lo tanto, estos últimos son considerados nutrientes esenciales que deben ser incorporados en la dieta (Lall y Dumas, 2015). Asimismo, si bien los LC-PUFAs no son estrictamente esenciales para el pacú y la trucha arcoíris, incluirlos como parte de su dieta mejora la calidad nutricional de la carne para consumo humano (Thanuthong et al., 2011; Gonçalves et al., 2021).

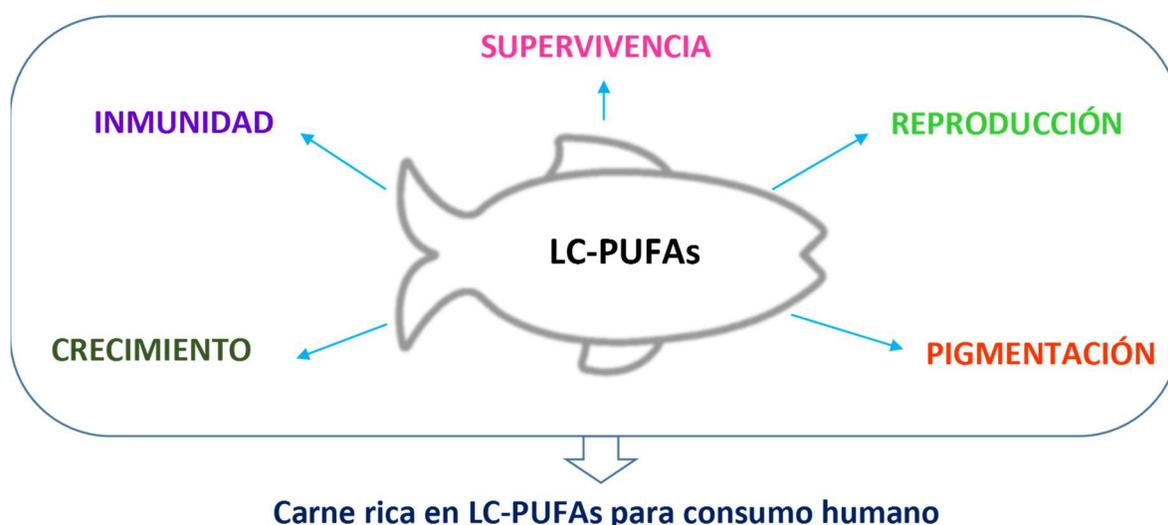


Figura 1.2. Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFAs) en acuicultura. Representación esquemática de las funciones de los LC-PUFAs en peces.

Con respecto a la maricultura, la mayoría de las especies marinas carecen o tienen muy poca capacidad enzimática para elongar y desaturar los AGs LA y ALA. Por lo tanto, los LC-PUFAs como el EPA, DHA y ARA son considerados nutrientes esenciales y deben ser incluidos en la dieta (Lall y Dumas, 2015; Mejri et al., 2021). Éstos, están involucrados en diferentes funciones fisiológicas, entre las que se incluyen la reproducción, la inmunidad, la regulación del equilibrio iónico, la contracción muscular, la adhesión celular, el control de la flotabilidad, el desarrollo del cerebro y los ojos, entre otras, por lo que afectan directamente el crecimiento y la supervivencia de las especies cultivadas (Glencross, 2009; Steinberg, 2022). El DHA y EPA tienen funciones importantes en el mantenimiento de la fluidez de las membranas, mientras que el ARA y EPA son precursores de eicosanoides bioactivos (Tocher, 2010). Durante el desarrollo larvario, el DHA se incorpora preferentemente al tejido nervioso y retinal, observándose anomalías en el crecimiento y

alta mortalidad cuando éste es insuficiente (Tocher, 2010; Mejri et al., 2021). En el cultivo de larvas de peces marinos, los alimentos vivos como rotíferos y artemia son los preferidos, aunque son nutricionalmente inadecuados en términos de PUFAs esenciales, por lo que se requiere el desarrollo de estrategias para su enriquecimiento (Tocher, 2010). Al igual que los peces, el cultivo de cefalópodos y moluscos como vieiras, ostras y mejillones, requieren dietas ricas en EPA, DHA y ARA. Estos LC-PUFAs son esenciales y afectan la supervivencia y el crecimiento de las larvas de estos animales, así como el depósito y la calidad de los lípidos en la carne (Prato et al., 2010; Rodríguez Pesante et al., 2020).

En Argentina, la maricultura constituye una actividad marginal y su producción es en la mayoría de los casos artesanal y/o experimental. De acuerdo al informe de Carciofi y Rossi (2021), en el año 2019 se produjeron 15,5 toneladas de ostras (en el sur de Buenos Aires) y 4 toneladas de mejillones (en Chubut y Tierra del Fuego). En la provincia de Río Negro se desarrollan cultivos experimentales de ostras planas, mejillones y vieiras. Por su parte el Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP) cuenta con un Programa de Maricultura y Biología Experimental (MARI) para el desarrollo del cultivo de besugo, lenguado, chernia, pez limón, pulpito y otras especies. La diversificación de la acuicultura con nuevas especies ha sido señalada como un aspecto clave para incrementar la sostenibilidad ambiental y la rentabilidad del sector acuícola (FAO, 2020). En este sentido, un punto crucial para lograr la expansión y el desarrollo de la maricultura sustentable en nuestro país se relaciona con la elaboración de alimentos acuícolas con un contenido elevado LC-PUFAs esenciales.

1.3. Recursos de PUFAs en la actualidad y problemáticas asociadas

Los AGs esenciales LA y ALA se encuentran disponibles en semillas, frutos secos, aceites vegetales y distintos productos a base de aceite vegetal. Asimismo, el ARA puede obtenerse a partir del consumo de carne y huevos, mientras que el EPA y el DHA a través de la ingesta de mariscos, pescados y de suplementos a base de aceites de pescado (Miles et al., 2021). El aceite de pescado, rico en triglicéridos con alto contenido de EPA y DHA, es considerado el principal recurso de LC-PUFAs ω 3. Actualmente, este aceite proviene del

procesado de poblaciones naturales de peces capturadas de la naturaleza (Turchini et al., 2019). Sin embargo, existen ciertas problemáticas asociadas a su producción (Fig. 1.3).

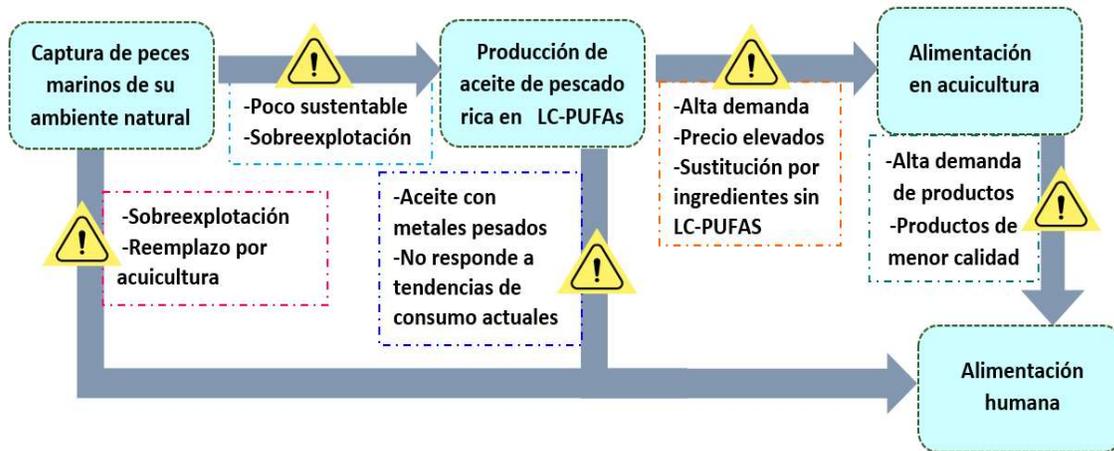


Figura 1.3. Problemáticas asociadas al uso de aceite de pescado como recurso de LC-PUFAs. En el diagrama de flujo se muestran problemáticas (indicadas con los símbolos de peligro) asociadas a la captura de peces para alimentación humana, y otras asociadas a la producción de aceite de pescado utilizado tanto en acuicultura como en alimentación humana.

De acuerdo con Lu et al. (2021), existe un interés creciente en la exploración de fuentes naturales de PUFAs como alternativa para reemplazar el uso de aceite de pescado. Estos autores identifican cuatro causas que promueven esta búsqueda:

- La baja o inexistente capacidad de los peces para sintetizar PUFAs.
- La disminución de la disponibilidad de peces y sus productos derivados como consecuencia de la sobreexplotación de los recursos marinos.
- El impacto negativo de la contaminación ambiental, que genera la acumulación de metales pesados u otras sustancias químicas tóxicas en los animales acuáticos, lo que amenaza la inocuidad respecto de la ingesta de peces y del aceite de pescado resultante.
- La influencia de los fenómenos climáticos naturales sobre la pesca oceánica, que provoca la fluctuación de los precios del aceite rico en PUFAs e incluso la interrupción de la producción en la sesión de invierno.

Los productos resultantes de la actividad acuícola se han convertido en la principal fuente de EPA y DHA para la creciente población humana. Sin embargo, la acuicultura también implica un importante consumo del suministro mundial disponible de EPA y DHA. Actualmente, la única forma de garantizar que los peces y otros organismos acuáticos en cultivo contengan altos niveles de EPA y DHA, es incluyendo aceite de pescado en su alimento (Turchini, 2019). Por otro lado, la creciente demanda de este aceite por las industrias acuícola, alimentaria y nutracéutica, sumado a fluctuaciones en el suministro, han conducido a un aumento en los precios (Chi et al., 2021). Debido a esto, la inclusión de aceite de pescado en los piensos acuícolas es cada vez menor y se reemplaza por otros ingredientes de menor calidad nutricional como los aceites de plantas terrestres que, si bien se consideran un ingrediente más sostenible y económico en comparación con el aceite de pescado, no contienen EPA y DHA. Esta situación afecta la calidad de los organismos acuáticos cultivados y, por ende, el mercado ofrece peces de menor calidad nutricional en términos de LC-PUFAs (Tocher, 2015; FAO, 2018).

Por otra parte, los avances científicos en torno al efecto de la alimentación sobre la salud han generado una mayor demanda de alimentos y suplementos capaces de aportar moléculas con actividad biológica con propiedades beneficiosas para el organismo. Otra tendencia que estimula la búsqueda de nuevos ingredientes ricos en LC-PUFAs, es el auge de hábitos de consumos veganos y/o vegetarianos, lo cual demanda ingredientes libres de animales para la elaboración de alimentos y bebidas (Olivier et al., 2020).

Considerando lo expuesto, el desarrollo de productos alternativos al aceite de pescado es un punto clave, no sólo para satisfacer la creciente demanda de LC-PUFAs desde el sector acuícola, sino también para hacer frente a las nuevas tendencias de consumo que afectan a las industrias nutracéutica y alimentaria (Olivier et al., 2020; Barta et al., 2021).

1.4. Las microalgas como recurso alternativo de LC-PUFAs

1.4.1. Cultivo de microalgas

El término microalgas incluye a una gran diversidad de organismos microscópicos fotosintéticos adaptados a variedad de ambientes (Khan et al., 2018). Estos organismos han

despertado un interés considerable a nivel mundial, dado su potencial en la formulación de alimentos, cosméticos, productos farmacéuticos, fertilizantes, tratamiento de aguas residuales y producción de biocombustibles (Camacho et al., 2019). En los ecosistemas marinos naturales, las microalgas son las principales productoras de LC-PUFAs, los cuales son transferidos a niveles tróficos superiores ocupados por camarones, peces y otros animales acuáticos. Por lo tanto, el cultivo de microalgas para la obtención de biomasa rica en LC-PUFAs surge como una alternativa prometedora.

Para desarrollar exitosamente cultivos de microalgas se requiere de un exhaustivo conocimiento de su biología y fisiología, de manera de poder cumplir con los requerimientos particulares de cada especie. De este modo, la mayoría de las especies crecen bajo condiciones autotróficas, es decir, dependen de la energía lumínica y de una fuente de carbono inorgánica, como el dióxido de carbono (CO_2), para generar energía química mediante el proceso de fotosíntesis. Las especies heterotróficas requieren una fuente orgánica de carbono como recurso de energía, mientras que aquellas mixotróficas representan una combinación de las dos condiciones anteriores (Peter et al., 2022). Si bien los cultivos heterotróficos o mixotróficos generalmente alcanzan una mayor producción de biomasa, son menos rentables y presentan mayor riesgo de contaminación por bacterias respecto de los autotróficos (Zhou et al., 2020).

La propagación de las microalgas en cultivos autotróficos depende de distintos factores como la disponibilidad de luz, la temperatura, el pH del medio, el suministro de CO_2 y la disponibilidad de nutrientes (Chhandama et al., 2021). Estos factores, no solo afectan la fotosíntesis y la producción de biomasa, sino que también influyen sobre el metabolismo celular y, por lo tanto, afectan la composición bioquímica de las células (Hu, 2004). En este sentido, la manipulación de las condiciones de crecimiento permite inducir la síntesis de determinadas moléculas, alcanzando así objetivos biotecnológicos específicos. Por otra parte, el cultivo *in vitro* de microalgas puede realizarse bajo dos modalidades: como cultivo continuo, en el cual el medio de cultivo es renovado periódicamente y, por lo tanto, funciona en exceso de nutrientes; o bien, como cultivo por lote o “batch”, un sistema simple y de fácil operación que no requiere la renovación del medio de cultivo (Fig. 1.4).

Bajo esta modalidad, se aporta al sistema una cantidad limitada de nutrientes para favorecer inicialmente la división celular y, por ende, un incremento de la biomasa; y, más avanzado el cultivo mediado por la limitación de nutrientes, estimular la síntesis de ciertos metabolitos (Vonshak, 1985; Debowski et al., 2012). Como consecuencia, los cultivos *batch* presentan distintas fases de crecimiento, las cuales reflejan cambios en la biomasa y en sus condiciones de cultivo (Lee, 2016) (Fig. 1.4). La identificación de estas fases es de gran relevancia, dado que la composición bioquímica de las microalgas varía en función de ellas. Así, por ejemplo, la máxima producción de proteínas se observa durante la fase exponencial de crecimiento, mientras que la de lípidos y carbohidratos ocurre en la fase estacionaria (Fidalgo et al., 1998; Gatenby et al., 2003). Por lo tanto, el momento de detener el cultivo y cosechar la biomasa microalgal dependerá de la molécula que se desee producir.

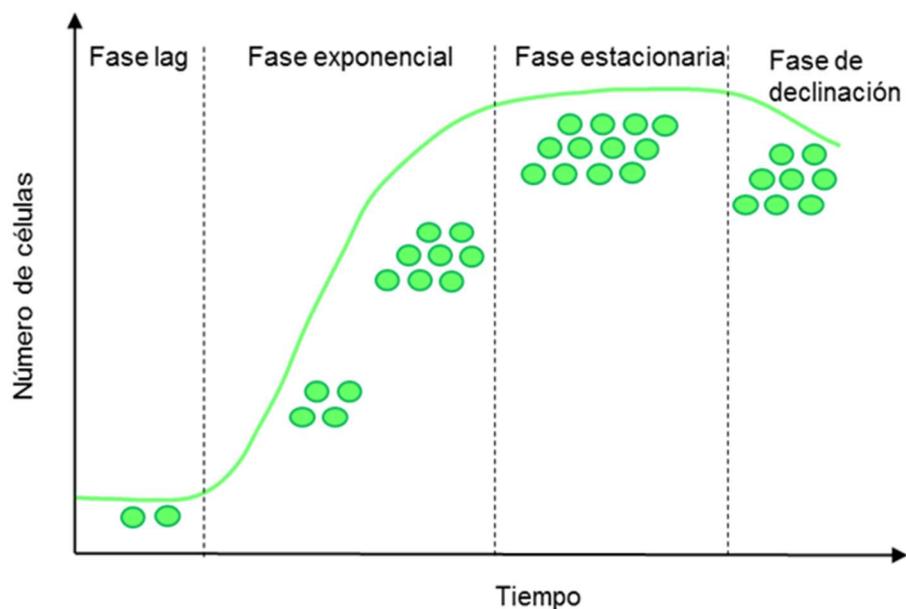


Figura 1.4. Cultivo de microalgas bajo la modalidad *batch*. En la figura se muestran los cambios del número de células en función del tiempo y las distintas fases del cultivo que pueden identificarse.

Los cultivos de microalgas pueden realizarse en sistemas abiertos, como piletas tipo *raceways*, o bien, en sistemas cerrados, como los fotobiorreactores (Fig. 1.5). En los primeros, el cultivo está expuesto directamente a la atmósfera y no existe control de los parámetros ambientales, tales como la temperatura e intensidad lumínica (Pulz, 2001).

Estos sistemas abiertos son más económicos, fáciles de construir, los costos de operación son bajos; sin embargo, se obtienen menores volúmenes de biomasa (Narala et al., 2016). Además, en los sistemas abiertos el riesgo de contaminación y de salinización es elevado y se requiere una mayor disponibilidad de terreno y agua (Norsker et al., 2011; Murthy 2011 ; Mayers et al., 2016 ;Costa et al., 2019). Por lo tanto, esta estrategia de cultivo es adecuada para especies robustas, de rápido crecimiento y generalmente para productos de bajo valor agregado (Acién et al., 2017; Aarujó et al., 2021). Por su parte, los fotobiorreactores permiten un control de las condiciones ambientales y de crecimiento, de la calidad de la biomasa y el riesgo de contaminación es relativamente bajo (Acién et al., 2017; Aarujó et al., 2021). Sin embargo, debido a su elevado costo, su uso se limita a la producción de moléculas de alto valor, destinadas principalmente para aplicaciones cosméticas, médicas, farmacéuticas y de la industria alimentaria (Pulz, 2001; Acién et al., 2013; Chew et al., 2017).



Figura 1.5. Diferentes sistemas de cultivo utilizados actualmente para la producción industrial de biomasa de microalgas. a) Fotobiorreactor de panel plano de 1 m³. b) Fotobiorreactor tubular de 2,5 m³. c) Fotobiorreactor tubular de 100 m³. d) Raceway de 200 m³ (Fuente: Pereira et al., 2018).

Particularmente, el cultivo autotrófico de microalgas marinas en fotobiorreactores posee numerosas ventajas (Santin et al., 2022; Debowski et al., 2020; Xia et al., 2021; Araujo et al., 2021):

- Las especies marinas presentan una elevada eficiencia fotosintética y velocidad de crecimiento.
- No requiere de agua dulce, un recurso finito y escaso a nivel mundial.
- No requiere tierras aptas para cultivo, por lo que no compete con la agricultura.
- Es un proceso ambientalmente seguro, dado que no requiere herbicidas ni pesticidas para su mantenimiento.
- Presenta elevada resistencia a la contaminación en comparación con los cultivos heterotróficos y mixotróficos.
- El crecimiento de las microalgas se relaciona directamente con la fijación de CO₂, contribuyendo de este modo a la lucha contra el calentamiento global.
- El uso de fotobiorreactores permite el control de las condiciones ambientales de manera sencilla. En este sentido, la producción de metabolitos de alto valor agregado puede regularse en parte manipulando las condiciones de crecimiento.

1.4.2. Biosíntesis de LC-PUFAs en microalgas

La versatilidad de las microalgas ofrece numerosas posibilidades de aislar especies de su entorno natural y cultivarlas bajo diferentes condiciones de crecimiento para producir biomasa rica en metabolitos de interés como, por ejemplo, los LC-PUFAs. Estos AGs, son componentes estructurales de las membranas celulares de las microalgas, formando parte de los fosfolípidos (FL) o glicolípidos (GL), aunque también pueden incorporarse a lípidos de almacenamiento como son los triglicéridos (TAG) (Schüler et al., 2017). En la Figura 1.6, se muestra un esquema simplificado de la síntesis lipídica en los distintos compartimentos celulares de las microalgas.

De manera general, la síntesis de LC-PUFAs en microalgas involucra una serie de pasos metabólicos que se desarrollan en distintos compartimentos celulares (Remize et al.,

2021). En el cloroplasto ocurre la síntesis de malonil-CoA, precursor inicial de la síntesis *de novo* de AGs. Éste reacciona con una molécula de acetil-CoA formando un ácido graso (AG) saturado de 4 carbonos. Mediante ciclos sucesivos de adición de 2 carbonos, se forman cadenas de 16 a 18 carbonos de longitud. Posteriormente, por acción de desaturasas se originan los AGs palmitoleico (16:1) y oleico (18:1) a partir del 16:0 y 18:0, respectivamente. Éstos, pueden permanecer en el cloroplasto y ser sustratos para la síntesis de GL, o bien, pueden ser liberados al citoplasma y transferidos al retículo endoplasmático para ser utilizados como parte de otras moléculas lipídicas.

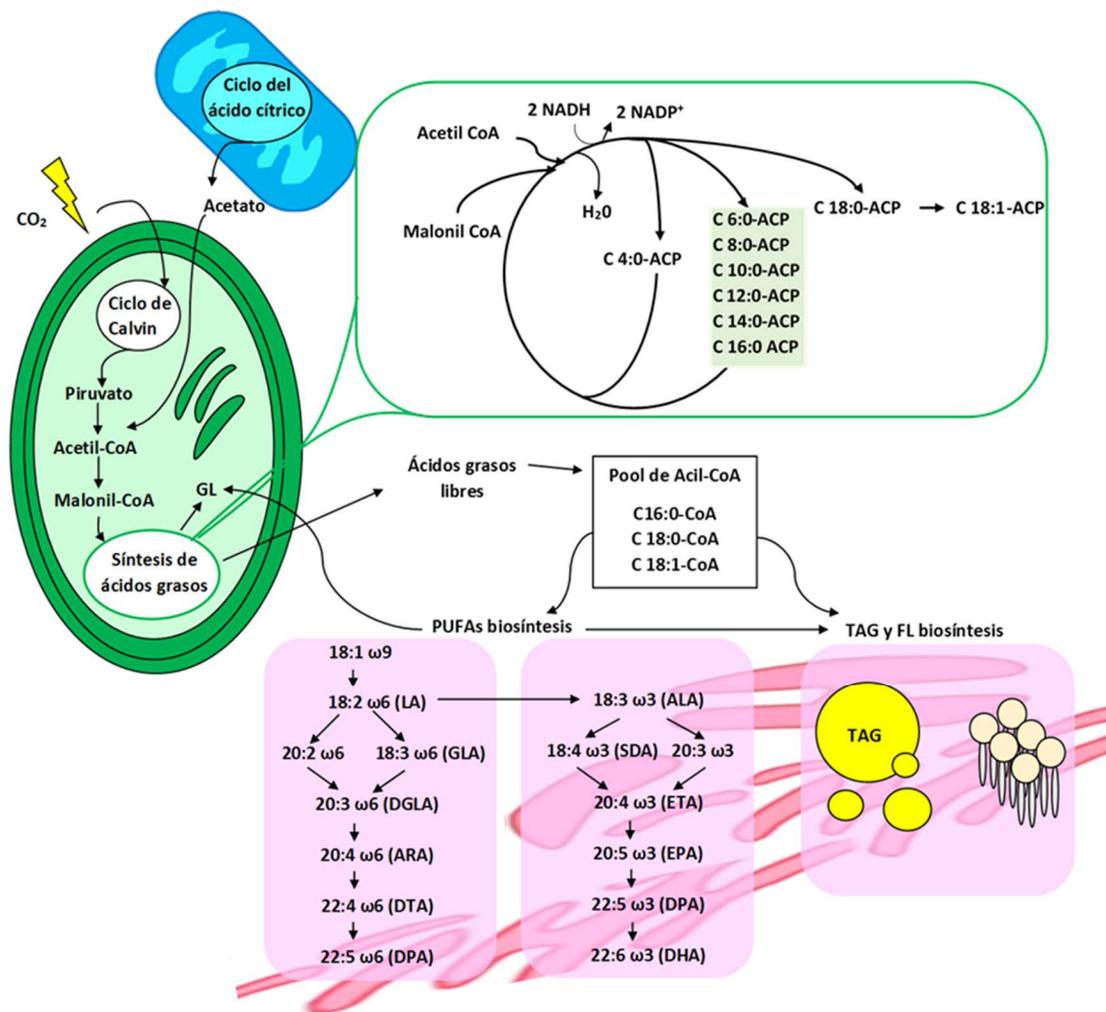


Figura 1.6. Biosíntesis de lípidos en microalgas. Esquema simplificado de las rutas metabólicas involucradas en la síntesis de distintas clases de lípidos en microalgas (Modificado de Mühlroth et al., 2013 y Ghiffary et al., 2019).

Por su parte, tanto la síntesis de PUFAs como la de TAG y FL, ocurre en el retículo endoplasmático. La insaturación del AG oleico genera los precursores de las familias $\omega 3$ y $\omega 6$: los AGs LA y ALA. A continuación, éstos son elongados e insaturados por diferentes enzimas, dando como resultado los LC-PUFAs: EPA, DHA, ARA y DPA. El destino de los mismos puede ser el retículo endoplasmático, donde se incorporan a moléculas de TAG o forman parte de la síntesis de FL, o bien, pueden ser exportados al cloroplasto para la síntesis de GL.

1.4.3. Selección de cepas

En la búsqueda de especies de microalgas productoras de LC-PUFAs es necesario considerar que no todas las especies poseen la misma capacidad de síntesis, encontrándose diferencias significativas en cuanto a la cantidad y a la calidad de este tipo de lípidos. En términos generales, algunas especies pertenecientes a las divisiones Dinophyta, Haptophyta, Cryptophyta y Euglenophyta son productoras por excelencia de DHA, mientras que especies de Haptophyta y Ochrophyta son excelentes fuentes de EPA (Remize et al., 2021). Además, al momento de seleccionar una especie se requiere tener en cuenta factores relacionados al crecimiento de la cepa en condiciones de cultivo, su robustez para crecer bajo condiciones estresantes y, fundamentalmente, su capacidad de producir biomasa y lípidos.

1.5. Las microalgas como productoras de moléculas de alto valor agregado

Además de LC-PUFAs, las microalgas marinas también sintetizan proteínas, carbohidratos, vitaminas, esteroides y pigmentos, los cuales poseen propiedades bioactivas (Wu et al., 2021) (Fig. 1.7). Particularmente, los esteroides provenientes de microalgas han atraído la atención por parte de los investigadores debido a sus efectos como protectores cardiovasculares, reductores del colesterol LDL, anticancerígenos, antioxidantes y antiinflamatorios (Ampofo y Abbey, 2022). Los esteroides son componentes vitales de las membranas eucariotas ya que regulan su fluidez y permeabilidad. Estos compuestos derivan de un núcleo esteroideo llamado ciclopentanoperhidrofenantreno, formado por la fusión de cuatro anillos, tres de los cuales (A, B y C) cuentan con 6 átomos de carbono y uno

de ellos (D) con cinco átomos de carbonos (Fig. 1.8) (Peña Díaz et al., 2004; Feduchi et al., 2014). Los esteroides que se encuentran presentes en las plantas generalmente reciben el nombre de fitoesteroides. Asimismo, la estructura de los fitoesteroides es muy similar a la del colesterol, el esteroide más abundante que se encuentra en los animales (Moreau et al., 2018).

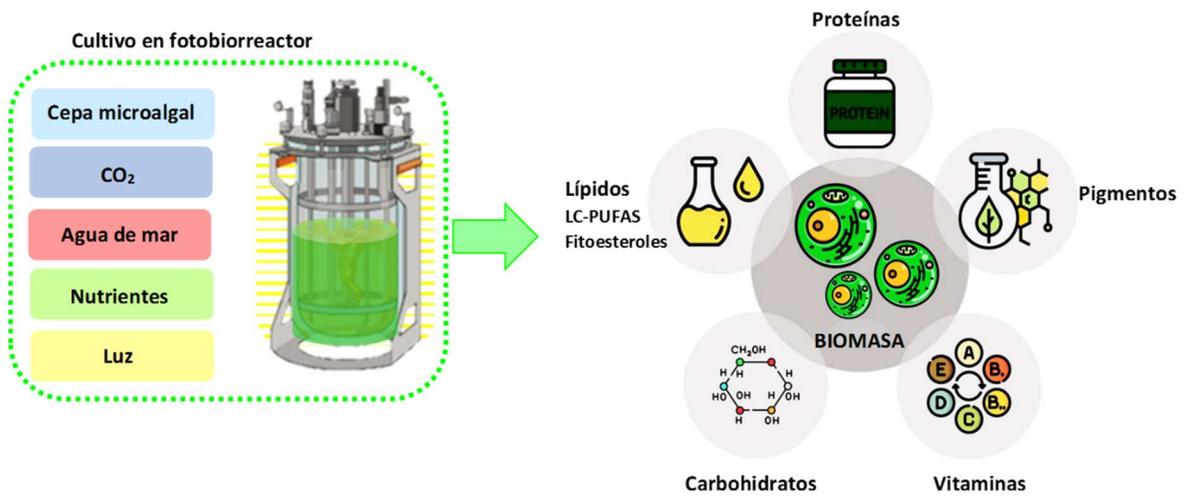


Figura 1.7. Cultivo autotrófico para la obtención de biomasa de microalgas como fuente de metabolitos de alto valor agregado. Se muestran los distintos requerimientos de los cultivos, así como distintos productos que pueden obtenerse de la biomasa (Modificado de Machado et al. 2022).

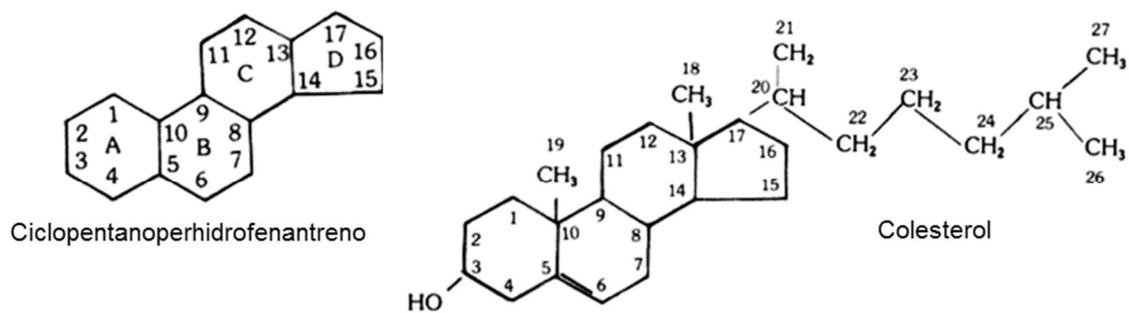


Figura 1.8. Estructura del núcleo esteroideo ciclopentanoperhidrofenantreno y del colesterol. En el colesterol se señalan los sustituyentes frente al núcleo original (Modificado de Peña Díaz et al., 2004).

En la molécula de colesterol, el núcleo esteroideo presenta una serie de sustituciones: una cadena lateral de 8 carbonos unida al carbono 17, un grupo –OH unido al carbono 3, dos grupos metilo unidos a los carbonos 10 y 13, y una insaturación entre los carbonos 5 y 6 (Fig. 1.8) (Peña Díaz et al., 2004). Estos cambios en el núcleo esteroideo brindan a la molécula un carácter anfipático, con una región polar (-OH) y otra no polar (ciclopentanoperhidrofenantreno y cadena lateral) (Feduchi et al., 2014).

Los fitoesteroles comparten con el colesterol el núcleo central de la molécula y difieren por la cadena hidrocarbonada lateral. En el colesterol esta cadena está formada por ocho carbonos y es saturada. En los fitoesteroles está formada por 9 o 10 carbonos y en algunos de ellos presenta un doble enlace (por ejemplo, estigmasterol y brasicasterol) (Valenzuela y Ronco, 2004) (Fig. 1.9). En la actualidad existen 4 fitoesteroles de interés comercial dada su funcionalidad para las industrias farmacéutica y de alimentos funcionales: campesterol, β -sitosterol, estigmasterol, y brasicasterol (Randhir et al., 2020), y su principal fuente son las plantas terrestres. Sin embargo, se estima que para el 2030 la demanda de fitoesteroles no podrá ser satisfecha por los recursos disponibles en la actualidad (Luo et al., 2015; Randhir et al., 2020).

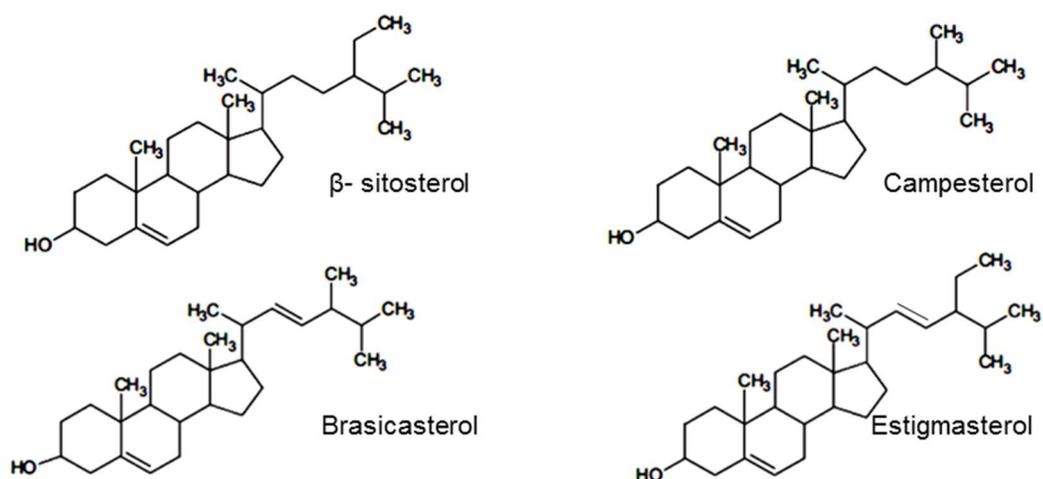


Figura 1.9. Fitoesteroles. Estructura química de los principales fitoesteroles de interés comercial (Randhir et al., 2020).

Se ha documentado la presencia de una gran variedad de fitoesteroles en diversas especies de microalgas (Volkman, 2003; Volkman et al., 2016). Sin embargo, al igual de lo que sucede con los AGs, la composición de esteroides varía en función de la especie. A pesar de ello, hasta el momento, existen escasos estudios acerca del efecto de las condiciones de cultivo de las microalgas sobre su síntesis (Krohn et al., 2022). En este sentido, la búsqueda de esteroides en microalgas productoras de LC-PUFAs, emerge como un punto clave que debe ser investigado.

1.6. El estrés como herramienta para la síntesis de moléculas de alto valor agregado

La capacidad de adaptación de las microalgas frente a la variación de las condiciones ambientales se convierte en una valiosa herramienta para la producción de metabolitos (Paliwal et al., 2017). Según Borowitzka (2018), cuando un organismo se enfrenta a uno o múltiples factores estresantes se interrumpe la homeostasis. Inicialmente, esto conduce a una disminución de una o más funciones fisiológicas para iniciar una respuesta de alarma. La misma es la responsable de desencadenar una respuesta celular tendiente a restaurar la homeostasis perdida. Asimismo, en el caso en que la magnitud de los factores estresantes exceda la capacidad celular de respuesta al estrés, las células mueren. Por lo tanto, la respuesta de los organismos a las variaciones de su entorno o a factores estresantes es variable, dependiendo del factor de estrés, de su magnitud, de su duración y del estado fisiológico del organismo. En este sentido, el trabajo de revisión de Paliwal et al. (2017) muestra cómo la temperatura, la intensidad de luz, la salinidad y la disponibilidad de nutrientes pueden controlar la síntesis de LC-PUFAs por parte de ciertas especies de microalgas. Debido a su rol crucial en el mantenimiento de la fluidez de la membrana celular, se demostró que la disminución de la temperatura de cultivo indujo un aumento de la síntesis de LC-PUFAs (Boelen et al., 2013). Este efecto fue similar para las distintas especies de microalgas evaluadas (Zhu et al., 1997; Boelen et al., 2013; Tatsuzawa y Takizawa, 1995a, Tatsuzawa y Takizawa, 1995b, Jiang y Gao, 2004; Mitra et al., 2015; Balakrishnan y Shanmugam, 2021). Asimismo, si bien la disminución de la temperatura de cultivo estimula un aumento de la insaturación de AGs, simultáneamente, disminuye la

división celular afectando negativamente la producción de biomasa (Minhas et al., 2016; Balakrishnan y Shanmugam, 2021).

1.7. Objetivos

Por todo lo expuesto, el **objetivo general** de esta tesis fue aislar microalgas nativas del estuario de Bahía Blanca y desarrollar estrategias de cultivo tendientes a mejorar la composición nutricional de la biomasa resultante para su posible uso en acuicultura y/o para consumo humano. Particularmente se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

1. Colectar muestras de microalgas de la zona interna del estuario e identificar potenciales especies productoras de LC-PUFAs.
2. Aislar las especies de interés y establecer cultivos *in vitro*.
3. Caracterizar el crecimiento de las especies aisladas.
4. Cultivar las especies seleccionadas en condiciones autotróficas y en fotobiorreactor bajo condiciones de crecimiento óptimas.
5. Diseñar estrategias de cultivo en fotobiorreactor que involucren el estrés térmico como herramienta para la inducción de LC-PUFAs.
6. Evaluar la producción de LC-PUFAs y otros metabolitos de la biomasa obtenida de los cultivos en fotobiorreactor bajo las condiciones ensayadas.

Asimismo, para cada uno de los capítulos de la presente tesis se detallarán de manera particular los objetivos específicos.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente capítulo, se describen las metodologías comunes a los distintos capítulos desarrollados en la tesis, relacionadas con el aislamiento de las especies, el acondicionamiento del material de laboratorio, la preparación del medio de cultivo, los cultivos en fotobiorreactor, los cálculos de parámetros de crecimiento y producción de biomasa, así como diferentes técnicas utilizadas para evaluar la composición bioquímica de la biomasa microalgal.

2.1. Medio de cultivo

Para el aislamiento de las especies, el mantenimiento de los cultivos stock y el desarrollo de los cultivos experimentales se utilizó el medio de cultivo f/2 (Guillard, 1973). Éste es un medio de agua de mar enriquecida con nutrientes. Los pasos para su elaboración se detallan a continuación, e incluyen el acondicionamiento del agua de mar y la preparación de soluciones de nutrientes.

2.1.1. Acondicionamiento del agua de mar

El agua de mar con 32 UPS de salinidad se colectó en bidones plásticos en Puerto Cuatrerros, los cuales fueron almacenados en oscuridad a 4°C durante dos meses para el proceso de envejecimiento. El agua envejecida fue filtrada utilizando un filtro de nitrato de celulosa (Gamafil; 0,45 µm de poro, 45 mm de diámetro), distribuida en botellas de vidrio de 1 L y esterilizada en autoclave a presión de 1 atm durante 20 minutos.

2.1.2. Soluciones de nutrientes

El medio f/2 requiere de macronutrientes (nitrato, silicato y fosfato), vitaminas (B12, biotina y tiamina) y micronutrientes (sulfato de cobre, molibdato de sodio, sulfato de zinc, cloruro de cobalto y cloruro de manganeso). Para la preparación de este medio, se trabajó con soluciones stock (SS). Para cada uno de los macronutrientes, se prepararon SS con agua

destilada de acuerdo a lo detallado en la Tabla 2.1. Para el caso de vitaminas y micronutrientes, se prepararon soluciones primarias (SP) de cada uno de los componentes detallados en la Tabla 2.1. Luego se prepararon SS de micronutrientes y vitaminas, añadiendo las cantidades de SP indicadas en la Tabla 2.1 por litro de agua destilada. Como elemento amortiguador del pH, y para evitar la precipitación de las sales, se utilizó el buffer TRIS.

Tabla 2.1. Composición del medio de cultivo f/2. Se indica la composición de las soluciones primarias (SP) y stock (SS) preparadas en agua destilada (dH₂O) así como la concentración final (μM) alcanzada en el medio de cultivo luego de añadir los mL de SS indicados por litro de agua de mar.

	SP	SS	SS /LH ₂ O de mar	Concentración (μM)
Macronutrientes				
NaNO ₃	-	15g/200mL	1mL	882,4568
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	-	1g/200mL	1mL	36,2293
NaSiO ₃ •9H ₂ O	-	15g/500mL	1mL	105,5595
Micronutrientes				
CuSO ₄ •5H ₂ O	0,98g/100mL	1mL/L	} 1mL	0,0401
ZnSO ₄ •7H ₂ O	2,20g/100mL	1mL/L		0,0765
CoCl ₂ •6H ₂ O	1,00g/100mL	1mL/L		0,0420
MnCl ₂ •4H ₂ O	18,00g/100mL	1mL/L		0,9095
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	0,63g/100mL	1mL/L		0,0248
Vitaminas				
B12	0,01g/10mL	1mL/L	} 0,5mL	0,0004
Biotin	0,01g/10mL	1mL/L		0,0020
Tiamina HCl (B1-HCl)	-	0,2g/L		0,0003
TRIS	-	50g/200mL	4mL	8,2549

2.1.3. Preparación del medio de cultivo f/2

Para la preparación del medio de cultivo se trabajó sobre una superficie esterilizada con alcohol 70% y en cercanía a la llama de un mechero Bunsen, utilizando una probeta de vidrio estéril. Por cada litro de agua de mar envejecida, filtrada y esterilizada se añadieron: 1 mL de la SS de nitratos, fosfatos, silicatos y micronutrientes, 0.5 mL de SS de vitaminas y finalmente 4 mL de SS de TRIS, alcanzando las concentraciones detalladas en la Tabla 2.1.

Previo a su agregado, las soluciones fueron esterilizadas utilizando filtros estériles Whatman (0,20 μm de poro y 45 mm de diámetro). Una vez preparado, el medio de cultivo se almacenó en botellas de vidrio estériles en heladera hasta su utilización.

2.2. Acondicionamiento del material de laboratorio

El material de vidrio (Erlenmeyers, tubos de ensayos, pipetas, equipo de filtración, etc.) fue acondicionado y esterilizado antes de su uso en las distintas experiencias. Primero, fue lavado con detergente no iónico (1% v/v) y enjuagado reiteradas veces con agua corriente. Adicionalmente, se realizó un lavado con una solución de HCl 10% (v/v) y enjuagues sucesivos con agua destilada. El material limpio se secó en estufa a 90°C y se acondicionó para su esterilizado. En el caso de los tubos de ensayo, estos fueron colocados con las tapas semiabiertas en una lata de metal cubierta con papel. Por su parte, las pipetas fueron envueltas individualmente con papel, mientras que, a los Erlenmeyers, las probetas y el equipo de filtración, se les colocó un tapón de algodón cubierto con papel. Finalmente, el material limpio y acondicionado se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 120°C y 1 atm.

2.3. Obtención de cultivos unialgales

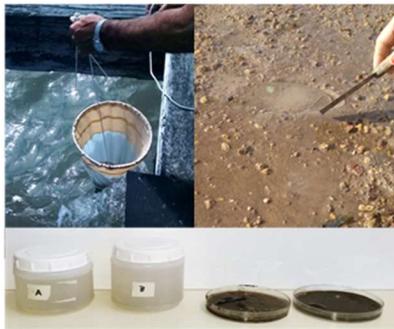
Para la obtención de especies de microalgas nativas, se realizaron muestreos en la zona interna del estuario de Bahía Blanca, accediendo desde Puerto Cuatros (38°44'S, 62°22'O), el cual se encuentra cercano a la localidad de General Daniel Cerri, Provincia de Buenos Aires, Argentina (Fig. 2.1). El procedimiento para la obtención de cultivos unialgales a partir de muestras naturales se esquematiza en la Figura 2.2. Se efectuaron muestreos por arrastre vertical mediante el uso de una red de plancton de 25 μm de poro y arrastres superficiales manuales de lodo costero (Fig. 2.2a). Las muestras se colectaron en envases de PVC y cajas de Petri (Fig. 2.2a) y fueron transportadas en una heladera portátil hasta el laboratorio, donde fueron enriquecidas con medio de cultivo f/2 y mantenidas en cámara de cultivo a 20°C, 37 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad lumínica y un fotoperiodo de 12:12 horas

(luz:oscuridad). Las muestras fueron observadas al microscopio óptico para identificar las especies presentes y seleccionar aquellas potencialmente de interés (Fig. 2.2b).

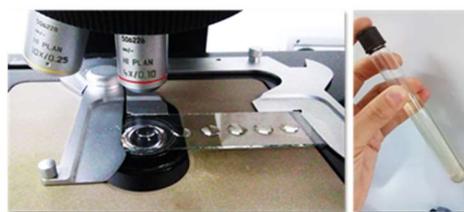


Figura 2.1. Localización del sitio de muestreo. En la imagen se muestra la ubicación del estuario de Bahía Blanca y se señala el muelle de Puerto Cuatros, desde donde se colectaron las muestras.

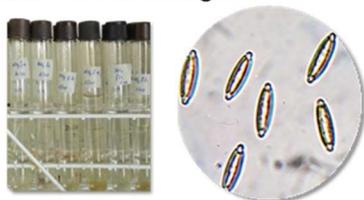
a-Colecta de muestras



b-Aislamiento de especies



d-Cultivos stock unialgales



c- Visualizaciones al microscopio óptico

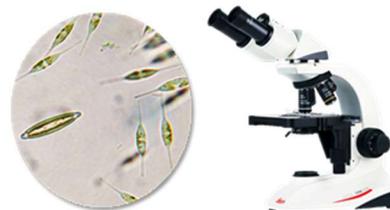


Figura 2.2 Aislamiento de microalgas. Esquema representativo del procedimiento para el aislamiento de especies de interés a partir de muestras naturales y la obtención de cultivos unialgales.

Los aislamientos se realizaron mediante el método de pipeteo y diluciones sucesivas (Andersen, 2005). Para esto, en un portaobjetos nuevo, esterilizado con alcohol 70% y flameado sobre el mechero, se depositó una gota de muestra y una serie sucesiva de gotas de medio de cultivo f/2 (Fig. 2.2b). Se utilizó un microscopio óptico LEICA, con un aumento de 4X (Fig. 2.2c). La técnica consistió en aspirar de la gota de muestra la especie de interés y llevarla a una primera gota de medio cultivo. Como generalmente en un comienzo se aspiran células de otras especies, se repitió el procedimiento de dilución hasta asegurarse la presencia de una única célula de interés. Finalmente, ésta se transfirió a un tubo de ensayo estéril con 5 mL de medio de cultivo f/2. La muestra resultante se incubó en cámara de cultivo en las mismas condiciones que las detalladas arriba. Una vez detectado color en los tubos, se corroboró la presencia de la especie de interés mediante la observación al microscopio óptico. En los casos donde se encontró más de una especie, se continuó con aislamientos sucesivos hasta la obtención de cultivos unialgales derivados de una única célula. Finalmente, los aislamientos obtenidos se mantuvieron mediante la renovación del medio de cultivo f/2 cada 15-20 días, obteniéndose de esta forma los cultivos stock de las especies aisladas (Fig. 2.2d).

2.4. Cultivos en fotobiorreactor

En esta sección se detallan aspectos relacionados al fotobiorreactor utilizado y a los cultivos llevados a cabo en él. Se describen las características del fotobiorreactor, el procedimiento realizado para la obtención de inóculos y aquellos relacionados con la cosecha de la biomasa resultante. Antes del comienzo de los cultivos, el fotobiorreactor fue desinfectado con agua clorada, enjuagado con agua corriente y finalmente con agua destilada estéril.

2.4.1. Características del fotobiorreactor

Se empleó un fotobiorreactor marca FIGMAY (Fig. 2.3). El mismo consiste en un cilindro de vidrio borosilicato de 70 cm de alto y 25 cm de diámetro, de 25 litros de capacidad máxima, dotado de una boca de acceso para la toma de muestras, robinetes para venteo de oxígeno, doble entrada para aire y CO₂ en forma simultánea, una paleta central

que permite la agitación en un sistema completamente estanco, con velocidades de agitación que van desde 10 a 90 rpm y válvulas de descarga. Cuenta con paneles de luces LED cuya intensidad se regula electrónicamente (Figura 2.3.b). La velocidad de mezcla se controló mediante un tablero electrónico, en el cual también se registró la temperatura (Fig. 2.4.a).

Para regular la temperatura del cultivo, se empleó un baño termostático LAUDA, modelo Alpha RA 8, el cual se acopló al fotobiorreactor (Fig. 2.4.b). Este equipo permitió realizar el estrés térmico manteniendo la temperatura deseada a través de la recirculación de un líquido refrigerante mediante una bobina de vidrio ubicada dentro del fotobiorreactor (Fig. 2.4.c). Adicionalmente, la temperatura del ambiente se reguló con aire acondicionado, teniendo en cuenta las condiciones de cultivo particulares de cada experiencia.

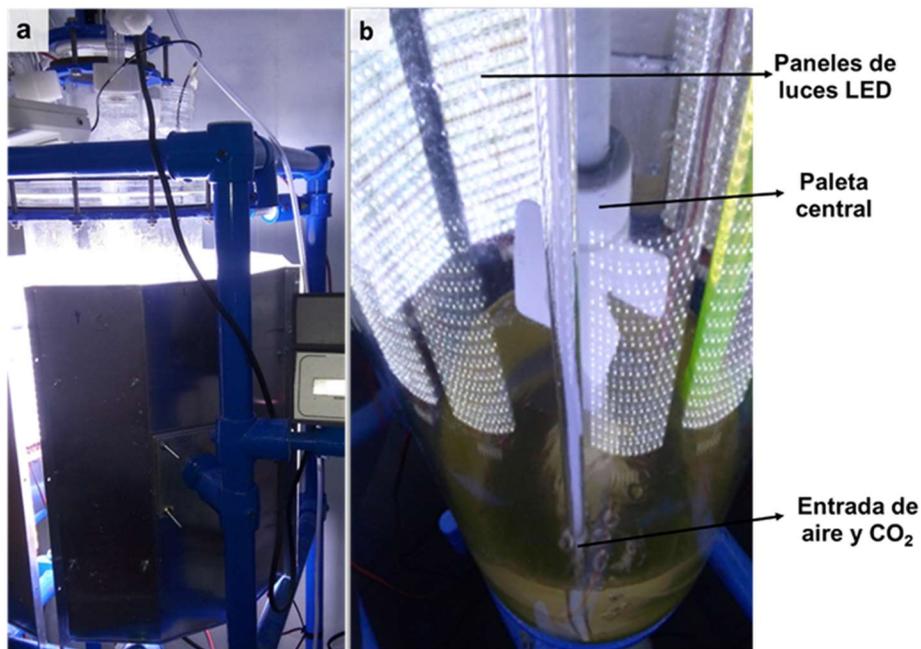


Figura 2.3. Fotobiorreactor FIGMAY disponible en el Laboratorio de Estudios Básicos y Biotecnológicos en Algas (LEBBA, CERZOS, CONICET-UNS). a) Vista general del fotobiorreactor. b) Detalle de los paneles de luces LED. También se observa la paleta central de agitación y la conexión de entrada de aire y CO₂.

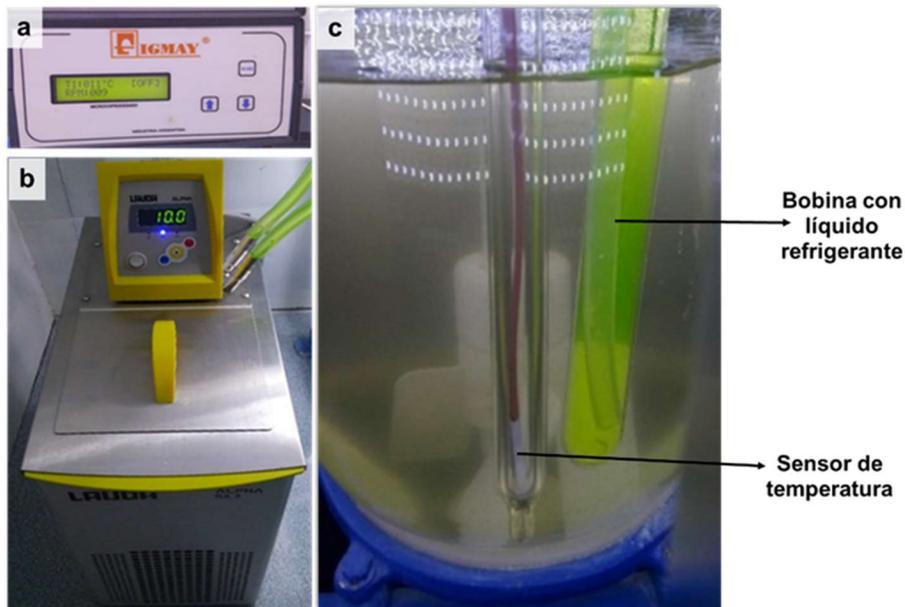


Figura 2.4. Dispositivos involucrados en el control de la temperatura. a) Tablero electrónico para registro de temperatura. **b)** Baño térmico conectado al fotobiorreactor para regulación de temperatura. **c)** Detalle del sensor de temperatura y líquido refrigerante en el fotobiorreactor.

2.4.2. Obtención del inóculo

Para dar inicio a las experiencias de cultivo en fotobiorreactor, se obtuvo un inóculo de células en fase de crecimiento exponencial. En la Figura 2.5 se detalla el procedimiento llevado a cabo para su obtención. El mismo consistió en realizar un escalado progresivo a partir de cultivos stock de microalgas. Se utilizaron Erlenmeyers con medio de cultivo f/2, de acuerdo a los volúmenes detallados en la Fig. 2.5. Los cultivos se mantuvieron en una cámara de cultivo a una temperatura de 20°C, intensidad lumínica de $37 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, aportada por tubos fluorescentes de luz blanca, fotoperíodo de 12:12 horas luz:oscuridad y agitación diaria manual. Las condiciones de crecimiento en el fotobiorreactor serán detalladas en cada capítulo de acuerdo a los diseños experimentales que allí se plantean.



Figura 2.5 Obtención de inóculo para cultivo en fotobiorreactor. Escalado progresivo realizado a partir de los cultivos stock para obtener un inóculo de células suficiente para iniciar un cultivo en fotobiorreactor.

2.4.3. Cosecha de biomasa

En la figura 2.6 se muestra cómo se llevó a cabo la cosecha de la biomasa microalgal al finalizar cada uno de los experimentos en el fotobiorreactor. En primer lugar, aprovechando la capacidad de autofloculación de las células, se detuvo la paleta de agitación del fotobiorreactor el día previo a la cosecha. De este modo, se redujo en gran medida el volumen de recolección de cultivo, retirándose gran parte del sobrenadante (Fig. 2.6a). La biomasa decantada fue colectada en recipientes de vidrio esterilizados (Fig. 2.6b) y trasladada al laboratorio para proceder a centrifugarla. En el caso particular de las especies que carecen de capacidad de autoflocular, se centrifugó el volumen total del cultivo. Para ello, se utilizó una centrífuga refrigerada Presvac de 6 litros de capacidad, a 3000 rpm y 10°C durante 10 minutos (Fig. 2.6c). En ambos casos, el pellet resultante fue lavado con buffer NaCl 0,9 % (p/v) y posteriormente centrifugado durante 10 minutos a 3500 rpm en una centrífuga de mesada Rolco (Fig. 2.6d). La biomasa resultante se conservó a -80 °C hasta su uso.



Figura 2.6. Cosecha de la biomasa microalgal producida en fotobiorreactor. a) Cultivo donde se observan las microalgas autofloculadas y el sobrenadante. **b)** Recolección de la biomasa decantada en recipientes de vidrio. **c)** Centrífuga Presvac . **d)** Tubos de centrifuga antes (tubos de la izquierda) y después (tubos de la derecha con pellet) del último paso de centrifugación con centrifuga de mesada Rolco.

2.5. Parámetros de crecimiento

2.5.1. Densidad celular

Para la determinación de la densidad celular, se utilizó una cámara de conteo *Sedgwick Rafter* bajo microscopio óptico Leica a 10X. Las muestras, fijadas mediante la aplicación de una solución al 5% de yodo molecular (I_2) y yoduro potásico (KI) en ácido acético, fueron sonicadas durante 3 segundos con el fin de romper los agregados celulares. El procedimiento consistió en colocar 1 mL de muestra en la cámara de conteo, tomando la precaución de distribuirla uniformemente. Luego se realizaron conteos por duplicado de las células presentes en el campo óptico central de tres cuadrantes de la cámara, elegidos al azar. Finalmente, se calculó la densidad celular (DC) considerando la siguiente ecuación:

$$DC = \bar{X} * 9 * 40 \text{ [N}^\circ \text{ células mL}^{-1}\text{]}$$

Ecuación 2.1

Siendo:

\bar{X} : promedio del número de células presentes en un campo óptico

9: número de campos ópticos por cuadrante

40: número total de cuadrantes.

2.5.2. Velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación

La velocidad máxima de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (TD) fueron calculados a partir de los recuentos celulares, de acuerdo a Guillard (1973). El valor de μ indica las divisiones celulares por día de cultivo (div día^{-1}), y para su cálculo se tuvieron en cuenta las máximas variaciones de la densidad celular (N) registradas durante la fase de crecimiento exponencial. Éstas fueron transformadas logarítmicamente ($Y = \log_{10} N$) y graficadas en función del tiempo (días). Así se obtuvo la recta de regresión cuya pendiente equivale a la constante de crecimiento (k_{10}). Esto se puede expresar mediante la siguiente ecuación matemática:

$$K_{10} = (\log_{10} N_{t2} - \log_{10} N_{t1}) / \Delta t$$

Siendo:

N_{t1} : densidad celular a un tiempo 1

N_{t2} : densidad celular en el tiempo 2

Δt : tiempo 2-tiempo 1

Dado que la constante k_{10} fue obtenida utilizando logaritmo en base 10, se utilizó el factor de conversión 3,322 ($=\log_{10}(2)$) (Brinkhuis, 1985) para calcular μ , según se detalla en la siguiente ecuación:

$$\mu = 3,322 \times k_{10} \text{ [div día}^{-1}\text{]} \quad \text{Ecuación 2.2}$$

El tiempo de duplicación (TD), es decir, el tiempo en horas que requiere una célula para dividirse, se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$TD = (1 / \mu) * 24 \text{ [horas]} \quad \text{Ecuación 2.3}$$

2.5.3. Peso seco

La producción de biomasa se calculó a partir de la determinación del peso seco (PS) de cada muestra por duplicado. Para esto, primero se acondicionaron filtros (GF/C 1,2 μm

marca Munktell) colocándolos sobre una base de papel de aluminio en estufa a 70°C durante 24 horas. Esto se llevó a cabo con el objeto de eliminar las moléculas de agua adsorbidas al papel. Posteriormente, se pesaron en una balanza digital con precisión de 4 dígitos. El valor obtenido correspondió al peso inicial. Luego, se filtró un volumen conocido de muestra homogeneizada, el mismo se lavó con el doble de volumen de agua destilada. Los filtros, conteniendo el material celular, fueron secados en estufa a 70°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se registró el peso correspondiente al peso final. Una vez obtenidos, los valores de peso inicial y final, se calculó el peso seco de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$PS = ((\text{Peso final} - \text{Peso inicial}) / \text{Volumen filtrado}) \text{ [g/L]} \quad \text{Ecuación 2.4}$$

2.6. Determinación del contenido y la composición lipídica de la biomasa

2.6.1. Estimación del contenido de lípidos neutros

El contenido relativo de lípidos neutros y su localización celular se evaluó empleando el colorante lipofílico Rojo Nilo (RN) (Martín et al., 2016). Este compuesto posee la propiedad de emitir una señal fluorescente ante la presencia de lípidos neutros intracelulares (Greenspan et al., 1985). Para la estimación del contenido relativo de lípidos neutros, en unidades arbitrarias de fluorescencia (u.a.), las células fueron incubadas con RN (1 mg mL⁻¹, en acetona) respetando la relación 1/1000 (volumen RN/volumen muestra). La medición de fluorescencia se llevó a cabo en un espectrofluorómetro Shimadzu RF-5301 PC (longitud de onda (λ) de excitación= 400 nm; λ de emisión= 577 nm). Además, las muestras tratadas con RN también fueron visualizadas con un microscopio de fluorescencia Eclipse E800, Nikon, con el fin de detectar su localización intracelular.

2.6.2. Extracción de lípidos

Para la determinación de lípidos totales, se siguió la metodología propuesta por Folch (1957). Se colocaron 200 mg de biomasa liofilizada en tubos de centrifuga de vidrio y se maseró hasta formar una harina. Posteriormente, se realizaron entre 3-4 ciclos de extracción, hasta obtener un extracto sin color. Cada ciclo consistió en adicionar 4 mL de la

solución de extracción cloroformo:metanol (2:1 v/v), homogeneizar la mezcla con ayuda de un vortex y luego romper las células colocando los tubos en un baño de ultrasonido durante 15 minutos. La mezcla se centrifugó durante 5 minutos a 2300 rpm y se recuperó el sobrenadante, previo filtrado, en una ampolla de decantación (Fig. 2.7 a-d).

Una vez terminados los ciclos de extracción, se adicionó a la ampolla NaCl al 9% en una cantidad equivalente al 20% del volumen de solución de extracción utilizado, agitando vigorosamente la ampolla y dejando escapar los gases. La ampolla permaneció en reposo hasta la creación de un sistema bifásico (Fig. 2.7d). La fase inferior, que contenía lípidos en cloroformo, se recuperó en un vaso de precipitado, mientras que la superior acuosa se descartó. La fase recuperada se volcó nuevamente en la ampolla, se adicionó nuevamente NaCl al 9% , se dejó reposar durante 24 horas, posteriormente se colectó en un recipiente de peso conocido y se secó con nitrógeno (Fig. 2.7 e).



Fig 2.7. Extracción de lípidos totales. a) Vortex. b) Baño ultrasonido. c) Centrifuga de mesada. d) Ampollas de decantación con separación de fases. La fase inferior contiene los extractos lipídicos. e) Secado de las fracciones lipídicas bajo atmósfera de nitrógeno.

2.6.3. Determinación de lípidos totales mediante gravimetría

La cantidad de lípidos totales (mg) se determinó mediante la diferencia entre el peso final del recipiente (luego de la evaporación con nitrógeno del extracto lipídico en cloroformo) y del peso inicial del mismo. Posteriormente, el contenido de lípidos totales se expresó como porcentaje (%) de peso seco, considerando la cantidad de biomasa liofilizada utilizada al inicio del proceso de extracción lipídica. Los extractos de lípidos totales se conservaron a -20°C hasta su uso posterior, ya sea para realizar el fraccionamiento lipídico, o bien, la caracterización de las especies lipídicas mediante cromatografía gaseosa.

2.6.4. Fraccionamiento lipídico

Para determinar la composición lipídica relativa en término de lípidos neutros (LN), fosfolípidos (FL) y glicolípidos (GL), se realizó un fraccionamiento de los extractos lipídicos totales. Para ello, se utilizaron cartuchos de sílica Sep-Pak de 1000 mg siguiendo el protocolo explicado por Popovich et al. (2012) (Fig. 2.8). Brevemente, luego de la activación de cada cartucho, se adicionaron 30 mg de extracto lipídico (ver sección 2.6.2) resuspendido en cloroformo (Fig. 2.8a). Una vez que la muestra embebió el cartucho, se realizaron extracciones sucesivas. Se utilizó cloroformo:ácido acético glacial (9:1, v/v) para eluir la fracción de LN (Fig. 2.8 b). Luego la mezcla acetona:metanol (9:1, v/v) seguida del agregado de metanol, para las fracciones de GL y FL, respectivamente (Fig. 2.8c y 2.8d). Las fracciones recuperadas se secaron bajo atmósfera de nitrógeno y se realizaron los pesajes correspondientes utilizando una balanza de precisión. El peso de cada fracción, obtenido por la diferencia entre el peso inicial de cada tubo y el final luego del secado, fue expresado como % de lípidos totales. Las fracciones resultantes se conservaron en freezer a -20°C para su posterior caracterización mediante cromatografía gaseosa.

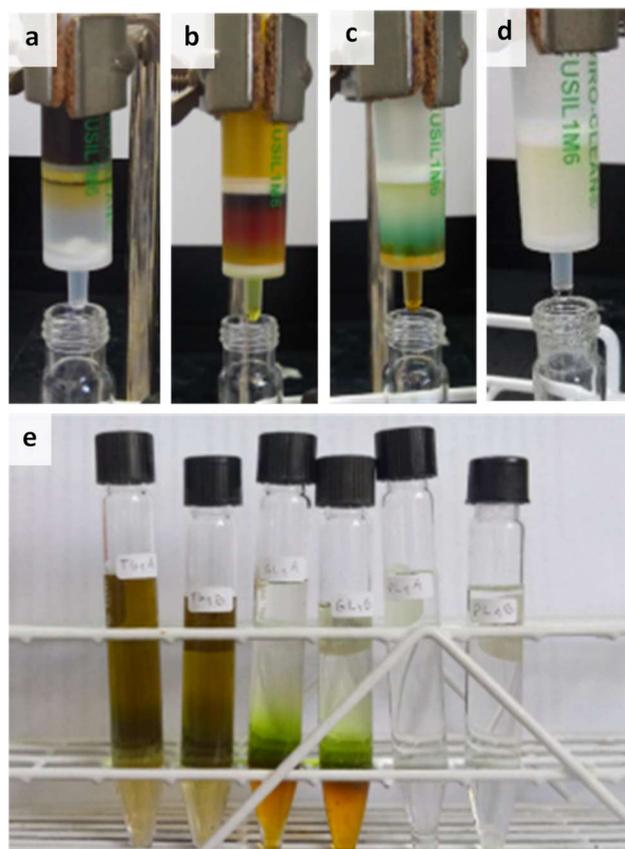


Figura 2.8. Fraccionamiento lipídico. a) Cartucho activado. Elución de: b) lípidos neutros (LN) c) glicolípidos (GL) y d) fosfolípidos (PL). e) Fracciones lipídicas recuperadas.

2.6.5. Cuantificación de triglicéridos (TAG) y esteroides

Se evaluó el contenido de TAG y esteroides en función de los días de cultivo, de acuerdo a la metodología detallada en Scodelaro et al. (2016). Para ello, se obtuvieron extractos lipídicos totales (Folch, 1957) para cada una de las condiciones experimentales a ensayar. Seguidamente, los mismos fueron sometidos a una cromatografía en capa fina (CCF) para separar las especies lipídicas de interés (Fig. 2.9). Finalmente, se realizó la cuantificación de los productos resultantes mediante un método enzimático colorimétrico. A continuación, se detallan cada uno de los procedimientos aplicados.

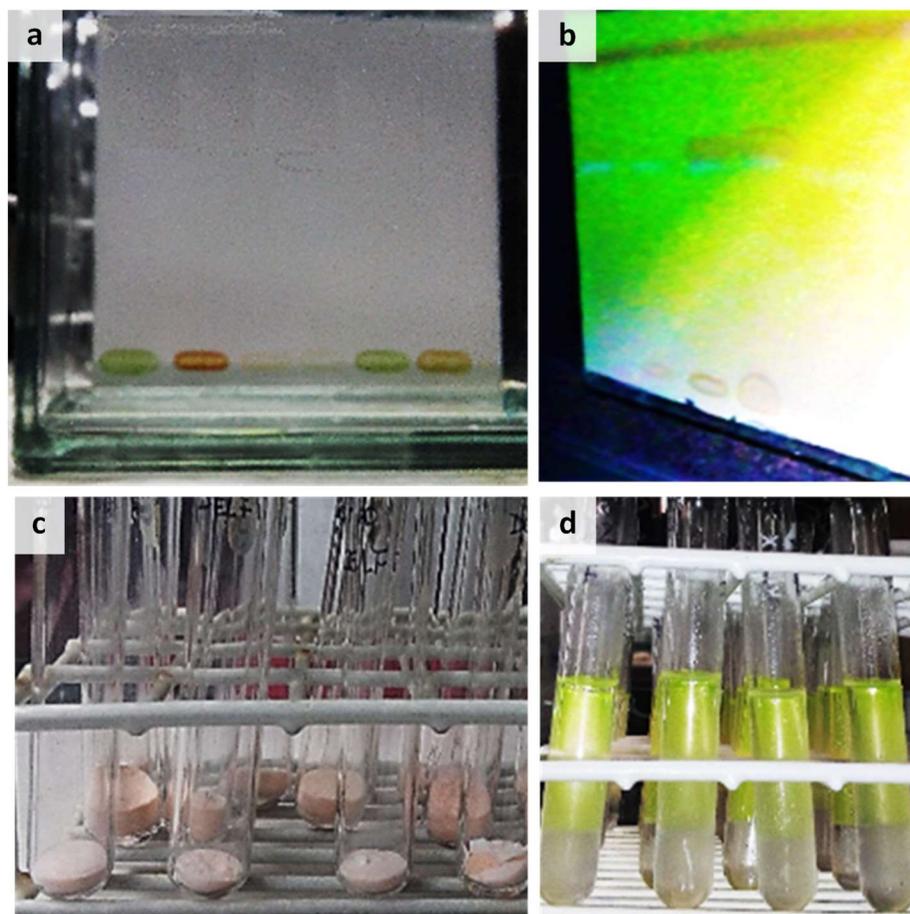


Figura 2.9. Cromatografía en capa fina. **a)** CCF monodimensional con muestras sembradas en la parte inferior, colocadas dentro de la cuba cromatográfica con la fase móvil correspondiente. **b)** Observación, bajo luz UV, de las fracciones de TAG, esteroides libres y esteroides esterificados. **c)** Fracciones raspadas. **d)** Proceso de elución.

2.6.5.1. Separación y elución

Los TAG y esteroides contenidos en el extracto lipídico total fueron separados por CCF monodimensional utilizando placas de sílica gel G (Merck) y una fase móvil compuesta por n-hexano:éter etílico (80:20, v:v) (Fig. 2.9a). Cada extracto lipídico fue sembrado junto con los estándares comerciales β -Sitosterol (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) y Trioleína (Wiener, Argentina). Los lípidos se visualizaron por exposición a la luz UV luego de rociar la placa con 2,7-diclorofluoresceína (Fig. 2.9b). Las manchas correspondientes a los lípidos neutros y esteroides fueron marcadas y raspadas para su elución. Este procedimiento se realizó mediante el agregado de solución de elución (cloroformo:metanol:agua; 5:5:1 v/v/v),

agitación y posterior centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos. Este procedimiento se realizó 3 veces para asegurar la correcta y máxima extracción de los lípidos de la sílica. El eluido se particionó por agregado de agua (0,4 mL cada 1 mL de eluido), se agitó vigorosamente, se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos y la fase superior acuosa se descartó. La fase inferior orgánica se secó bajo atmósfera de nitrógeno gaseoso.

2.6.5.2. Cuantificación mediante espectrofotometría

Los extractos secos de TAG y esteroides libres y esteroides esterificados se cuantificaron utilizando los kits enzimáticos colorimétricos comerciales TG color GPO/PAP AA Colestat enzimático AA para la determinación de TAG y esteroides, respectivamente. Ambos fueron adquiridos en Wiener Lab (Rosario, Argentina) e incluyen una solución estándar y un reactivo (reactivo A) cuya composición se detalla en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Kits para la determinación espectrofotométrica de triglicéridos y esteroides. Se muestra la composición de los Kits Colestat enzimático AA y TG color CPO/PAP AA utilizados para la determinación de triglicéridos y esteroides, respectivamente.

Kit TG color GPO/PAP AA		
Standard		
	<i>Glicerol</i>	2,26 mmol/L
Reactivo A		
	<i>Buffer Good (pH) 6,8</i>	50 mmol/L
	<i>Clorofenol</i>	2 mmol/L
	<i>Lipoprotein lipasa (LPL)</i>	≥ 800 U/L
	<i>Glicerol kinasa (GK)</i>	≥ 500 U/L
	<i>Glicerol fosfato oxidasa (GPO)</i>	≥ 1500 U/L
	<i>Peroxidasa (POD)</i>	≥ 900 U/L
	<i>Adenosina trifosfato (ATP)</i>	2 mmol/L
	<i>4-aminofenazona (4-AF).</i>	0,4 mmol/L
Kit Colestat enzimático AA		
Standard		
	<i>Colesterol</i>	2 g/L
Reactivo A		
	<i>Colesterol esterasa (CHE)</i>	≥ 100 U/L
	<i>Colesterol oxidasa (CHOD)</i>	≥ 100 U/L
	<i>Peroxidasa (POD)</i>	≥ 1000 U/L
	<i>4-aminofenazona (4-AF)</i>	0,2 mmol/L
	<i>Buffer Good</i>	50 mmol/L
	<i>Fenol</i>	15 mmol/L
	<i>Colato de sodio</i>	0,2 mmol/L

Para ello, los extractos obtenidos en la sección anterior (2.6.5.2), se resuspendieron en 100 μ L de isopropanol. A continuación, se efectuaron las reacciones colorimétricas siguiendo las instrucciones disponibles en cada kit comercial. Brevemente, los extractos de TAG o esteroides fueron incubados durante 20 minutos a temperatura ambiente con 1 mL de reactivo A. Luego, se procedió a leer la absorbancia de cada solución a una λ de 505 nm. Simultáneamente se realizó una curva de calibrado con cada una de las soluciones standard. Los resultados obtenidos se normalizaron considerando la cantidad de biomasa utilizada en cada caso.

2.7. Identificación lipídica mediante cromatografía gaseosa

La cromatografía gaseosa es una técnica mediante la cual se separan los componentes de una muestra de manera muy eficiente. Para ello, se debe inyectar una pequeña cantidad de muestra en una corriente de gas inerte (fase móvil) a elevada temperatura, la cual atraviesa una columna cromatográfica (fase estacionaria). En ella ocurre la separación de los componentes de la muestra por medio de un mecanismo de partición. Los componentes separados emergen de la columna en intervalos y atraviesan un sistema de detección adecuado. A continuación se detallan los procedimientos realizados para la identificación de ácidos grasos (AGs) y esteroides.

2.7.1. Identificación de ácidos grasos

Los AGs presentes en el extracto lipídico total, así como los de cada una de las fracciones lipídicas (LN, GL y FL) fueron identificados mediante cromatografía gaseosa. Para ello, se procedió a realizar su derivatización a ésteres metílicos de AGs (FAMEs, del inglés *fatty acid methyl esters*) (Popovich et al., 2012). A los extractos secos de lípidos (ver apartados 2.6.2. y 2.6.4. de la sección 2.6. de "Materiales y Métodos") se les adicionó 2 mL de una solución de KOH 10% en metanol, agitando vigorosamente, purgando el aire mediante una corriente de nitrógeno. Seguidamente, los viales se colocaron en un baño térmico a 80°C durante 45 minutos. Para separar los AGs del material insaponificable, se adicionaron 2 mL de éter de petróleo, creando así un sistema bifásico cuya fase superior

fue descartada. Luego, a la fracción inferior recuperada se le agregaron 0,5 mL de ácido clorhídrico en un baño de hielo y 2 mL de éter de petróleo. Luego de agitar, se recuperó la fase superior. A continuación, los extractos se evaporaron completamente bajo atmósfera de nitrógeno. Luego se adicionaron 1,5 mL de una solución de trifluoruro de boro preparada en metanol al 10%. Las fracciones se colocaron en un baño de agua a 80°C durante 30 minutos. Posteriormente, se realizaron dos ciclos de extracción de metilésteres de AGs, agregando 2 mL de éter de petróleo, agitando en un vórtex y dejando reposar hasta la formación de un sistema bifásico. La fase superior, conteniendo los FAMES, fue separada, secada bajo atmósfera de nitrógeno y recuperada con hexano de calidad cromatográfica.

Los FAMES fueron analizados utilizando un cromatógrafo gaseoso HP 4890D, Hewlett Packard, USA, equipado con una columna de capilaridad SP2560 (100 m, 0,25 mm, y 0,2 μ m de espesor de film de fase estacionaria) (Supelco Inc., USA). Las condiciones operativas fueron las siguientes: relación de Split 20:1; velocidad: 21 cm/s; se empleó hidrógeno como gas *Carrier*. Las temperaturas empleadas fueron: inyector= 175°C, detector de ionización a la llama (FID, del inglés “*flame ionization*”)= 260°C, horno = inicialmente a 140°C durante 5 min, estableciéndose una rampa de aumento de 4°C/min, alcanzando una temperatura final de 240°C durante 15 minutos. El tiempo total de corrida fue de 45 minutos. Los datos fueron analizados utilizando el software HP3398A GC Chemstation Software (Hewlett Packard, USA). Su identificación se realizó comparando los picos obtenidos con un estándar Supelco FAME 10 mix 37 (CRM47885, Supelco Inc., USA).

2.7.2. Identificación de esteroides

El análisis de la composición de esteroides se realizó mediante cromatografía gaseosa, de acuerdo al protocolo descrito en Scodelaro et al. (2016). Los extractos secos de esteroides (obtenidos en el apartado 2.5.2.2 de la sección “Materiales y Métodos”) fueron transformados químicamente en trimetilsililésteres, empleando el reactivo silanizante SIGMA SIL-A (Sigma-Aldrich, USA), siguiendo las instrucciones provistas por la empresa. Se utilizó un cromatógrafo gaseoso (7820A, Agilent, USA) equipado con una columna capilar SE 54 (30m, 0,25 mm, y 0,2 μ m de espesor de fase estacionaria) (Supelco Inc., USA). Las condiciones operativas fueron las siguientes: relación de *split* 20:1; velocidad: 37 cm/s. Se

empleó hidrógeno como gas *carrier*. La temperatura del inyector fue de 280°C y la del detector FID de 300°C. El horno inicialmente se mantuvo a 260°C durante 2 min, y luego se aplicó una rampa de incremento de temperatura a una velocidad de 1°C/min; la temperatura final fue de 265 °C durante 20 minutos. El tiempo total de corrida fue de 40 minutos. La identificación de los esteroides se realizó por comparación de sus tiempos relativos de retención con los de una mezcla de esteroides analizada en las mismas condiciones, de acuerdo al método descrito por el International Olive Council (IOC, 2001). Los análisis se realizaron por duplicado.

2.8. Estimación de la producción de ácidos grasos

La conversión de los datos de FAMES en cantidad (expresada en gramos (g)) de ácido graso por cada 100 gramos de biomasa ($\text{g en } 100 \text{ g de biomasa}^{-1}$) fue realizada utilizando los factores de conversión propuestos por Weihrauch et al. (1975). Para ello, se consideró la composición lipídica de las diatomeas *Phaeodactylum tricornutum* y *Pavlova lutheri* en relación a las clases de lípidos que constituyen cada una de las fracciones lipídicas, a saber: TAG (fracción LN); monogalactosildiacilglicerol (MGDG), digalactosildiacilglicerol (DGDG) y sulfoquinovosidiacilglicerol (SQDG) (fracción GL); y fosfatidilcolina (PC), fosfatidletanolamina (PE) y fosfatidilglicerol (PG) (fracción FL) (Yang et al. 2017; Yang et al. 2020). En la Tabla 2.3 se detalla el procedimiento para el cálculo de los factores de conversión F.

Para cada clase lipídica, se consideró la masa molecular promedio de los valores publicados por Yu et al. (2009), Liang et al. (2014) y Yao et al. (2015). Posteriormente, se restó a la masa molecular total aquella correspondiente al de cada componente molecular, exceptuando a los AGs constituyentes. De esta forma se obtuvo la contribución de éstos a la masa molecular. Al realizar la relación entre el peso molecular de cada clase lipídica y el de los AGs, se obtuvieron los factores F expresados en gramos de ácido graso por gramo de cada clase de lípidos (g AG/g Líp.), obteniéndose un factor F promedio para LN, GL y FL. Además, se obtuvieron las cantidades de las fracciones de LN, GL y FL expresadas como % de lípidos totales. Estos valores fueron multiplicados por los factores F de la Tabla 2.5, obteniéndose los AGs presentes en 100 gramos de lípidos. Luego, estos valores divididos

por 100 permitieron obtener los factores F*, específicos para cada condición experimental que expresan la cantidad de AGs (expresada en g) presentes para cada especie lipídica (g AGs/ gramo especie lipídica). Para el caso de lípidos totales, el factor F* utilizado correspondió a la suma de los factores F* para LN, GL y FL.

Tabla 2.3. Cálculo de los factores de conversión F. Se indican detalles de los datos utilizados para el cálculo de los factores de conversión F.

	Cantidad AG	Peso molecular promedio ¹	Peso molecular promedio por AG en la molécula	Contribución de los AG al peso molecular	F (gAG/ g Lip)
LN					
TAG	3	848	270	810	0,96
GL					
MGDG	2	751	266	533	0,71
DGDG	2	944	282	564	0,597
SQDG	2	799	258	517	0,65
Promedio GL					0,65
FL					
PC	2	736	258	517	0,7
PE	2	723	273	547	0,76
PG	2	766	280	559	0,73
Promedio FL					0,73

¹Los valores corresponden a datos publicados por Yu et al. (2009), Liang et al. (2014) y Yao et al. (2015) para microalgas. LN: Lípidos neutros; TAG: triacilglicerol; GL: glicolípidos; MGDG: monogalactosildiacilglicerol; DGDG: digalactosildiacilglicerol; SQDG: sulfoquinovosidiacilglicerol. FL: fosfolípidos. PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; PG fosfatidilglicerol.

Para obtener la cantidad de AGs de cada fracción lipídica y del extracto lipídico total, presentes en 100 g de biomasa, los factores F* fueron multiplicados por el valor obtenido para cada especie lipídica (g) en 100 g biomasa. Finalmente, a partir del perfil de AGs (expresado como % del total de FAME) se obtuvo la producción de cada ácido graso cada 100 g biomasa.

CAPÍTULO 3

DIATOMEAS NATIVAS COMO POTENCIAL RECURSO DE ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS DE CADENA LARGA

3.1. Introducción

En la actualidad, existe una creciente demanda de compuestos bioactivos a partir de recursos naturales por parte de diversos sectores industriales. Las microalgas se presentan como una opción viable para satisfacer esta demanda. Estos organismos poseen la capacidad de generar diversas moléculas bioactivas, razón por la cual son considerados plataformas productivas. Sin embargo, la síntesis de todas estas biomoléculas requiere de una selección adecuada de especies, de un conocimiento profundo de su biología y fisiología y de una evaluación rigurosa de las estrategias de cultivo. En este sentido, un grupo de microalgas de interés son las diatomeas.

Las diatomeas son organismos fotosintéticos responsables de aproximadamente un 40% de la producción de biomasa marina anual (Yi et al., 2017; Bozarth et al., 2009). Este grupo de organismos comprende más de 100.000 especies separadas en dos grandes grupos: céntricas y pennadas (Round et al., 1990). Las céntricas, de simetría radial, poseen numerosos cloroplastos y su reproducción sexual es por oogamia (Chepurnov y Mann, 2004). En cambio, las especies pennadas poseen simetría bilateral, son usualmente alargadas, con un número reducido de cloroplastos y su reproducción sexual es por isogamia o anisogamia fisiológica (Chepurnov y Mann, 2004). Sin embargo, la identificación de las especies en base a caracteres morfológicos suele ser difícil debido a la similitud entre especies diferentes, así como por la variación morfológica durante su ciclo de vida (Negrisolo et al., 2004). En este sentido, se han desarrollado protocolos eficaces para la identificación de cepas de microalgas utilizando marcadores moleculares que son independientes del fenotipo (Radha et al., 2013; Hadi et al., 2016). Los análisis de filogenia molecular ubican a las diatomeas dentro del Supergrupo Stramenopiles, División Ochrophyta (estramenópilos fotosintéticos), Clase Bacillariophyceae (Adl. et al., 2019; Bellorín Romero et al., 2022).

Las diatomeas habitan en todas las zonas climáticas, es decir, presentan flexibilidad fisiológica lo cual facilita su adaptación a un amplio rango de condiciones ambientales (Bozarth et al., 2008). A su vez, es posible su cultivo en laboratorio, así como en sistemas a mayor escala, a velocidades de crecimiento que pueden controlarse a través de la disponibilidad de nutrientes (Wang y Seibert 2017; Savio et al., 2020). Este grupo de microalgas posee un gran potencial para la producción de una variedad de compuestos y aplicaciones. Ciertas especies, han sido propuestas para la producción de biodiesel (Popovich et al., 2012; Martín et al., 2016; Hegel et al., 2019; Popovich et al., 2019), biorremediación (Hedayatkah et al., 2018; Wang et al., 2019), aplicaciones farmacéuticas, cosméticas y en la industria de alimentos (Lu et al., 2018; Popovich et al., 2019; Yang et al., 2020; Erdoğan et al., 2022) así como en nanotecnología (Samantaray et al., 2020; Maher y Losic, 2022).

Una de las propiedades de las diatomeas, de interés para el presente estudio, es su capacidad de síntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFAs). Estos ácidos grasos, tal como se explicó en el Capítulo 1, son requeridos por la industria acuícola ya que son esenciales para la alimentación de peces y otras especies acuáticas cultivadas. Particularmente, los LC-PUFAs característicos de las diatomeas son los ω 3 EPA, DHA y el ω 6 ARA. Los PUFAs forman parte de los lípidos polares de las membranas celulares, y de los glicolípidos localizados, principalmente, en las membranas de los cloroplastos (Yi et al., 2017). A su vez, las diatomeas oleaginosas tienen la capacidad de acumular lípidos neutros, principalmente en la forma de triglicéridos (TAG), siendo los LC-PUFAs parte de esta fracción lipídica (Zulu et al., 2018). Sin embargo, la capacidad de síntesis de LC-PUFAs en diatomeas es variable, dependiendo de la especie y de las condiciones en las cuales son cultivadas (Luo et al., 2015; Qiao et al., 2016; Gong et al., 2019).

En base a lo expuesto anteriormente, y considerando el objetivo general de la tesis, para desarrollar el presente capítulo se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

- 1- Colectar muestras fitoplanctónicas y de lodos de la zona interna del estuario de Bahía Blanca, aislar especies de diatomeas y establecer cultivos unialgales.
- 2- Desarrollar cultivos autotróficos *batch* a escala de laboratorio de las especies aisladas, para evaluar sus parámetros de crecimiento y producción de biomasa.
- 3- Seleccionar la especie con mejores características productivas e identificarla a nivel molecular mediante el análisis filogenético del gen cloroplástico *rbcL*.
- 4- Realizar un cultivo *batch* autotrófico en fotobiorreactor bajo condiciones de crecimiento óptimas, evaluando:
 - a. Los parámetros de crecimiento y producción de biomasa.
 - b. La disponibilidad de macronutrientes a lo largo del cultivo.
 - c. La síntesis de lípidos neutros en función de los días de cultivo.
 - d. El contenido de lípidos totales de la biomasa obtenida y su perfil de ácidos grasos.
 - e. La producción de ácidos grasos de la biomasa obtenida.

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Obtención de cultivos unialgales

Las muestras fitoplanctónicas fueron colectadas en otoño de 2017 de la zona interna del estuario de Bahía Blanca (38° 45' S, 62° 22' W), Buenos Aires, Argentina. Las mismas fueron observadas al microscopio óptico para corroborar la presencia de diatomeas. Seguidamente se realizó una revisión bibliográfica con el fin de identificar en la muestra aquellas especies de diatomeas que hayan sido reportadas como productoras de LC-PUFAs. De este modo, se aislaron y cultivaron tres especies: *Navicula gregaria*, *Skeletonema costatum* y *Cylindrotheca closterium*, siguiendo la metodología descrita en la Sección 2.3 del Capítulo 2 de la presente tesis.

3.2.2. Cultivos a escala de laboratorio de las diatomeas aisladas

Para cada una de las especies aisladas, se ensayó un cultivo autotrófico *batch* a escala de laboratorio. Se realizó un escalado progresivo para la obtención de un inóculo de células en fase exponencial, de acuerdo al esquema de la Figura 3.1. Los cultivos

experimentales se realizaron durante 7 días, por triplicado en medio de cultivo f/2, a un volumen de trabajo de 100 mL y una densidad celular inicial de 10.000 cél mL⁻¹. Las condiciones de cultivo, tanto para el escalado, como para las experiencias, fueron las mismas condiciones que se detallan en la sección anterior para la obtención de los cultivos stocks, agregando movimientos constantes mediante un agitador.

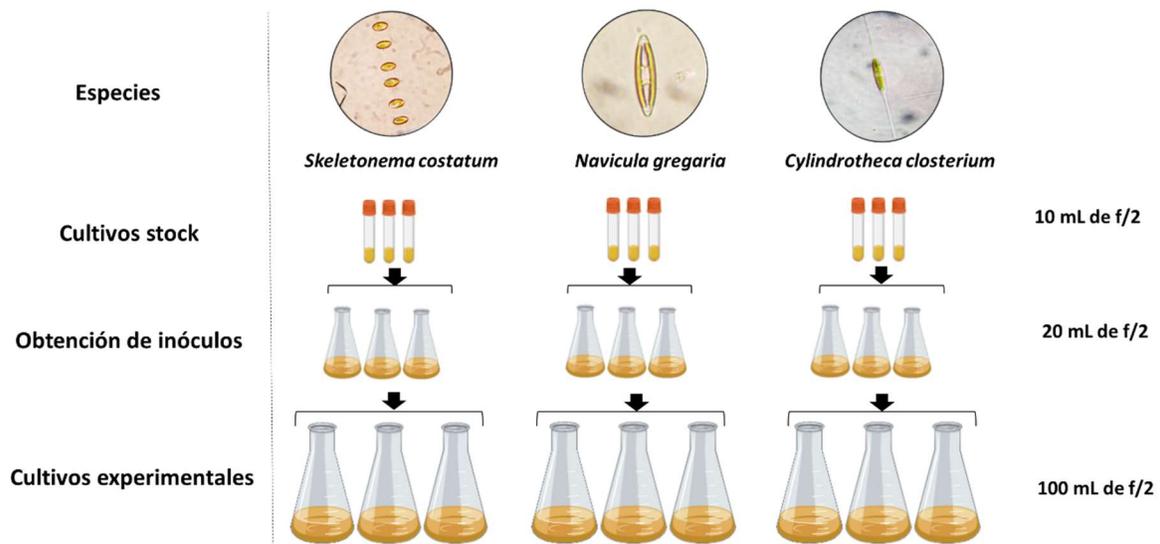


Figura 3.1. Cultivos a escala de laboratorio de *Skeletonema costatum*, *Navicula gregaria* y *Cyndrotheca closterium*. Escalado progresivo a partir de los cultivos stock hasta la obtención de inóculos necesarios para el inicio de los cultivos experimentales.

3.2.2.1. Parámetros de crecimiento y producción de biomasa

Para caracterizar el crecimiento de las especies aisladas se colectaron muestras diarias. Se utilizó una cámara *Sedgewick Rafter* para realizar los recuentos celulares y se calculó la densidad celular (DC), la velocidad máxima de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (TD) de acuerdo a lo descrito en la Sección 2.5 del Capítulo 2 de la presente tesis (Ecuaciones 2.1, 2.2 y 2.3).

La producción de biomasa de las especies, expresada como contenido de carbono, fue estimada a partir del volumen celular (V). Para el cálculo de V, se consideró la longitud

promedio (n=20 células) de cada especie y las ecuaciones propuestas según la morfología de cada una de las especies (Fig. 3.4)

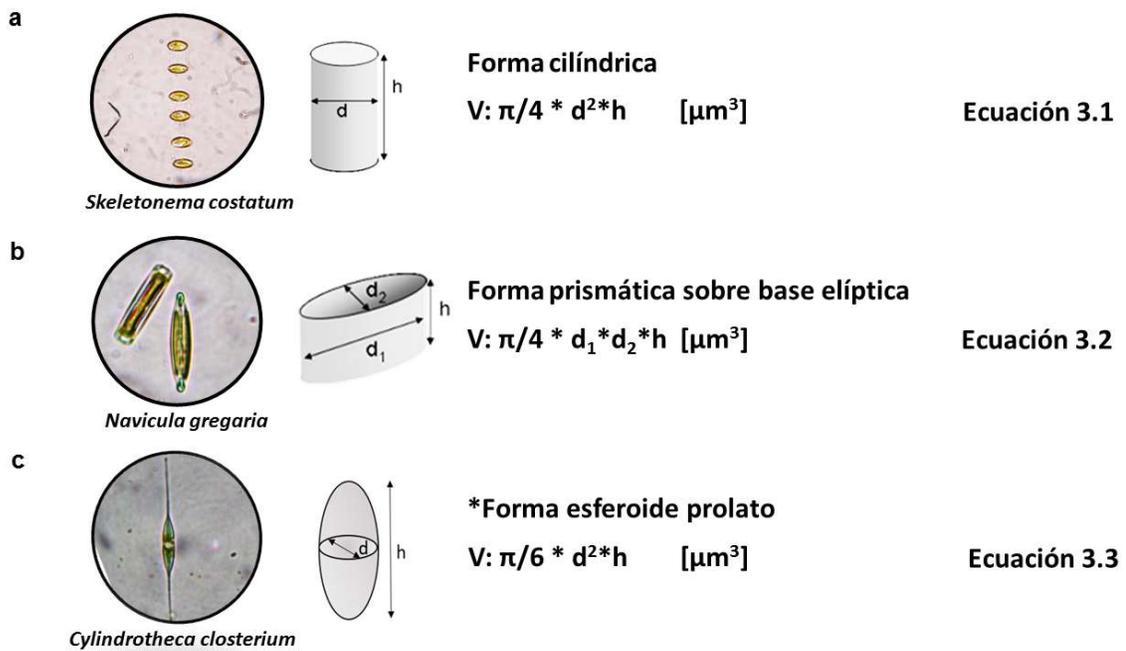


Figura 3.2. Volumen celular. Ecuaciones utilizadas para calcular el volumen celular de acuerdo a la morfología de **a)** *S. costatum* **b)** *N. gregaria* y **c)** *C. closterium* (Hillebrand et al., 1999). *Para el cálculo del volumen celular de *C. closterium* no se consideraron las prolongaciones celulares.

Una vez obtenido el volumen celular, se estimó el contenido de carbono de acuerdo a la siguiente ecuación, propuesta por Menden-Deuer y Lessard (2000) para diatomeas:

$$\text{Log (pg C cél}^{-1}\text{)} = -0.541 + (0.811 * V) \quad \text{siendo } V: \text{Volumen } [\mu\text{m}^3] \quad \text{Ecuación 3.4}$$

Finalmente, el contenido de carbono por célula (pg C cél⁻¹) se multiplicó por la densidad celular, obteniéndose así una estimación de la producción de biomasa expresada como contenido de carbono por unidad de volumen de cultivo (pg C mL⁻¹).

3.2.3. Cultivo de diatomeas en fotobiorreactor

De acuerdo a los resultados obtenidos, se seleccionó la especie *C. closterium* para evaluar su crecimiento y producción lipídica en fotobiorreactor. Se realizó un cultivo *batch* autotrófico, durante 10 días, en medio de cultivo f/2 (volumen final de 10 litros) y una

densidad celular inicial de 200.000 células mL⁻¹. Las condiciones de crecimiento fueron: aireación constante con aporte de CO₂ al 1%, iluminación LED con intensidad de 60 μ mol fotón m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 12:12 horas, mezcla constante a 9 rpm y temperatura a 20°C. La biomasa se cosechó el día 10 por centrifugación a 3200 rpm, se liofilizó y almacenó a -80°C hasta su uso. Para más detalles de los cultivos en fotobiorreactor ver Sección 2.4, Capítulo 2.

3.2.3.1. Caracterización morfológica y análisis filogenético de la cepa seleccionada

Se realizó una caracterización de la cepa en base a caracteres morfológicos de las células mediante observaciones al microscopio óptico. La disposición de los núcleos celulares y el cloroplasto fue visualizada mediante microscopía de fluorescencia. Para esto, las células fueron tratadas con 4,6-diamidino-2- fenilindol (DAPI) siguiendo las instrucciones del fabricante (Sigma-Aldrich) y visualizadas con un microscopio de fluorescencia Eclipse E800, Nikon.

Por otra parte, la biomasa cosechada del fotobiorreactor, fue utilizada para la identificación a nivel molecular. El ADN fue extraído usando DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Las condiciones de la PCR incluyeron un paso inicial de desnaturalización a 95°C durante 2 minutos, seguido por 35 ciclos a 94°C por 40 segundos, 52°C por 50 segundos, 72°C por 1 minuto y un paso de extensión final a 72°C por 7 minutos. Los productos amplificados fueron secuenciados por una secuenciación de Sanger en Macrogen. Se realizaron amplificaciones PCR del gen del cloroplasto *rbcL*. Las secuencias homólogas para otras especies de Bacillariophyceae fueron obtenidas de la base de datos GenBank usando búsquedas BLASTn. Las mismas se alinearon con AliView v.1.26 (Larsson 2014) y se utilizó IQtree2 (Nguyen et al., 2015) para ejecutar los análisis filogenéticos de Máxima Verosimilitud con 100 réplicas.

3.2.3.2. Parámetros de crecimiento y producción de biomasa

A partir de los recuentos celulares se determinaron la DC, μ y TD (Ecuaciones 2.1, 2.2 y 2.3). La producción de biomasa se evaluó mediante la determinación del PS (g L⁻¹)

(Ecuación 2.3). Para detalles de metodología consultar la Sección 2.5 del Capítulo 2. Todos los análisis fueron realizados por duplicado.

3.2.3.3. Análisis de la concentración de nutrientes en el medio de cultivo

Con el fin de caracterizar la dinámica de los macronutrientes nitratos (NO_3^-), fosfatos (PO_4^{3-}) y silicatos (SiO_4^{4-}) en el cultivo, se tomaron muestras los días 0, 3 y 10 de cultivo y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Previo a cada determinación, las muestras fueron filtradas empleando filtros Whatman GF/F (0,7 mm) para separar el medio de cultivo de las células en suspensión (Martín et al., 2016). Posteriormente, se realizaron diluciones de las muestras con agua destilada con el objeto de lograr concentraciones adecuadas para el rango de detección de los métodos empleados (Tabla 3.1). Los análisis se realizaron utilizando las técnicas colorimétricas detalladas a continuación. Las mediciones de absorbancia se efectuaron en un espectrofotómetro UV-Visible Cary 60 Agilent, a las longitudes de onda correspondientes para cada macronutriente.

Tabla 3.1. Dilución de las muestras para la determinación de nutrientes disueltos. Se indican los volúmenes de muestra y de agua destilada ($\text{H}_2\text{O d}$) utilizados para alcanzar los volúmenes finales (V_f) para la determinación de nitratos, fosfatos y silicatos en los distintos días de cultivo.

Días	Nitratos ($V_f=10\text{ mL}$)		Fosfatos ($V_f=5\text{ mL}$)		Silicatos ($V_f=5\text{ mL}$)	
	Muestra	$\text{H}_2\text{O d}$	Muestra	$\text{H}_2\text{O d}$	Muestra	$\text{H}_2\text{O d}$
0	0,25	9,75	0,5	4,5	0,25	4,75
3	1	9	1	4	0,25	4,75
10	7	3	2,5	2,5	0,25	4,75

- Nitratos.

La determinación colorimétrica de nitratos se efectuó de acuerdo al método de Bendschneider y Robinson (1952). Brevemente, se realizó una reducción de los nitratos a nitritos utilizando un sobre del reactivo NitraVer 5 mediante el método de reducción de Cadmio (HACH) para 10 mL de muestra diluida (Tabla 3.1). Luego se adicionó 1 mL sulfanilamida, provocando una reacción de diazotación entre el nitrito y la sulfanilamida y, posteriormente, 1 mL de N (1 naftil) etilendiamina, dando como resultado un compuesto de color rosado. El mismo fue cuantificado espectrofotométricamente a una longitud de

onda de 540 nm. Paralelamente, se realizó una curva de calibrado empleando soluciones de concentración conocida, abarcando el rango entre 8 y 18 μM . Las mismas fueron preparadas mediante diluciones sucesivas de un estándar de concentración 98,64 mM KNO_3 .

-Fosfatos.

La concentración de fosfatos (PO_4^-) se determinó siguiendo el método de Murphy y Riley (1962). El mismo consiste en hacer reaccionar a los iones ortofosfato presentes en la muestra con molibdato de amonio y tartrato de amonio potásico, en medio ácido, para dar lugar a un compuesto que, al ser reducido por el ácido ascórbico, produce un compuesto cuya coloración es azul. Brevemente, a 5 mL de muestra diluida se adicionaron 0,4 mL del reactivo color, compuesto por una solución de ácido sulfúrico 4.5M, 0,5 mL de solución de tartrato de amonio y potasio, 1 mL de solución de molibdato de amonio y 1 mL de ácido ascórbico. La curva de calibrado se realizó con soluciones testigo de concentraciones en el rango de 1.5 -7.5 $\mu\text{g PO}_4^- \cdot \text{mL}^{-1}$, preparadas a partir de un estándar de 1 $\text{mg mL}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$. La lectura de las absorbancias correspondientes a los testigos y las muestras diluidas fueron realizadas a una longitud de onda de 885 nm.

-Silicatos.

La determinación de silicatos (Si) disueltos se realizó mediante el método de Koroleff (1976), previa hidrólisis ácida a fin de evitar la polimerización de los silicatos. Para 5 mL de muestra se adicionaron 0,15 mL de un reactivo mixto, compuesto de ácido sulfúrico y heptamolibdato de amonio en partes iguales, y se dejó reaccionar durante 15 minutos. Posteriormente, se adicionaron 0,10 mL de solución de ácido oxálico y luego 0,10 mL de ácido ascórbico, dejando reposar por 30 minutos. De este modo, la forma reducida silicomolibdato en solución ácida, reacciona en presencia de ácido ascórbico, formando azul de molibdeno. La curva de calibrado fue realizada con soluciones testigos de concentraciones en el rango de 1,5-7,5 $\mu\text{g Si mL}^{-1}$, preparadas a partir de un estándar de fluorosilicato de sodio 2.038 μM . Las absorbancias correspondientes fueron obtenidas a una longitud de onda de 810 nm.

3.2.3.4. Determinación del contenido y la composición lipídica de la biomasa

La síntesis de lípidos neutros y su localización celular se evaluó mediante el colorante Rojo Nilo (Capítulo 2. Sección 2.6.1). A su vez, a partir de la biomasa liofilizada obtenida del cultivo en fotobiorreactor, se realizó la extracción lipídica de acuerdo con el método de Folch (Capítulo 2. Sección 2.6.2) y se calculó el contenido de lípidos totales (% de peso seco) mediante gravimetría (Capítulo 2. Sección 2.6.3). Posteriormente, los extractos lipídicos fueron derivatizados, obteniéndose los FAMES, los cuales fueron identificados mediante cromatografía gaseosa (Capítulo 2. Sección 2.7.1).

3.2.4. Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico de los datos usando el software Infostat (Di Rienzo et al., 2018). Se compararon los parámetros de crecimiento y la producción de biomasa entre las especies aisladas. Mediante un análisis de ANOVA simple se determinó si existen diferencias significativas entre las tres especies y mediante la Prueba de Tukey se analizó entre que especies se encuentran las diferencias.

3.3. Resultados

3.3.1. Comparación del crecimiento de las diatomeas aisladas

Se evaluó el crecimiento de las diatomeas aisladas *S. costatum*, *C. closterium* y *N. gregaria* a escala de laboratorio (Fig. 3.3). Al comparar parámetros de crecimiento entre estas especies, *C. closterium* presentó un valor de μ significativamente mayor ($p < 0,05$) ($1,87 \pm 0,41 \text{ div día}^{-1}$) respecto de *S. costatum*. ($1,02 \pm 0,06 \text{ div día}^{-1}$) y *N. gregaria* ($0,95 \pm 0,07 \text{ div día}^{-1}$). El TD fue significativamente menor ($p < 0,05$) ($13,24 \pm 2,66 \text{ h}$) al obtenido para las otras dos especies evaluadas ($25,3 \pm 2,66 \text{ h}$ y $23,6 \pm 1,36 \text{ h}$ para *N. gregaria* y *S. costatum*, respectivamente.) Asimismo, no se hallaron diferencias significativas entre los valores de μ y TD obtenidos para *N. gregaria* y *S. costatum* ($p > 0,05$).

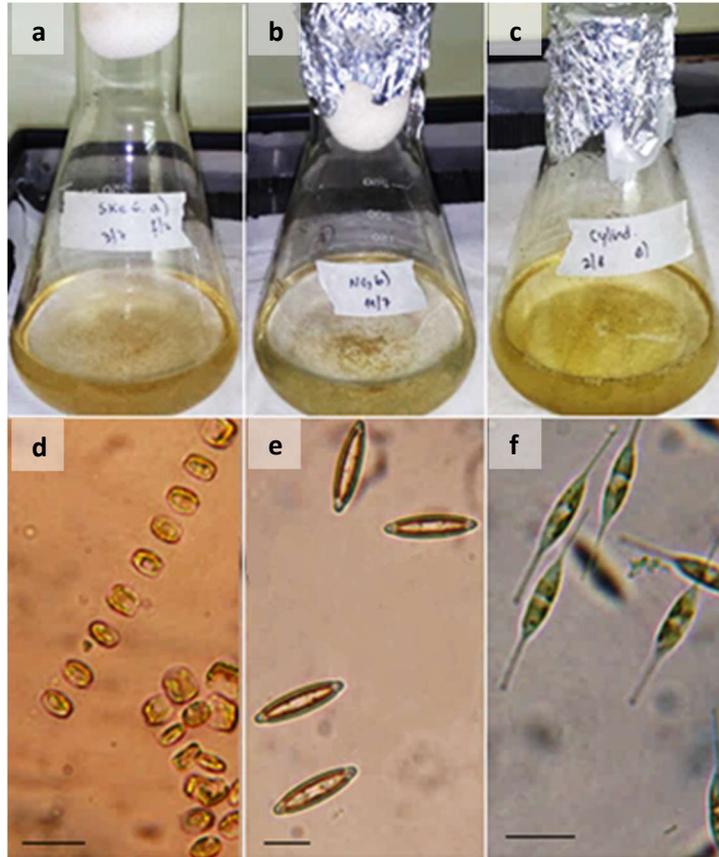


Figura 3.3. Cultivos de las especies aisladas. *S. costatum* (a y d), *N. gregaria* (b y e) y *C. closterium* (c y f) luego de 7 días de cultivo en medio f/2 (a-c). Detalle de las diatomeas en fase exponencial de crecimiento, observadas al microscopio óptico (d-f) (Barra de escala =10 μm)

La curva de crecimiento obtenida para cada una de las especies aisladas se muestra en la Figura 3.4. La DC de *C. closterium* al final del ciclo de cultivo fue mayor que la de las otras dos especies evaluadas, alcanzando un valor máximo de $110 \pm 0,90 \times 10^4$ células mL^{-1} en el día 6 de cultivo. Este valor fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que aquel obtenido para *S. costatum*. ($66 \pm 0,79 \times 10^4$ células mL^{-1}) y *N. gregaria* ($10 \pm 2,50 \times 10^4$ células mL^{-1}), para el mismo día de cultivo.

Los valores correspondientes al volumen celular (μm^3) y contenido de carbono (expresado en picogramos de carbono por célula ($\text{pg C c\acute{e}l}^{-1}$)) para las tres especies evaluadas a lo largo de los 7 días de cultivo se presentan en la Tabla 3.1. Puede observarse que ambos parámetros estudiados fueron significativamente mayores para *N. gregaria* en comparación con los obtenidos para las otras dos especies ($p < 0,05$). En cuanto a la

producción de biomasa (expresada en $\mu\text{g C mL}^{-1}$), *C. closterium* presentó valores significativamente mayores ($p < 0,05$) que *N. gregaria* y *S. costatum* hacia el final del cultivo (días 5-7) (Fig. 3.5).

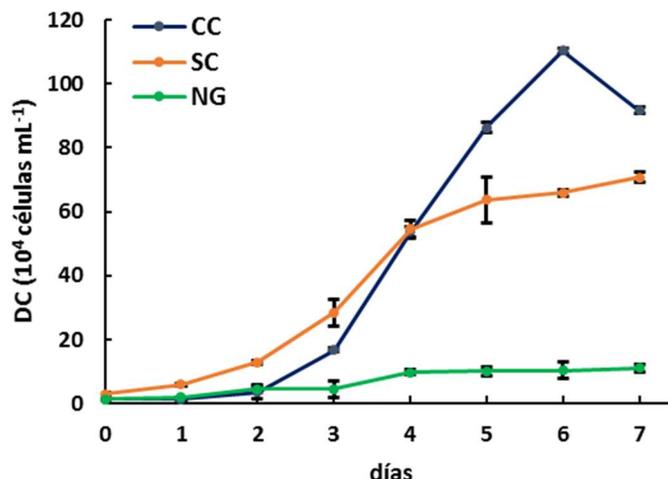


Figura 3.4. Curvas de crecimiento de las especies aisladas. El gráfico muestra la densidad celular (DC) alcanzada por cada una de las especies *S. costatum* (SC), *C. closterium* (CC) y *N. gregaria* (NG) en función de los días de cultivo. Los valores representan el promedio \pm el desvío estándar ($n=3$).

Tabla 3.1. Mediciones volumétricas y estimación del contenido de carbono de las especies aisladas. En la tabla se presentan los valores del volumen celular (V ; μm^3) y del contenido de carbono por célula (pg C cél^{-1}) de *S. costatum*, *N. gregaria* y *C. closterium* en los distintos días de cultivo.

Días	<i>S. costatum</i>		<i>N. gregaria</i>		<i>C. closterium</i>	
	V	C	V	C	V	C
0	197,27 \pm 95,64 ^a	20,53 \pm 8,27 ^a	684,46 \pm 141,00 ^b	57,16 \pm 9,60 ^b	134,36 \pm 74,09 ^a	14,92 \pm 7,03 ^a
1	140,36 \pm 119,14 ^a	15,30 \pm 9,81 ^a	713,61 \pm 163,69 ^b	59,08 \pm 11,07 ^b	133,40 \pm 87,08 ^a	14,75 \pm 7,95 ^a
2	155,47 \pm 52,55 ^a	17,09 \pm 4,75 ^a	698,27 \pm 173,09 ^b	58,03 \pm 11,55 ^b	96,13 \pm 68,38 ^a	11,24 \pm 6,67 ^a
3	138,29 \pm 54,28 ^a	15,49 \pm 5,01 ^a	704,40 \pm 147,61 ^b	58,50 \pm 10,04 ^b	101,03 \pm 60,62 ^a	11,85 \pm 5,80 ^a
4	140,21 \pm 77,19 ^a	15,48 \pm 7,14 ^a	727,72 \pm 208,94 ^b	59,91 \pm 13,94 ^b	110,92 \pm 72,15 ^a	12,72 \pm 6,81 ^a
5	97,68 \pm 53,58 ^a	11,90 \pm 4,77 ^a	719,13 \pm 198,38 ^b	59,35 \pm 13,33 ^b	120,96 \pm 100,52 ^a	13,47 \pm 8,94 ^a
6	129,16 \pm 56,95 ^a	14,62 \pm 5,28 ^a	677,10 \pm 133,29 ^b	56,68 \pm 9,11 ^b	105,77 \pm 57,14 ^a	12,35 \pm 5,45 ^a
7	98,79 \pm 44,04 ^a	11,77 \pm 4,21 ^a	819,45 \pm 217,31 ^b	66,00 \pm 14,43 ^b	95,93 \pm 51,36 ^a	11,42 \pm 4,96 ^a

Los valores representan el valor promedio \pm el desvío estándar ($n=20$).

Letras diferentes indican diferencias significativas entre las especies para un día de cultivo ($p < 0,05$)

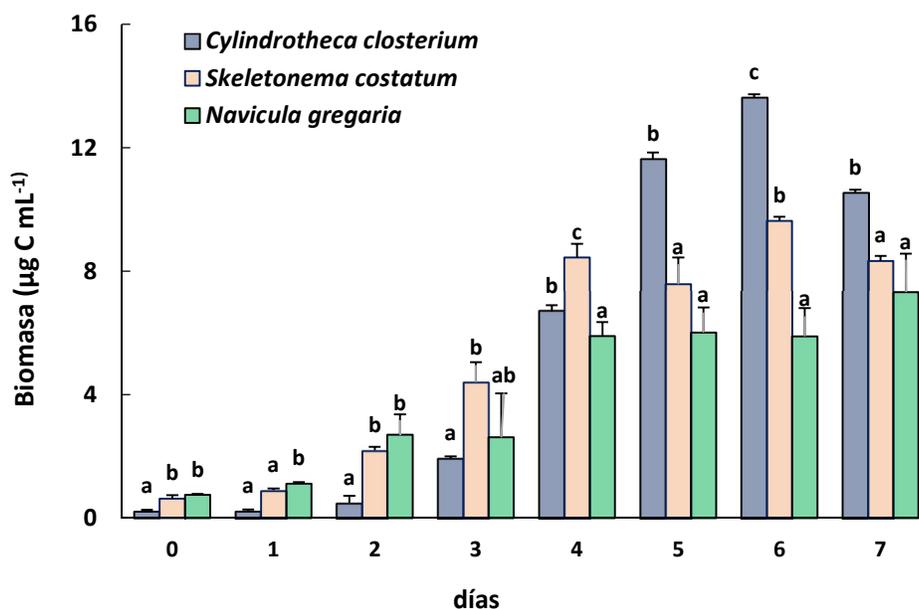


Figura 3.5. Cinética de producción de biomasa de las especies aisladas. Biomasa estimada expresada como contenido de carbono por unidad de volumen de cultivo ($\mu\text{g C mL}^{-1}$) en función de los días de cultivo para *C. closterium*, *S. costatum* y *N. gregaria*. Los valores representan el valor promedio \pm el desvío estándar ($n=3$). Las letras diferentes indican diferencias significativas entre las especies para un día de cultivo ($p<0,05$)

3.3.2. Caracterización morfológica y molecular de *Cyldrotheca closterium*

De acuerdo a los resultados obtenidos, se seleccionó a la especie *C. closterium* (Fig. 3.6). La especie se caracterizó por presentar células solitarias, delicadas y aciculares. Los frústulos fueron fusiformes, con extremos alargados, rostrados y girados sobre su eje apical. No se detectaron estrías al microscopio óptico. En el centro de las células se observaron dos cloroplastos parietales (Fig. 3.6 a-e), uno a cada lado del núcleo central (Fig. 3.6f). Las dimensiones celulares fueron: eje apical de 35-55 μm y eje transapical de 3-5 μm .

Esta identificación morfológica de *C. closterium* fue corroborada mediante estudios moleculares basados en el gen cloroplástico *rbcL*. El árbol de máxima verosimilitud obtenido se muestra en la Figura 3.8. Puede observarse que la cepa aislada, identificada morfológicamente como *C. closterium*, forma parte de un gran grupo parafilético bien soportado (85% *bootstrap*), junto a otras cepas identificadas como *C. closterium*, *C. gracilis*

y *Cylindrotheca* sp. Dentro del gran clado se observan siete subgrupos identificados con números romanos I-VII con valores de *bootstrap* mayores a un 80% (Fig.3.8). La cepa del presente estudio, junto con otras cepas, quedaron por fuera de estos agrupamientos. Por su parte, *C. fusiformis* formó un clado separado junto con taxones no identificados a nivel de especie, con un apoyo estadístico del 100%.

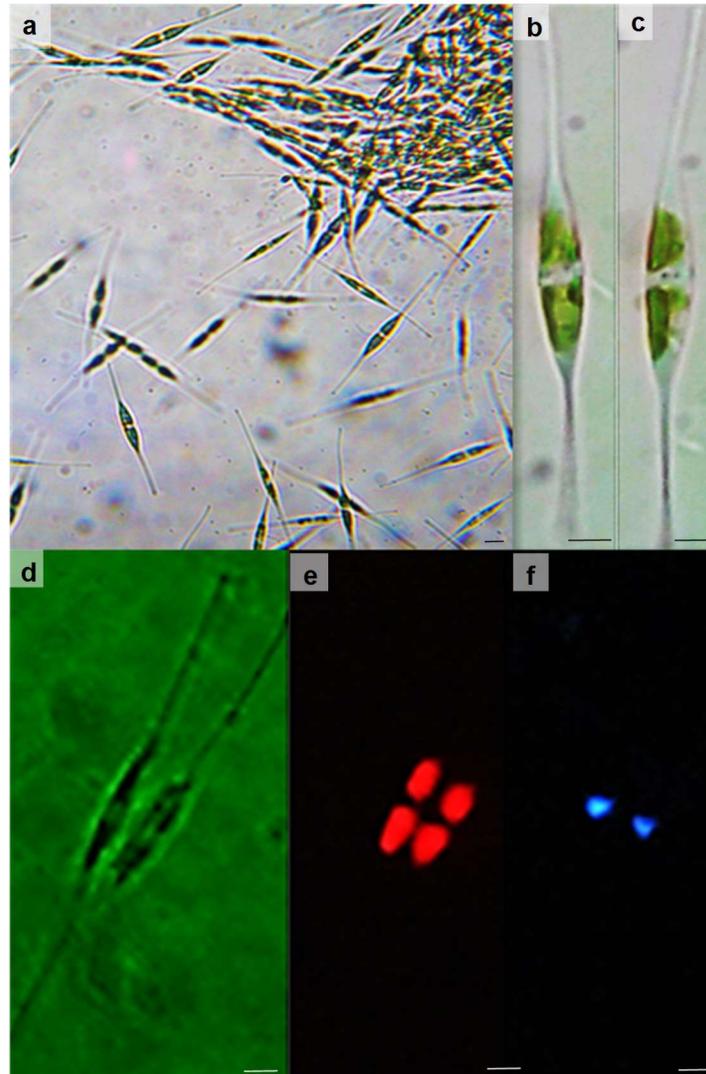


Figura 3.6. Células vegetativas de *C. closterium*. a-c) Células observadas con microscopio óptico. a) Vista general de células en cultivo. b) Célula en vista valvar. c) Célula en vista cingular. d) Observación de dos células con microscopio óptico y (e-f) con microscopio de fluorescencia. Cada célula posee dos cloroplastos (e) y un núcleo central teñido con DAPI (f). Barra de escala= 5µm.

3.3.3. Cultivo de *Cylindrotheca closterium* en fotobiorreactor

Cylindrotheca closterium fue cultivada en fotobiorreactor durante 10 días para evaluar la producción de biomasa y de lípidos. Los valores de μ y TD fueron de $1,13 \pm 0,40$ div día^{-1} y $23,75 \pm 10,47$ horas, respectivamente. En la Figura 3.9 a-c se observa como el cultivo cambia de color a medida que transcurren los días.

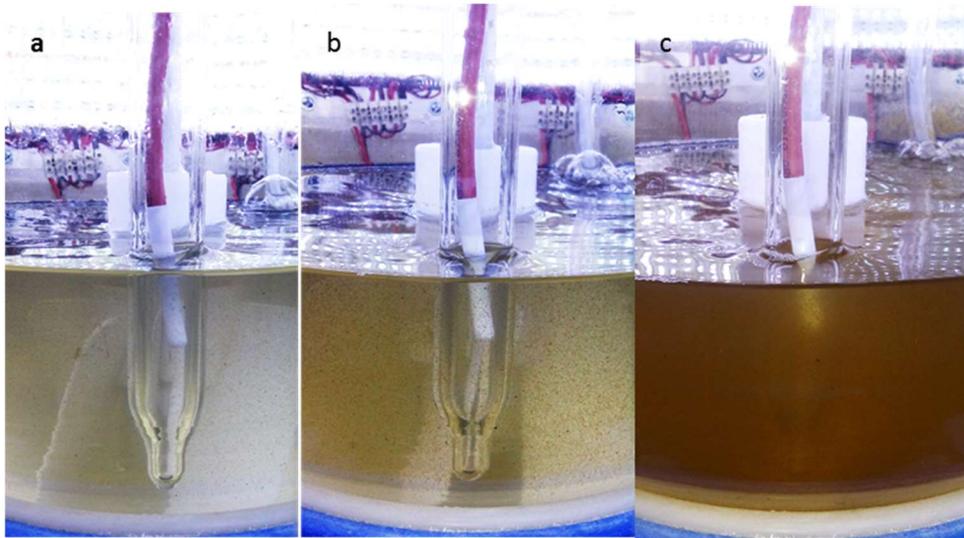


Figura 3.9. Cultivo de *C. closterium* en fotobiorreactor. La figura muestra la coloración del cultivo en los días a) 0, b) 5 y c) 10.

La curva de crecimiento de *C. closterium*, representada como densidad celular en función del tiempo, se observa en la Fig. 3.10. El cultivo mostró un crecimiento sostenido hasta el día 5. Durante la fase estacionaria de crecimiento se registró la mayor producción de biomasa, reflejándose en los valores máximos de PS (mg L^{-1}) (Fig. 3.10) y de lípidos neutros (intensidad de fluorescencia relativa de Rojo Nilo expresada como unidades arbitrarias de fluorescencia, u.a.) (Fig. 3.11). La producción de biomasa (PS) alcanzada el día 10 de cosecha fue de 160 ± 14 mg L^{-1} , correspondiendo un $27,98 \pm 1,17$ % del peso seco a lípidos totales.

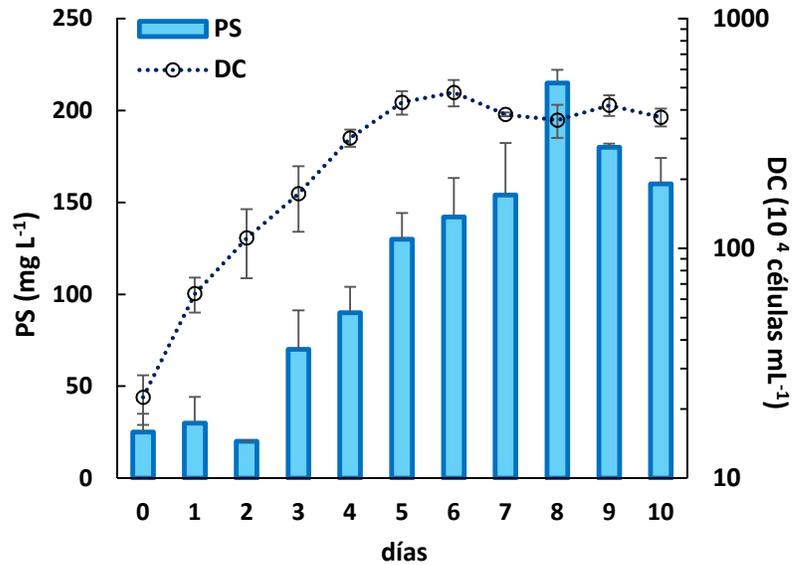


Figura 3.10. Parámetros de crecimiento y producción de biomasa obtenidos durante el cultivo de *C. closterium* en fotobiorreactor. Peso seco (PS), expresado como cantidad de biomasa seca por litro de cultivo (mg L^{-1}); densidad celular (DC), expresada como número de células por mililitro de cultivo (células mL^{-1}). Los valores representan el valor promedio \pm el desvío estándar ($n=2$).

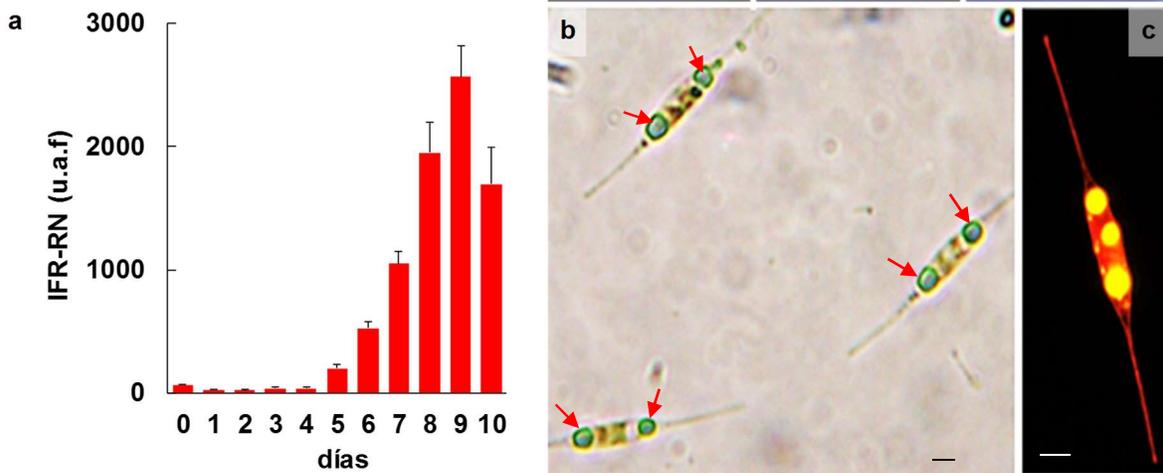


Figura 3.11. Acumulación de lípidos neutros en *C. closterium*. a) Intensidad de fluorescencia relativa de Rojo Nilo (IFR-RN) expresada en unidades arbitrarias de fluorescencia (u. a.f). Los valores representan el valor promedio \pm el desvío estándar ($n=2$). b) y c) Células de *C. closterium* en el día 9 de cultivo b) observadas con microscopio óptico. Las flechas indican las gotas lipídicas y c) teñidas con Rojo Nilo. Se observan las gotas lipídicas con microscopía de fluorescencia. (Barra de escala= $5 \mu\text{m}$).

La variación de la concentración de macronutrientes disueltos en el medio de cultivo se observa en la Figura 3.9. Las concentraciones molares (M) iniciales de silicatos, fosfatos y nitratos registradas fueron 97,77 μM , 41,14 μM y 653,10 μM , respectivamente. Los silicatos no alcanzaron niveles de concentración limitantes ($< 22 \mu\text{M}$) para el crecimiento de diatomeas, permaneciendo en exceso y sin variaciones significativas a partir del día 3 de cultivo. Por su parte, las concentraciones de fosfatos y nitratos disminuyeron marcadamente a partir del tercer día de cultivo, alcanzando valores por debajo de las concentraciones limitantes (fosfatos $< 8,9 \mu\text{M}$; Nitratos $10,2 \mu\text{M}$) hacia el día 10 de cultivo.

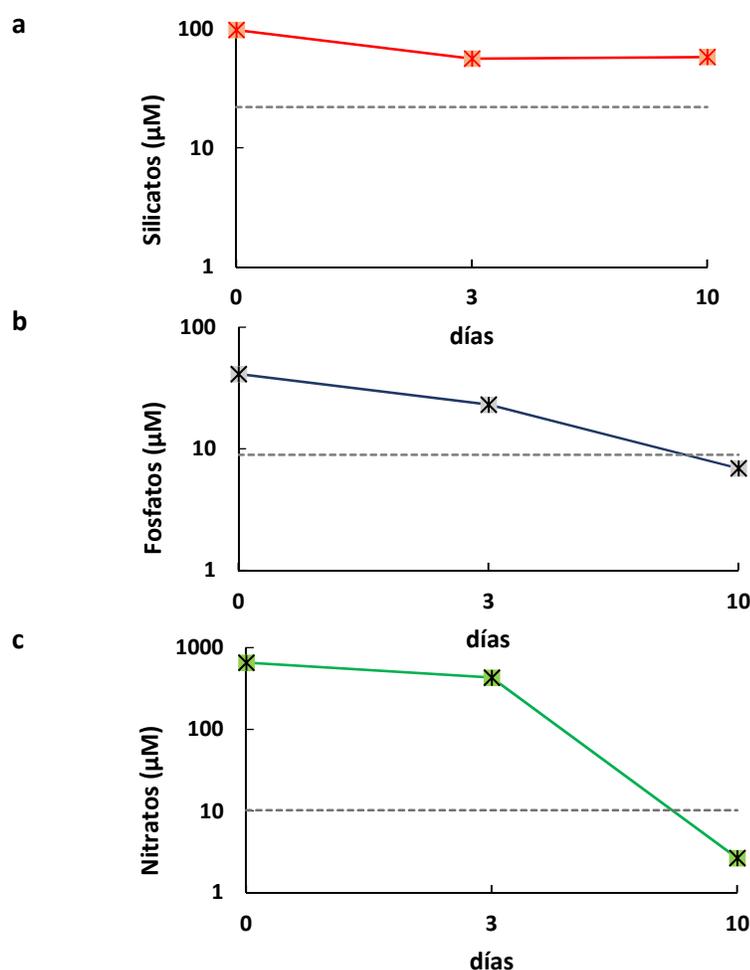


Figura 3.12. Cinética de nutrientes disueltos en el cultivo de *C. closterium* en fotobiorreactor. La línea punteada indica el valor limitante de cada nutriente disuelto para el crecimiento de diatomeas (silicatos $< 22 \mu\text{M}$; fosfatos $< 8,9 \mu\text{M}$; nitratos $< 10,2 \mu\text{M}$). Tomado de Sarthou et al., (2005).

En la Tabla 3.2 se presenta la composición de AGs del extracto lipídico total, expresada como porcentaje (%) del total de FAMES y en términos productivos (mg 100g de biomasa⁻¹).

Tabla 3.2. Análisis de la composición de AGs de la biomasa de *C. closterium* obtenida a partir de su crecimiento en fotobiorreactor. Contenido de AGs expresado como proporción relativa (% del total de FAMES) y en términos productivos (mg en 100 g de biomasa⁻¹). Los valores representan el valor medio \pm desvío estándar (n=4).

Ácidos grasos (AGs)	Contenido de AGs	
	% del total de FAMES	mg de AGs en 100 gramos de biomasa
Saturados (SFAs)		
C 4:0	0,63 \pm 0,52	156,24 \pm 28,86
C 6:0	0,33 \pm 0,24	81,83 \pm 5,35
C 14:0	10,46 \pm 0,46	2589,40 \pm 114,85
C 15:0	0,38 \pm 0,04	93,96 \pm 10,33
C 16:0	31,56 \pm 0,48	7813,64 \pm 117,82
C 17:0	0,09 \pm 0,02	22,41 \pm 5,43
C18:0	3,86 \pm 0,15	956,36 \pm 37,99
C 20:0	0,38 \pm 0,02	93,22 \pm 4,38
C 22:0	0,19 \pm 0,03	46,30 \pm 7,35
C 24:0	0,10 \pm 0,07	24,02 \pm 16,46
Monoinsaturados (MUFAs)		
C 16:1	25,68 \pm 0,55	6359,36 \pm 137,26
C 17:1	0,88 \pm 0,01	216,65 \pm 2,80
C 18:1 ω 9	1,20 \pm 0,07	297,12 \pm 18,21
C 18:1 ω 9	8,60 \pm 0,13	2128,12 \pm 32,56
C 24:1 ω 9	0,40 \pm 0,15	98,30 \pm 37,12
Poliinsaturados (PUFAs)		
C 18:2 ω 6 (LA)	2,36 \pm 0,14	584,34 \pm 33,62
C 18:3 ω 6 (GLA)	0,87 \pm 0,06	214,92 \pm 15,41
C 20:2 ω 6 (EDA)	0,82 \pm 0,04	202,66 \pm 9,98
C 20:3 ω 6 (DHLA)	0,21 \pm 0,01	51,50 \pm 2,17
C 20:4 ω 6 (ARA)	3,00 \pm 0,36	789,23 \pm 88,07
C 20:5 ω 3 (EPA)	7,05 \pm 0,95	1744,71 \pm 234,08
C 22:2 ω 6 (DDA)	0,10 \pm 0,01	25,26 \pm 3,50
C 22:6 ω 3 (DHA)	0,69 \pm 0,14	170,71 \pm 33,44

Los ácidos grasos saturados (SFAs) representaron el $48 \pm 1,5$ % del total de FAMES (Fig. 3.13a), siendo mayoritarios los AGs 14:0 y 16:0, con una producción de $2.589,41 \pm 114,85$ y $7.813,84 \pm 117,82$ mg 100 g biomasa⁻¹, respectivamente (Tabla 3.2). Por su parte, los ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) representaron el $36,7 \pm 0,2$ % del total de FAMES (Fig. 3.13a). De este porcentaje, un $25,68 \pm 0,5$ % correspondió al AG 16:1, con una producción de $6.359,36 \pm 137,26$ mg 100 g biomasa⁻¹ (Tabla 3.2) y un 10,2 % a AGs de la serie ω 9 (Fig. 3.13b).

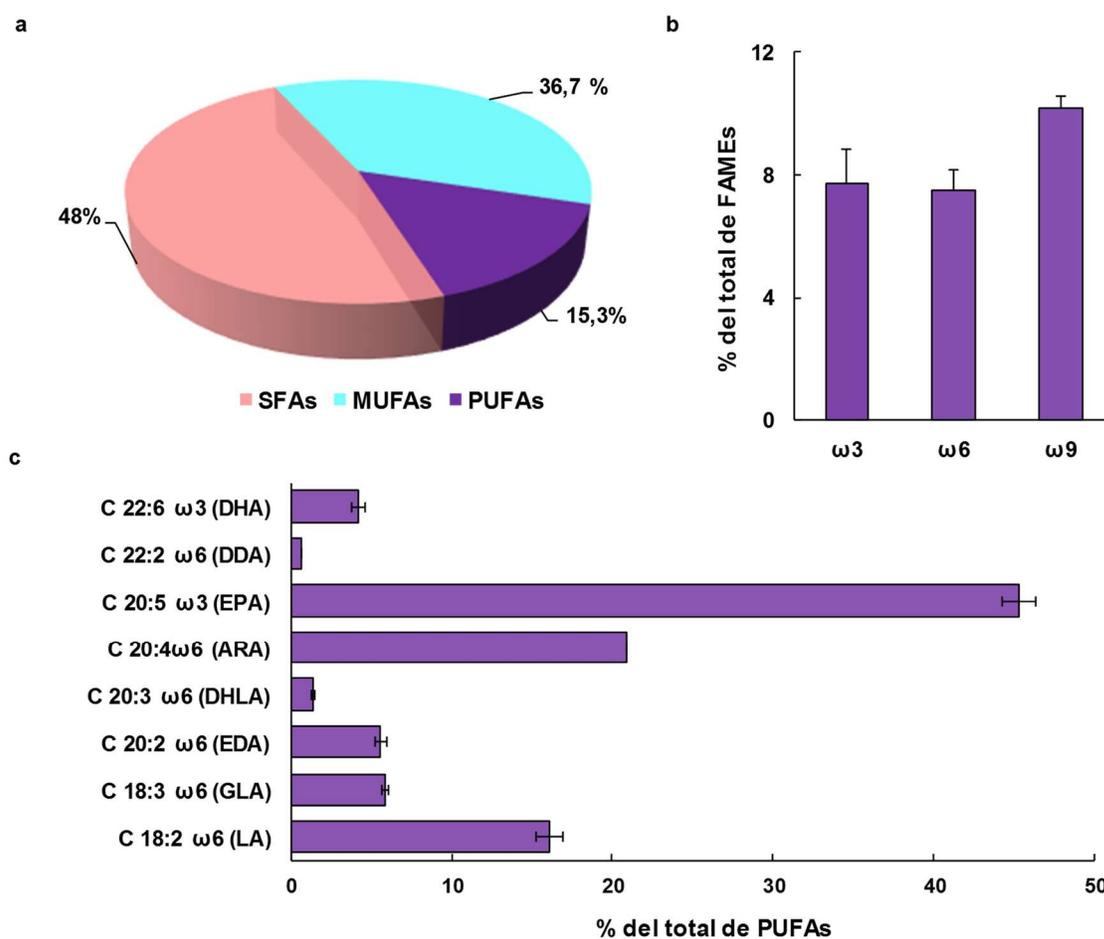


Figura 3.13. Caracterización de los AGs presentes en *C. closterium*. a) Porcentaje de SFAs, MUFAs y PUFAs y b) porcentaje de PUFAs ω 3, ω 6 y ω 9, expresados sobre el total de FAMES. c) Cantidad relativa de AGs poliinsaturados expresadas como % del total de PUFAs. Los valores representan el valor promedio \pm el desvío estándar (n=2). DDA: ácido docosadienoico (DDA); DHLA: ácido dihomo-gamma-linolénico; EDA: ácido eicosadienoico; GLA: ácido gamma-linolénico.

En relación a los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), estos alcanzaron un $15,3 \pm 1,7$ % del total de FAMEs (Fig. 3.13a), con una producción de $3.783,33 \pm 420,27$ mg 100 g biomasa⁻¹. Aquellos pertenecientes a la serie $\omega 3$ representaron el $7,7 \pm 1,1$ %, mientras que los $\omega 6$ significaron el $7,5 \pm 1,1$ % de los PUFAs (Fig. 3.13b). Los AGs $\omega 3$ y $\omega 6$ mayoritarios fueron el EPA (20:5 $\omega 3$) y el ARA (20:4 $\omega 6$), representando el $46,06 \pm 1,07\%$ y $20,86 \pm 0,01$ % del total de PUFAs, respectivamente (Fig. 3.13c). Estos porcentajes fueron equivalentes a una producción de $1.744,71 \pm 234,08$ y $789,23 \pm 88,07$ mg 100 g biomasa⁻¹, respectivamente (Tabla 3.2). Con respecto al DHA (22:6 $\omega 3$), éste representó el $4,48 \pm 0,39$ % del total de PUFAs (Fig. 3.13c), con una producción de $170,71 \pm 33,44$ mg 100 g biomasa⁻¹ (Tabla 3.2).

3.4. Discusión

Las microalgas poseen la capacidad de sintetizar diversas moléculas con actividad biológica como lípidos, proteínas, carbohidratos, vitaminas, etc. Esto depende de la especie involucrada, así como de su respuesta fisiológica frente a distintos factores como la temperatura, intensidad lumínica, fotoperíodo, concentración de nutrientes, entre otros (Barkia et al., 2019). Sin embargo, la potencialidad de producción de biocompuestos a partir de microalgas, no solo depende de la composición bioquímica de la especie, sino también de su capacidad de producción de biomasa en sistemas de cultivo bajo condiciones controladas (Hu, 2004). En este sentido, las tres especies de diatomeas oleaginosas aisladas de la zona interna del estuario de Bahía Blanca, *N. gregaria*, *C. closterium* y *S. costatum*, han sido reportadas como especies productoras de PUFAs (Popovich et al., 2012; Scholz y Liebezeit, 2012), y pudieron ser cultivadas *in vitro* con el fin de compararlas en términos de crecimiento y producción de biomasa.

Al evaluar el crecimiento de las especies nativas aisladas, *C. closterium* presentó mejores características, reflejadas en una mayor velocidad de crecimiento y un tiempo de duplicación menor. Estos resultados concuerdan con los descritos por diversos autores que han reportado a *C. closterium* como una especie de rápido crecimiento (Liang et al., 2002; Duong et al., 2015; Wang et al., 2019). Sumado a esto, el valor de μ obtenido para *C. closterium* en el presente estudio se encuentra dentro del rango reportado por Kingston

(2009) ($1,84-1,96 \text{ div día}^{-1}$) para otra cepa de la misma especie, en condiciones de crecimiento similares. Por su parte, los valores de μ obtenidos para *S. costatum* y *N. gregaria* fueron similares a los hallados para otras cepas de estas especies, aisladas en 2007 en el mismo sitio de muestreo, con valores de $1,4 \text{ div día}^{-1}$ y $0,8 \text{ div día}^{-1}$, respectivamente (Popovich et al., 2012). La densidad celular alcanzada por *C. closterium* al final de la experiencia superó a la de *N. gregaria* y *S. costatum*. Sin embargo, debido a que existen variaciones entre los volúmenes celulares de estas especies, la densidad celular es considerada inadecuada como una medida de biomasa microalgal relativa (Hillebrand et al., 1999). Por ejemplo, *N. gregaria* alcanzó una densidad celular muy baja y un volumen celular significativamente mayor en comparación con *S. costatum* y *C. closterium*. Por lo tanto, se comparó la producción de biomasa considerando el contenido de carbono por unidad de volumen ($\mu\text{g C mL}^{-1}$). De esta manera, se tiene en cuenta tanto el volumen de las células como la densidad celular alcanzada por el cultivo. En estos términos, no se encontraron diferencias entre *N. gregaria* y *S. costatum*. Sin embargo, *C. closterium* presentó mejores resultados en términos de producción de biomasa, alcanzando un valor máximo de $\approx 14 \mu\text{g C mL}^{-1}$ en el día 6 de cultivo, y valores de volumen celular y contenido de carbono variables, similares a los reportados para otras cepas de *C. closterium* obtenidas de otros ambientes naturales ($125 \mu\text{m}^3$ y 17 pg C cel^{-1} , respectivamente) (Cornet-Barthaux et al., 2007). Considerando estos resultados, *C. closterium* fue la especie seleccionada como mejor opción para evaluar la producción y calidad lipídica de la biomasa obtenida a partir de un cultivo autotrófico en fotobiorreactor.

Se cree que las características morfológicas en las diatomeas exhiben plasticidad fenotípica, y se ha demostrado que la mayoría de las variaciones en ciertas características taxonómicamente importantes, no están controladas genéticamente (Li et al., 2007). Particularmente, *C. closterium* es morfológicamente similar a otras especies, como por ejemplo *Nitzchia longissima* y *N. reversa*, por lo que pueden ser confundidas al microscopio óptico (Li et al., 2007; Vanormelingen et al., 2013). En este sentido, los estudios de filogenia a nivel molecular considerando el gen *rbcL* corroboraron la identificación de la cepa aislada, previamente identificada como *C. closterium* en base a su morfología. En concordancia con

lo reportado por Stock et al., (2019), Vanormelingen et al., (2013), y Li et al., (2007) el análisis de filogenia evidenció la presencia de múltiples linajes dentro del grupo parafilético de *C. closterium*, lo que sugiere la presencia de diferentes subespecies. Incluso la cepa del presente estudio presentó diferencias genéticas que podrían indicar que corresponde a una subespecie distinta. Sin embargo, para llegar a conclusiones certeras acerca de esta presunción se requiere de un análisis exhaustivo que incluya no solo el análisis filogenético, sino también diferentes aspectos morfológicos, reproductivos y ambientales de la cepa, lo cual excede los objetivos de la presente tesis.

La velocidad de crecimiento de *C. closterium* en el fotobiorreactor fue mayor que la registrada para la diatomea *Halamphora coffeaeformis*, también presente en el estuario de Bahía Blanca, creciendo bajo condiciones similares a las del presente estudio (Scodelaro et al., 2020). Por su parte, la producción de biomasa alcanzada ($160 \text{ mg de peso seco L}^{-1}$) fue igual a la producción reportada para otra cepa de *C. closterium* aislada de un criadero chileno de abulón (*Haliotis rufescens*) y creciendo en fotobiorreactor en el mismo medio de cultivo, la misma temperatura y cosechada luego de siete días de cultivo (Silva-Aciares y Riquelme, 2008).

Las diatomeas oleaginosas, cuando son expuestas a condiciones de deficiencia de nutrientes, producen y almacenan gotas lipídicas citoplasmáticas constituidas principalmente por triglicéridos (Maeda et al., 2017). En los cultivos *batch*, el estrés por limitación de nutrientes inhibe la división celular y, paralelamente, induce la síntesis de lípidos. Ambos fenómenos son característicos de la fase estacionaria de crecimiento (Lee, 2016; Gatenby et al., 2003). Esta tendencia fue evidenciada en *C. closterium*, donde el mayor contenido de lípidos neutros se registró durante la fase estacionaria de crecimiento. Este evento, además, coincidió con la disminución de las concentraciones de nitratos y fosfatos por debajo de los valores considerados como limitantes para diatomeas (Shartou et al., 2005; Barnech Bielsa et al., 2016). En el presente estudio, la producción de lípidos alcanzó $\approx 28 \%$ de peso seco, similar a la reportada para una cepa de *C. closterium* obtenida de una colección de cultivos de microalgas de Turquía (20-30 % del peso seco), aunque las

condiciones de cultivo involucraron a un fotobiorreactor tipo *air-lift* empleando diferentes intensidades lumínicas (Demirel et al., 2015).

El análisis de la composición de AGs en *C. closterium* mostró que los SFAs más abundantes fueron los ácidos mirístico (14:0) y palmítico (16:0); el principal MUFA fue el ácido palmitoleico (16:1) y tanto el EPA (20:5 ω 3) como el ARA (20:4 ω 3) fueron los representantes mayoritarios de la fracción de PUFAs. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Scholz y Liebezeit (2012) para 25 diatomeas bentónicas aisladas del mar de Solthörn (Alemania), así como con reportes previos de las diatomeas *N. gregaria*, *S. costatum* y *Halamphora coffeaeformis* aisladas del estuario de Bahía Blanca (Popovich et al., 2012; Popovich et al., 2020). Las diatomeas son consideradas un grupo de microalgas con alto contenido de LC-PUFAs, principalmente EPA, DHA y ARA, los cuales forman parte tanto de los lípidos polares constituyentes de las membranas celulares, como de los lípidos de almacenamiento (Zulu et al., 2018; Sanaa et al., 2018). La composición de PUFAs de *C. closterium* mostró un elevado porcentaje de EPA y ARA, representando \approx 45% y 20% del total de PUFAs, respectivamente. Sin embargo, un alto contenido relativo de PUFAs (% del total de FAMES) no implica necesariamente una buena producción de ácidos grasos. Diversas especies de microalgas han sido evaluadas en relación a la producción de AGs. Matos et al. (2016) compararon la producción de AGs en especies de microalgas pertenecientes a distintas divisiones: *Chlorella vulgaris*, *Spirulina platensis*, *Nannochloropsis gaditana*, *N. oculata*, *Porphyridium cruentum* y la diatomea *Phaeodactylum tricornutum*. Estos autores concluyeron que las especies marinas *N. oculata* y *P. tricornutum* fueron las que lograron una mayor producción de AGs esenciales, equivalente a 3 g EPA en 100 g de biomasa microalgal, valor similar al obtenido para *C. closterium* en el presente estudio. Por su parte, las producciones de DHA (43-80 mg en 100 g de biomasa) y ARA (0-83 mg en 100 g de biomasa) para estas especies, fueron menores que las observadas en *C. closterium* (\approx 170 mg y 790 mg en 100 g de biomasa para DHA y ARA, respectivamente).

3.5. Conclusiones

La posibilidad de emplear microalgas nativas con el objetivo de producir algún metabolito de interés requiere del aislamiento de especies a partir de muestras naturales y

de la evaluación de su capacidad de crecimiento y producción bajo condiciones controladas. El cultivo autotrófico *batch* de *C. closterium* en fotobiorreactor con medio de cultivo f/2, durante 10 días, fue adecuado para inducir la síntesis de lípidos neutros durante la fase estacionaria de crecimiento. La composición de ácidos grasos evidenció el potencial de esta especie para la producción de LC-PUFAs de interés para la industria acuícola y/o alimentaria, principalmente EPA y ARA. Estos resultados sirvieron de base para evaluar diferentes estrategias de cultivo con el fin de incrementar la producción de estos ácidos grasos, cuestión que se abordará en el capítulo siguiente.

CAPÍTULO 4

EL ESTRÉS POR BAJA TEMPERATURA COMO UNA HERRAMIENTA PARA MEJORAR LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS EN *CYLINDROTHECA CLOSTERIUM*

4.1. Introducción

Tal como se expuso en capítulos anteriores, algunas especies de diatomeas son capaces de producir LC-PUFAs, entre ellos se destacan los AGs esenciales EPA y ARA, los cuales son de gran interés para la industria (Bozarth et al., 2009; Adarme-Vega et al., 2012; Yi et al., 2017). Además de PUFAs, estos organismos pueden sintetizar otras moléculas bioactivas, tales como proteínas y esteroides (Levasseur et al., 2020). La bibliografía disponible acerca del uso de diatomeas como fuente de compuestos para las industrias nutracéutica y alimentaria generalmente plantea trabajar bajo el concepto de biorrefinería (Marella y Tiwari, 2020; Bhattacharjya et al., 2020; Popovich et al., 2020; Celi et al., 2022); es decir, se debe procesar la biomasa de manera de obtener y valorizar diferentes compuestos, entre ellos la pared celular silíceo (Martín et al. 2018; Pajot et al. 2022). Sin embargo, el enfoque planteado en esta tesis apunta a la utilización de la biomasa en su conjunto, como fuente de LC-PUFAs y de otros compuestos de alto valor nutricional. En este sentido, el presente capítulo se focaliza en el posible uso de biomasa de la diatomea *C. closterium* con fines acuícolas.

Los alimentos acuícolas formulados, poseen proteínas como componente mayoritario, siendo la harina de pescado la fuente proteica ideal para los mismos (Li et al., 2009). Sin embargo, al igual que sucede con el aceite de pescado, existe un interés creciente en la búsqueda de recursos alternativos. Esto surge a partir de problemas de sostenibilidad, fluctuaciones de la oferta y de los precios de este insumo (Turchini et al., 2009; Tocher, 2015; Maisashvili et al., 2015; FAO, 2018; Hua et al., 2019). En este sentido, diferentes autores han evaluado la utilización de microalgas en alimentos acuícolas como reemplazo parcial de la harina de pescado. Por ejemplo, en piensos destinados a la alimentación del salmón del Atlántico, se logró emplear un 5 - 10% de harina de la diatomea *Nanofrustulum*

sp. y la Prasinophyceae *Tetraselmis* sp. (Kiron et al., 2012). En otro estudio, un 6% de la harina de pescado pudo ser reemplazada exitosamente por biomasa de la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* (Sørensen et al., 2016), sin observarse cambios significativos en el consumo del alimento ni en el crecimiento de los peces.

La composición de esteroides es un factor importante a considerar dadas las necesidades nutricionales de los organismos acuáticos cultivados. Algunos invertebrados marinos, como ostras, mejillones y vieiras, carecen o tienen capacidad limitada para sintetizar esteroides. Sin embargo, estos organismos pueden convertir los fitoesteroides dietarios en otros esteroides necesarios, como el colesterol (Barrett et al., 1995). Asimismo, en lo que respecta a la alimentación de peces en cultivo, el colesterol debe ser aportado en la dieta dado que su ausencia puede producir alteraciones en el metabolismo lipídico (Zhu et al., 2018). Considerando que algunas diatomeas, además de LC-PUFAs, producen proteínas con elevado contenido de aminoácidos esenciales (Brown, 1991) y tanto fitoesteroides como colesterol (Rampen et al., 2010), este grupo de microalgas surge como un recurso nutricional interesante con fines acuícolas.

La composición bioquímica de las microalgas presenta una gran variabilidad, dependiendo de la cepa y de las condiciones de crecimiento a las que son sometidas (Brown, 1991; Luo et al., 2015; Qiao et al., 2016; Gong et al., 2019). Los fotobiorreactores son sistemas cerrados en los cuales es posible llevar a cabo cultivos de microalgas con un control estricto de las condiciones de crecimiento (Acién Fernández et al., 2013). Así, estos sistemas permiten implementar estrategias de cultivo que involucren factores estresantes, con el objetivo de inducir cambios en el metabolismo celular para favorecer la síntesis de compuestos de interés. Borowitzka (2018) define el concepto de estrés como una disrupción repentina o abrupta de la homeostasis celular como consecuencia de la acción de un estresor (cambio de intensidad de luz, temperatura, concentración de nutrientes, etc.). En respuesta a ello, se inducen cambios a nivel metabólico tendientes a intentar restablecer el estado de equilibrio inicial. Es de destacar la variedad y complejidad de respuestas celulares posibles frente a un estresor, ya que diferentes factores estresantes desencadenan procesos particulares que incluso, probablemente, varíen entre taxones.

En el capítulo anterior, se evidenció la síntesis de LC-PUFAs por parte de *C. closterium* al ser cultivada en fotobiorreactor. Asimismo, resulta interesante evaluar estrategias de cultivo empleando diferentes estresores que permitan incrementar su síntesis. La temperatura del cultivo es un factor importante que afecta el crecimiento de las microalgas y puede ser utilizado como un estresor para mejorar el contenido de LC-PUFAs. Éstos son componentes estructurales de las membranas celulares que contribuyen a la señalización celular e intervienen en diferentes funciones fisiológicas de las células (Aussant et al., 2018). En diatomeas, existen evidencias que sugieren que la disminución de la temperatura de cultivo altera la composición de ácidos grasos, incrementando su grado de insaturación para mejorar la fluidez de las membranas celulares (Blanchemain y Grizeau, 1999; Jiang y Gao, 2004). Por su parte, Wang et al. (2019) evaluaron el efecto del estrés por limitación de nitrógeno, transfiriendo cultivos de *C. closterium* en fase exponencial a un medio f/2 carente de nitrógeno. Estos autores observaron que, al inicio de la exposición al estresor, los PUFAs estaban presentes principalmente en las membranas celulares. Sin embargo, luego de 96 horas, los TAGs fueron el principal reservorio de PUFAs, sugiriendo que éstos son reciclados y dirigidos hacia los lípidos de almacenamiento. Asimismo, esta redistribución de los PUFAs hacia los TAGs no solo depende de la especie sino también de las condiciones de crecimiento (Tonon et al., 2002).

De acuerdo a lo expuesto anteriormente y en relación al objetivo general de la tesis, los **objetivos específicos** del presente capítulo se enfocan en evaluar el efecto del estrés térmico en cultivos de *C. closterium*, sobre:

1. los parámetros de crecimiento y de producción de biomasa;
2. la composición de AGs, considerando los extractos de lípidos totales;
3. el contenido y la composición de AGs de cada una de las fracciones lipídicas;
4. la síntesis de TAGs y esteroides en función de los días de cultivo;
5. la composición de esteroides de la biomasa resultante;
6. el contenido de proteínas y la composición aminoacídica de la biomasa.

Para llevar adelante la propuesta experimental, se compararán los parámetros correspondientes a cada una de las condiciones sometidas a estrés por baja temperatura con aquellos obtenidos para los cultivos de *C. closterium* bajo las condiciones experimentales detalladas en el Capítulo 3 de la presente tesis (condición Control).

4.2. Materiales y Métodos

4.2.1 Cultivos de *C. closterium* en fotobiorreactor: estrés por baja temperatura

Se realizaron cultivos de *C. closterium* en fotobiorreactor en un volumen final de 10 litros a partir de una densidad celular inicial de 1.5×10^5 células en fase de crecimiento exponencial. Se realizaron dos tratamientos de estrés térmico por baja temperatura: a) se mantuvo la temperatura a 20°C durante 7 días y, una vez alcanzada la fase estacionaria de crecimiento, ésta se disminuyó a $11 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 3 días (condición EBTEs); y b) se mantuvo la temperatura de cultivo a 20°C durante 3 días y, estando el cultivo en fase exponencial de crecimiento, se disminuyó la temperatura a $11 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 7 días (condición EBTE_x). Estos resultados fueron comparados con los obtenidos luego del cultivo de *C. closterium* a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 10 días (condición Control). Finalmente, la biomasa fue cosechada, liofilizada y almacenada a -80°C hasta su uso. Para más detalles acerca de las condiciones empleadas para los cultivos en fotobiorreactor consultar la Sección 2.4 del Capítulo 2 de la presente tesis.

4.2.2. Parámetros de crecimiento y producción de biomasa

Se tomaron muestras diarias para determinar DC (células mL⁻¹), μ (div día⁻¹), TD (horas) y PS (g L⁻¹) de acuerdo a lo detallado en la Sección 2.5 del Capítulo 2 (Ecuaciones 2.1, 2.2, 2.3 y 2.4, respectivamente). El volumen celular (V ; μ^3) se calculó de acuerdo con la Ecuación 3.3 (Capítulo 3, Sección 3.2.2.2).

4.2.3. Determinación del contenido y composición lipídica de la biomasa

4.2.3.1. Estimación del contenido de lípidos neutros

Las gotas lipídicas intracelulares fueron detectadas mediante la utilización de los colorantes Sudán IV y Rojo Nilo, y su observación al microscopio óptico y de fluorescencia, respectivamente, de acuerdo a lo detallado en la Sección 2.6.1 del Capítulo 2.

4.2.3.2. Determinación del contenido de lípidos totales y de las fracciones lipídicas de *C. closterium*

A partir de biomasa liofilizada se realizó una extracción de lípidos totales (ver en detalle en la Sección 2.6.2 del Capítulo 2) y posteriormente se cuantificó el contenido lipídico (% de PS) mediante gravimetría, según la metodología descrita en la Sección 2.6.3 del Capítulo 2. Los extractos de lípidos totales fueron fraccionados en LN, FL y GL, determinándose mediante gravimetría el contenido de cada fracción (Sección 2.6.4 del Capítulo 2).

4.2.3.3. Cuantificación de TAGs y esteroides

Se realizó la cuantificación de TAGs y esteroides para los días 2, 4, 7 y 9 de cultivo, mediante cromatografía de capa fina acoplada a su cuantificación espectrofotométrica, siguiendo la metodología detallada en la Sección 2.6.5 del Capítulo 2.

4.2.3.4. Identificación de ácidos grasos y esteroides mediante cromatografía gaseosa

Para determinar la composición de AGs, tanto de los extractos lipídicos como de las fracciones lipídicas (LN, GL y FL), los AGs fueron convertidos químicamente en FAMES y analizados mediante cromatografía gaseosa (Sección 2.7.1, Capítulo 2). Mediante esta técnica, también se analizó la composición de esteroides de la biomasa de acuerdo a lo detallado en la Sección 2.7.2 del Capítulo 2.

4.2.3.5. Estimación de la producción de ácidos grasos

La producción de AGs (mg 100 g de biomasa⁻¹) fue estimada a partir del contenido de ácidos grasos expresados como % del total de FAME (ver Sección 2.8 de Capítulo 2).

4.2.4. Determinación del contenido proteico y caracterización de la composición de aminoácidos de la biomasa

4.2.4.1. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de las proteínas presentes en la biomasa de *C. closterium* cultivada bajo condiciones control y de estrés térmico (EBTEs y EBTE_x) se llevó a cabo mediante el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976). El mismo se fundamenta en el cambio de absorbancia que sufre el colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 al unirse a las proteínas. Este cambio puede ser detectado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 595 nm. El primer paso consistió en realizar una extracción de proteínas utilizando un buffer de lisis de composición: Tris HCl 100 mM (pH 7,5), NaCl 300 mM, EDTA 4 mM, EGTA 4 mM, Tritón X-100 0.2%, Nonidet P-402%). Las muestras fueron agitadas vigorosamente y centrifugadas a 14.000 ×g durante 15 minutos y a 4°C, con el fin de remover el material insoluble. Posteriormente, a partir de una alícuota del sobrenadante resultante, se realizó la reacción colorimétrica Bradford empleando albúmina de suero bovino como estándar.

4.2.4.2. Análisis de la composición de aminoácidos

Para determinar el perfil de aminoácidos se emplearon 6 mg de biomasa liofilizada. En primer lugar, se llevó a cabo una hidrólisis ácida adicionando 1 mL de ácido metanosulfónico 4 N conteniendo triptamina 0,2% (p / v) a 115 °C durante 22 horas, en tubos sellados al vacío. Los aminoácidos libres resultantes se separaron mediante cromatografía de intercambio catiónico utilizando un analizador automático de aminoácidos (Biochrom 30, GE-Healthcare Life Sciences, Reino Unido), soluciones de citrato de sodio de diferente pH final (pH = 2,2, 3,2, 4,25 y 6,45) y una solución de hidróxido de sodio 0,4 M (pH = 13,6). A continuación, el extracto resultante se volvió a derivatizar usando ninhidrina y los productos se detectaron mediante espectrofotometría visible a 570 nm y 440 nm. Finalmente, los aminoácidos se identificaron mediante la comparación de sus tiempos de retención con los correspondientes a estándares comerciales de aminoácidos (18AA-Sigma y estándares individuales para L-metionilsulfona, L-norleucina, L-metioninsulfóxido, L-triptófano y L-ornitina). La cuantificación se realizó utilizando L-norleucina como patrón interno (Simpson et al., 1976; Brown, 1991).

4.2.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos fue realizado utilizando el software Infostat (Di Rienzo et al., 2018). Las comparaciones de diferentes parámetros se realizaron entre las distintas condiciones de cultivo (Control, EBTEs y EBTE_x). A través de un análisis de ANOVA simple se determinó si existen diferencias significativas entre las tres condiciones de crecimiento, y mediante la Prueba de Tukey se analizó entre qué condiciones se encontraban tales diferencias ($p < 0,05$).

4.3. Resultados

4.3.1. Crecimiento y producción de biomasa

Los cambios de color que fueron presentando los cultivos durante las experiencias se muestran en la Fig. 4.1.

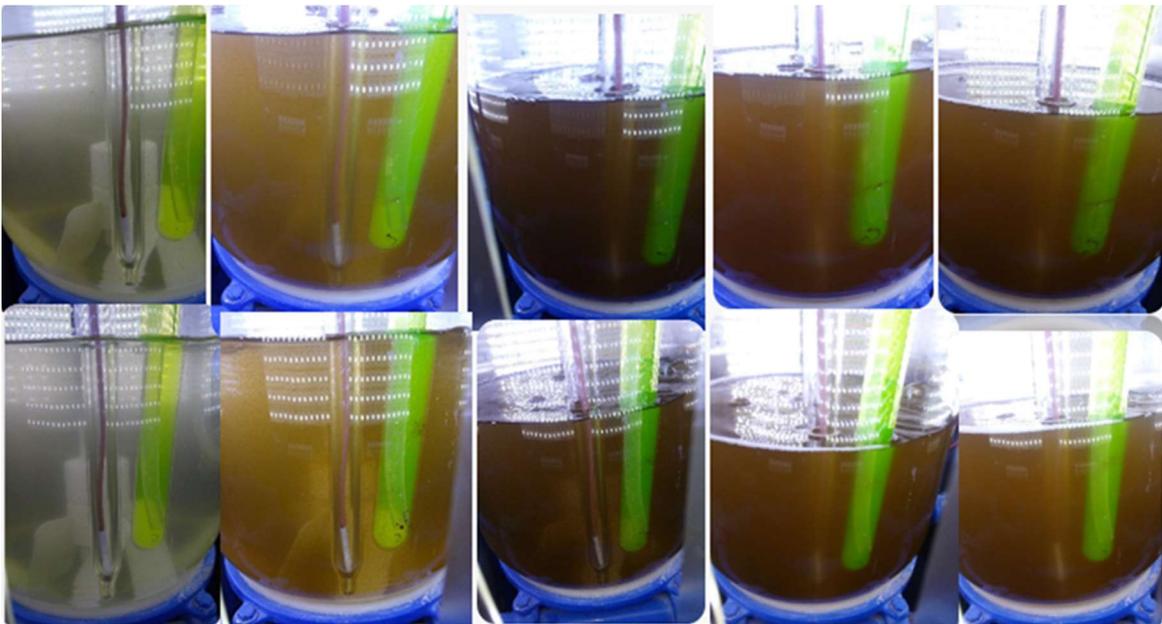


Figura 4.1. Cultivos en fotobiorreactor bajo las condiciones de estrés térmico. En la figura se muestran los cambios en la coloración de los cultivos en fotobiorreactor a los días 0, 2, 4, 8 y 9 (de izquierda a derecha), para las condiciones de estrés térmico EBTEs (arriba) y EBTE_x (abajo). Los cultivos correspondientes a la condición control pueden observarse en el Capítulo 3.

La cinética de crecimiento y de producción de biomasa de *C. closterium* cultivada a 20°C (Control) y bajo las dos condiciones de estrés térmico (EBTEx y EBTEs) se muestran en la Figura 4.2. *C. closterium* presentó una velocidad de crecimiento similar para todas las condiciones ensayadas, evidenciando un comportamiento exponencial durante los primeros días de cultivo (Fig. 4.2a). La densidad celular alcanzada al final del cultivo fue similar para las condiciones control y EBTEs ($p > 0,05$), mientras que fue significativamente menor al aplicar el estrés térmico durante la fase exponencial de crecimiento (condición EBTEx) ($p < 0,05$) (Fig. 4.2a; Tabla 4.1).

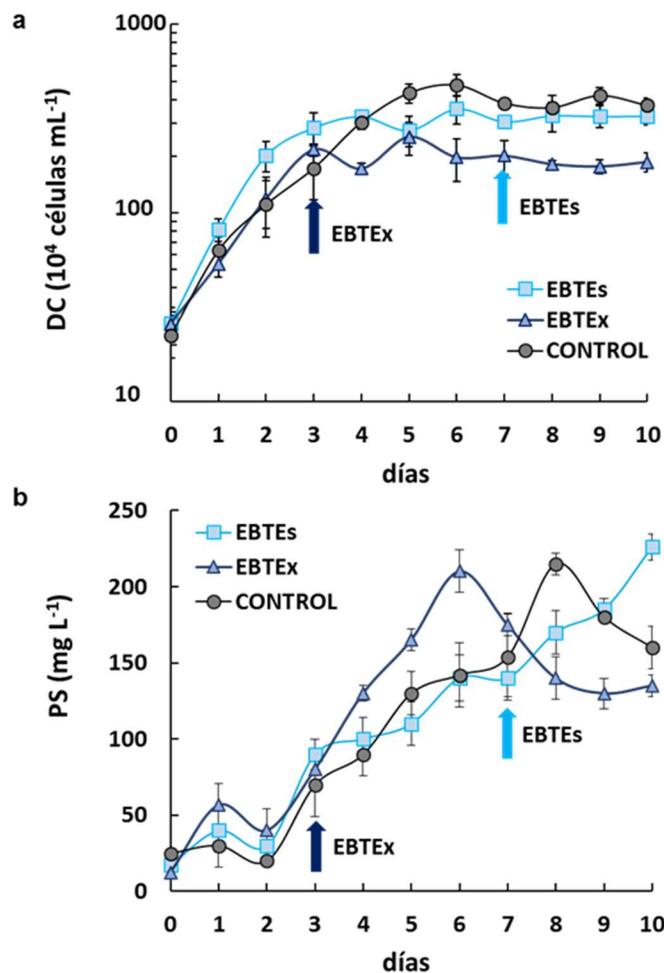


Figura 4.2. Cinética de crecimiento y de producción de biomasa obtenidas para *C. closterium* aplicando diferentes temperaturas de cultivo. a) Densidad celular (DC) y b) producción de biomasa (PS) obtenidas para las distintas condiciones ensayadas: control, EBTEs y EBTEx. Los valores representan el promedio \pm desvío estándar ($n = 3$).

En relación a la producción de biomasa, inicialmente ésta evidenció una fase de latencia durante la cual el PS no sufrió cambios significativos en ninguna de las condiciones testeadas (Fig. 4.2b). La producción máxima se observó en los días 6 (EBTE_x) y 8 (Control) de cultivo, respectivamente. Luego, ambas condiciones mostraron un marcado descenso de biomasa hacia el día 10. Sin embargo, al aplicar el estrés térmico al inicio de la fase estacionaria (EBTE_s), se logró una producción de biomasa sostenida, alcanzando el valor máximo al final de la experiencia (Fig. 4.2b y Tabla 4.1). Los parámetros μ y TD no presentaron diferencias significativas entre las tres condiciones ensayadas ($p > 0,05$); mientras que el volumen celular se incrementó significativamente en ambas condiciones de estrés térmico (EBTE_s y EBTE_x), en relación al control ($p < 0,05$) (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Parámetros de crecimiento y productivos obtenidos para las diferentes condiciones de temperatura ensayadas. Velocidad de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (TD), densidad celular (DC), volumen celular (VC) y peso seco (PS) de *C. closterium* cultivada a 20°C (Control), o bien, sometida a estrés térmico durante la fase estacionaria (EBTE_s) y exponencial (EBTE_x) de crecimiento. Los valores representan el promedio \pm desvío estándar ($n = 3$). Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

	Control	EBTE _s	EBTE _x
μ (div día ⁻¹)	1,13 \pm 0,40 ^a	1,30 \pm 0,20 ^a	1,05 \pm 0,30 ^a
D (h)	23,75 \pm 10,47 ^a	18,75 \pm 2,64 ^a	24,11 \pm 6,36 ^a
DC (N° cel mL ⁻¹)*	3723040 \pm 334905 ^c	3269280 \pm 204404 ^b	1864667 \pm 210308 ^a
VC (μm^3)*	86,03 \pm 31,84 ^a	144,29 \pm 34,61 ^b	153,38 \pm 44,89 ^b
PS (mg L ⁻¹)*	160 \pm 14 ^b	226 \pm 08 ^c	135 \pm 07 ^a

*Valores obtenidos para el día 10 de cultivo.

4.3.2. Lípidos totales y fraccionamiento lipídico

El contenido de lípidos totales representó un 28% del PS para las condiciones control y EBTE_s, mientras que para EBTE_x alcanzó \approx 20% PS. En cuanto a las fracciones lipídicas, los LN fueron los mayoritarios, seguidos por los GL y FL para todas las condiciones de cultivo ensayadas (Fig. 4.3a). Si bien las diferentes condiciones de estrés térmico no afectaron la distribución porcentual de las fracciones (Fig. 4.3a), cuando los valores fueron expresados como mg L⁻¹, la producción de LN fue significativamente mayor en la condición de estrés EBTE_s ($p < 0,05$) (Fig. 4.3b). Particularmente, los TAGs evidenciaron un incremento

proporcional a los días de cultivo, alcanzando valores máximos durante la fase estacionaria de crecimiento (Fig. 4.4). Considerando las condiciones ensayadas, la máxima producción de TAGs se obtuvo al día 10 de cultivo, luego de aplicar el estrés térmico durante la fase estacionaria de crecimiento (EBTEs) (Fig. 4.4).

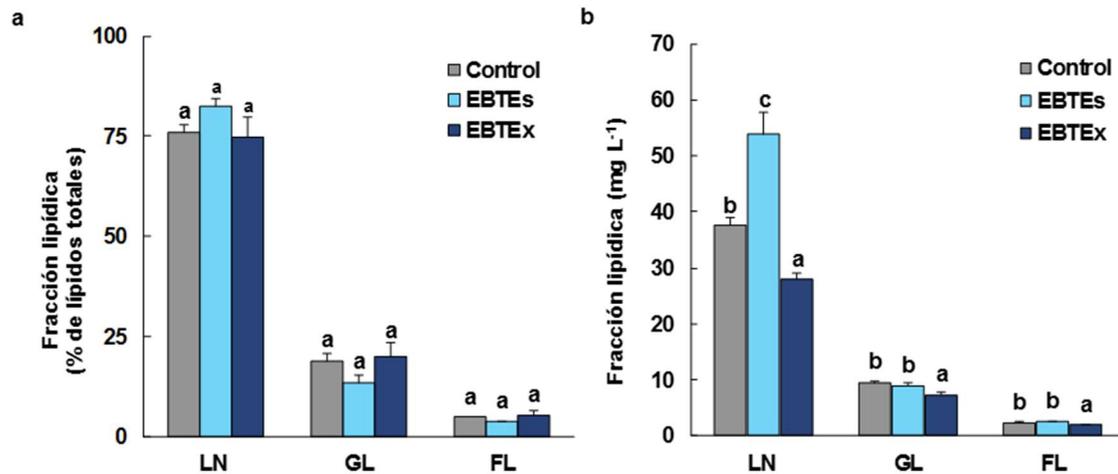


Figura 4.3. Efecto de la temperatura de cultivo sobre las fracciones lipídicas de *C. closterium*. a) Contenido de lípidos neutros (LN), glicolípidos (GL) y fosfolípidos (FL) expresados como porcentaje (%) de lípidos totales; b) producción de LN, GL y PL (mg L⁻¹) en *C. closterium* obtenida para las tres condiciones de cultivo ensayadas: control, y estrés por baja temperatura en fase estacionaria (EBTEs) y exponencial (EBTEx). Las letras diferentes indican diferencias significativas por fracción lipídica ($p < 0,05$).

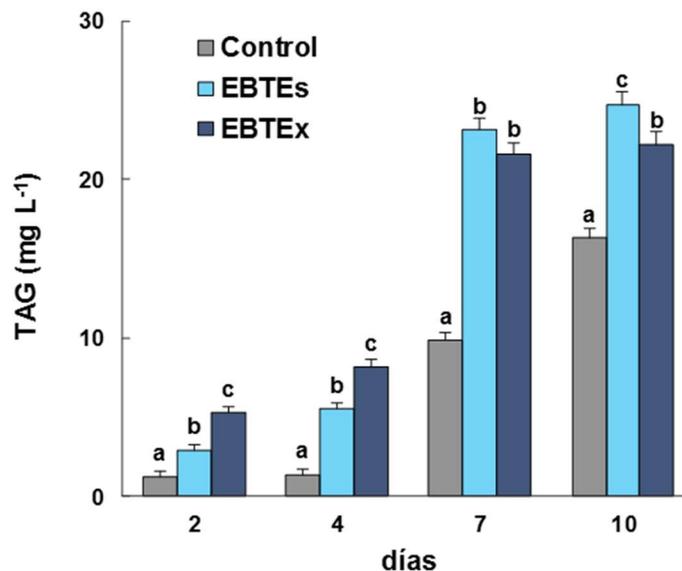


Figura 4.4. Producción lipídica de *C. closterium* en función del tiempo de cultivo. Cuantificación de TAGs (mg L⁻¹) luego de 2, 4, 7 y 10 días de cultivo bajo las condiciones Control, EBTEs y EBTEx. Los valores corresponden al valor promedio \pm desvío estándar ($n = 3$). Las letras indican diferencias significativas entre condiciones por día de cultivo ($p < 0,05$).

Adicionalmente, la síntesis de TAGs fue detectada mediante microscopía óptica y de fluorescencia (Fig. 4.5). Los cultivos en fase exponencial de crecimiento presentaron células con numerosas gotas lipídicas, de tamaño reducido, dispersas en el citoplasma, mientras que, hacia el final de la experiencia, la mayoría de las células presentaron 2 ó 3 gotas lipídicas de gran tamaño (Fig. 4.5).

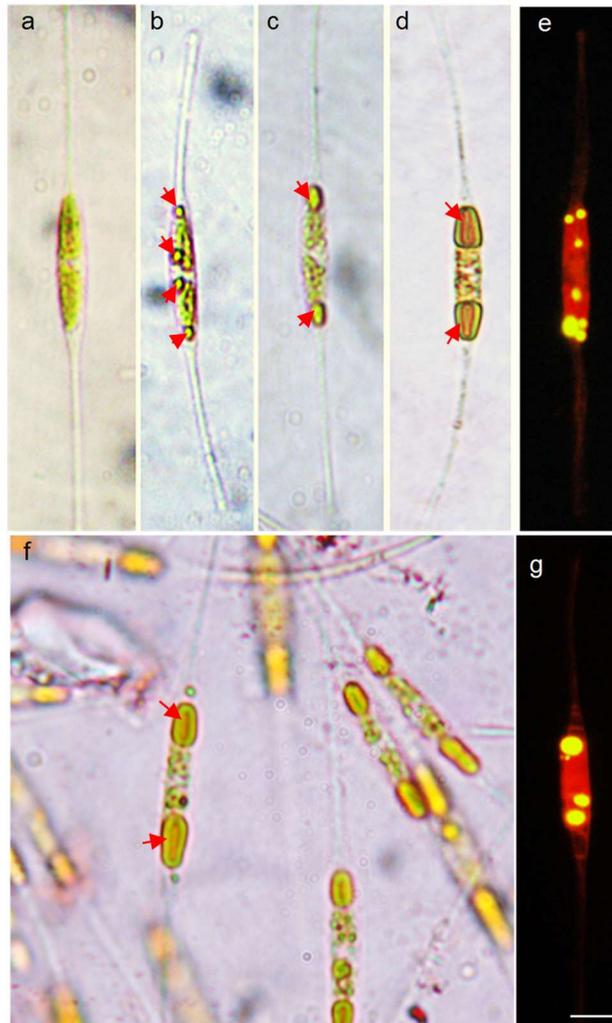


Figura 4.5. Gotas lipídicas intracelulares en *C. closterium*. a-g. Luego de su exposición al estrés térmico durante la fase de crecimiento estacionario (EBTEs), en los días 2 (a), 4 (b y e), 7 (c) y 10 (d, f y g) de cultivo. Células teñidas con SUDAN IV (a-d y f) y observadas con microscopio óptico. Las flechas rojas señalan gotas lipídicas citoplasmáticas. Células teñidas con Rojo Nilo (e y g) y observadas mediante microscopía de fluorescencia. (Barra de escala = 5 μ m)

4.3.3. Composición de ácidos grasos

La composición de ácidos grasos de cada una de las condiciones experimentales ensayadas puede observarse en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2 Composición de ácidos grasos de *C. closterium*. Contenido relativo de ácidos grasos (% del total de FAMES) obtenido a partir de extractos de lípidos totales de *C. closterium* cultivada bajo condiciones de control, EBTEs y EBTE_x. La tabla muestra los valores promedio \pm desvío estándar (n = 3). Las letras indican diferencias estadísticamente significativas (p <0,05) entre las condiciones ensayadas.

Ácidos grasos	Lípidos totales		
	CONTROL	EBTEs	EBTE _x
Saturados (SFAs)			
C 14:0	10,46 \pm 0,46 ab	10,90 \pm 0,15 b	10,18 \pm 0,27 a
C 15:0	0,38 \pm 0,04 a	0,38 \pm 0,01 a	0,73 \pm 0,02 b
C 16:0	31,56 \pm 0,48 c	24,78 \pm 0,11 b	21,76 \pm 1,19 a
C 17:0	0,09 \pm 0,02	nd	nd
C18:0	3,86 \pm 0,15 c	0,50 \pm 0,05 b	0,35 \pm 0,03 a
C 20:0	0,38 \pm 0,02 c	0,14 \pm 0,01 b	0,10 \pm 0,01 a
C 22:0	0,19 \pm 0,03	nd	nd
C 24:0	0,10 \pm 0,07 b	nd	0,04 \pm 0,01 a
Monoinsaturados (MUFAs)			
C 14:1	nd	nd	0,10 \pm 0,01
C 16:1	25,68 \pm 0,55 a	33,94 \pm 1,11 c	30,16 \pm 1,63 b
C 17:1	0,88 \pm 0,01 a	1,63 \pm 0,13 b	2,47 \pm 0,07 c
C 18:1 ω 9	9,80 \pm 0,13 b	5,28 \pm 0,14 a	4,31 \pm 0,12 a
C 24:1 ω 9	0,40 \pm 0,15 a	0,81 \pm 0,20 b	0,59 \pm 0,07 ab
Poliinsaturados (PUFAs)			
C 18:2 ω 6 (LA)	2,36 \pm 0,14 a	3,10 \pm 0,10 a	5,78 \pm 1,00 b
C 18:3 ω 6 (GLA)	0,87 \pm 0,06 a	1,17 \pm 0,15 b	0,91 \pm 0,04 a
C 20:2 ω 6 (EDA)	0,82 \pm 0,04 a	1,50 \pm 0,02 b	1,75 \pm 0,17 c
C 20:3 ω 6 (DHHA)	0,21 \pm 0,01 a	0,32 \pm 0,11 b	0,17 \pm 0,02 a
C 20:4 ω 6 (ARA)	3,00 \pm 0,36 a	4,20 \pm 0,21 b	3,11 \pm 0,18 a
C 20:5 ω 3 (EPA)	7,05 \pm 0,95 a	10,20 \pm 0,77 b	15,46 \pm 1,51 c
C 22:2 ω 6 (DDA)	0,10 \pm 0,01 a	nd	0,15 \pm 0,02 a
C 22:6 ω 3 (DHA)	0,69 \pm 0,14 a	1,23 \pm 0,08 b	1,52 \pm 0,30 b
Σ SFAs	47,97 \pm 1,49 b	37,07 \pm 0,17 ab	33,51 \pm 1,36 a
Σ MUFAs	36,70 \pm 0,21 a	41,35 \pm 0,43 b	37,64 \pm 1,69 a
Σ PUFAs	15,28 \pm 1,70 a	21,64 \pm 0,80 b	28,85 \pm 3,04 c
Σ ω 3	7,74 \pm 1,08 a	11,43 \pm 0,80 b	16,98 \pm 1,79 c
Σ ω 6	7,50 \pm 0,68 a	10,21 \pm 0,10 ab	11,72 \pm 1,27 b
Σ ω 9	10,19 \pm 0,35 b	6,08 \pm 1,14 a	4,91 \pm 0,06 a

Los análisis cromatográficos revelaron un incremento en el contenido de PUFAs (% del total de FAMES) a expensas de una disminución de los SFA, como respuesta al estrés térmico por baja temperatura independientemente de la fase en la cual fue aplicado. Asimismo, el contenido de PUFAs fue significativamente mayor para la condición EBTE_x, debido principalmente a un aumento del contenido relativo de EPA ($p < 0,05$). Por su parte, el DHA mostró un incremento significativo en ambas condiciones de estrés térmico, mientras que el ARA sólo lo demostró en la condición EBTE_s ($p < 0,05$). La disminución del porcentaje de SFA se debió principalmente a los ácidos palmítico (16:0) y esteárico (18:0). El porcentaje total de MUFA solo se incrementó en la condición EBTE_s, debido al ácido palmitoleico (16:1).

4.3.4. Producción de ácidos grasos

Por otra parte, cuando el contenido de ácidos grasos fue expresado en términos productivos ($\text{g } 100 \text{ g de biomasa}^{-1}$), ambos tratamientos de estrés térmico mostraron un incremento similar en la producción de PUFAs, por encima del nivel obtenido para la condición control (Fig. 4.6a). Los PUFAs $\omega 3$ incrementaron de 1,91 a 2,96 $\text{g } 100 \text{ g de biomasa}^{-1}$ en ambas condiciones de estrés térmico (EBTE_s y EBTE_x) (Fig. 4.6b). Esto se explica principalmente por el aumento significativo en la producción de EPA y DHA ($p < 0,05$), los cuales alcanzaron un valor similar en ambas condiciones de estrés térmico ($p > 0,05$) (Fig. 4.6c). En relación a los PUFAs $\omega 6$, su producción ($\text{g } 100 \text{ g biomasa}^{-1}$) fue significativamente mayor bajo la condición EBTE_s (Fig. 4.6b), debido principalmente al incremento de ARA (Fig. 4.6c).

En la Tabla 4.3 se presenta la composición de AGs de cada una de las fracciones lipídicas obtenidas. Los resultados evidenciaron cambios en las cantidades relativas (% del total de FAMES) de SFAs, MUFAs, y PUFAs. Para la condición EBTE_s, las cantidades de SFAs y PUFAs en la fracción LN disminuyeron con respecto al control, a expensas de un incremento en los MUFAs. Por su parte, en la misma fracción bajo la condición EBTE_x, la proporción de SFAs también disminuyó, aunque en este caso fue acompañada de un incremento en el contenido relativo de MUFAs y PUFAs. Los valores máximos de PUFAs se

encontraron en la fracción de GL, representando el 26,61 % y 22,71 % del total de FAMES para las condiciones EBTE_x y EBTE_s, respectivamente.

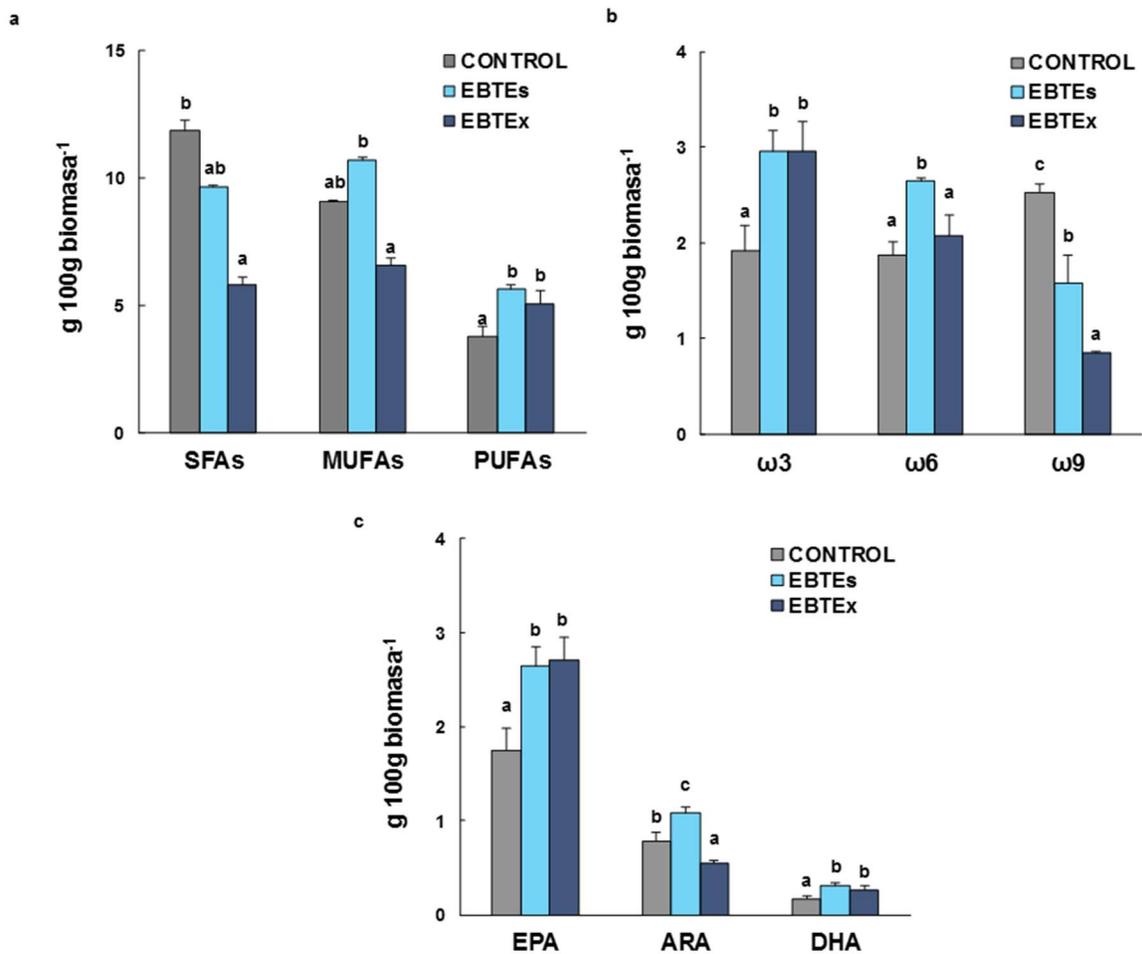


Figura 4.6. Análisis de la producción de ácidos grasos de *C. closterium*. Se muestran los resultados, expresados en gramos cada 100 g de biomasa ($\text{g } 100 \text{ g biomasa}^{-1}$) correspondientes a **a)** ácidos grasos saturados (SFAs), monoinsaturados (MUFAs) y poliinsaturados (PUFAs); **b)** PUFAs ω 3, 6 y 9; y **c)** ácidos grasos eicosapentaenoico (EPA), araquidónico (ARA) y docosahexaenoico (DHA) para las condiciones control, EBTE_s y EBTE_x. El factor de conversión (F) utilizado fue 0,88 para las condiciones Control y EBTE_x y 0,90 para la condición EBTE_s. Los valores se presentan como un promedio \pm su desviación estándar ($n = 3$). Las letras representan diferencias significativas ($p < 0,05$) para cada valor.

Tabla 4.3. Composición de ácidos grasos de las fracciones lipídicas de *C. closterium*. Los valores se expresan como contenido relativo (% del total de FAMES) y en términos productivos (mg en 100 g de biomasa⁻¹). Para estimar la producción de ácidos grasos (expresada como mg 100 g de biomasa⁻¹), los factores de conversión (F) utilizados para las condiciones control, EBTEs y EBTE_x, respectivamente, fueron LN: 0,73, 0,79 y 0,71; GL: 0,12, 0,09 y 0,13; y PL: 0,04, 0,03 y 0,04. Los valores corresponden al valor promedio ± la desviación estándar (n = 3). Las letras diferentes indican diferencias significativas entre condiciones de crecimiento (p<0,05).

	Control		EBTEs		EBTE _x	
	% del total de FAMES	mg en 100g biomasa ⁻¹	% del total de FAMES	mg en 100g biomasa ⁻¹	% del total de FAMES	mg en 100g biomasa ⁻¹
LN						
SFAs	46,09 ± 0,27 ^c	7120 ± 42,25 ^b	41,74 ± 0,34 ^b	7770 ± 63,54 ^c	36,52 ± 0,52 ^a	3860 ± 55,25 ^a
MUFAs	38,76 ± 0,29 ^a	5990 ± 45,02 ^b	44,51 ± 0,22 ^c	8290 ± 41,42 ^c	42,17 ± 0,25 ^b	4460 ± 27,18 ^a
PUFAs	15,14 ± 0,03 ^b	2340 ± 5,25 ^a	13,74 ± 0,51 ^a	2554 ± 86,23 ^b	21,31 ± 0,69 ^c	2250 ± 73,58 ^a
ω3	7,72 ± 0,11 ^a	1190 ± 16,98 ^a	7,34 ± 0,38 ^a	1370 ± 71,07 ^{ab}	13,80 ± 0,72 ^b	1440 ± 75,48 ^b
ω6	7,42 ± 0,08 ^b	1150 ± 12,46 ^b	6,40 ± 0,16 ^a	1190 ± 23,02 ^b	7,55 ± 0,18 ^b	810 ± 20,89 ^a
EPA	7,10 ± 0,11 ^a	1097 ± 13,77 ^a	6,73 ± 0,33 ^a	1252 ± 62,15 ^b	12,67 ± 0,68 ^b	1339 ± 72,25 ^b
DHA	0,59 ± 0,05 ^a	91 ± 3,20 ^a	0,60 ± 0,04 ^a	111 ± 6,54 ^b	0,93 ± 0,07 ^b	98 ± 7,14 ^{ab}
ARA	2,92 ± 0,08 ^c	451 ± 1,37 ^b	2,70 ± 0,07 ^b	502 ± 13,12 ^b	2,18 ± 0,18 ^a	230 ± 19,46 ^a
GL						
SFAs	50,52 ± 0,93 ^c	327 ± 6,01 ^c	42,53 ± 0,37 ^b	149 ± 1,20 ^a	40,32 ± 1,64 ^a	203 ± 8,25 ^b
MUFAs	30,02 ± 0,66 ^a	195 ± 4,25 ^c	33,51 ± 0,62 ^b	116 ± 2,19 ^a	30,07 ± 1,06 ^a	151 ± 5,35 ^b
PUFAs	19,45 ± 0,53 ^a	126 ± 3,44 ^{ab}	22,71 ± 0,32 ^{ab}	79 ± 1,02 ^a	26,61 ± 2,68 ^c	149 ± 13,47 ^b
ω3	6,34 ± 0,29 ^a	41 ± 1,88 ^b	8,70 ± 0,27 ^b	30 ± 0,93 ^a	12,12 ± 0,95 ^c	61 ± 4,78 ^c
ω6	13,12 ± 0,30 ^a	85 ± 1,91 ^b	14,01 ± 0,14 ^{ab}	49 ± 0,39 ^a	17,48 ± 1,89 ^b	88 ± 9,50 ^b
EPA	6,08 ± 0,29 ^a	39 ± 1,79 ^b	8,39 ± 0,19 ^b	29 ± 0,65 ^a	11,70 ± 0,88 ^c	59 ± 4,42 ^c
DHA	0,26 ± 0,16 ^a	2 ± 0,13 ^b	0,31 ± 0,09 ^a	1 ± 0,30 ^a	0,42 ± 0,07 ^a	2 ± 0,37 ^b
ARA	2,12 ± 0,30 ^b	7 ± 0,49 ^b	1,90 ± 0,04 ^b	7 ± 1,32 ^a	1,38 ± 0,17 ^a	7 ± 0,83 ^a
FL						
SFAs	47,32 ± 2,68 ^a	24 ± 1,48 ^b	42,67 ± 1,83 ^a	14 ± 0,58 ^a	43,82 ± 0,54 ^a	18 ± 0,23 ^{ab}
MUFAs	39,29 ± 1,51 ^a	20 ± 0,77 ^b	39,31 ± 1,29 ^a	11 ± 0,31 ^a	36,61 ± 0,42 ^a	15 ± 0,18 ^{ab}
PUFAs	13,4 ± 1,18 ^a	7 ± 0,60 ^a	21,35 ± 1,45 ^b	7 ± 0,45 ^a	19,57 ± 0,12 ^b	8 ± 0,05 ^b
ω3	6,00 ± 0,89 ^a	3 ± 0,53 ^a	11,81 ± 0,58 ^b	4 ± 0,18 ^{ab}	12,32 ± 0,03 ^b	5 ± 0,02 ^b
ω6	7,39 ± 0,32 ^a	4 ± 0,19 ^b	9,54 ± 0,89 ^b	3 ± 0,30 ^a	7,25 ± 0,08 ^a	3 ± 0,03 ^a
EPA	4,27 ± 0,89 ^a	2 ± 0,38 ^a	7,68 ± 0,47 ^b	2 ± 0,15 ^a	8,54 ± 0,09 ^b	4 ± 0,04 ^b
DHA	1,73 ± 0,76 ^a	1 ± 0,08 ^a	4,13 ± 0,69 ^b	1 ± 0,22 ^a	3,79 ± 0,13 ^b	2 ± 0,05 ^b
ARA	3,81 ± 0,32 ^a	2 ± 0,15 ^b	4,84 ± 0,58 ^a	1 ± 0,01 ^a	3,83 ± 0,21 ^a	1 ± 0,09 ^a

Sin embargo, al expresar el contenido de AGs como mg 100 g de biomasa⁻¹, los resultados revelaron que los LN fueron cuantitativamente el principal recurso de ácidos grasos, obteniéndose el valor máximo de PUFAs (2.554 mg 100 g biomasa⁻¹) en la fracción de LN, bajo la condición EBTEs. Considerando los AGs esenciales, los mayores porcentajes de ω 3 and ω 6 respecto al control fueron detectados en la fracción de GL. Sin embargo, en términos productivos (mg 100 g biomasa⁻¹), la principal fuente de ácidos grasos ω 3 y ω 6 fue la fracción de LN para todas las condiciones testeadas. El EPA aumentó significativamente en ambos tratamientos de estrés térmico ($p < 0,05$), alcanzando valores de 1.252 mg y 1.339 mg 100 g de biomasa⁻¹ en la fracción de LN para las condiciones EBTEs y EBTE_x, respectivamente. Con respecto al DHA y ARA, los valores máximos fueron detectados en la fracción lipídica dominante (LN) luego de aplicar estrés térmico durante la fase estacionaria.

Finalmente, el contenido relativo (% del total de FAMES) de ω 3 y ω 6 correspondientes a la condición EBTEs fue comparado con los valores reportados para diferentes aceites de pescado (Tabla 4.4). En este sentido, *C. closterium* presentó un porcentaje mayor de ARA, un contenido similar de EPA y un valor de DHA más bajo que el reportado para los diferentes aceites de pescado.

Tabla 4.4. Comparación entre los ácidos grasos esenciales de *C. closterium* y diferentes aceites de pescado. Los valores que se muestran para *C. closterium* (en % del total de FAMES) corresponden a la condición de estrés térmico aplicado en fase de crecimiento estacionario (EBTEs). * De Silva et al. (2011)

	*Anchoa	*Arenque	*Capelán	*Arenque americano	<i>C. closterium</i>
EPA	7.6-22.0	3.9-15.2	6.1-8.0	11.1-16.3	10.2
ARA	0.1	<1	0.2	0.2	4.2
DHA	9.0-12.7	2.0-7.8	3.7-6.0	4.8-13.8	1.2

4.3.5. Producción y composición de esteroides

En relación a los esteroides de *C. closterium*, ambas condiciones de estrés térmico por baja temperatura (EBTEs y EBTE_x) indujeron un incremento similar en comparación con la condición control (Fig. 4.7a).

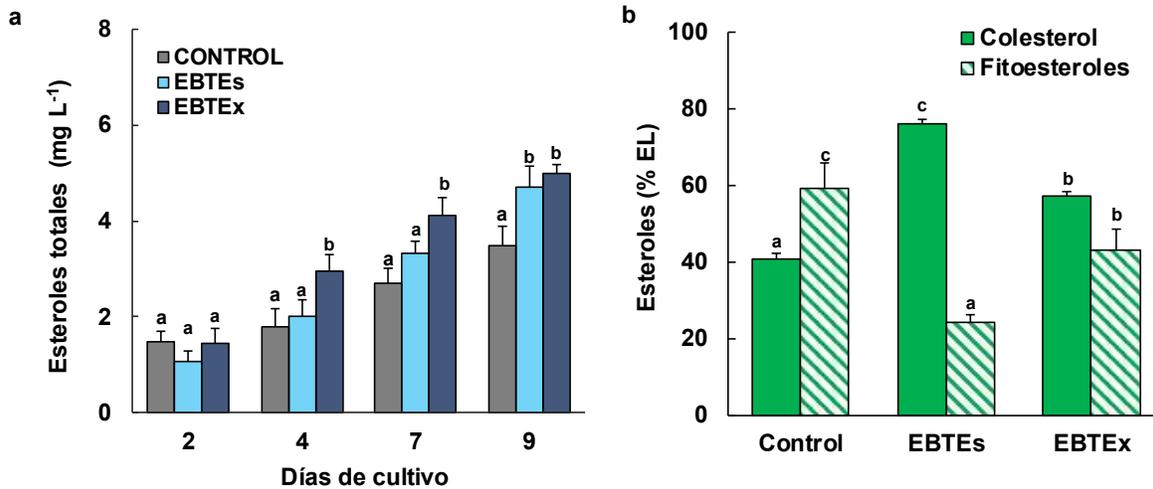


Figura 4.7. Esteroles de *C. closterium*. **a)** Determinación espectrofotométrica del contenido total de esteroles en *C. closterium* (mg L⁻¹) a los 2, 4, 7 y 9 días de cultivo para las condiciones Control, EBTEs y EBTEx. **b)** Cantidades relativas expresado como % de esteroles libres (% EL) de fitoesteroles totales y colesterol en las condiciones ensayadas. Los valores se presentan como promedio ± desviación estándar (n = 3). Las letras representan diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) entre condiciones.

El análisis de la composición de esteroles mediante cromatografía gaseosa obtenido para cada condición experimental se muestra en la Tabla 4.5. El colesterol (colest-5-en-3 β -ol) fue el predominante en todas las condiciones experimentales estudiadas. Además, se observó un incremento significativo en su concentración debido al estrés por baja temperatura (p < 0,05) (Tabla 4.5), representando un 41% (Control), 76% (EBTEs) y 57% (EBTEx) del total de esteroles libres. Si bien el 24-metilcolesta-5,22-dien-3 β -ol representó el 32% del total esteroles libres en la condición control, se observó una disminución significativa de su contenido en ambas condiciones de estrés térmico (Tabla 4.5).

Tabla 4.5. Perfil de esteroides de *C. closterium*. Se muestran los valores. La tabla muestra para las condiciones control, EBTEs y EBTEEx mediante cromatografía gaseosa. Los valores se presentan como promedio \pm desviación estándar (n = 3). Las letras diferentes representan diferencias significativas en relación a la condición control (p <0,05).

Nombre sistemático de esteroides	TRR *	Esteroides ($\mu\text{g L}^{-1}$ de esteroides libres)		
		Control	EBTEs	EBTEEx
No identificado	0,86	37,7 \pm 7,76 a	11,97 \pm 2,10 b	12,62 \pm 0,34 b
No identificado	0,89	13,2 \pm 3,45 a	nd	9,27 \pm 3,14 a
No identificado	0,92	nd	8,50 \pm 1,30	nd
No identificado	0,93	nd	6,01 \pm 1,11	nd
Colest-5-en-3 β -ol	0,98	630,0 \pm 78,93 b	1200,00 \pm 9,12 c	490,00 \pm 2,78 a
24-Metilcolesta-5,22-dien-3 β -ol	1,07	495,0 \pm 79,59 b	102,11 \pm 1,46 a	98,09 \pm 4,90 a
No identificado	1,14	14,3 \pm 5,92 a	26,54 \pm 12,26 b	26,20 \pm 4,94 b
24-Etilcolesta-5,22-dien-3 β -ol	1,30	7,8 \pm 0,90 a	11,23 \pm 3,42 a	9,02 \pm 1,68 a
24-Metil-7-alfa-colesten-3 β -ol	1,32	11,2 \pm 7,90 a	nd	6,97 \pm 2,56 a
No identificado	1,36	nd	7,50 \pm 0,27 a	17,99 \pm 8,17 b
24-Etilcolesta-5,23-dien-3 β -ol	1,42	17,7 \pm 2,32 a	11,75 \pm 2,00 a	16,92 \pm 1,30 a
24-Etilcolesta-5,25(27)-dien-3 β -ol	1,47	27,9 \pm 0,48 b	19,31 \pm 1,86 a	16,40 \pm 2,38 a
24-Etilcolesta-5-en-3 β -ol	1,51	31,6 \pm 3,97 b	8,69 \pm 0,36 a	11,52 \pm 1,65 a
No identificado	1,60	10,0 \pm 1,11 a	20,53 \pm 1,53 c	14,30 \pm 0,67 b
24-Etilcolesta-5,24-dien-3 β -ol	1,62	16,1 \pm 6,00 a	22,98 \pm 2,51 b	23,79 \pm 2,18 b
24-Etilcolest-7-en-3 β -ol	1,70	14,4 \pm 3,94 a	30,19 \pm 7,66 b	33,14 \pm 2,34 b
No identificado	1,78	70,1 \pm 15,74 b	24,10 \pm 5,60	20,29 \pm 2,04 a
No identificado	2,25	98,0 \pm 0,00	nd	nd
No identificado	2,61	38,0 \pm 18,26 a	72,62 \pm 6,36 b	54,62 \pm 3,14 ab
No identificado	2,81	20,0 \pm 15,76	nd	nd

4.3.6. Análisis de proteínas y aminoácidos

Además, se analizó el efecto del estrés térmico sobre el contenido proteico de la biomasa de *C. closterium*. La disminución de la temperatura de cultivo durante la fase estacionaria de crecimiento (EBTEs), no indujo cambios en el contenido de proteínas (mg g de biomasa⁻¹) respecto a la condición control. No obstante, cuando los cultivos se expusieron a la baja temperatura durante la fase exponencial de crecimiento (EBTEEx), el contenido proteico fue significativamente mayor que bajo las otras dos condiciones ensayadas (Fig. 4.8a). Sin embargo, considerando que la condición EBTEs alcanzó el valor máximo en términos de producción de ácidos grasos esenciales, esta condición fue seleccionada para realizar el análisis del perfil de aminoácidos (AAs). Su contenido total de aminoácidos considerados esenciales (AAE) para animales acuáticos representó el 46,81 % del total de AA identificados, mientras que los condicionalmente esenciales (AACE) y no

esenciales (AANE) representaron el 8,62 % y 44,69 %, respectivamente (Fig. 4.8b). Excepto el triptófano, todos los AAE estuvieron presentes en *C. closterium*, siendo los mayoritarios leucina, valina, fenilalanina y lisina (Tabla 4.6). Los AAs más abundantes fueron el glutamato y aspartato, representando el 11,90 % y 9,84 % del total de AAs, respectivamente (Tabla 4.6).

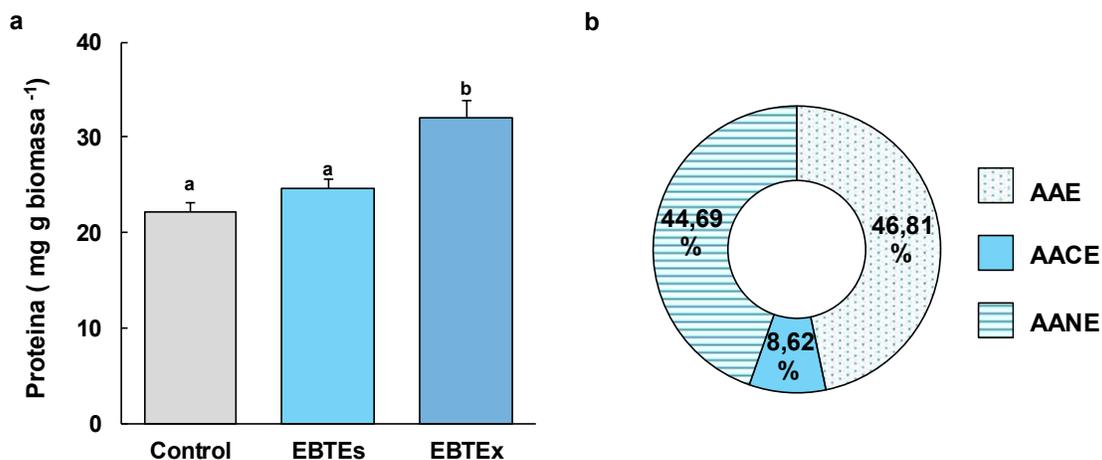


Fig. 4.8. Análisis proteico de *C. closterium*. **a)** Contenido de proteína (mg g biomasa⁻¹) para las diferentes condiciones de crecimiento (control, EBTEs y EBTEx). Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). **b)** Proporción de aminoácidos esenciales (AAE), condicionalmente esenciales (AACE) y no esenciales (AANE) para animales acuáticos (expresados como porcentaje (%) del total de aminoácidos) (Li et al., 2008). Los valores que se muestran son aquellos obtenidos para la condición EBTEs. Los valores representan el valor promedio \pm desvío estándar ($n = 3$).

Tabla 4.6. Composición de aminoácidos de *C. closterium*. Los valores, expresados como porcentaje (%) del total de aminoácidos que se muestran, representan el valor promedio \pm desvío estándar (n = 3). *AA: aminoácidos esenciales, condicionalmente esenciales y no esenciales para animales acuáticos (Li et al., 2009).

Aminoácidos (AA)	% del total de AA
AA Esenciales*	
Arginina	5,4 \pm 0,08
Histidina	3,1 \pm 0,01
Isoleucina	4,49 \pm 0,35
Leucina	7,83 \pm 0,17
Lisina	6,01 \pm 0,01
Metionina	2,67 \pm 0,04
Fenilalanina	6,07 \pm 0,17
Treonina	5,04 \pm 0,23
Triptofano	nd
Valina	6,19 \pm 0,57
AA Condicionalmente esenciales *	
Cisteina	1,52 \pm 0,01
Glutamina	nd
Hidroxiprolina	nd
Prolina	6,62 \pm 1,30
Taurina	nd
AA no esenciales*	
Alanine	6,38 \pm 0,06
Asparagina	nd \pm
Aspartato	9,84 \pm 0,40
Glutamato	11,9 \pm 0,47
Glicina	5,59 \pm 0,14
Serina	6,56 \pm 0,32
Tirosina	4,43 \pm 0,04

4.4. Discusión

Cylindrotheca closterium ha sido reportada como una especie con excelentes parámetros de crecimiento y producción de biomasa en comparación con otras diatomeas (Liang et al., 2002; Duong et al., 2015; Wang et al., 2018). En el presente estudio, la velocidad máxima de crecimiento de *C. closterium* coincidió con aquellas reportadas para otras cepas de la misma especie (Wang et al., 2015; Demirel, 2016; Erdoğan et al., 2016), y fue superior a la obtenida para otras especies de diatomeas marinas nativas del estuario de Bahía Blanca (Popovich et al., 2012; Barnech Bielsa et al., 2016; Martín et al., 2016). La

exposición de los cultivos al estrés térmico afectó negativamente a la densidad celular, siendo esta menor al final de cada condición ensayada. Asimismo, el volumen celular incrementó considerablemente, explicando el aumento en la producción de biomasa. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Montagnes y Franklin (2001), quienes reportaron que la disminución de la temperatura de cultivo puede afectar negativamente la velocidad de crecimiento de las diatomeas y generar, simultáneamente, un incremento en su volumen celular.

Existen reportes que demuestran que la síntesis de lípidos en diatomeas se incrementa bajo diversas condiciones de estrés como, por ejemplo, alta intensidad lumínica, deficiencia de nutrientes o cambios bruscos en la temperatura (Lombardi y Wangersky, 1995; Zulu et al., 2018). A diferencia de estos reportes, cuando el estrés térmico fue aplicado durante la fase exponencial de crecimiento de *C. closterium*, el contenido de lípidos (% peso seco) disminuyó. Por otro lado, cuando *P. tricornutum* fue sometida a un estrés térmico similar, no se observaron cambios significativos en términos lipídicos (Sayanova et al. 2017). Contrariamente, los lípidos (% de peso seco) producidos por *C. closterium* al disminuir la temperatura durante la fase estacionaria, fueron mayores respecto de los valores reportados para otras cepas de *Cylindrotheca* sp. cultivadas en medio f/2 a 22°C y cosechadas en fase estacionaria de crecimiento (Liang et al., 2002) o al final de la fase exponencial (Wang et al. 2015).

Los TAGs son el principal constituyente lipídico de diversas especies de microalgas (Zulu et al., 2018). La síntesis de TAGs en *C. closterium* siguió la tendencia esperada, alcanzando su valor máximo durante la fase estacionaria de crecimiento bajo estrés térmico. Además, este estresor no afectó la distribución de las fracciones lipídicas, ya que los lípidos neutros fueron la fracción dominante en todas las condiciones ensayadas. Estos resultados concuerdan con los reportados para otras especies de diatomeas expuestas a diferentes condiciones de estrés (Popovich et al., 2012; Yang et al., 2017).

La exposición a bajas temperaturas impacta en las membranas celulares generando una disminución de su fluidez. Este efecto puede revertirse aumentando la síntesis y disponibilidad de PUFAs, como el EPA o el DHA (Aussant et al., 2018). Bajo las condiciones

ensayadas en la presente tesis, la disminución repentina de la temperatura del cultivo indujo un incremento significativo en los PUFAs de *C. closterium*. Un efecto similar fue observado en *Thalassiosira pseudonana*, *Chaetoceros calcitrans*, *Chaetoceros simplex*, *Chaetoceros gracilis*, y *P. tricornutum*. Estas diatomeas mostraron un aumento del contenido de PUFAs y una disminución equivalente en los SFAs cuando las células crecieron a 10°C en comparación con lo observado a 25°C (Thompson et al., 1992). A su vez, Jiang y Gao (2004) reportaron que las cantidades relativas de PUFAs incrementaron significativamente de 12% a 20% del total de PUFAs en respuesta al estrés por baja temperatura en *P. tricornutum*. Este efecto fue observado luego de 3 días de aplicar estrés térmico, sugiriendo que los mecanismos involucrados en la respuesta frente a este estrés son muy rápidos (Sayanova et al., 2017).

Los resultados presentados muestran que ambos tratamientos de temperatura (EBTEs y EBTE_x) indujeron un incremento en los niveles de EPA (% of total FAMES) en la fracción polar. Esto es consistente con lo reportado por Chen et al. (2008), sugiriendo que el EPA es el principal AG de la fracción polar cuando las células son expuestas a bajas temperaturas. Asimismo, en *P. tricornutum* y *T. pseudonana* los contenidos de EPA y DHA en la fracción de lípidos polares (% of total FAMES) fueron superiores a los de *C. closterium* (Ryckebosch et al., 2014). Sin embargo, dado que los lípidos polares representan una la fracción lipídica minoritaria, carecen de relevancia en términos de producción de PUFAs. En este sentido, en *C. closterium* se detectó un incremento en las cantidades relativas de EPA en la fracción cuantitativamente dominante (LN), solo cuando el estrés térmico se aplicó durante la fase exponencial de crecimiento.

Un incremento en el % total de FAMES no necesariamente implica un incremento en la producción de ácidos grasos en términos de biomasa. Boelen et al. (2017) observaron que, aunque *S. costatum* mostró un contenido mayor de EPA que *T. pseudonana* (\approx 20% y 8% del total de FAMES, respectivamente), cuando estos valores fueron normalizados considerando el volumen celular ($\text{fg } \mu\text{m}^{-3}$), el EPA fue 9 veces más abundante en *T. pseudonana* que en *S. costatum*. En este sentido, cuando el contenido de AG fue expresado en términos de biomasa en *C. closterium*, los LN fueron la fracción que más contribuyó a la

producción de EPA, DHA y ARA. De esto, se deduce que la mejor estrategia de cultivo para lograr la producción de AG esenciales sería bajar la temperatura al comienzo de la fase estacionaria de crecimiento. Los resultados con respecto al contenido de PUFAs ω -3 de *C. closterium* son similares a los reportados para *P. tricornutum*, con valores de 2.960 mg y 2.945 mg (100 g biomasa)⁻¹, respectivamente. Sin embargo, los PUFAs ω -6 fueron más abundantes en *C. closterium* (2.648 mg 100 g biomasa⁻¹) que en *P. tricornutum* (482 mg 100 g biomasa⁻¹) (Matos et al., 2016).

Los PUFAs son esenciales para animales vertebrados debido a su rol en el crecimiento, desarrollo, la inmunidad, la nutrición de reproductores y la calidad de sus huevos y larvas (Bell y Sargent, 2003; Sanaa et al., 2018). La producción de EPA y DHA en *C. closterium* fue consistente con la reportada para otras especies de microalgas. Sin embargo, el contenido de ARA obtenido en *C. closterium* fue mucho mayor que el reportado para *C. vulgaris* (12 mg 100 g biomasa⁻¹), *Haematococcus pluvialis* (292 mg 100 g biomasa⁻¹), *I. galbana* (69 mg 100 g biomasa⁻¹) y *P. tricornutum* (83 mg 100 g biomasa⁻¹), especies comúnmente utilizadas como alimentos de organismos acuáticos (Batista et al., 2013; Matos et al., 2016; Bonfanti et al., 2018). Por otro lado, la producción de EPA en *C. closterium* fue mayor que la reportada para *I. galbana* (276 mg 100 g biomasa⁻¹) y similar a la indicada para *P. tricornutum* (2.753 mg 100 g biomasa⁻¹), mientras que la producción de DHA fue mayor que la reportada para *P. tricornutum* (80 mg 100 g biomasa⁻¹), y mucho menor que la detectada en *I. galbana* (2.146 mg 100 g biomasa⁻¹) (Matos et al., 2016; Bonfanti et al., 2018). Los resultados obtenidos para la cepa nativa *C. closterium* concuerdan con estudios previos que proponen a las diatomeas como recursos de PUFAs, específicamente EPA y ARA (Sanaa et al., 2018; Shah et al., 2018). A su vez, los valores de EPA y ARA obtenidos en la condición EBTEs son comparables a los reportados para diversos aceites de pescado (De Silva et al., 2011). Por lo tanto, la aplicación de estrés térmico durante la fase de crecimiento estacionario en *C. closterium* sería una buena estrategia para la producción de lípidos enriquecidos en PUFAs.

Cuando las diatomeas crecen bajo condiciones de estrés pueden producir diversos esteroides (Ballantine et al., 1979; Ryckebosch et al., 2014; Volkman, 2016). En el presente

estudio se demostró que una disminución en la temperatura de cultivo da lugar a un aumento en la síntesis de esteroides en *C. closterium*. Véron et al. (1996) reportaron resultados similares relacionados con el efecto de la temperatura sobre el contenido de esteroides en *P. tricornutum*. Sin embargo, en *Cyclotella meneghiniana* las concentraciones de esteroides fueron mayores a 25 °C que a 10 °C (Piepho et al., 2012) En términos de composición de esteroides, el principal esteroide encontrado en *C. closterium* fue el colesterol, el cual representó el 75% del total de esteroides en la condición EBTEs. Además, se detectaron pequeñas cantidades de fitoesteroides. Estos resultados concuerdan con los reportados para la diatomea *Nitzschia closterium* y la eustigmatofita *Nannochloropsis oculata*, donde el esteroide dominante fue el colesterol (Volkman et al., 1992; Barrett et al., 1995). Aunque la presencia de colesterol en la dieta humana se encuentra asociada con un incremento en el riesgo de aterosclerosis y trombosis coronaria (Attia et al., 2015), su presencia es necesaria en las dietas en peces (Barrett et al., 1995; Norambuena et al., 2013; Zhu et al., 2014, 2018). Rampen et al. (2010) caracterizaron el perfil de esteroides de más de 100 especies de diatomeas cosechadas al final de la fase logarítmica de crecimiento. Los resultados reportados por estos autores para *C. closterium* concuerdan con los obtenidos en la presente tesis. Se identificaron los siguientes esteroides: Colest-5-en-3 β -ol, 24-metilcolesta-5,24(28)-dien-3 β -ol y 24- etilcolesta-5,24(28Z)-dien-3 β -ol, representando el 92%, 5%, y 3 % del contenido total de esteroides, respectivamente.

Las proteínas constituyen la principal fuente de nitrógeno para los peces y otros organismos acuáticos. Estas moléculas, además, representan el principal y más costoso componente de los alimentos acuáticos formulados artificialmente (Li et al., 2009). Los aminoácidos son los componentes básicos de las proteínas y, algunos de ellos, son esenciales ya que no pueden ser sintetizados y deben ser proporcionados por la dieta (Cowey, 1994). En el presente estudio, se encontraron nueve de los diez aminoácidos esenciales para animales acuáticos (Li et al., 2009), indicando que la biomasa de *C. closterium* posee una buena calidad proteica. Por otro lado, es de destacar que el perfil de aminoácidos resultante fue muy similar al informado por Brown (1991) para diferentes especies de diatomeas comúnmente utilizadas en acuicultura.

4.5. Conclusiones

Las diatomeas surgen como un recurso atractivo para la producción sustentable de biomasa rica en PUFAs. Sin embargo, es indispensable evaluar las respuestas particulares de cada especie frente a diferentes estrategias de cultivo, en búsqueda de aquellas condiciones que permitan incrementar la producción de los metabolitos de interés. Las principales conclusiones arribadas en el presente capítulo son:

- ✓ En cultivos de *C. closterium* el estrés por baja temperatura aplicado durante fase estacionaria de crecimiento es una estrategia apropiada para incrementar la producción de biomasa, lípidos y LC-PUFAs esenciales, particularmente EPA y ARA.
- ✓ La presencia de esteroides, tanto colesterol como fitoesteroides, y de proteínas de calidad incrementan el valor nutricional de la biomasa de *C. closterium*.
- ✓ La rápida respuesta de *C. closterium* al estrés térmico sugiere que esta estrategia podría ser apropiada para implementarse en procesos productivos.

La información básica proporcionada en este capítulo constituye un aporte valioso en la búsqueda de una producción alternativa y sostenible de PUFAs, esteroides y aminoácidos esenciales, abriendo nuevas posibilidades de investigación en lo que respecta a la nutrición. Asimismo, uno de los desafíos pendientes es desarrollar sistemas productivos a mayor escala que incluyan un control eficaz de la temperatura para inducir estrés térmico y que, al mismo tiempo, sean económicamente viables.

CAPÍTULO 5

EVALUACIÓN DE UN FERTILIZANTE AGRÍCOLA COMO MEDIO DE CULTIVO PARA *CYLINDROTHECA CLOSTERIUM*

5.1. Introducción

El cultivo de microalgas a escala de laboratorio se realiza empleando medios de cultivo convencionales, formulados a partir de reactivos puros y de concentración conocida. Sin embargo, cuando se efectúan producciones a gran escala el medio de cultivo representa entre el 30% y 40% de los costos operativos del proceso (Fernández Linares et al., 2017; De Carvalho et al., 2019). Por lo tanto, la búsqueda de medios de cultivo alternativos, rentables desde el punto de vista económico y cuya elaboración sea más sencilla, es uno de los objetivos desde el área productiva de las microalgas. Tanto el nitrógeno (N) como el fósforo (P) son nutrientes claves para el crecimiento y metabolismo de las microalgas (Koley et al., 2019). En este sentido, los fertilizantes agrícolas en los que se incluyen N y P como componentes principales, se presentan como una fuente de nutrientes alternativa de bajo costo para el cultivo de distintas especies de diatomeas (Simental y Sánchez-Saavedra, 2003; Popovich et al., 2020; Saxena et al., 2022). Sin embargo, la concentración de fertilizante óptima para elaborar el medio de cultivo debe determinarse a través de estudios que tengan como objetivo alcanzar una elevada densidad celular, así como un buen rendimiento de los metabolitos que se deseen producir (Koley et al., 2019).

En el Capítulo 3 se demostró que *C. closterium* es una especie con aptitud para la producción de biomasa rica en LC-PUFAs, principalmente EPA y ARA. En el presente capítulo se evalúa el crecimiento y producción de lípidos de *C. closterium* utilizando un medio de cultivo de bajo costo a base de fertilizante foliar Bayfolan®. Particularmente, se plantean los siguientes **objetivos específicos**:

1. Evaluar el crecimiento de *C. closterium* a escala de laboratorio, utilizando medios de cultivo a base de distintas concentraciones del fertilizante Bayfolan®.

2. Estimar el contenido de lípidos neutros de *C. closterium* bajo las distintas concentraciones del fertilizante.
3. En base a los resultados obtenidos a escala de laboratorio, diseñar y llevar a cabo un cultivo en fotobiorreactor utilizando el medio de cultivo a base de Bayfolan®.
4. Analizar el efecto del medio de cultivo sobre la producción de biomasa, LC-PUFAs y otros metabolitos de interés.
5. Comparar los resultados obtenidos con aquellos presentados en el Capítulo 3, donde *C. closterium* creció en fotobiorreactor en medio f/2, bajo las mismas condiciones de cultivo.

5.2. Materiales y métodos

5.2.1. Medios de cultivos

Se elaboraron tres medios de cultivo empleando distintas concentraciones del fertilizante agrícola Bayfolan® (Bayer, Perú), cuya composición química puede observarse en la Tabla 5.1. Se utilizó agua de mar envejecida, filtrada (0,45 µm) y esterilizada en autoclave (1 hora a 20 atmósferas de presión). Se adicionaron 4 mL L⁻¹ de Tris y 1 mL L⁻¹ de solución stock de silicatos (Na₂SiO₃ • 2H₂O [30 g L⁻¹ dH₂O]). Posteriormente, se agregó Bayfolan® en las siguientes concentraciones: 0,05 mL L⁻¹, 0,10 mL L⁻¹ y 0,15 mL L⁻¹, denominando a cada condición experimental de acuerdo a cada una de estas concentraciones de fertilizante empleadas. Tanto el silicato, como el TRIS y el fertilizante, fueron esterilizados utilizando un filtro de 0,22 µm.

Tabla 5.1. Composición química del fertilizante foliar Bayfolan®. Información obtenida de la etiqueta del producto.

Elementos	Concentración
Nitrógeno Total (N)	110 g L ⁻¹
Anhídrido Fosfórico (P₂O₅)	80 g L ⁻¹
Óxido de Potasio (K₂O)	60 g L ⁻¹
Hierro (Fe)	190 g L ⁻¹
Manganeso (Mn)	162 g L ⁻¹
Boro (B)	102 g L ⁻¹
Cobre (Cu)	81 g L ⁻¹
Zinc (Zn)	61 g L ⁻¹
Molibdeno (Mo)	9 g L ⁻¹
Cobalto (Co)	3,5 g L ⁻¹
Vitamina B1, Hormonas de crecimiento	4 ppm

5.2.2. Cultivos a escala de laboratorio

Los inóculos para cada una de las condiciones experimentales fueron obtenidos mediante un escalado progresivo a partir de cultivos stock de *C. closterium* (Fig. 5.1). Esto fue realizado en una cámara de cultivo bajo las mismas condiciones empleadas en la Sección 3.2.3. del Capítulo 3. Con el fin de aclimatar las células a las condiciones experimentales, se pasaron alícuotas de los cultivos stock en medio f/2 a tubos de ensayo con los medios de cultivo conteniendo Bay 0,05, Bay 0,10, Bay 0,15 y f/2 (control) (Paso 1, Fig. 5.1). Las células permanecieron en estas condiciones durante cuatro repiques sucesivos.

A partir de los cultivos stock aclimatados se desarrolló un escalado progresivo. Éste se inició empleando 50 mL de medio de cultivo y 10 mL de stock aclimatado (Paso 2, Fig. 5.1). Luego de 3 días, se transfirieron 40 mL de este último a un nuevo Erlenmeyer conteniendo 200 mL de medio de cultivo (Paso 3, Fig. 5.1) y se dejaron por cuatro días. Finalmente, para cada condición, los cultivos se juntaron y homogeneizaron, estableciéndose así el inóculo de *C. closterium* para dar inicio a los cultivos experimentales (Paso 4, Fig. 5.1). Éstos se llevaron a cabo en condiciones autotróficas bajo la modalidad *batch* utilizando los medios de cultivo Bay 0,05, Bay 0,10 y medio f/2 (Control). La condición

Bay 0,15 fue descartada desde un comienzo ya que esa concentración no resultó ser adecuada para *C. closterium*. Las condiciones experimentales se realizaron en un volumen final de trabajo de 400 mL, partiendo de una densidad celular inicial de 50.000 cél. mL⁻¹. Los cultivos se mantuvieron con aireación constante en cámara de cultivo bajo las mismas condiciones de temperatura e intensidad lumínica detalladas para la obtención del inóculo.

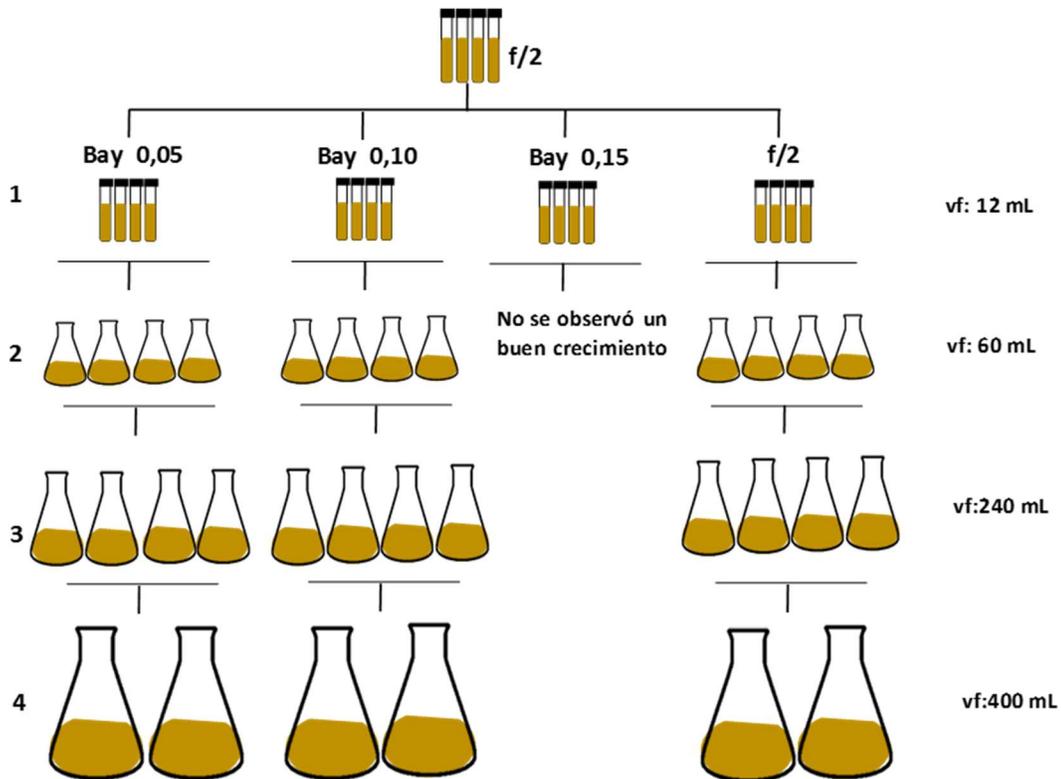


Fig. 5.1. Cultivos a escala de laboratorio. Esquema representativo de los pasos involucrados desde la aclimatación de las células a los medios de cultivo (1), la obtención del inóculo (2 y 3) y los cultivos experimentales (4). vf: volumen final.

5.2.3. Parámetros de crecimiento

Para cada condición se colectaron muestras diarias a fin de caracterizar la curva de crecimiento. Se calculó la DC (células mL⁻¹), μ y el TD utilizando las ecuaciones 2.1, 2.2. y 2.3, respectivamente (Sección 2.5. del Capítulo 2).

5.2.4. Producción de biomasa

La producción de biomasa se evaluó mediante la determinación del peso seco (g L^{-1}). Para su determinación se colectaron muestras de 10 mL, las cuales fueron procesadas de acuerdo a la metodología detallada en la Sección 2.5.3 del Capítulo 2 (Ecuación 2.4). Todos los análisis fueron realizados por duplicado.

5.2.5. Estimación del contenido de lípidos neutros

La evaluación del contenido de lípidos neutros se realizó mediante mediciones de fluorescencia con el empleo de Rojo Nilo de acuerdo a lo detallado en el Capítulo 2 (Sección 2.6.1). Se colectaron muestras diarias, por duplicado, de 5 mL de cultivo a los cuales se añadió Rojo Nilo en acetona. Luego se midió la intensidad relativa de fluorescencia del Rojo Nilo (IRF-RN), la cual se expresa como unidades arbitrarias de fluorescencia (u.a.f).

5.2.6. Cultivo en fotobiorreactor

De acuerdo a los resultados obtenidos, se seleccionó la condición Bay 0,05 para evaluar el crecimiento y la producción de LC-PUFAs de *C. closterium*. El inóculo fue obtenido mediante escalado progresivo de los cultivos stock en cámara de cultivo (ver Sección 2.4.2, del Capítulo 2). Las condiciones del fotobiorreactor fueron las mismas que se indican en la Sección 3.2.3, Capítulo 3. Los datos obtenidos, se compararon con los obtenidos en el Capítulo 3, donde *C. closterium* fue cultivada en las mismas condiciones, pero utilizando medio de cultivo f/2.

5.2.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos fue realizado utilizando el software Infostat (Di Rienzo et al., 2018). Las comparaciones de diferentes parámetros se realizaron entre las distintas condiciones de cultivo (Bay 0,05, Bay 0,1 y f/2). A través de un análisis de ANOVA simple se determinó si existen diferencias significativas entre las tres condiciones de crecimiento y mediante la Prueba de Tukey se analizó entre qué condiciones se encontraban tales diferencias ($p < 0,05$).

5.3. Resultados

5.3.1. Cultivos a escala de laboratorio

El crecimiento de *C. closterium* en los diferentes medios de cultivo se muestra en la Fig. 5.2. Los resultados evidencian un crecimiento similar en todas las condiciones ensayadas, las cuales alcanzaron la fase estacionaria a partir del día 5 (Fig. 5.2). La μ máxima y el TD fueron similares entre las condiciones mostrando valores de $\approx 1,44 \text{ div día}^{-1}$ y TD $\approx 16,5 \text{ horas}$ ($p > 0,05$) (Tabla 5.1). La densidad celular final al día 10, así como la producción de biomasa, fueron significativamente menores para la condición Bay 0,05 respecto a las condiciones f/2 y Bay 0,10 ($p < 0,05$).

La producción de biomasa de *C. closterium* fue evaluada considerando los valores de peso seco (Fig. 5.3). Los resultados obtenidos para distintos días de cultivo fueron similares entre las condiciones ensayadas, alcanzándose a máxima producción de biomasa ($\approx 250 \text{ mg L}^{-1}$) en el día 10 ($p > 0,05$).

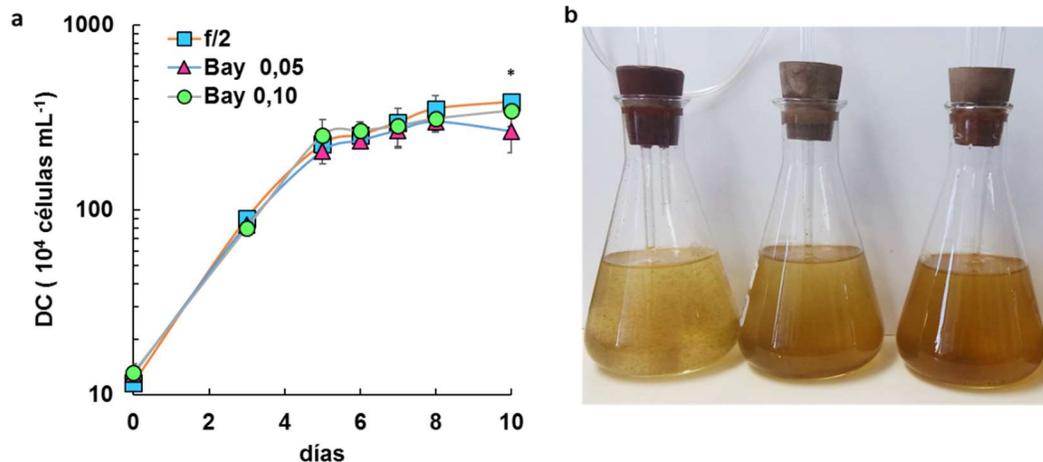


Figura 5.2. Crecimiento de *C. closterium* en distintos medios de cultivo. a) Curva de crecimiento de *C. closterium* utilizando medio de cultivo elaborado con el fertilizante Bayfolan® a concentraciones de $0,05 \text{ mL L}^{-1}$ (Bay 0,05) y $0,1 \text{ mL L}^{-1}$ (Bay 0,1); y medio de cultivo f/2 (control). **b)** Cultivos de *C. closterium* al día 10, correspondientes de izquierda a derecha a la condiciones Bay 0,05, Bay 0,10 y f/2. El * indica diferencias significativas ($p < 0,05$).

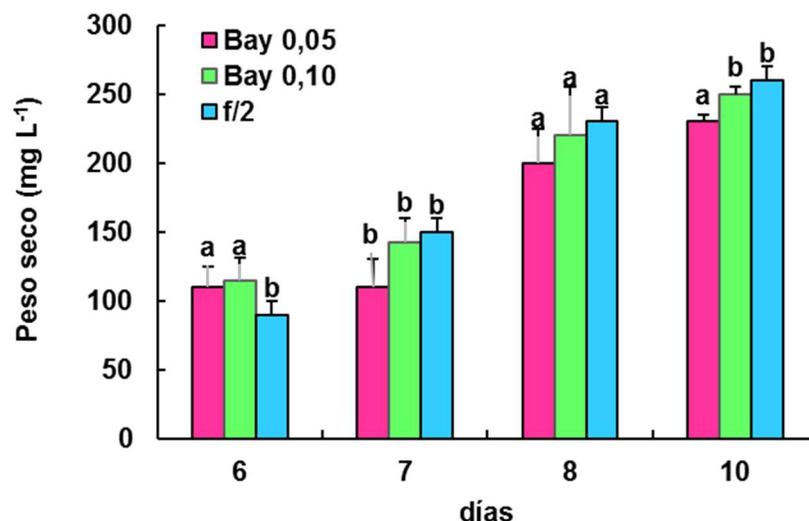


Figura 5.3. Producción de biomasa de *C. closterium* utilizando distintos medios de cultivo. Se muestran los valores de peso seco obtenidos durante la fase estacionaria de crecimiento, utilizando medio de cultivo a base del fertilizante Bayfolan® en una concentración de 0,05 mL L⁻¹ (Bay 0,05) y 0,10 mL L⁻¹ (Bay 0,10) y medio f/2 (control). Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05)

Tabla 5.1. Parámetros de crecimiento y contenido relativo de lípidos de *C. closterium*. Se muestran los valores máximos de velocidad de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (TD). También, se observan los valores finales de densidad celular (DC) y la intensidad relativa de fluorescencia de Rojo Nilo en función del peso seco (IRF-RN/PS), obtenidos para los medios de cultivo f/2 y aquellos elaborados con Bayfolan® a concentraciones de 0,05 mL L⁻¹ (Bay 0,05) y 0,1 mL L⁻¹ (Bay 0,10). Las letras diferentes indican diferencias significativas entre condiciones (p<0,05).

	μ (div día ⁻¹)	TD (horas)	DC (células mL ⁻¹)	IRF-RN/PS
f/2	1,45 ± 0,08 a	16,52 ± 1,80 a	3842720 ± 890632 a	9,72 a
Bay 0,05	1,39 ± 0,09 a	17,28 ± 1,53 a	2673920 ± 640624 b	15,16 b
Bay 0,10	1,47 ± 0,05 a	16,35 ± 3,46 a	3456325 ± 635914 a	10,44 a

El empleo del colorante lipofílico Rojo Nilo reveló un mayor contenido de lípidos neutros luego del uso de medios de cultivo elaborados con fertilizante, en relación al control (f/2) (Fig. 5.4a). Este efecto se acentuó entre los días 5 y 9 de cultivo (p<0,05) (Fig. 5.4). Las observaciones de las células al microscopio óptico mostraron relación con estos resultados, evidenciándose la presencia de gotas lipídicas citoplasmáticas (Fig. 5.4c). Sin embargo, la

relación entre la intensidad de fluorescencia de Rojo Nilo y el peso seco fue mayor para la condición Bay 0,05 ($p < 0,05$) (Tabla 5.1).

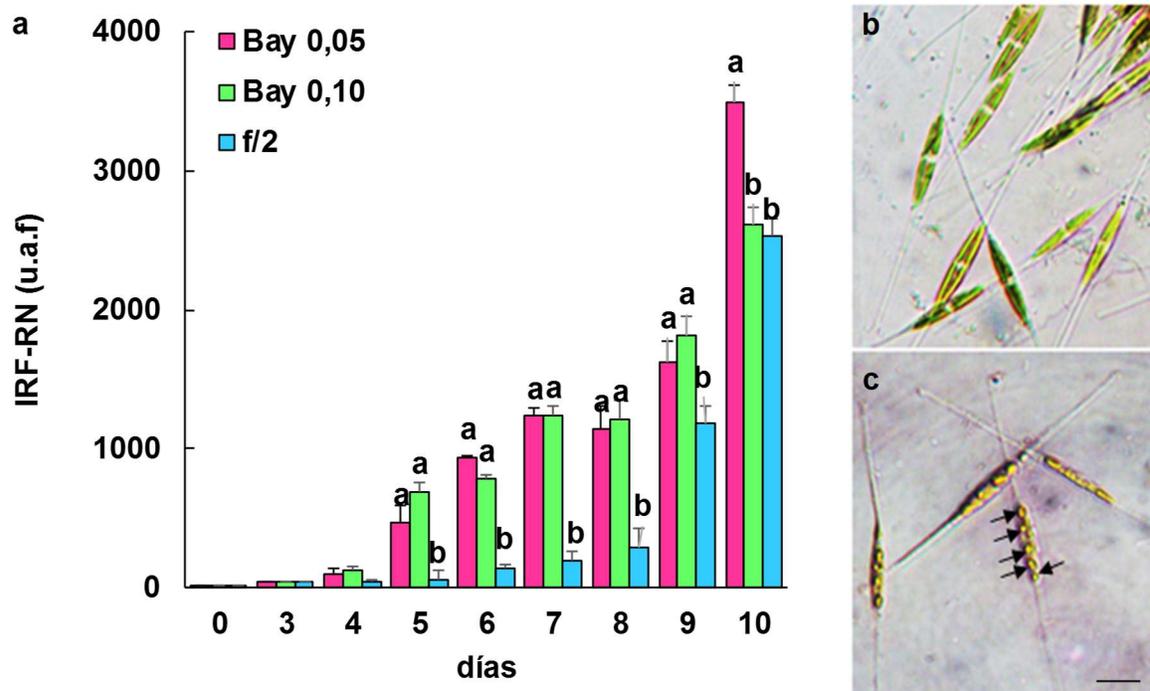
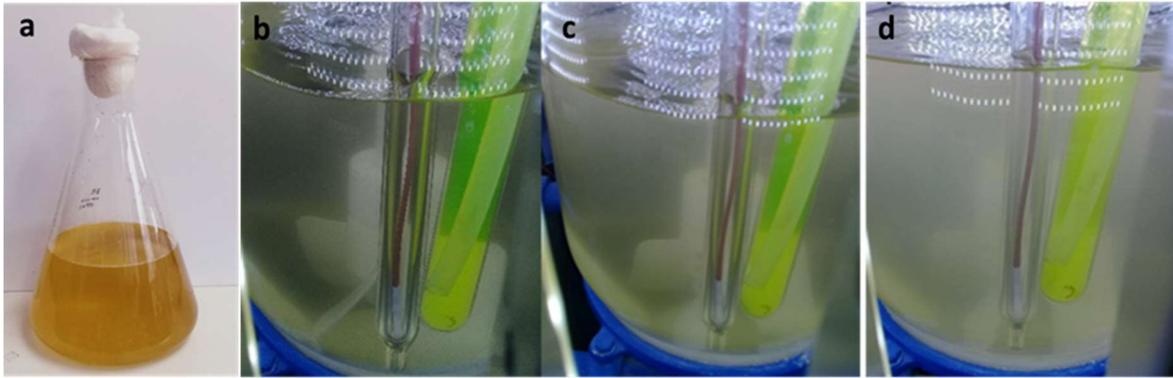


Figura 5.4. Contenido de lípidos neutros en *C. closterium*. a) Intensidad de fluorescencia relativa de Rojo Nilo (IRF-RN) en función de los días de cultivo, expresado en unidades arbitrarias de fluorescencia (u.a.f), bajo las tres condiciones ensayadas: medio de cultivo elaborado con el fertilizante Bayfolan® a concentraciones de 0,05 mL L⁻¹ (Bay 0,05) y 0,10 mL L⁻¹ (Bay 0,10); y medio de cultivo f/2. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre condiciones ($p < 0,05$). b y c) Imágenes al microscopio óptico *C. closterium* en medio de cultivo conteniendo el fertilizante agrícola (Bay 0,05) luego de 4 (b) y 10 (c) días de cultivo. Las flechas señalan gotas lipídicas. Barra de escala=5 μm.

5.3.2. Cultivo en fotobiorreactor

Considerando los resultados obtenidos a escala de laboratorio, se seleccionó la condición Bay 0,05 para realizar un cultivo a mayor escala en fotobiorreactor. Mediante el escalado progresivo a partir de cultivos stock se obtuvo un inóculo denso para dar inicio al fotobiorreactor (Fig. 5.5a). No se observaron cambios en la coloración del cultivo durante los días 0 a 4 en el fotobiorreactor (Fig. 5.5.b-d). En la figura 5.6 se observa la curva de crecimiento de *C. closterium* utilizando medio de cultivo Bay 0,05 durante los días 0 a 4.

Puede observarse que la DC no presentó variaciones a lo largo de los días, mostrando una cinética diferente a la obtenida para *C. closterium* creciendo en fotobiorreactor en las mismas condiciones, pero con medio de cultivo f/2.



5.5. Cultivo en fotobiorreactor de *C. closterium* utilizando medio de cultivo a base del fertilizante Bayfolan®. a) inóculo de células obtenido mediante escalado progresivo desde los stocks. b-d) Cultivo en fotobiorreactor (día 0, 2 y 4) a un volumen de 10 L.

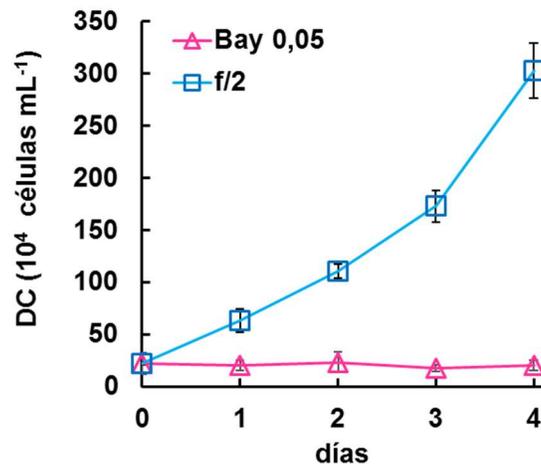


Figura 5.6. Crecimiento de *C. closterium* en fotobiorreactor en distintos medios de cultivo. Densidad celular (DC) obtenida durante los días 0 a 4 de cultivo, con medio de cultivo Bayfolan en concentración de 0,05 mL L $^{-1}$ (Bay 0,05) y en el medio de cultivo f/2.

Observaciones del cultivo al microscopio óptico permitieron detectar una transición en el cultivo desde su inicio en el fotobiorreactor, donde la mayoría de las células se encontraban con la morfología típica de las células vegetativas, reproduciéndose

asexualmente (Fig. 5.7a), hacia la dominancia de células con morfologías asociadas a distintos estadios sexuales (Fig. 5.7b, 5.8 y Fig. 5.9).

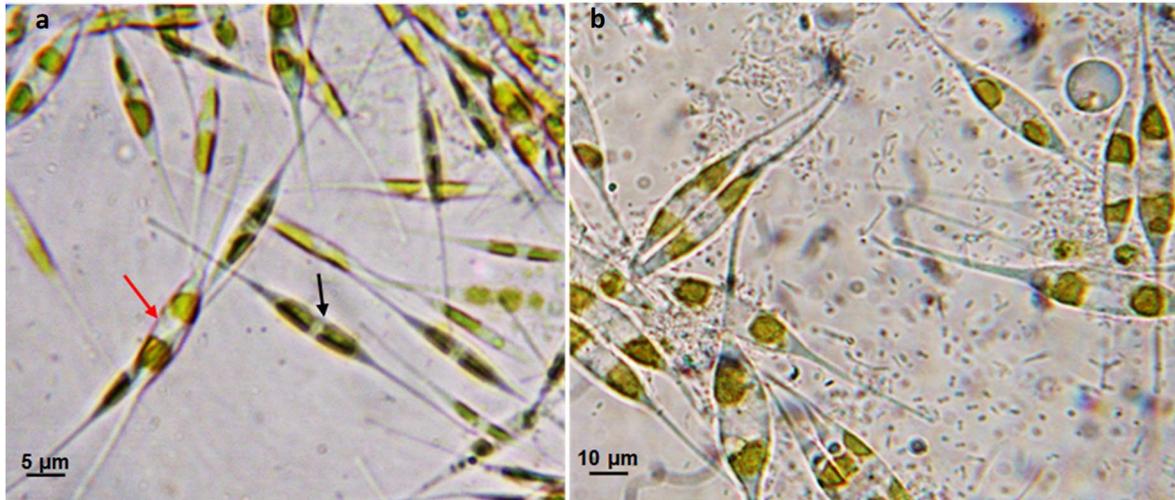


Figura 5.7. Aspecto general del cultivo de *C. closterium* reproduciéndose sexualmente. a) Cultivo de transición en el cual se observan en su mayoría células vegetativas (flecha negra) y algunos estadios sexuales (gametangios, flecha roja). **b)** Cultivo en el cual predominan estadios sexuales.

Diferentes morfologías de las células de *C. closterium* durante la reproducción sexual en el cultivo en fotobiorreactor se muestran en la Fig. 5.8. Se observaron células vegetativas recientemente apareadas (Fig. 5.8a) y otras que comenzaron a enroscarse a través de sus proyecciones apicales, con los típicos cloroplastos parietales (Fig. 5.8b). Células en íntimo contacto, con cloroplastos de forma esférica (Fig. 5.8c); células fusionadas por completo, tanto el citoplasma como los cloroplastos (Fig. 5.8d y Fig. 5.9) y formación de una auxospora (Fig. 5.8e y Fig. 5.8f).

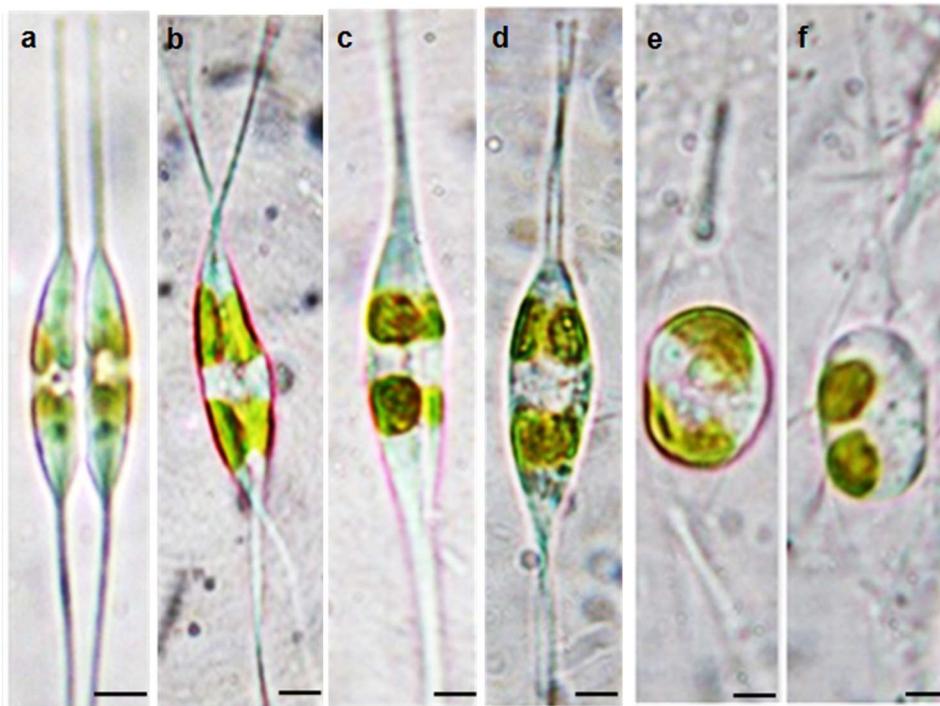


Figura 5.8. Estadios de la reproducción sexual en *C. closterium*. a) Células vegetativas apareadas y b) comenzando a enroscarse a través de sus proyecciones. Observar los cloroplastos parietales característicos de la especie. c) Células apareadas con los cloroplastos esféricos. d) Células fusionadas. e y f) Formación de la auxospora.

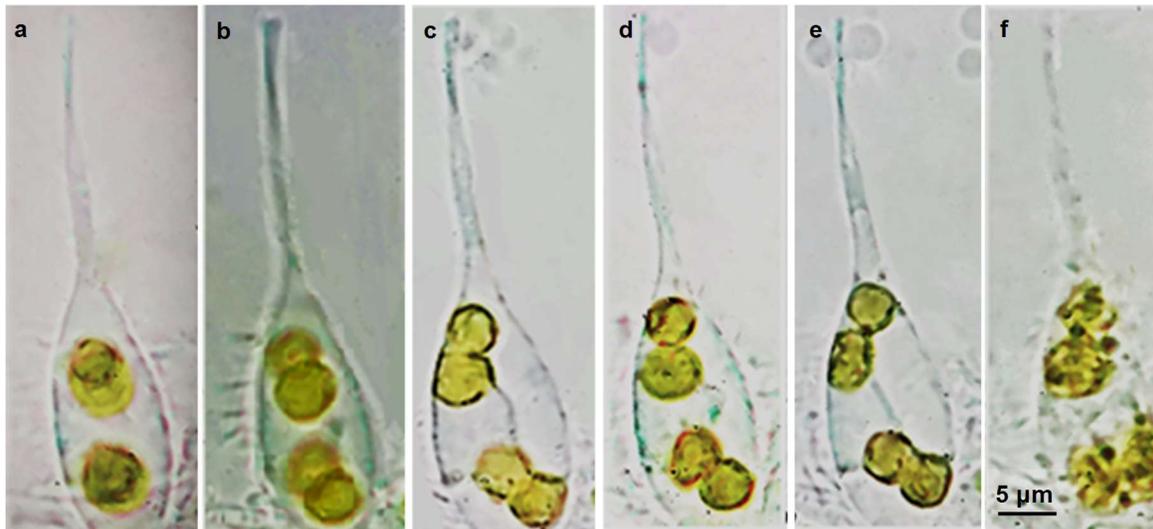


Figura 5.9. Fusión celular. a-f. Secuencia del proceso de fusión de dos células de *C. closterium*. Barra de escala: 5µm

5.4. Discusión

El empleo de fertilizantes agrícolas como fuente de nutrientes para el cultivo de microalgas es muy promisorio, dado su bajo costo y su composición en términos de macronutrientes, micronutrientes y vitaminas, necesarios para el desarrollo de las microalgas (Fernández-Linares et al., 2017). Particularmente, el fertilizante foliar Bayfolan ha sido utilizado en diferentes concentraciones como un medio alternativo y económico para el cultivo de microalgas de agua dulce como *Scenedesmus* (Bayfolan 1 mL L⁻¹) (Fernández-Linares et al., 2019), y de especies marinas tales como *Halamphora coffeaeformis* (0,28 mL L⁻¹) (Popovich et al., 2020), *Tetraselmis suecica* e *Isochrysis galbana* (Bayfolan 0,07 mL L⁻¹) (Alejos Cabrera et al., 2022), entre otras. Sin embargo, la utilización de Bayfolan para el cultivo de *C. closterium* en fotobiorreactor, no fue una estrategia factible para la producción de biomasa, ya que las células comenzaron a reproducirse sexualmente deteniendo el crecimiento vegetativo.

En general, las condiciones para inducir la reproducción sexual en diatomeas son más estrictas que aquellas necesarias para su crecimiento vegetativo, debido a que existen varios factores que influyen en el éxito del apareamiento, tales como la composición del medio de cultivo, la temperatura, la disminución del tamaño celular, entre otros (Chepurvov et al. 2004; Poulíková y Mann, 2019). En *C. closterium* no se observó una disminución del tamaño de las células durante el cultivo. Si bien se desconocen las causas que indujeron la reproducción sexual, lleva a pensar que ésta estaría relacionada con algún componente del fertilizante agrícola empleado. Probablemente, con el contenido de amonio del fertilizante Bayfolan (Popovich et al., 2020), dado que este nutriente ha sido citado como un factor clave para la formación de células sexuales en otras especies de diatomeas (Moore et al., 2017; Poulíčková y Mann, 2019). Asimismo, considerando que, durante los ensayos a escala de laboratorio, así como en la obtención del inóculo, *C. closterium* creció de manera vegetativa, no se puede descartar la intervención de una combinación de factores asociados a las condiciones de crecimiento en el fotobiorreactor. De todos modos, es necesario realizar un estudio más exhaustivo para establecer las causas que inducen la reproducción sexual en *C. closterium*.

Las diatomeas pennadas pueden presentar reproducción homotálica (=monoico) o heterotálica. En la primera, la reproducción sexual ocurre dentro de un cultivo clonal, y se producen gametas por individuos compatibles de la misma cepa. La segunda implica la fusión de gametas producidas por individuos compatibles pertenecientes a distintas cepas; o comportamientos de apareamiento (*matting*) complejos que implican una mezcla de reproducción homotálica y heterotálica (Chepurnov et al., 2004; Amato et al., 2010). El proceso de reproducción sexual registrado en este trabajo es homotálico, ya que el cultivo fue realizado a partir de células en stock provenientes de una única célula aislada a partir de una muestra natural. A su vez, de acuerdo a las morfologías celulares observadas, el patrón reproductivo de *C. closterium* muy probablemente se corresponda al Tipo II, según el sistema de clasificación Geitleriano (Geitler, 1973; Amato et al., 2010), con la formación de una auxospora por par de células parentales. Al comparar las morfologías celulares registradas en este trabajo con aquellas reportadas por Vanormelingen et al. (2013) surgen marcadas diferencias. Estos autores describieron la reproducción heterotálica para *C. closterium* y clasificaron el patrón reproductivo como Tipo I; es decir, establecieron el desarrollo de 2 cigotos por par de células parentales en *C. closterium*, los cuales, mediante expansión, resultan en dos auxosporas. Considerando la evidencia obtenida para la cepa nativa de *C. closterium* en términos reproductivos, junto con aquella que surge del análisis filogenético (ver Fig. 3.8, Capítulo 3), se sostiene la idea de que la cepa empleada en el presente trabajo se trata de una subespecie del gran grupo parafilético de *C. closterium*.

5.5 Conclusiones

Los fertilizantes agrícolas son una fuente alternativa de nutrientes para el cultivo de microalgas, con ventajas en términos de su bajo costo. Sin embargo, considerando los requerimientos particulares de cada especie y las distintas respuestas fisiológicas a las condiciones de cultivo, deben evaluarse cuidadosamente las concentraciones a emplear y encontrar la que mejor se adapte al objetivo perseguido. Las principales conclusiones del presente capítulo son:

- ✓ En *C. closterium*, el medio de cultivo compuesto por el fertilizante Bayfolan a la concentración empleada, no fue una estrategia apropiada para la producción de biomasa rica en metabolitos de interés.
- ✓ El fertilizante agrícola tendría la capacidad de estimular la reproducción sexual de esta especie, la cual es un evento indeseable en procesos de producción de biomasa.
- ✓ Nuevas concentraciones y otros fertilizantes deberían ser ensayados en cultivos en fotobiorreactor.
- ✓ En la cepa nativa *C. closterium* se registraron estadios sexuales diferentes a los reportados por otros autores para la misma especie. Estos resultados, abren nuevas líneas de investigación en torno a las estrategias reproductivas de *C. closterium*.

CAPÍTULO 6

PAVLOVA GYRANS COMO RECURSO ALTERNATIVO DE ÁCIDOS GRASOS ESENCIALES

6.1. Introducción

La división Haptophyta, también conocida como Prymnesiophyta, agrupa una diversidad de organismos unicelulares caracterizados por la presencia de un apéndice filamentoso entre los dos flagelos llamado haptonema (Edwardsen et al., 2007). Algunas de estas especies, como *Isochrysis galbana* y *Pavlova viridis* han sido propuestas como un recurso de LC-PUFAs para alimentos y piensos acuícolas. A diferencia de las diatomeas y las algas verdes, las haptófitas pertenecientes a los géneros *Isochrysis* y *Pavlova* tienen como ventaja la ausencia de una pared celular resistente, facilitando el proceso digestivo de diversos organismos acuáticos, como así también el procesamiento de la biomasa con propósitos comerciales (Martínez-Fernández et al., 2004; Tibbetts et al., 2020). Además, algunas especies del género *Pavlova* han sido reconocidas como un recurso de esteroides y pigmentos con potenciales aplicaciones en las industrias alimentaria, acuícola y farmacéutica (Ahmed et al., 2015; C. Robertson et al., 2015). De acuerdo con esto, existen evidencias que sostienen el uso de la biomasa de haptófitas como fuente de PUFAs en los alimentos. Por ejemplo, *I. galbana* se ha agregado como ingrediente funcional a galletitas dulces, pasta, puré de tomate y yogur (Gouveia et al., 2008; Fradique et al., 2013; Gheysen et al., 2019; Matos et al., 2021). En este sentido, resulta atractiva la prospección de ambientes naturales en busca de haptófitas nativas como un recurso alternativo de LC-PUFAs con fines alimenticios.

Como se ha mencionado en capítulos previos, aunque la biomasa de microalgas es una fuente de metabolitos de alto valor agregado, la composición química varía en función de la especie y de las condiciones de crecimiento (Jónasdóttir 2019; Taipale et al., 2020; Ansari et al., 2021). En condiciones de estrés, ciertas microalgas inducen metabólicamente la síntesis de lípidos neutros bajo la forma de TAGs, los cuales actúan como un reservorio

de LC-PUFAs (Cohen et al., 2000; Zienkiewicz et al., 2016). A su vez, para distintas haptófitas también se ha demostrado que la temperatura de cultivo reduce la fluidez de la membrana, provocando un incremento en la síntesis de PUFAs como una respuesta adaptativa ante los cambios ambientales. Por ejemplo, Tatsuzawa y Takizawa (1995) demostraron que el cultivo de *Pavlova lutheri* a 15°C incrementó el contenido relativo de EPA and DHA, respecto a los valores obtenidos a 25°C. Estos resultados sugieren que estos AGs son necesarios en mayor proporción para el crecimiento de la especie en esas condiciones. Coincidentemente, Balakrishnan y Shanmugam (2020) reportaron en *Isochrysis* sp. que la temperatura de cultivo es inversamente proporcional a la síntesis de PUFAs, especialmente en términos de EPA y DHA; sin embargo, la producción de biomasa disminuyó significativamente al disminuir la temperatura de cultivo. Considerando esto, es interesante diseñar e implementar una estrategia de cultivo en dos fases para alcanzar la máxima producción de biomasa y mejorar la producción de LC-PUFAs. En este sentido, el estrés por baja temperatura aplicado durante la fase estacionaria de crecimiento resultó una estrategia efectiva para incrementar la producción de LC-PUFAs sin afectar significativamente la producción de biomasa en *C. closterium* (Capítulo 4). Teniendo en cuenta que la capacidad de respuesta al estrés es específica de cada especie, resulta de gran interés evaluar el efecto del estrés por baja temperatura sobre la producción de biomasa y PUFAs en una haptófitas nativa del estuario de Bahía Blanca.

De acuerdo a lo expuesto anteriormente y considerando los objetivos generales descriptos, se proponen los siguientes **objetivos específicos**:

- 5- Colectar muestras fitoplanctónicas de la zona interna del estuario de Bahía Blanca, y establecer cultivos unialgales de alguna/s especie/s de haptófitas.
- 6- Identificar la/s especie/s aislada/s en base a sus características morfológicas.
- 7- Desarrollar cultivos *batch* autotróficos, a escala de laboratorio, para caracterizar su crecimiento y producción de biomasa.
- 8- Identificar la especie seleccionada mediante el análisis de la secuencia del gen que codifica para el 18S rARN.

- 9- Realizar cultivos *batch* autotróficos en fotobiorreactor a una temperatura de 20°C (control), y disminuyendo la temperatura de manera repentina a 11°C (estrés térmico) durante la fase estacionaria de crecimiento, para establecer:
- Los parámetros de crecimiento y de producción de biomasa;
 - La cinética de acumulación de lípidos, esteroides y pigmentos;
 - La composición de la biomasa en términos de ácidos grasos, esteroides y pigmentos;
 - La calidad de los lípidos obtenidos desde el punto de vista de la salud humana, mediante el cálculo de índices lipídicos.

6.2. Materiales y Métodos

6.2.1. Obtención de cultivos unialgales

Las muestras fitoplanctónicas fueron colectadas en diciembre de 2019 de la zona interna del estuario de Bahía Blanca (38° 45' S, 62° 22' W), Argentina. El aislamiento fue realizado siguiendo la metodología descrita en la Sección 2.3 del Capítulo 2 de la presente tesis. Se establecieron cultivos no axénicos en medio de cultivo f/2, los cuales fueron mantenidos en cámara de cultivo a 20°C, 37 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad lumínica provista por lámparas fluorescentes y respetando un ciclo de 12:12 horas de luz:oscuridad.

6.2.2. Crecimiento y producción de biomasa a escala de laboratorio

Con el objetivo de obtener información preliminar acerca del crecimiento de la especie aislada en condiciones de laboratorio, se realizaron cultivos a pequeña escala por triplicado durante 10 días. Se partió de una concentración celular inicial de 50.000 cél mL^{-1} , empleando medio f/2. Las condiciones de cultivo fueron las mismas que las mencionadas en la sección anterior. Se tomaron muestras diarias para caracterizar la curva de crecimiento mediante la gráfica de la densidad celular en función de los días de cultivo. La DC (células mL^{-1}), el μ (div día^{-1}) y el TD (horas) se calcularon utilizando las Ecuaciones 2.1, 2.2 y 2.3, respectivamente, de acuerdo a lo detallado en la Sección 2.5 del Capítulo 2 del presente trabajo de tesis. La biomasa final fue cosechada mediante centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos y almacenada a -80°C hasta su uso.

6.2.3. Identificación molecular y análisis filogenético

Parte de la biomasa cosechada en el paso anterior fue utilizada para la identificación a nivel molecular. El ADN fue extraído usando DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones provistas por el fabricante. La identificación se realizó amplificando el gen que codifica para el 18S rARN. Las determinaciones se llevaron a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*). Las condiciones incluyeron un paso inicial de desnaturalización a 95°C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos, cada uno conformado por una etapa de desnaturalización a 94°C durante 40 segundos, una etapa de apareamiento a 52°C durante 50 segundos, y una de extensión subiendo la temperatura a 72°C durante 1 minuto; finalmente se realizó un paso de extensión final a 72°C por 7 minutos. Los productos amplificados fueron recuperados y secuenciados (Macrogen, Inc.). Las secuencias homólogas para otras especies de Pavlovophyceae fueron obtenidas de la base de datos GenBank usando búsquedas BLASTn. Las secuencias se alinearon con AliView v.1.26 (Larsson 2014) y se utilizó IQtree2 (Nguyen et al., 2015) para ejecutar los análisis filogenéticos.

6.2.4. Cultivos en fotobiorreactor

Se realizaron cultivos *batch* autotróficos en fotobiorreactor durante 10 días empleando medio de cultivo *f/2* en un volumen final de 10 litros. Las características del fotobiorreactor fueron detalladas en el Capítulo 2, Sección 2.4.1. El inóculo de células en fase de crecimiento exponencial se obtuvo realizando un escalado progresivo (ver Capítulo 2, Sección 2.4.2.). En este caso, se mantuvo la temperatura a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 7 días y, una vez alcanzada la fase estacionaria de crecimiento, ésta se disminuyó a $10 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 3 días (condición EBTEs). Estos resultados fueron comparados con los obtenidos luego del cultivo de la especie a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 10 días (condición Control). Los cultivos recibieron aireación continua y 1% de CO_2 durante una hora diaria. Además, se aplicó agitación constante a 9 rpm. La intensidad lumínica equivalente a $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fue aportada por luces LED respetando un ciclo de luz:oscuridad 12:12 h. La biomasa final fue cosechada mediante centrifugación a 3500 rpm durante 15 min a 10°C lavada con solución salina, liofilizada y almacenada a -80°C .

6.2.4.1 Parámetros de crecimiento y producción de biomasa

La DC (células mL⁻¹), μ (div. día⁻¹), TD (horas) y la producción de biomasa expresada como PS (mg L⁻¹), se calcularon mediante las ecuaciones 2.1, 2.2, 2.3 y 2.4 (Capítulo 2, Sección 2.5)

6.2.4.2. Cuantificación de pigmentos fotosintéticos

Los pigmentos fotosintéticos primarios y secundarios fueron cuantificados espectrofotométricamente siguiendo el método propuesto por Jeffrey y Humphrey (1975) y Strickl y Parsons (1972). La técnica consiste en medir con un espectrofotómetro la extinción de la luz al atravesar una cubeta en la que se ha colocado un extracto de pigmentos celulares. Es decir, la intensidad de luz que absorben estos pigmentos a una determinada longitud de onda (λ), lo cual se relaciona directamente con la concentración de estos pigmentos en el extracto. Para cada condición de crecimiento, se colectaron muestras de 40 mL correspondientes a los 0, 3, 6 y 9 días de cultivo. Las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos. Los pellets obtenidos, fueron re-suspendidos en metanol y mantenidos en hielo y al resguardo de la luz. Posteriormente, se realizaron lecturas de absorbancia (A) entre las longitudes de onda de 630 nm y 750 nm de los extractos utilizando un espectrofotómetro Shimatzu UV- Visible 1603. El contenido [μ g] de clorofila *a* (cl *a*), clorofila *c* (cl *c*) y carotenoides (car) fueron estimados a partir de las ecuaciones propuestas por Jeffrey y Humphrey (1975) y Strickl y Parsons (1968), respectivamente:

$$Cl\ a = 11,43 * (A_{664\text{ nm}}) - 0,64 * (A_{630\text{ nm}}) \quad \text{Ecuación 6.1}$$

$$Cl\ c = 27,09 * (A_{630\text{ nm}}) - 3,63 * (A_{663\text{ nm}}) \quad \text{Ecuación 6.2}$$

$$Car = 4 * (A_{480\text{ nm}} - A_{750\text{ nm}}) \quad \text{Ecuación 6.3}$$

6.2.4.3. Determinación del contenido y composición lipídica de la biomasa

6.2.4.3.1. Estimación del contenido de lípidos neutros

Las gotas lipídicas intracelulares fueron detectadas mediante su tinción con el colorante Sudán IV y Rojo Nilo y observación al microscopio óptico y de fluorescencia, de acuerdo a lo detallado en la Sección 2.6.1 del Capítulo 2. La cinética de acumulación de

lípidos neutros se realizó mediante mediciones de fluorescencia con el empleo de Rojo Nilo de acuerdo a lo detallado en el Capítulo 2, Sección 2.6.1). Para ello, se colectaron muestras diarias, a las cuales se añadió Rojo Nilo (RN) en acetona. Luego, se midió la intensidad relativa de fluorescencia de RN (IRF-RN) medida en unidades arbitrarias de fluorescencia (u.a.f) empleando un espectrofluorómetro.

6.2.4.3.2. Determinación del contenido de lípidos totales y de las fracciones lipídicas

Para conocer la cantidad de lípidos disponibles en cada condición de temperatura, se realizó la extracción lipídica de acuerdo al método de Folch modificado (ver Sección 2.6.2, Capítulo 2). Además, se realizó un fraccionamiento lipídico a partir de 30 mg de lípidos obteniéndose lípidos neutros (LN), glicolípidos (GL) y fosfolípidos (FL), según lo detallado en la Sección 2.6.4, del Capítulo 2. Luego, el contenido de lípidos totales (LT) y el correspondiente a cada fracción lipídica fueron determinados gravimétricamente.

6.2.4.3.3. Cuantificación de TAGs y esteroides

La producción de TAGs y esteroides se evaluó según lo detallado en la Sección 2.6.5, del Capítulo 2. Para la obtención de los extractos de TAGs y esteroides de *P. gyrans* se realizó una cromatografía de capa fina. Las bandas resultantes fueron identificadas mediante el uso de estándares adecuados, luego fueron raspadas y eluidas. Finalmente, se llevaron a cabo las cuantificaciones espectrofotométricas de TAGs y esteroides empleando el kit enzimático colorimétrico.

6.2.4.3.4. Identificación de ácidos grasos y esteroides mediante cromatografía gaseosa

Los extractos lipídicos (LT, LN, GL y FL) fueron derivatizados en FAMES para la identificación de sus AGs mediante cromatografía gaseosa. La producción de AGs (en mg cada 100 g de biomasa) fue estimada a partir del contenido de AGs expresados como porcentaje (%) del total de FAMES. Para más detalles acerca de la metodología, consultar la Sección 2.7.1 del Capítulo 2.

Por otra parte, se analizó la composición de esteroides de la biomasa obtenida en el día final de cultivo en ambas condiciones: control y EBTEs, de acuerdo a lo detallado en la Sección 2.7.2 del Capítulo 2. Brevemente, luego de la separación de los esteroides mediante

cromatografía en capa fina, éstos fueron recuperados y derivatizados en trimetilsililésteres para su detección e identificación mediante cromatografía gaseosa.

6.2.4.4. Cálculo de índices nutricionales de calidad lipídica

Considerando el perfil de AGs (% del total de FAMES) obtenido a partir de los extractos de LT de *P. gyrans*, se calcularon los índices aterogénico (IA), trombogénico (IT) y e hipocolesterolémico (HH) mediante las siguientes ecuaciones (Ulbricht y Southgate, 1991; Chen y Liu, 2020):

$$AI = (12:0 + (4 * 14:0) + 16:0) / (\Sigma MUFA + \Sigma PUFA)$$

$$TI = (14:0 + 16:0 + 18:0) / [(0.5 * 18:1) + (0.5 * \Sigma \text{ de otros MUFA}) + (0.5 * \omega 6) + (3 * \omega 3) + (\omega 3 / \omega 6)]$$

$$HH = (18:1 + \Sigma PUFA) / (12:0 + 14:0 + C16:0)$$

6.2.5. Análisis estadístico

Los resultados son expresados como el promedio \pm desviación estandar (n=3). El análisis estadístico de los datos fue realizado utilizando el software Infostat (Di Rienzo et al. 2018). Para detectar diferencias entre las condiciones se aplicó un test t-Student ($p < 0,05$).

6.3. Resultados

6.3.1. Identificación de la especie y caracterización del crecimiento bajo condiciones de laboratorio

La especie aislada fue identificada por medio de características morfológicas como *Pavlova gyrans* Butcher (1952) (Fig. 6.1). Las células observadas al microscopio óptico se mostraron solitarias (Fig. 6.1a-c) y muy móviles. Su forma fue variable, siendo mayormente oval o elongada (3-5 μm ancho y 4-8 μm largo), presentando dos flagelos, uno posterior y otro anterior (Fig. 6.1a), dos cloroplastos de color amarillo verdoso (Fig. 6.1b) y un estigma conspicuo rojo en la región apical (Fig. 6.1c). Usualmente, se observaron cuerpos hialinos en la región posterior (Fig. 6.1b), parte de los cuales hicieron protrusión en la célula, formando estructuras con el aspecto de pseudópodos (Fig. 6.1c).

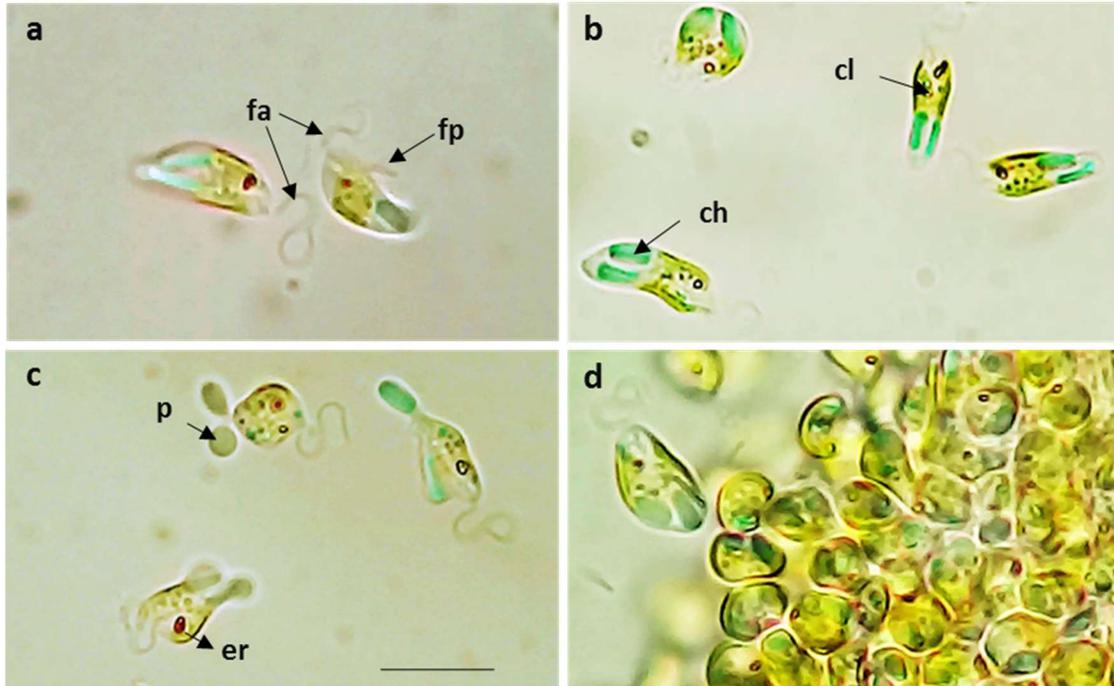


Figura 6.1. *Pavlova gyrans* observada con microscopio óptico. a-c) Células flageladas solitarias. d) Agregados celulares. fa: flagelo anterior; fp: flagelo posterior; ch: cuerpo hialino; cl: cloroplastos; er: estigma; p: estructura semejante a un pseudópodo. Barra de escala 5 µm para todas las figuras.

La caracterización morfológica fue consistente con la identificación molecular. En la Figura 6.2 se observa el árbol filogenético resultante basado en el análisis de la secuencia del gen 18S rARN. La secuencia de genes obtenida fue 100% idéntica a la de otras cepas de *P. gyrans*. Éstas formaron un grupo monofilético con otras secuencias hermanas obtenidas de *P. pinguis* y *P. granifera*. Otras especies del género *Pavlova* fueron asociadas con *Diacronema* (Fig.6.2). Los otros dos géneros en la familia Pavlovaceae son representados por la única especie del género *Exanthemachrysis*, *E. gayraliae*, y la especie tipo del género *Rebecca*, *R. salina* (Fig. 6.2).

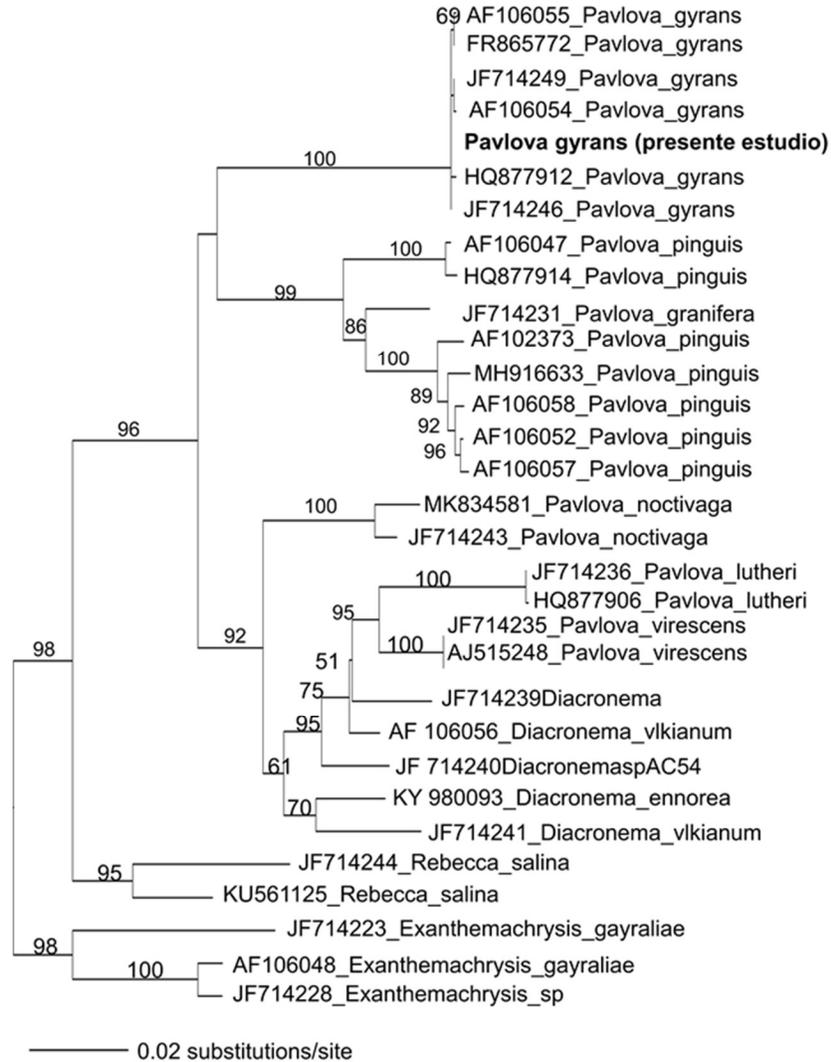


Figura 6.2. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en el análisis del gen nuclear 18S r ARN. Los valores de *bootstrap* se obtuvieron a partir del análisis Maximum Likelihood.

La Figura 6.3a muestra el crecimiento de *P. gyrans* bajo condiciones de laboratorio, alcanzando la fase estacionaria en el día 7 de cultivo (Fig. 6.3b). Durante esta fase, se observaron agregados celulares embebidos en mucílago (Fig. 6.1d). La máxima μ y el TD fueron $1,01 \pm 0,17$ div día⁻¹ y $24,31 \pm 4,1$ h, respectivamente.

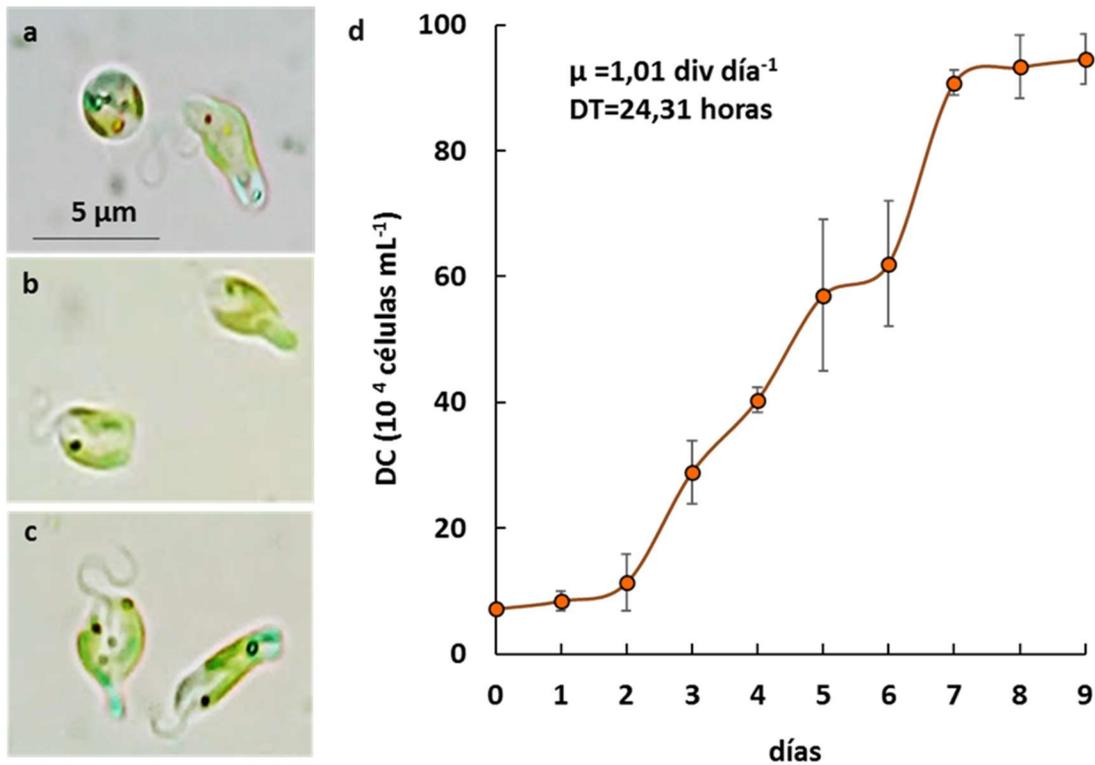
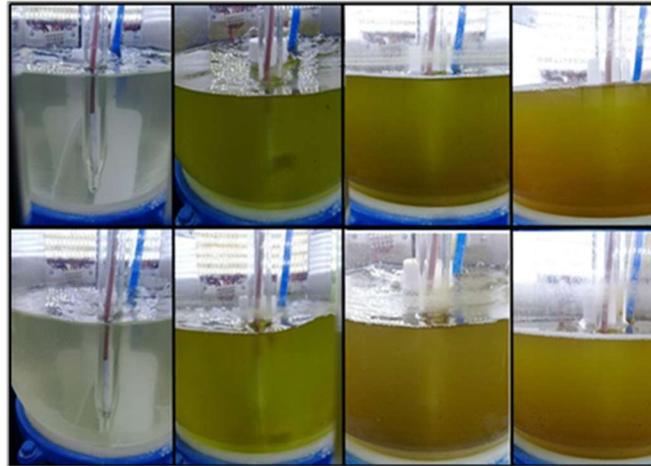


Figura 6.3. Caracterización del crecimiento de *Pavlova gyrans* bajo condiciones de laboratorio. a-c) Células de *P. gyrans* luego de 2 (a), 4 (b) y 7 (c) días de cultivo. d) La curva de crecimiento muestra los cambios en la densidad celular (DC) en función de los días de cultivo. Los valores representan el promedio \pm el desvío estándar (n=3). Los parámetros μ y TD se calcularon durante la fase exponencial.

6.3.2. Crecimiento y producción de biomasa en el cultivo en fotobiorreactor

Una vez demostrada la factibilidad de desarrollar cultivos de *P. gyrans* en condiciones de laboratorio, se realizaron cultivos a mayor escala en fotobiorreactor (Fig. 6.4a). Los valores obtenidos de DC y PS de *P. gyrans* durante 10 días de cultivo bajo las dos condiciones de temperatura ensayadas (Control y EBTEs) se muestran en la Figura 6.4b. Los cultivos de *P. gyrans* alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento en los días 7 (Control) y 9 (EBTEs). La DC y el PS incrementaron significativamente en la condición EBTEs respecto al control ($p < 0,05$) (Fig. 6.4b; Tabla 6.1). Los parámetros de crecimiento (μ y TD) obtenidos para los cultivos en fotobiorreactor, no mostraron diferencias significativas entre las dos condiciones ensayadas ($p > 0,05$) (Tabla 6.1).

a



b

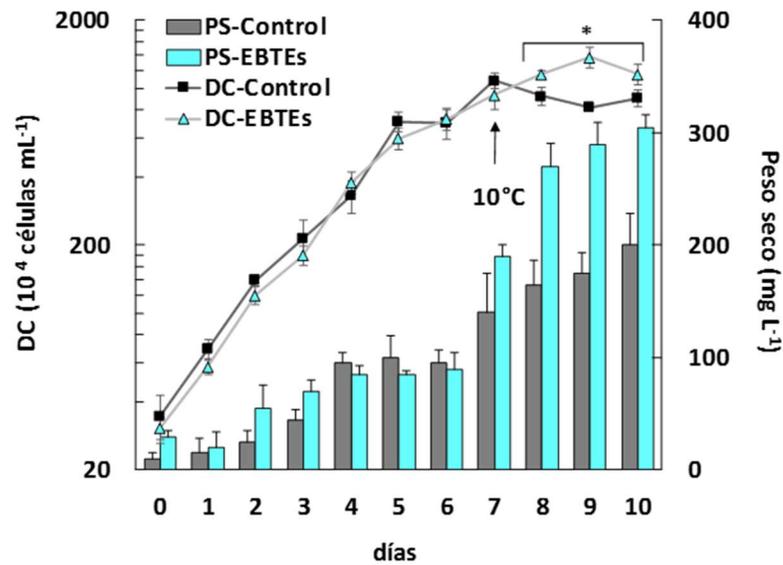


Figura 6.4. Caracterización del crecimiento de *Pavlova gyrans* en fotobiorreactor. a) Fotobiorreactor con cultivos luego de 0, 2, 4 y 9 días de crecimiento bajo la condición Control (arriba) y EBTEs (abajo). Notar el cambio de color de los cultivos. **b)** El crecimiento se expresa como densidad celular (DC, cél mL⁻¹) y la producción de biomasa como peso seco (PS, mg L⁻¹). Los valores que se muestran representan el promedio \pm desviación estándar (n=3). * Indica diferencias significativas entre condiciones (p < 0,05).

Tabla 6.1. Resumen de parámetros obtenidos para *Pavlova gyrans* cultivada en fotobioreactor. Los valores se expresan como la media \pm desviación estándar (n = 3). Los valores de velocidad de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (TD) se calcularon en la fase de crecimiento exponencial, mientras que los otros parámetros se midieron el día 10 de cultivo. DC: densidad celular; PS: peso seco; TAG: triglicéridos. * Representa diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

	Control	EBTEs
μ (div día ⁻¹)	1,01 \pm 0,21	0,98 \pm 0,32
TD (horas)	23,81 \pm 2,31	24,42 \pm 0,56
DC (10 ⁴ células mL ⁻¹)	899 \pm 77	1156 \pm 125
PS (mg L ⁻¹)	200 \pm 28,28	305 \pm 10,60 *
TAGs (mg L ⁻¹)	6,35 \pm 0,28	5,93 \pm 0,34

6.3.3. Estimación del contenido de lípidos neutros

La cinética de acumulación de lípidos neutros fue evaluada mediante mediciones de la intensidad relativa de fluorescencia de Rojo Nilo. A partir del día 5 se observa un incremento de los valores de fluorescencia, tanto para la condición control como la de estrés térmico (Fig. 6.5a), sin registrarse diferencias significativas entre ambas ($p > 0,05$). En ambos casos, el valor máximo se obtuvo hacia el final del cultivo (día 10) y representó un incremento de 85 veces por sobre el valor inicial (día 0). Estos datos fueron consistentes con la aparición de gotas lipídicas, las cuales se detectaron mediante microscopía óptica y de fluorescencia luego del empleo del mismo colorante (Fig. 6.5b). En este sentido, la producción de TAG al final del cultivo también fue similar para ambas condiciones, alcanzando un valor de ≈ 6 mg L⁻¹ ($p < 0,05$) (Tabla 6.1).

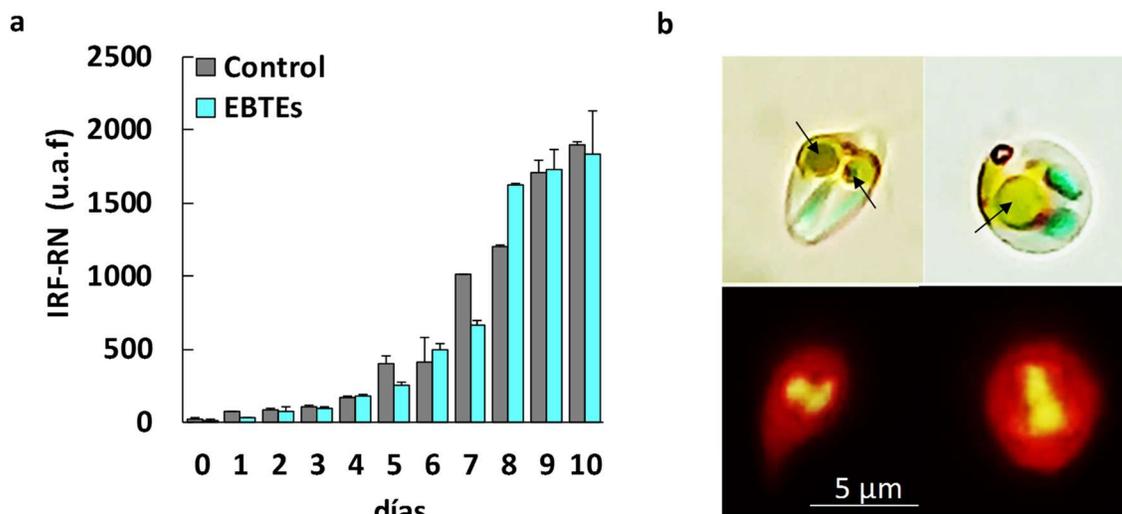


Figura 6.5. Evaluación de la síntesis de lípidos neutros en *Pavlova gyrans*. **a)** Análisis de la fluorescencia de Rojo Nilo (RN) en las condiciones control y EBTEs. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias de fluorescencia promedio (u.a.f) \pm desviación estándar ($n = 3$). **b)** Gotas lipídicas de *P. gyrans* en la fase de crecimiento estacionaria. Arriba: células teñidas con SUDAN IV y observadas al microscopio óptico. Las flechas indican los cuerpos lipídicos. Abajo: Células tratadas con RN y observadas al microscopio de fluorescencia. Los cuerpos lipídicos se observan en amarillo.

6.3.4. Lípidos totales y fraccionamiento lipídico

El contenido de lípidos totales de la biomasa representó un ≈ 12 -13% del peso seco en ambas condiciones de temperatura ($p > 0,05$). La fracción mayoritaria fue la de LN, representando un $\approx 63\%$ de LT para ambas condiciones de temperatura, seguida por la fracción de GL ($\approx 32\%$ de LT) y la de FL ($\approx 5\%$ de LT) (Fig. 6.6a) ($p > 0,05$). Sin embargo, cuando los resultados fueron expresados como mg L^{-1} , la producción de LT fue significativamente mayor en el caso de la condición EBTEs, equivalente a $38,31 \text{ mg L}^{-1}$ ($p < 0,05$), y representó un incremento del $\approx 40\%$ por encima del valor obtenido para la condición control (Fig. 6.6b). A su vez, la producción de cada una de las fracciones fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en el caso de la condición EBTEs, alcanzando valores de $24,41 \text{ mg L}^{-1}$ (LN), $11,64 \text{ mg L}^{-1}$ (GL) y $2,26 \text{ mg L}^{-1}$ (FL) (Fig. 6.6b).

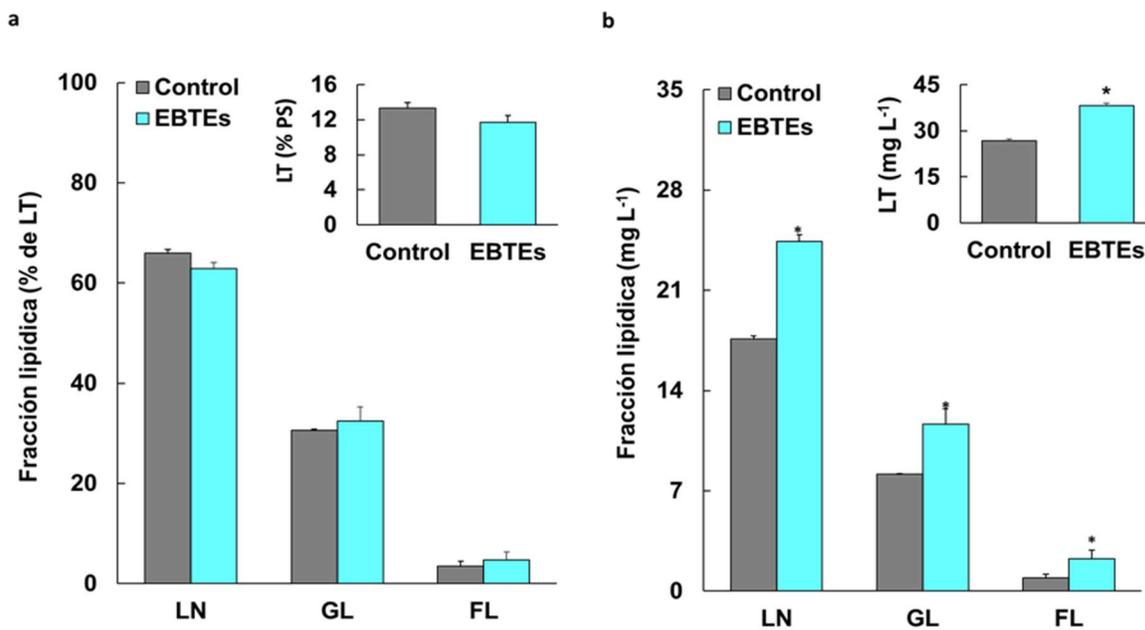


Figura 6.6. Contenido lipídico relativo y absoluto de *Pavlova gyrans* cultivada bajo condiciones control (C) y de estrés por baja temperatura (EBTEs). **a)** Representación gráfica del contenido relativo de lípidos neutros (LN), glicolípidos (GL) y fosfolípidos (FL) expresados como porcentaje (%) de lípidos totales (LT). Gráfico insertado: contenido relativo de LT expresado como porcentaje de peso seco (% PS). **b)** Fracciones lipídicas expresadas en términos productivos (mg L⁻¹ de cultivo). Gráfico insertado: producción absoluta de LT (mg L⁻¹). Los valores representan medias ± SD (n = 2) para las condiciones Control y EBTEs. * Indica diferencias estadísticamente significativas entre condiciones (p<0,05).

6.3.5. Caracterización de ácidos grasos

La composición porcentual de AGs de *P. gyrans* obtenida para las condiciones Control y EBTEs, se observa en la Tabla 6.2. Considerando los LT, el contenido de SFA disminuyó significativamente bajo la condición EBTEs (p<0,05). Los principales representantes de este grupo fueron los ácidos mirístico (14:0) y palmítico (16:0) en ambas condiciones experimentales. Sin embargo, el estrés térmico indujo una disminución significativa de 14:0 (Tabla 6.2) (p < 0,05). Los MUFAs representaron el ≈28% de ambas condiciones experimentales (p>0,05) (Tabla 6.2), siendo el ácido palmítico (16:1) el principal (≈25% del total de AGs) (Tabla 6.2). Los PUFAs fueron dominantes en *P. gyrans*, tanto en la condición control como en la EBTEs. Éstos mostraron un incremento significativo en respuesta a la disminución de la temperatura de cultivo, pasando de representar 35,71%

($\pm 4,6$) (control) a un 41,6% ($\pm 1,5$) (EBTEs) ($p < 0,05$) (Tabla 6.2). Contrariamente, el contenido relativo de $\omega 3$ no mostró cambios significativos en respuesta a la disminución de la temperatura ($p > 0,05$) (Fig. 6.7a), mientras que los $\omega 6$ incrementaron de 16,09 % ($\pm 1,45$) a 18,65% ($\pm 0,93$) ($p < 0,05$) (Fig. 6.7b). Los principales PUFAs detectados luego de aplicar la disminución repentina de la temperatura de cultivo fueron el EPA y DPA, los cuales representaron cerca del 80% de los $\omega 3$ y el 50% del total de $\omega 6$, respectivamente (Fig. 6.7 c, d).

Además, se analizó la composición de AGs en las fracciones lipídicas (LN, GL y PL) (Tabla 6.2). En la fracción de LN, los AGs 14:0 y 15:0 presentaron variaciones significativas debido al estrés por baja temperatura ($p < 0,05$) (Tabla 6.2). Contrariamente, el principal MUFA (16:1) no mostró cambios bajo la condición EBTEs respecto al control ($p > 0,05$). En todos los PUFAs analizados se observaron variaciones significativas en respuesta a la disminución de la temperatura de cultivo ($p < 0,05$), excepto en el DHA (Tabla 6.2). La fracción de GL mostró una ligera disminución en el porcentaje de PUFAs como consecuencia del estrés térmico, a expensas de un incremento en los porcentajes de SFAs y MUFAs ($p < 0,05$) (Tabla 6.2). Finalmente, respecto de la fracción de FL, el porcentaje de MUFAs incrementó significativamente, mientras que los SFAs y PUFAs disminuyeron cuando *P. gyrans* creció bajo la condición EBTEs ($p < 0,05$) (Tabla 6.2). El EPA fue el PUFA $\omega 3$ más abundante en todas las fracciones lipídicas sometidas a estrés por temperatura, representando un 80% del total de $\omega 3$ (Fig. 6.7c). Por otro lado, en las fracciones de LN y FL, el principal $\omega 6$ fue el DPA, mientras que el LA fue el mayoritario en la fracción de GL, alcanzando en todos los casos más del 40% del total de PUFAs $\omega 6$ (Fig. 6.7d).

Tabla 6.2. Composición relativa de ácidos grasos de *Pavlova gyrans*. Los resultados se expresan como porcentaje (%) del total. Se muestra la composición correspondiente al extracto de lípidos totales (LT) y a cada una de las fracciones lipídicas: LN (lípidos neutros), GL (glicolípidos) y FL (fosfolípidos) obtenidos para las condiciones Control y EBTEs. El símbolo Σ denota la sumatoria de SFAs; MUFAs y PUFAs. Los valores corresponden al promedio \pm desviación estándar (n = 4). * Indica diferencias estadísticamente significativas entre condiciones ($p < 0,05$).

Ácidos grasos	LT		LN		GL		FL	
	Control	EBTEs	Control	EBTEs	Control	EBTEs	Control	EBTEs
SFAs								
C 14:0	17.53 \pm 0.96	14.79 \pm 0.86 *	15.67 \pm 0.63	12.80 \pm 0.65 *	29.70 \pm 1.03	31.69 \pm 0.82	8.79 \pm 0.31	13.6 \pm 1.99 *
C 15:0	1.68 \pm 0.02	0.36 \pm 0.03 *	1.58 \pm 0.09	0.35 \pm 0.01 *	2.63 \pm 0.14	1.03 \pm 0.01 *	1.34 \pm 0.20	...
C 16:0	14.89 \pm 1.01	15.14 \pm 0.32	15.52 \pm 1.05	17.96 \pm 1.66	17.81 \pm 0.48	21.03 \pm 0.09 *	25.98 \pm 0.21	23.06 \pm 1.60
C 17:0	0.56 \pm 0.22	0.33 \pm 0.01	0.72 \pm 0.22	0.33 \pm 0.00	...	0.30 \pm 0.07	0.73 \pm 0.01	...
C18:0	0.68 \pm 0.22	0.22 \pm 0.04 *	0.73 \pm 0.33	0.44 \pm 0.20	1.17 \pm 0.97	0.63 \pm 0.03	15.25 \pm 0.05	10.96 \pm 5.74
C20:0	...	0.13 \pm 0.03						
MUFAs								
C 14:1	0.12 \pm 0.02	0.08 \pm 0.02 *	0.15 \pm 0.03	0.10 \pm 0.01	2.97 \pm 1.54 *
C 16:1	25.19 \pm 4.07	24.54 \pm 0.60	28.85 \pm 3.04	24.57 \pm 0.89	17.71 \pm 0.52	21.54 \pm 0.08 *	8.03 \pm 0.41	17.22 \pm 2.04 *
C 17:1	1.27 \pm 0.04	1.03 \pm 0.03 *	1.24 \pm 0.09	0.94 \pm 0.02 *	1.80 \pm 0.12	1.40 \pm 0.01 *
C 18:1	1.28 \pm 0.34	1.12 \pm 0.03	1.57 \pm 0.21	1.38 \pm 0.21	0.79 \pm 0.31	1.58 \pm 0.11 *	4.79 \pm 0.30	5.24 \pm 3.10
C 24:1	1.10 \pm 0.35	0.89 \pm 0.11	0.57 \pm 0.14	0.56 \pm 0.03	2.39 \pm 0.03	1.53 \pm 0.05	1.26 \pm 1.32	...
PUFAs								
C 18:2ω6 (LA)	3.76 \pm 0.37	3.41 \pm 0.04	3.82 \pm 0.69	4.44 \pm 0.12 *	0.58 \pm 0.02	1.55 \pm 0.02 *	5.51 \pm 1.80	3.05 \pm 0.66
C 18:3ω6 (GLA)	0.28 \pm 0.04	0.22 \pm 0.02 *	0.31 \pm 0.02	0.23 \pm 0.01 *
C 18:3ω3 (ALA)	0.66 \pm 0.05	0.24 \pm 0.01 *	0.59 \pm 0.03	0.19 \pm 0.01 *	0.87 \pm 0.05	0.29 \pm 0.01 *
C 20:2ω6 (EDA)	5.43 \pm 0.29	4.28 \pm 0.06 *	5.33 \pm 0.35	3.78 \pm 0.08 *	5.25 \pm 0.32	4.00 \pm 0.05 *	1.21 \pm 0.02	2.21 \pm 0.39 *
C 20:4ω6 (ARA)	1.27 \pm 0.10	1.45 \pm 0.04 *	1.35 \pm 0.01	1.58 \pm 0.01 *	0.43 \pm 0.05	0.27 \pm 0.00 *	0.72 \pm 0.21	...
C 20:5ω3 (EPA)	14.64 \pm 0.55	18.17 \pm 0.55 *	13.05 \pm 2.43	17.08 \pm 0.10 *	13.17 \pm 0.34	8.78 \pm 0.29 *	19.68 \pm 0.96	15.18 \pm 3.49
C 22:5ω6 (DPA)	5.35 \pm 0.64	9.29 \pm 0.77 *	5.18 \pm 0.90	9.05 \pm 0.42 *	3.55 \pm 0.24	3.24 \pm 0.06	1.81 \pm 0.01	5.02 \pm 0.15 *
C 22:6ω3 (DHA)	4.32 \pm 0.80	4.31 \pm 0.27	3.76 \pm 1.28	4.22 \pm 0.11	2.17 \pm 0.10	1.13 \pm 0.04 *	4.74 \pm 0.06	2.23 \pm 0.39 *
Σ SFAs	35.33 \pm 0.47	30.97 \pm 1.00 *	34.22 \pm 2.31	31.89 \pm 1.21	51.31 \pm 0.67	54.20 \pm 0.97 *	52.25 \pm 0.39	47.61 \pm 0.97 *
Σ MUFAs	28.96 \pm 4.11	27.66 \pm 0.53	32.38 \pm 3.25	27.55 \pm 0.74 *	22.67 \pm 0.37	26.23 \pm 0.37 *	14.08 \pm 0.61	25.43 \pm 0.54 *
Σ PUFAs	35.71 \pm 4.57	41.33 \pm 1.53 *	33.39 \pm 5.56	40.56 \pm 0.46 *	26.01 \pm 0.71	19.57 \pm 0.60 *	33.67 \pm 1.00	27.70 \pm 1.51 *

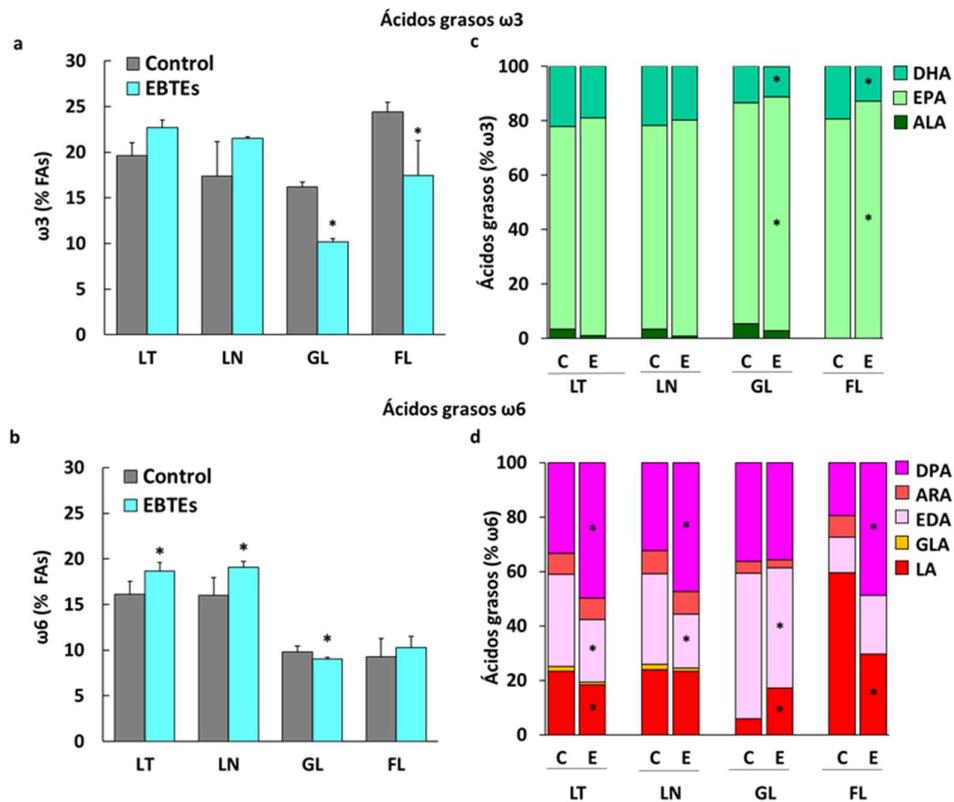


Figura 6.7. Efecto del estrés por disminución de la temperatura de cultivo sobre el contenido relativo de ácidos grasos poliinsaturados ω3 y ω6 de *Pavlova gyrams*. **a)** Contenido relativo de ω3 y **b)** ω6 de los diferentes extractos lipídicos (LT: lípido total; LN: lípidos neutros, GL: glicolípidos y FL: fosfolípidos) en las condiciones control y EBTEs. Los valores corresponden a la media ± desviación estándar (n = 4). * Indica diferencias estadísticamente significativas entre condiciones (p<0,05). **c y d)** Efecto del estrés por baja temperatura sobre los AGs ω3 (% del total de ω3) (**c**), y los AGs ω6 (% del total de ω6) (**d**). C: control; E: EBTEs; Ácidos grasos ω3: ácido docosahexaenoico (DHA); ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido linolénico (ALA). Ácidos grasos ω6: docosapentaenoico (DPA), araquidónico (ARA), eicosadienoico (EDA), gamma-linolénico (GLA) y linoleico (LA).

6.3.6. Producción de ácidos grasos

El contenido de AGs de la biomasa fue expresado en términos productivos (Fig. 6.8 y Fig. 6.9). El análisis de los extractos de LT mostró un incremento significativo en la producción de PUFAs bajo la condición EBTEs respecto a la condición control, alcanzando valores de ≈ 4 y ≈ 4.8 g 100g biomasa⁻¹, respectivamente (p<0,05). Además, es de destacar que tanto los PUFAs ω3 como los ω6 aumentaron notablemente en respuesta al estrés por disminución de la temperatura (p<0,05) (Fig. 6.8a, insertada). Este efecto se debió principalmente al incremento en la producción de EPA y DPA.

Además, la fracción de LN fue la principal contribuyente a la producción de PUFAs en respuesta al estrés térmico en *P. gyrans* (Fig. 6.9).

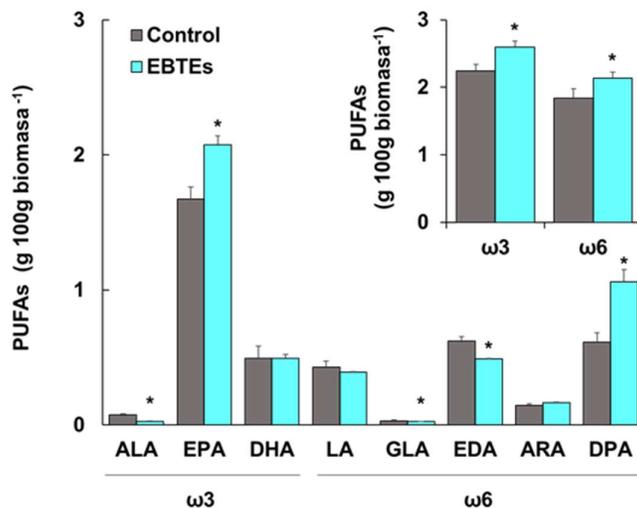


Figura 6.8. Análisis de la producción de PUFAs en *Pavlova gyrans*. Los resultados se expresan en 100 gramos de biomasa ($\text{g } 100 \text{ g biomasa}^{-1}$) y corresponden a extractos de lípidos totales obtenidos en cultivos bajo condiciones control y EBTEs. **Gráfico insertado: Producción de PUFAs $\omega 3$ y $\omega 6$.** Factor de conversión (F): 0,86. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$) en la producción de PUFAs entre condiciones.

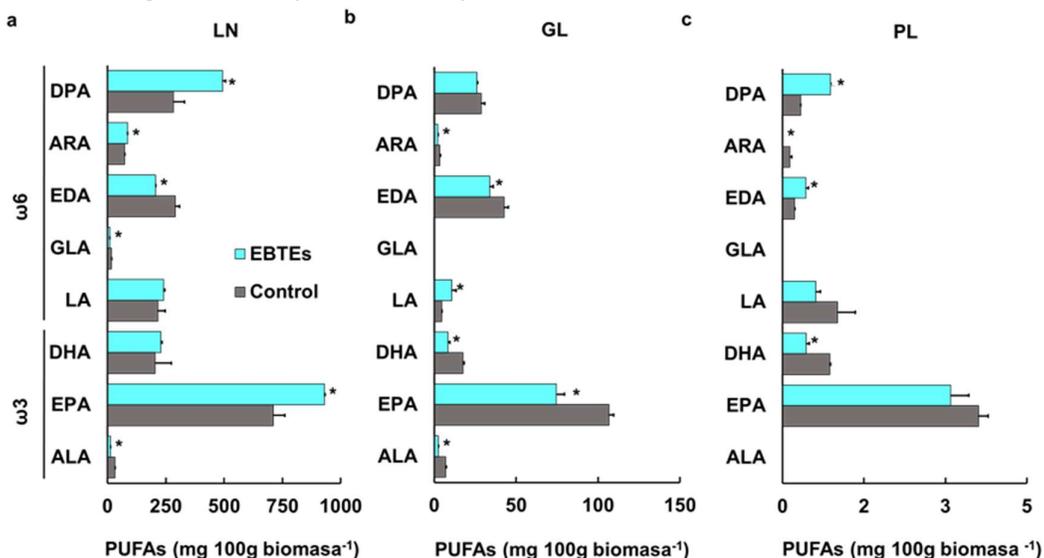


Figura 6.9. Producción de PUFAs en las fracciones lipídicas. Los resultados se expresan en 100 g de biomasa ($\text{mg } 100 \text{ g biomasa}^{-1}$) y corresponden a las fracciones de lípidos neutros (LN), glicolípidos (GL) y fosfolípidos (FL) para las condiciones control y EBTEs. Factores de conversión (F): 0,62; 0,21 y 0,03 para los LN, GL y FL, respectivamente. PUFAs $\omega 3$: ácido linolénico (ALA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA). PUFA $\omega 6$: linoleico (LA), gamma-linolénico (GLA), eicosadienoico (EDA), araquidónico (ARA) y docosapentaenoico (DPA). El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$) en la producción de PUFAs entre condiciones ensayadas ($n=4$)

6.3.7. Índices nutricionales de calidad lipídica

Los valores correspondientes a los índices lipídicos aterogénico (IA), trombogénico (IT) e hipocolesterolémico (HH) se muestran en la Tabla 6.3. En la misma se observa que el estrés térmico indujo una reducción de los índices IA e IT en *P. gyrans*. De manera opuesta, el índice HH mostró un aumento significativo ($p < 0,05$). Complementariamente, el análisis de estos índices en cada una de las fracciones lipídicas permitió establecer que los cambios observados en respuesta al estrés térmico coinciden con aquellos sufridos por la fracción de LN.

Tabla 6.3. Índices lipídicos calculados para la biomasa de *Pavlova gyrans*. Se muestran los valores obtenidos para los índices aterogénico (IA), trombogénico (IT) e hipocolesterolémico (HH) correspondientes a las fracciones de lípidos totales (LT), lípidos neutros (LN), glicolípidos (GL) y fosfolípidos (FL) para la condición control y EBTEs. Los valores se presentan como media \pm desviación estándar ($n = 4$). *Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las condiciones mencionadas.

índices	LT		LN		GL		FL	
	Control	EBTEs	Control	EBTEs	Control	EBTEs	Control	EBTEs
IA	1.31 \pm 0.03	1.08 \pm 0.07 *	1.19 \pm 0.09	1.02 \pm 0,01 *	2.85 \pm 0.08	3.16 \pm 0.15 *	1.30 \pm 0.03	1.57 \pm 0.03 *
IT	0.40 \pm 0.05	0.33 \pm 0.02 *	0.42 \pm 0.08	0.36 \pm 0.01	0.74 \pm 0.01	1.03 \pm 0.06 *	0.57 \pm 0.01	0.57 \pm 0.05
HH	1.14 \pm 0.13	1.42 \pm 0.10 *	1.13 \pm 0.22	1.36 \pm 0.03 *	0.55 \pm 0.02	0.41 \pm 0.03 *	1.10 \pm 0.04	0.88 \pm 0.03 *

6.3.8. Análisis de esteroides

Se analizó el efecto de la baja temperatura sobre los esteroides de *P. gyrans* (Fig. 6.9, Tabla 6.4). El valor máximo de esteroides se observó en el día 4, siendo de $\approx 4 \text{ mg L}^{-1}$ de esteroides en ambas condiciones de temperatura ensayadas (Fig. 6.9). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el día 9 asociadas al estrés térmico ($p > 0,05$) (Fig. 6.9a). La Figura 6.9b muestra el porcentaje relativo de esteroides libres (EL) y esterificados (EE) a AGs a lo largo de los días de cultivo. Entre los días 2 y 7, se evidenció una mayor proporción de EE ($\approx 70\%$) respecto a los EL ($\approx 30\%$) mientras que, hacia el final del ensayo (día 9), el estrés por baja temperatura afectó su distribución, notándose un aumento en el porcentaje de EL y una disminución en el de EE respecto a la condición control ($p < 0,05$) (Fig. 9b).

La determinación de la composición de esteroides mediante cromatografía de gases para extractos de *P. gyrans* en el día 9 reveló que 24-etilcolesta-5,22-dien-3 β -ol y 24-etilcolesta-5,24-dien-3 β -ol fueron las especies moleculares más abundantes identificadas (Tabla 6.3).

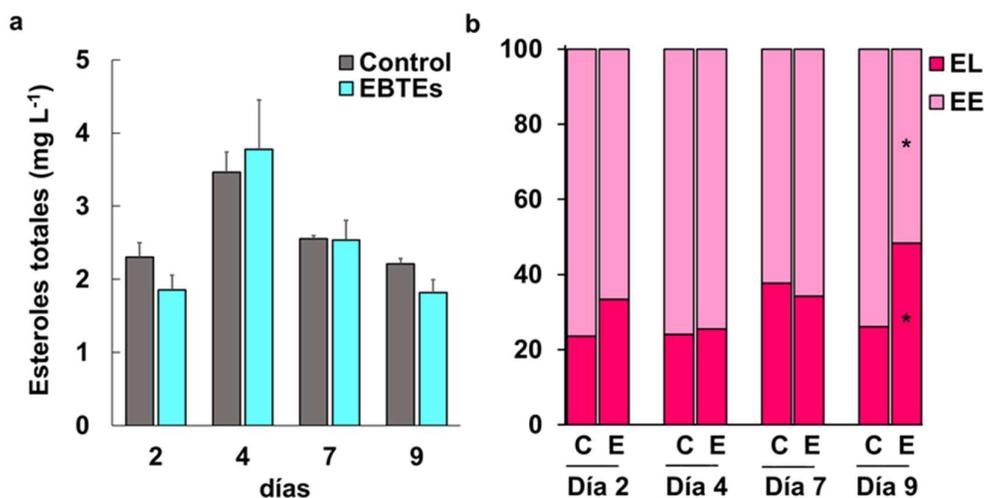


Figura 6.9. Determinación espectrofotométrica de esteroides de *Pavlova gyrans*. a) Producción de esteroides totales (ET) expresados como producción (mg L^{-1}). b) Contenido relativo (% de ET) de esteroides libres (EL) y esteroides esterificados (EE). Los valores corresponden a los días 2, 4, 7 y 9 de cultivo para las condiciones C y EBTEs ($n=3$). Los asteriscos (*) representan diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) entre condiciones.

Tabla 6.4. Análisis de la composición de esteroides de *Pavlova gyrans* en condiciones control y EBTEs. TRR: Tiempos de retención de esteroides relativos al estándar interno 5- α -colestano-3- β -ol ($\text{}$), detectados a partir de cromatografía gaseosa. * Indica diferencias significativas entre condiciones ($p<0,05$).

Nombre sistemático de esteroides	TRR *	Esteroides ($\mu\text{g L}^{-1}$ de esteroides libres)	
		Control	EBTEs
Colest-5-en-3 β -ol	0.98	1.21 \pm 0.51	1.18 \pm 0.14
24-Metilcolest-5,22-dien-3 β -ol	1.07	1.30 \pm 0.33	0.98 \pm 0.05 *
24-Metilen-colest-5-en-3 β -ol	1.21	14.06 \pm 1.76	11.49 \pm 0.17 *
24-Etilcolest-5,22-dien-3 β -ol	1.30	321.82 \pm 3.77	313.95 \pm 0.90
24-Metil-7-alfa-colestano-3 β -ol	1.32	28.39 \pm 1.37	27.27 \pm 0.20 *
No identificado	1.34	nd	1.00 \pm 0.03
No identificado	1.36	nd	1.38 \pm 0.02*
24-Etilcolest-5,23-dien-3 β -ol	1.40	20.74 \pm 2.00	2.30 \pm 0.22*
24-Etilcolest-5,25(27)-dien-3 β -ol	1.45	29.35 \pm 5.10	26.51 \pm 0.21
24-Etilcolest-5-en-3 β -ol	1.49	32.18 \pm 0.60	31.52 \pm 0.66
24-Etilcolestano-3 β -ol	1.51	5.35 \pm 0.83	1.21 \pm 0.39 *
24-Etilcolest-5,24-dien-3 β -ol	1.60	77.53 \pm 0.12	72.95 \pm 0.02*
24-Etilcolest-7-en-3 β -ol	1.68	22.85 \pm 3.55	nd
No identificado	1.80	15.75 \pm 4.20	19.94 \pm 2.00 *
No identificado	1.92	9.04 \pm 1.40	15.38 \pm 8.04
No identificado	1.98	12.91 \pm 4.94	8.35 \pm 0.11
No identificado	2.06	nd	3.11 \pm 0.15
No identificado	2.15	nd	30.10 \pm 2.50
No identificado	2.32	3.60 \pm 0.56	8.76 \pm 1.30 *
No identificado	2.39	69.98 \pm 5.30	57.74 \pm 3.20
No identificado	2.41	105.91 \pm 16.45	nd

El estrés por disminución de la temperatura no afectó significativamente el contenido de 24-etilcolest-5,22-dien-3 β -ol ($p>0,05$) de la biomasa, el cual representó ≈ 41 -49% de esteroides libres con una producción de $\approx 320 \mu\text{g L}^{-1}$. Por otro lado, el 24-

etilcolesta-5,24-dien-3 β -ol mostró una reducción estadísticamente significativa, alcanzando un valor de 73 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($p < 0,05$) como consecuencia de la aplicación de estrés térmico.

6.3.9. Análisis del contenido de pigmentos fotosintéticos

Finalmente, se estudió el efecto del estrés por baja temperatura sobre las clorofilas (Cl) *a*, *c* y carotenoides (Car) en *P. gyrams*.

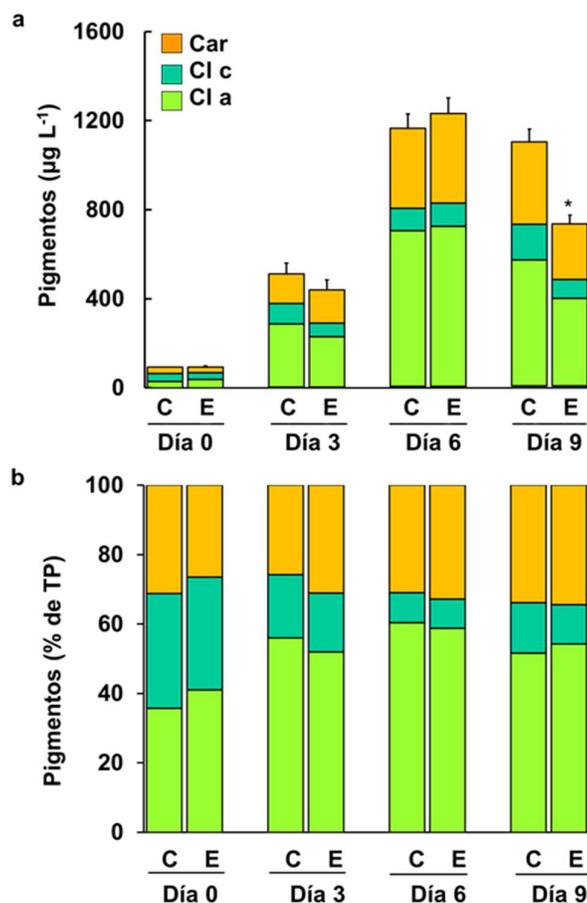


Figura 6.10. Análisis de la composición de pigmentos de *Pavlova gyrams*. Cuantificación espectrofotométrica de carotenoides (Car) y clorofilas *a* (Cl *a*) y *c* (Cl *c*), expresados como: **a)** producción ($\mu\text{g L}^{-1}$) y **b)** contenido relativo (porcentaje (%)) respecto de los pigmentos totales). Los valores corresponden a las condiciones control y EBTEs para los días 0, 3, 6 y 9 de cultivo ($n=3$). Los asteriscos (*) representan diferencias estadísticamente significativas entre condiciones ($p < 0,05$).

Tanto la Cl *a* como los Car alcanzaron su valor máximo el día 6, evidenciando un incremento de 21 y 13 veces, respectivamente, con respecto a la condición inicial (día 0) (Fig. 6.10a). El estrés por disminución de la temperatura de cultivo redujo

marcadamente los pigmentos fotosintéticos, en comparación con la condición control (1,43; 1,93 y 1,48 veces para Cl α , c y Car, respectivamente) (Fig. 6.10a). Los contenidos relativos de Cl α , c y Car, fueron similares al comienzo del experimento (día 0) en ambas condiciones experimentales (Fig. 6.10b). Sin embargo, con los días de cultivo (días 0-6) el contenido relativo de Cl α aumentó a expensas de una disminución de la Cl c, mientras que el porcentaje de Car no mostró cambios significativos. Finalmente, el contenido relativo de los pigmentos analizados no mostró variaciones asociadas al estrés por baja temperatura ($p > 0,05$) (Fig. 6.10b).

6.4. Discusión

La división Haptophyta comprende más de 400 especies de microalgas que se clasifican en dos clases en base a evidencias morfológicas y moleculares: Pavlovophyceae y Prymnesiophyceae. La clase Pavlovophyceae contiene solo un orden (Pavloales) y una familia (Pavlovaceae) que comprende cuatro géneros (*Pavlova*, *Diacronema*, *Exanthemachrysis* y *Rebecca*) (Bendif et al., 2011). En el presente estudio, la caracterización morfológica fue consistente con la descripción realizada por Butcher para *Pavlova gyrans* (1952). Sin embargo, existen dificultades en identificar la especie considerando solo características morfológicas, debido a que *P. gyrans* y la especie *P. pinguis* se consideran crípticas o, incluso, diferentes estados del ciclo de vida de una misma especie (Bendif et al., 2011; Zang et al., 2018). En este sentido, el análisis filogenético permitió diferenciar a *P. gyrans* de *P. pinguis*, indicando que se trata de dos especies diferentes. Así, la cepa aislada del estuario de Bahía Blanca corresponde a la especie *P. gyrans*.

Uno de los principales objetivos de este estudio fue evaluar el efecto de reducir de manera abrupta la temperatura de cultivo al comienzo de la fase de crecimiento estacionaria. La disminución de la temperatura no afectó la velocidad máxima de crecimiento en *P. gyrans*, la cual fue similar a las reportadas para otras especies de *Pavlova* (0,7-0,9 div día⁻¹), así como para especies de uso comercial como la haptófita *I. galbana* y la criptófita *Rhodomonas* sp. ($\mu \approx 1$ div día⁻¹) (Ponis et al., 2006; Oostlander et al., 2020; Zarrinmehr et al., 2020; Fernandes y Cordeiro, 2021). Sumado a esto, el estrés por baja temperatura mejoró la producción de biomasa en *P. gyrans*. Estos resultados están en consonancia con aquellos obtenidos para *C. closterium* (Capítulo 4), aunque el

rendimiento final fue mayor para *P. gyrans* (305 mg L⁻¹) que para *C. closterium* (226 mg L⁻¹). En este sentido, *P. gyrans* se presenta como una cepa prometedora en términos de crecimiento y producción de biomasa.

El análisis de la cinética de la acumulación de lípidos neutros en función de los días de cultivo mostró la tendencia esperada, evidenciando valores máximos hacia la fase de crecimiento estacionario (Tan et al., 2016; Schüler et al., 2017; Ananth et al., 2021). Según Brindhadevi et al. (2021), los cambios en la temperatura de cultivo pueden afectar positiva o negativamente el contenido total de lípidos en las microalgas. Sin embargo, en este estudio, el estrés por disminución de la temperatura no afectó el contenido total de lípidos, alcanzando rendimientos similares, tanto en condiciones de control como de estrés ($\approx 13\%$ del peso seco). Este último valor fue más bajo que el reportado para otras especies de *Pavlova*, *Diacronema* e *Isochrysis* (17,9-30% PS) (Martínez-Fernández et al., 2006; Fradique et al., 2013; Syazwina et al., 2020). Los lípidos neutros fueron la fracción lipídica principal de *P. gyrans*, seguida de las fracciones de glicolípidos y fosfolípidos, en forma similar a lo reportado para *I. galbana* por Zhu et al. (1997). Además, las fracciones lipídicas de *P. gyrans* no se vieron afectadas por el estrés térmico. Sin embargo, el mayor rendimiento en términos de biomasa obtenido bajo la condición de estrés se tradujo en un incremento de los lípidos totales y de las fracciones lipídicas en un 40% (mg L⁻¹).

La biosíntesis de PUFAs en las microalgas presenta características distintivas de acuerdo a la especie y también a las condiciones de cultivo (Barta et al. 2021). En este sentido, la temperatura representa un factor crucial para la producción de biomasa y síntesis de PUFAs (Balakrishnan y Shanmugam, 2021). En el presente estudio, los PUFAs representaron el 41% del total de AGs cuando *P. gyrans* fue sometida a estrés térmico, siendo el EPA y el DPA los representantes más significativos de las familias $\omega 3$ y $\omega 6$, respectivamente. Estos resultados confirman lo reportado por estudios previos, los cuales afirman que las especies del género *Pavlova* son buenas fuentes de PUFAs (Milke et al., 2008; Guihéneuf et al., 2015; Haas et al., 2016; Tibbetts et al., 2020). Sumado a esto, la evidencia obtenida muestra que el contenido relativo de PUFAs encontrado en *P. gyrans* fue mayor que aquel obtenido para *C. closterium* ($\approx 26\%$ del total de AG) en iguales condiciones de temperatura (Capítulo 4). Además, el valor total de PUFAs, así como los obtenidos para EPA y ARA en *P. gyrans*, fueron superiores a los informados

para aceites de pescado de anchoa (PUFAs, EPA y ARA \approx 30%, 9% y 1% del total de AGs, respectivamente) (Kaya et al., 2008).

En cuanto a las fracciones lipídicas, los PUFAs formaron parte tanto de los lípidos polares como de los lípidos neutros en *P. gyrans*. Un hecho interesante que surge de este trabajo es que el estrés por disminución de la temperatura condujo a un mayor contenido relativo de PUFAs en la fracción de lípidos neutros, mientras que en las fracciones de lípidos polares el porcentaje relativo de PUFAs disminuyó, a expensas de un incremento en los MUFAs. Estos resultados difieren de los obtenidos en *C. closterium*, donde dicho estrés indujo un aumento de los PUFAs en las fracciones de lípidos polares y una disminución en la fracción de lípidos neutros (Capítulo 4). Estas diferencias respecto de la distribución intracelular de los PUFAs, podría tener su origen en el mecanismo molecular que subyace a su síntesis, dado que la misma puede ocurrir *de novo*, o bien, mediante la remodelación de los lípidos de las membranas celulares (Schüler et al., 2017). Estas cuestiones inherentes al mecanismo molecular responsable de la síntesis de PUFAs en *P. gyrans* deberían considerarse en futuros estudios.

El estrés térmico aumentó tanto el contenido relativo de PUFAs en *P. gyrans*, como la producción de biomasa. Por lo tanto, esta estrategia de cultivo posiblemente podría ser considerada para aplicar en otras cepas de *Pavlova* con el objetivo de incrementar la producción de PUFAs. Asimismo, en comparación con los resultados obtenidos en *C. closterium* (Capítulo 4), se observa que, aunque la cantidad relativa de PUFAs encontrada en *P. gyrans* (% del total de AG) fue el doble respecto de la de *C. closterium*, la producción de PUFAs fue mayor en la diatomea (5,6g 100g biomasa⁻¹). El EPA fue el principal ω 3 encontrado en ambas especies estudiadas, mientras que, respecto de los ω 6, el ARA fue el más abundante en *C. closterium* y el DPA en *P. gyrans*. Las especies del género *Pavlova*, incluida *P. gyrans*, son una buena fuente de EPA y DPA (Tibbetts et al., 2020; Xu et al., 2008), mientras que otras haptófitas como *I. galbana* se caracterizan por su elevado contenido de DHA (Bonfanti et al., 2018; Matos et al., 2021).

Tal como se mencionó en el Capítulo 1, los PUFAs desempeñan un papel fundamental en la salud. En este sentido, un desequilibrio en la relación ω 3/ ω 6 se encuentra asociado con riesgos para la salud. La relación ω 3/ ω 6 obtenida para *P. gyrans* (1,22) fue menor que la reportada para las otras haptófitas (Tibbetts et al., 2020; Xu et

al., 2008; Bonfanti et al., 2018; Matos et al., 2021) y similar a la obtenida para *C. closterium* (Capítulo 4).

Los aceites enriquecidos en ω_3 , principalmente DHA y EPA, se consideran suplementos alimenticios saludables, especialmente en aquellos países donde el consumo de pescado es bajo (Gharajeh et al., 2020; Fernandes et al., 2021). A su vez, una buena fuente de ω_3 debe contener al menos 0,03 g de ALA por 100 g de producto o > 0,04 g de EPA + DHA por 100 g de producto (Fernandes et al., 2021). En este estudio, la biomasa de *P. gyrans* mostró un contenido de 0,07 g de ALA y 2,33 g de EPA + DHA cada 100 g de biomasa en la condición sometida a estrés térmico. Por lo tanto, la estrategia de cultivo empleada convierte a *P. gyrans* en una buena fuente de PUFAs ω_3 .

Los PUFAs también se relacionan con el retraso del desarrollo de enfermedades cardiovasculares, reduciendo el riesgo asociado con la aterosclerosis, la trombosis coronaria y la formación de coágulos en los vasos sanguíneos (Aussant et al., 2018). En este sentido, los índices aterogénico (IA), trombogénico (IT) e hipocolesterolémico (HH) son buenos indicadores de la calidad nutricional de los lípidos (Gharajeh et al., 2020; Fernandes et al., 2021). Cuando los valores de IA e IT son inferiores a 1, existe un riesgo reducido de enfermedad coronaria (Pleadin et al., 2017), mientras que un HH relativamente alto es deseable en una dieta saludable (Chen et al., 2020). En *P. gyrans*, se observó una reducción de los valores de IA e IT y un aumento en la relación HH en respuesta al estrés térmico. Por lo tanto, esta estrategia de cultivo mejoró la calidad de los lípidos de *P. gyrans*, permitiendo alcanzar valores similares a los reportados para diferentes aceites de pescado (Pleadin et al., 2017). Por lo tanto, *P. gyrans* puede considerarse un candidato potencial para su uso como suplemento dietario.

De acuerdo a lo mencionado en el Capítulo 1, además de aplicaciones nutraceuticas, los PUFAs tienen un papel importante en los alimentos acuícolas. Las larvas de peces marinos requieren altos niveles de estos lípidos debido a su incapacidad para sintetizarlos a partir de precursores de cadena más corta y menos insaturados (Basford et al., 2020). El DPA y el ARA parecen ser importantes para promover el crecimiento y la supervivencia en varias especies de peces marinos y larvas de invertebrados, como las vieiras (Milke et al., 2008; Basford et al., 2020). Además, el EPA y DHA promueven el crecimiento y la supervivencia de los peces (Santigosa et al., 2021). Algunos autores han reportado el uso de especies del género *Pavlova* para alimentos

acuícolas (Milke et al., 2004; Milke et al., 2008). A diferencia de otras especies de microalgas utilizadas en alimentos para peces de cultivo, como *Chlorella* o *Nannochloropsis*, las especies del género *Pavlova* presentan paredes celulares fácilmente digeribles por diversos organismos acuáticos (Tibbetts et al., 2020). Por lo tanto, la biomasa seca de *P. gyrans* podría agregarse directamente al alimento. En conjunto, estos resultados muestran el potencial de *P. gyrans* como fuente de PUFAs para alimentos acuícolas.

Además de los PUFAs, las microalgas se consideran una fuente potencial y sostenible de fitoesteroles, componentes promotores de la salud (Randhir et al., 2020). El contenido de esteroides de *P. gyrans* en la condición EBTEs fue superior al reportado para *P. salina* e *I. galbana* ($< 2,5 \mu\text{g mg}^{-1}$) e inferior al de *P. lutheri* ($26,05 \mu\text{g mg}^{-1}$) (Ahmed et al., 2015). En cuanto a la composición de esteroides de las microalgas, algunas especies tienen una especie molecular predominante, mientras que otras presentan una mezcla compleja (Volkman et al., 2003; Xu et al., 2008). En el presente trabajo se encontraron 21 esteroides diferentes en *P. gyrans*, de los cuales once fueron identificados. El esteroide predominante fue el 24-Etilcolesta-5,22-dien-3 β -ol, representando $\approx 40-50\%$ del total de esteroides. Resultados similares fueron reportados por Volkman et al. (1990) para diversas especies de *Pavlova*, donde el 24-Etilcolesta-5,22-dien-3 β -ol representó entre el 30 y el 50 % de los esteroides totales.

Variaciones en las condiciones ambientales como la temperatura y la disponibilidad de nutrientes, pueden influir significativamente en la producción de esteroides en las microalgas (Volkman et al., 2016). En *P. gyrans*, el estrés térmico no afectó la producción de esteroides, pero sí se observó una disminución en su producción entre la fase de exponencial y estacionaria de crecimiento en ambas condiciones. Estos resultados difieren de lo observado en *C. closterium* (Capítulo 4), donde la producción total de esteroides aumentó con el tiempo de cultivo y con el estrés térmico. Se han reportado variaciones cuantitativas importantes en función de las fases de crecimiento de cultivos *batch*, donde ciertos esteroides incrementan hacia la fase estacionaria de crecimiento mientras que otros disminuyen (Volkman, 2003). En este sentido, para otras especies de microalgas se ha demostrado que los esteroides 24-etilcolesta-5,22E-dien3 β -ol y colest-5-en-3 β -ol (mayoritarios de *P. gyrans* y *C. closterium*, respectivamente) presentaron tendencias opuestas respecto a las fases de crecimiento.

Así, el 24-etilcolesta-5,22E-dien3 β -ol disminuyó con los días de cultivo en *P. lutheri*, mientras que el colest-5-en-3 β -ol presentó la tendencia opuesta (Xu et al., 2008; Lu et al., 2014). Si bien en la presente tesis se analizó la caracterización cromatografía de esteroides al final del cultivo, estas tendencias opuestas en los esteroides predominantes en *C. closterium* y *P. gyrans*, podrían explicar las diferencias observadas entre estas especies respecto al contenido de esteroides en función de los días de cultivo.

Los pigmentos cumplen funciones biológicas en organismos no fotosintéticos como agentes antioxidantes y antiinflamatorios (D'Alessandro et al., 2016). De acuerdo a Van Lenning et al. (2003), las clorofilas *a*, *c1* y *c2*, y los carotenoides fucoxantina, diadinoxantina, diatoxantina y β -caroteno, son los pigmentos más comunes que se encuentran en las especies de Pavlovophyceae, representando alrededor del 85% del total de los pigmentos. Los resultados reportados por estos autores para *P. gyrans* fueron similares a los obtenidos en este trabajo de tesis para la condición control, donde en ambos casos la temperatura de cultivo fue de 20°C. Por otro lado, el estrés ha sido utilizado ampliamente como una herramienta para inducir la síntesis de pigmentos en las microalgas. Contrariamente a los resultados mostrados anteriormente, donde la producción de pigmentos disminuyó como consecuencia del estrés térmico, Potijun et al. (2021) observaron que el estrés por baja temperatura indujo la acumulación de carotenoides y clorofila en la clorofita *Chlamydomonas reinhardtii*, sugiriendo que el aumento del nivel de carotenoides podría desempeñar un papel crucial en la aclimatación al estrés por frío. En este sentido, y en concordancia con estudios previos (Orset y Young, 1999; García González et al., 2005; Guihéneuf et al., 2017; Ferro et al., 2018; Potijun et al., 2021) pareciera que no existe una respuesta general en términos de producción de pigmentos por parte de las microalgas frente al estrés térmico, dado que la exposición a bajas temperaturas puede aumentar o disminuir significativamente el contenido de carotenoides y clorofilas en estos organismos.

6.5. Conclusiones

Las haptófitas surgen como un recurso atractivo para la producción sustentable de biomasa rica en LC-PUFAs. Si bien existen diversos reportes de haptófitas ricas en LC-PUFAs, la prospección de ambientes naturales en búsqueda de especies nativas es

relevante desde el punto de vista de la seguridad ambiental y la valoración de los recursos. Las principales conclusiones del presente capítulo son:

- ✓ La especie aislada del estuario de Bahía Blanca fue identificada mediante características morfológicas y estudios moleculares como *Pavlova gyrans*.
- ✓ *P. gyrans* mostró ser una especie robusta para el crecimiento en condiciones de laboratorio y en fotobiorreactor.
- ✓ La disminución repentina de la temperatura de cultivo durante fase estacionaria de crecimiento demostró ser una estrategia apropiada para incrementar la producción de LC-PUFAs, particularmente EPA y DPA.
- ✓ La rápida respuesta de *P. gyrans* a este estrés térmico sugiere que esta estrategia de cultivo podría ser apropiada para implementarse en procesos productivos.
- ✓ El contenido de esteroides y pigmentos incrementa el valor nutricional de la biomasa de *P. gyrans*.
- ✓ Los valores de los índices lipídicos obtenidos para *P. gyrans* son similares a los reportados para diferentes aceites de pescado. Por lo tanto, *P. gyrans* puede considerarse un candidato potencial para su uso como suplemento dietario.

La información básica proporcionada en este capítulo abre nuevas posibilidades de investigación en lo que respecta al uso de la biomasa de *P. gyrans* en diferentes aplicaciones, tanto para alimentación humana como acuícola. Además, el hecho de que los LC-PUFAs sean parte de la fracción de lípidos neutros, proporciona un punto de partida en la búsqueda de otras estrategias de cultivo estresantes, las cuales, junto con el estrés por baja temperatura, promuevan una mayor acumulación de lípidos de almacenamiento ricos en LC-PUFAs. Finalmente, el mayor desafío a futuro es poder desarrollar la producción comercial de *P. gyrans* como fuente alternativa y sustentable de LC-PUFAs para reemplazar, al menos en parte, el uso de aceite de pescado.

SÍNTESIS Y CONCLUSIONES GENERALES

Los LC-PUFAs tienen beneficios nutricionales únicos para la salud humana y la mayoría de las pautas nutricionales incluyen recomendaciones para aumentar su ingesta. La principal fuente actual de LC-PUFAs es el aceite de pescado marino. Sin embargo, la creciente demanda de ese insumo y su producción comercial a partir de poblaciones de peces silvestres ha generado preocupaciones económicas, éticas y ambientales. Por ello, el aceite de pescado busca ser sustituido cada vez más con alternativas vegetales en los alimentos acuícolas modernos. Sin embargo, como los aceites vegetales carecen de LC-PUFAs, su utilización conduce a una disminución de la disponibilidad de estos nutrientes, afectando negativamente la calidad de la carne obtenida a partir de los peces en cultivo y destinada a consumo humano. Por lo tanto, existe una gran demanda de nuevas fuentes de LC-PUFAs, siendo las microalgas una alternativa prometedora ya que producen naturalmente altos niveles de estas moléculas de interés. Un aspecto primordial respecto del uso de microalgas como fuente de LC-PUFAs, es el descubrimiento de cepas robustas, que crezcan rápido y que produzcan altos niveles de los compuestos deseados. En este sentido, el estuario de Bahía Blanca ofreció un entorno natural de diatomeas y haptófitas. Estas especies fueron capaces de adaptarse a distintas condiciones de cultivo en el laboratorio a partir de cambios metabólicos que se tradujeron en su composición bioquímica, posiblemente gracias a la adaptación de estas cepas a las condiciones ambientales cambiantes propias del estuario.

Se lograron establecer cultivos unialgales de tres especies de diatomeas, de las cuales la cepa identificada morfológicamente y molecularmente como *Cylindrotheca closterium* fue la que mejor creció en condiciones de laboratorio. Inicialmente, se realizó un cultivo en fotobiorreactor en condiciones óptimas de temperatura (20°C). Los resultados evidenciaron la acumulación de lípidos neutros en función de los días de cultivo, los cuales fueron la fracción principal que contribuyó a la producción de LC-PUFAs. El EPA y el ARA fueron los LC-PUFAs mayoritarios. A su vez, los esteroides también incrementaron con los días de cultivo, siendo el colest-5-en-3 β -ol (colesterol) la especie molecular mayoritaria de esta fracción. Además, considerando que la disminución de la temperatura de cultivo impacta a nivel celular induciendo la síntesis de PUFAs, se

ensayaron dos estrategias de cultivo que involucraron estrés térmico. Una de ellas, consistió en disminuir repentinamente la temperatura de cultivo durante fase exponencial de crecimiento (EBTE_x); mientras que en el otro caso esta disminución se aplicó al comienzo de la fase estacionaria de crecimiento (EBTE_s). Los resultados obtenidos determinaron que la condición EBTE_s fue la mejor en términos de producción de biomasa, lípidos neutros, esteroides y LC-PUFAs, principalmente EPA y ARA. A su vez, la biomasa de *C. closterium* obtenida bajo esta condición mostró un contenido aceptable de proteínas conformadas por aminoácidos esenciales valorados desde el área acuícola.

Los análisis de filogenia de la cepa nativa en base a estudios moleculares con el gen *rbcl*, evidenciaron múltiples linajes dentro del gran clado correspondiente a *C. closterium*, lo que supone la presencia de diversas subespecies. Particularmente, la cepa del presente estudio quedó separada del resto de los agrupamientos. Además de estos hallazgos, la reproducción sexual de *C. closterium* observada en cultivos con el fertilizante Bayfolan presentó estadios sexuales diferentes a los descritos por otros autores, lo que indicaría que la cepa aislada presenta un patrón reproductivo diferente a los ya reportados para esta especie. Estos resultados, llevan a suponer que la cepa nativa se trata de una subespecie distinta. En este sentido, se abren nuevas posibilidades de investigación que busquen, no solo esclarecer la identidad de esta cepa, sino también cuales fueron los desencadenantes del proceso reproductivo, así como un estudio más exhaustivo del proceso en sí mismo.

Por otra parte, se buscó aislar algún representante del grupo de las haptófitas, dado que en éste se incluyen especies de microalgas que han sido propuestas como fuente de LC-PUFAs en la industria alimentaria, y también en la acuícola. En este sentido, se establecieron cultivos de la haptófita identificada como *Pavlova gyrans* en base a caracteres morfológicos y moleculares. Considerando los resultados obtenidos para *C. closterium*, *P. gyrans* fue cultivada en fotobiorreactor manteniendo las condiciones de temperatura ensayadas previamente. De modo similar a lo ocurrido en *C. closterium*, los lípidos neutros incrementaron en función de los días de cultivo y fueron también la fracción lipídica dominante. Esta especie fue capaz de sintetizar LC-PUFAs, siendo los mayoritarios el EPA y el DPA. La composición de esteroides de la biomasa obtenida reveló que el 24-etilcolesta-5,22-dien-3 β -ol y 24-etilcolesta-5,24-dien-3 β -ol fueron los

predominantes. Por su parte, se demostró que la disminución repentina de la temperatura de cultivo durante la fase estacionaria de crecimiento fue una estrategia apropiada para incrementar la producción de biomasa y lípidos en *P. gyrams*. El contenido total de esteroides no resultó afectado por el estrés térmico, aunque si se observó un incremento en la proporción de esteroides esterificados en relación a los esteroides libres. Contrariamente, la producción de pigmentos disminuyó en respuesta al estrés térmico. A su vez, la estrategia de cultivo fue eficiente para incrementar la síntesis y producción de LC-PUFAs en esta especie, fundamentalmente EPA y DPA.

Los resultados obtenidos aportan información valiosa en la búsqueda de recursos alternativos de LC-PUFAs y otros compuestos como esteroides, aminoácidos esenciales y pigmentos. La rápida respuesta de las cepas nativas de *C. closterium* y *P. gyrams* al estrés térmico, sugiere que la estrategia de cultivo ensayada podría ser apropiada para implementarse en procesos productivos. Asimismo, uno de los desafíos pendientes es desarrollar sistemas productivos a mayor escala que incluyan un control eficaz de la temperatura para inducir estrés térmico y que, al mismo tiempo, sean económicamente viables.

Considerando que las diatomeas y las haptófitas son utilizadas en acuicultura, y que el perfil de ácidos grasos obtenido para estas especies bajo EBTEs fue similar al reportado para distintos aceites de pescado, estos resultados abren nuevas posibilidades de investigación en lo que respecta a la utilización de estas microalgas nativas destinada en alimentación y/o en acuicultura. En este último caso, se podría considerar su uso como alimento vivo, o bien, incorporando la biomasa en los piensos. Respecto de los LC-PUFAs relevantes para acuicultura, las dos especies produjeron EPA y DHA. Asimismo, debido a que *C. closterium* es un buen recurso de ARA y *P. gyrams* de DPA, posiblemente una combinación de ambas especies sea la mejor opción para la alimentación de diferentes especies acuícolas en cultivo.

Por último, para *P. gyrams* se calcularon diferentes índices lipídicos relacionados a la calidad del aceite con potenciales aplicaciones como suplemento dietario. Los valores obtenidos bajo la condición EBTEs fueron similares a los reportados para diferentes aceites de pescado. Considerando que existen antecedentes que proponen la inclusión de biomasa de ciertas especies de haptófitas en alimentos, se abren nuevas

líneas de investigación con respecto a la utilización de *P. gyrans* en la industria alimentaria como una fuente de LC-PUFAs.

Bibliografía

- Acién, F.G., Fernández Sevilla, J.M. & Molina, G.E. (2013). Photobioreactors for the production of microalgae. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 2, 131–151.
- Acién, F. G., Molina, E., Reis, A., Torzillo, G., Zittelli, G. C., Sepúlveda, C. & Masojídek, J. (2017). Photobioreactors for the production of microalgae. (pp. 1-44). En *Microalgae-based biofuels and bioproducts*. Gonzalez-Fernandez, C., Muñoz, R., Eds.; Woodhead Publishing: Sawston, UK.
- Adarme-Vega T.C., Lim D.K.Y., Timmins M., Vernen F., Li Y. & Schenk P.M. (2012). Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. *Microbial Cell Factories*, 11,96.
- Adl, S.M., Bass, D., Lane, C.E., Lukeš, J., Schoch, C.L., Smirnov, A., Agatha, S., Berney, C., Brown, M.W., Burki, F., Cárdenas, P., Čepička, I., Chistyakova, L., del Campo, J., Dunthorn, M., Edvardsen, B., Eglit, Y., Guillou, L., Hampl, V., Heiss, A.A., Hoppenrath, M., James, T.Y., Karnkowska, A., Karpov, S., Kim, E., Kolisko, M., Kudryavtsev, A., Lahr, D.J.G., Lara, E., Gall, L.L., Lynn, D.H., Mann, D.G., Massana, R., Mitchell, E.A.D., Morrow, C., Park, J.S., Pawlowski, J.W., Powell, M.J., Richter, D.J., Rueckert, S., Shadwick, L., Shimano, S., Spiegel, F.W., Torruella, G., Youssef, N., Zlatogursky, V. & Zhang, Q.Q. (2019) Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 66, 4–119.
- Ahmed, F., Zhou, W. & Schenk, P. M. (2015). *Pavlova lutheri* is a high-level producer of phytosterols. *Algal research*, 10, 210-217.
- Alejos Cabrera, R.M., Gaspar Reyes, W.A., Flores Ramos, L., Ynga Huaman, G. A., Ruiz Soto, A. & Nino Velasquez, A.F. (2022). Effect of time in culture on fatty acid composition of copepods *Tisbe* sp. and *Apocyclops* sp. *Journal of the World Aquaculture Society*, 53(2), 475-484.
- Amato, A. (2010). Diatom reproductive biology: Living in a crystal cage. *The International Journal of Plant Reproductive Biology* 2(1) pp. 1-10, 2010.
- Ampofo, J. & Abbey, L. (2022). Microalgae: Bioactive Composition, Health Benefits, Safety and Prospects as Potential High-Value Ingredients for the Functional Food Industry. *Foods*, 11(12), 1744.
- Ananthi, V., Brindhadevi, K., Pugazhendhi, A. & Arun, A. (2021). Impact of abiotic factors on biodiesel production by microalgae. *Fuel*, 284, 118962.
- Andersen, R. A. (2005). Algal culturing techniques. Elsevier Academic Press, New York, 578 p.
- Andersen, R.A. & Kawachi, M. (2005). Traditional microalgae isolation techniques. En: Andersen R.A. (Ed) *Algal culturing techniques*, Elsevier, Burlington, pp. 83-100.
- Ansari, F. A., Guldhe, A., Gupta, S. K., Rawat, I. & Bux, F. (2021). Improving the feasibility of aquaculture feed by using microalgae. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(32), 43234-43257.

Araújo, R., Vázquez Calderón, F., Sánchez López, J., Azevedo, I. C., Bruhn, A., Fluch, S. & Ullmann, J. (2021). Current status of the algae production industry in Europe: an emerging sector of the blue bioeconomy. *Frontiers in Marine Science*, 7, 626389.

Attia J.A., Al-Harhi M.A., Korish M.A. & Shiboob M.M. (2015). Fatty acid and cholesterol profiles and hypocholesterolemic, atherogenic, and thrombogenic indices of table eggs in the retail market. *Lipids Health Dis*, 14,136

Aussant, J., Guihéneuf, F. & Stengel, D.B. (2018). Impact of temperature on fatty acid composition and nutritional value in eight species of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(12), 5279-5297.

Balakrishnan, J. & Shanmugam, K. (2021). Lowering the culture medium temperature improves the omega-3 fatty acid production in marine microalga *Isochrysis* sp. CASA CC 101. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 51(5), 511-518.

Ballantine J.A., Lavis A. & Morris R.J. (1979). Sterols of the phytoplankton effects of illumination and growth stage. *Phytochemistry*, 18,1459– 1466.

Bárceñas-Pérez, D., Lukeš, M., Hrouzek, P., Kubáč, D., Kopecký, J., Kaštánek, P. & Cheel, J. (2021). A biorefinery approach to obtain docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid n-6 from *Schizochytrium* using high performance countercurrent chromatography. *Algal Research*, 55, 102241.

Barkia I., Saari N. & Manning S.R. (2019). Microalgae for High-Value Products Towards Human Health and Nutrition. *Marine Drugs*, 17(5),304.

Barnech Bielsa G., Popovich C., Rodríguez M., Martínez A.M., Martín L., Matulewicz M. & Leonardi P. (2016). Simultaneous production assessment of triacylglycerols for biodiesel and exopolysaccharides as valuable co-products in *Navicula cincta*. *Algal Research*, 15, 120–128.

Barrett S.M., Volkman J.K., Dunstan G.A. & LeRoi J.M. (1995). Sterols of 14 species of marine diatoms (Bacillariophyta). *Journal of Phycology*, 31,360–369.

Barta, D. G., Coman, V. & Vodnar, D. C. (2021). Microalgae as sources of omega-3 polyunsaturated fatty acids: Biotechnological aspects. *Algal Research*, 58, 102410.

Basford, A. J., Mos, B., Francis, D. S., Turchini, G. M., White, C. A., & Dworjanyn, S. (2020). A microalga is better than a commercial lipid emulsion at enhancing live feeds for an ornamental marine fish larva. *Aquaculture*, 523, 735203.

Batista A.P., Gouveia L., Bandarra N.M., Franco J.M. & Raymundo A. (2013). Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. *Algal Research*, 2,164–173.

Bell J.G. & Sargent J.R. (2003). Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. *Aquaculture*, 21,491–499.

Bellorín Romero A., Bulboa Contador C. & Contreras Porcia L. (2022). Algas. Una Introducción a la ficología. Ril Editores. Santiago. 696pp.

- Bendschneider K. & Robinson R.J. (1952). A new spectrophometric determination of nitrite in sea water. *Journal Marine Research*. 11: 87-96.
- Bhattacharjya, R., Marella, T. K., Tiwari, A., Saxena, A., Singh, P. K. & Mishra, B. (2020). Bioprospecting of marine diatoms *Thalassiosira*, *Skeletonema* and *Chaetoceros* for lipids and other value-added products. *Bioresource Technology*, 318, 124073.
- Blanchemain A. & Grizeau D. (1999). Increased production of eicosapentaenoic acid by *Skeletonema costatum* cells after decantation at low temperature. *Biotechnology Techniques*, 13, 497–501 (1999). <https://doi.org/10.1023/A:1008989730798>
- Boelen, P., van Dijk, R., Sinninghe Damsté, J. S., Rijpstra, W. I. C. & Buma, A. G. (2013). On the potential application of polar and temperate marine microalgae for EPA and DHA production. *AMB Express*, 3(1), 1-9.
- Bonfanti, C., Cardoso, C., Afonso, C., Matos, J., Garcia, T., Tanni, S., & Bandarra, N. M. (2018). Potential of microalga *Isochrysis galbana*: Bioactivity and bioaccessibility. *Algal research*, 29, 242-248.
- Borowitzka, M. A. (2018). The ‘stress’ concept in microalgal biology—homeostasis, acclimation and adaptation. *Journal of Applied Phycology*, 30(5), 2815-2825.
- Bozarth A., Maier U.G. & Zauner Z. (2009). Diatoms in biotechnology: modern tools and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82,195–201.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72,248–254.
- Brindhadevi, K., Mathimani, T., Rene, E. R., Shanmugam, S., Chi, N. T. L. & Pugazhendhi, A. (2021). Impact of cultivation conditions on the biomass and lipid in microalgae with an emphasis on biodiesel. *Fuel*, 284, 119058.
- Brinkhuis, B. H. (1985). Growth patterns and rates En: Littler M.M Stein-Taylor, J.R y Littler D.S. (eds). *Handbook of Phycological Methods*. Pp. 461-467. Cambridge University Press.
- Brown M.R. (1991). The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 45,79–99.
- Camacho, F., Macedo, A. & Malcata, F. (2019). Potential industrial applications and commercialization of microalgae in the functional food and feed industries: A short review. *Marine Drugs*, 17(6), 312.
- Carciofi, I. & Rossi, L. Acuicultura en Argentina: red de actores, procesos de producción y espacios para el agregado de valor. En búsqueda del impulso exportador para los productos acuícolas. Documentos de Trabajo del CCE N° 13, septiembre de 2021, Consejo para el Cambio Estructural - Ministerio de Desarrollo Productivo de la Nación. https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/2021/03/dt_13_-_acuicultura.pdf
- Castro, L. F. C., Tocher, D. R. & Monroig, O. (2016). Long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in chordates: Insights into the evolution of Fads and Elovl gene repertoire. *Progress in Lipid Research*, 62, 25-40.

- Celi, C., Fino, D. & Savorani, F. (2022). *Phaeodactylum tricornutum* as a source of value-added products: A review on recent developments in cultivation and extraction technologies. *Bioresource Technology Reports*, 101122.
- Chen G., Jiang Y., Chen F. (2008). Fatty acid and lipid class composition of the eicosapentaenoic acid-producing microalga, *Nitzschia laevis*. *Food Chemistry*, 104,1580–1585.
- Chen, J. & Liu, H. (2020). Nutritional indices for assessing fatty acids: A mini-review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 5695.
- Chepurnov, V., Mann, D. G., Sabbe, K. & Vyverman, W. (2004). Experimental studies on sexual reproduction in diatoms. *International Review of Cytology: a Survey of Cell Biology*, 237, 91-154
- Chew, K. W., Yap, J. Y., Show, P. L., Suan, N. H., Juan, J. C., Ling, T. C. & Chang, J. S. (2017). Microalgae biorefinery: high value products perspectives. *Bioresource Technology*, 229, 53-62.
- Chhandama, M. V. L., Satyan, K. B., Changmai, B., Vanlalveni, C. & Rokhum, S. L. (2021). Microalgae as a feedstock for the production of biodiesel: A review. *Bioresource Technology Reports*, 15, 100771.
- Chi, G., Xu, Y., Cao, X., Li, Z., Cao, M., Chisti, Y. & He, N. (2021). Production of polyunsaturated fatty acids by *Schizochytrium (Aurantiochytrium)* spp. *Biotechnology Advances*, 107897.
- Cohen, Z., Khozin-Goldberg, I., Adlerstein, D. & Bigogno, C. (2000). The role of triacylglycerol as a reservoir of polyunsaturated fatty acids for the rapid production of chloroplastic lipids in certain microalgae. *Biochemical Society Transactions*, 28(6) 740-743.
- Cornet-Barthaux V., Armand L. & Quéguine B. (2007). Biovolume and biomass estimates of key diatoms in the Southern Ocean. *Aquatic Microbial Ecology*, 48, 295–308.
- Costa, J. A. V., Freitas, B. C. B., Santos, T. D., Mitchell, B. G. & Morais, M. G. (2019). Open pond systems for microalgal culture. En *Biofuels from Algae* (pp. 199-223). Elsevier.
- Cowey C.B. (1994). Amino acid requirements of fish: a critical appraisal of present values. *Aquaculture*, 124,1–11.
- D'Alessandro, E. B. & Antoniosi Filho, N. R. (2016). Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 58, 832-841.
- De Carvalho, J. C., Sydney, E. B., Assú Tessari, L. F. & Soccol, C. R. (2019). Culture media for mass production of microalgae. *Biofuels from Algae*, 33–50. doi:10.1016/b978-0-444-64192-2.00002-0
- De Silva S., Francis D.S. & Tacon A.G.J. (2011). Fish oil in aquaculture: in retrospect. En: Turchini G.M., Ng W.K., Tocher D.R. (eds). *Fish oil replacement and alternative lipid sources in aquaculture feeds*. CRC Press, Boca Raton, pp 1–20.

Debowski M., Zieliński M., Krzemieniewski M., Magda D. & Nowicka A. (2012). Microalgae - Cultivation methods. *Polish Journal of Natural Sciences*, 27, 151-164.

Debowski, M., Krzemieniewski, M., Zieliński, M. & Kazimierowicz, J. (2021). Immobilized microalgae-based photobioreactor for CO₂ capture (IMC-CO₂PBR): Efficiency estimation, technological parameters, and prototype concept. *Atmosphere*, 12(8), 1031.

Demirel Z. (2016). Identification and fatty acid composition of coccolithophore and diatom species isolated from Aegean Sea. *Romanian Biotechnological Letters*, 21,11746–11753.

Demirel, Z., Imamoglu, E. & Conk Dalay, M. (2015). Fatty acid profile and lipid content of *Cylindrotheca closterium* cultivated in air-lift photobioreactor. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 90(12), 2290-2296.

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M. & Robledo C.W. (2018). Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina URL <http://www.infostat.com.ar>

Dunbar, B. S., Bosire, R. V. & Deckelbaum, R. J. (2014). Omega 3 and omega 6 fatty acids in human and animal health: An African perspective. *Molecular and cellular Endocrinology*, 398(1-2), 69-77.

Duong, V.T., Thomas-Hall, S.R. & Schenk, P.M. (2015). Growth and lipid accumulation of microalgae from fluctuating brackish and seawater locations in South East Queensland—Australia. *Frontiers Plant Science*, 6, 359.

Edwardsen, B. & Medlin, L. (2007). Molecular systematics of the Haptophyta. En: J. Lewis, J. Brodie, (Eds.), *Unravelling the algae – the past, present and future of algal molecular systematics*. The Systematics Association, Taylor and Francis, London, New York, 2007, pp. 183–196.

Erdoğan, A., Demirel, Z., Dalay, M.C. & Eroğlu, A.E. (2016). Fucoxanthin content of *Cylindrotheca closterium* and its oxidative stress mediated enhancement. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 16,489–497.

Erdoğan, A., Karataş, A.B., Demirel, Z. & Dalay, M.C. (2022). Purification of fucoxanthin from the diatom *Amphora capitellata* by preparative chromatography after its enhanced productivity via oxidative stress. *Journal of Applied Phycology*, 34(1), 301-309.

FAO (2018). The state of world fisheries and aquaculture 2018. Meeting the sustainable development goals. FAO, Rome

FAO (2020). The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in Action. Rome.

Fawley, M. W., Fawley, K. P. & Owen, H. A. (2005). Diversity and ecology of small coccoid green algae from Lake Itasca, Minnesota, USA, including *Meyerella planktonica*, gen. et sp. nov. *Phycologia*, 44(1), 35-48.

- Feduchi Conosa, E., Catiñeyra, I. B., Romero Magdalena, C. S. & Yañez Conde., Esther. (2010). Bioquímica, conceptos esenciales. Ed. Médica Panamericana, Madrid, 379 p.
- Fernandes, T. & Cordeiro, N. (2021). Microalgae as sustainable biofactories to produce high-value lipids: Biodiversity, exploitation, and biotechnological applications. *Marine drugs*, 19(10), 573
- Fernandes, T., Ferreira, A. & Cordeiro, N. (2021). Comparative lipidomic analysis of *Chlorella stigmatophora* and *Hemiselmis* cf. *andersenii* in response to nitrogen-induced changes. *Algal Research*, 58, 102417.
- Fernández-Linares, L. C., Barajas, C. G., Páramo, E. D. & Corona, J. A. B. (2017). Assessment of *Chlorella vulgaris* and indigenous microalgae biomass with treated wastewater as growth culture medium. *Bioresource Technology*, 244, 400-406.
- Ferro, L., Gorzsás, A., Gentili, F. G. & Funk, C. (2018). Subarctic microalgal strains treat wastewater and produce biomass at low temperature and short photoperiod. *Algal Research*, 35, 160-167.
- Fidalgo J.P., Cid A., Torres E., Sukenik A. & Herrero C. (1998). Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*, 166, 105–116.
- Folch J., Lees M., Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497–509
- Fradique, M., Batista, A. P., Nunes, M. C., Gouveia, L., Bandarra, N. M. & Raymundo, A. (2013). *Isochrysis galbana* and *Diacronema vlkianum* biomass incorporation in pasta products as PUFA's source. *LWT-Food Science and Technology*, 50(1), 312-319.
- García-González, M., Moreno, J., Manzano, J. C., Florencio, F. J. & Guerrero, M. G. (2005). Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis- β -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology*, 115(1), 81-90.
- Gatenby C.M., Orcutt D.M., Kreeger D.A., Parker B.C., Jones V.A. & Neves R.J. (2003). Biochemical composition of three algal species proposed as food for captive freshwater mussels. *Journal of Applied Phycology*, 15, 1–11.
- Gatenby C.M., Orcutt D.M., Kreeger D.A., Parker B.C., Jones V.A. & Neves R.J. (2003). Biochemical composition of three algal species proposed as food for captive freshwater mussels. *Journal of Applied Phycology* 15: 1–11.
- Geitler L. (1973). Auxosporenbildung und Systematik bei pennaten Diatomeen und die Cytologie von Cocconeis-Sippen. Österreichische. *Botanische Zeitschrift*, 122, 299–321.
- Gharajeh, N. H., Valizadeh, M., Dorani, E. & Hejazi, M. A. (2020). Biochemical profiling of three indigenous *Dunaliella* isolates with main focus on fatty acid composition towards potential biotechnological application. *Biotechnology Reports*, 26, e00479.

- Gheysen, L., Demets, R., Devaere, J., Bernaerts, T., Goos, P., Van Loey, A.V., Cooman L. & Foubert, I. (2019). Impact of microalgal species on the oxidative stability of n-3 LC-PUFA enriched tomato puree. *Algal Research*, 40, 101502.
- Ghiffary, M. R., Kim, H. U. & Chang, Y. K. (2019). Metabolic Engineering Strategies for the Enhanced Microalgal Production of Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids (LC-PUFAs). *Biotechnology Journal*, 14(6), 1900043.
- Glencross, B. D. (2009). Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Reviews in Aquaculture*, 1(2), 71-124.
- Gonçalves, L. U., Cortegano, C. A. A., Barone, R. S. C., Lorenz, E. K. & Cyrino, J. E. P. (2021). Effects of dietary linolenic acid to linoleic acid ratio on growth performance, proximate composition and fatty acid contents of pacú (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquaculture Research*, 52(12), 6667-6677.
- Gong Y., Bandara T., Huntley M., Johnson Z.I., Dias J., Dahle D., Sorensen M. & Kiron V. (2019). Microalgae *Scenedesmus* sp. as a potential ingredient in low fishmeal diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 501:455–464.
- Gouveia, L., Coutinho, C., Mendonça, E., Batista, A.P., Sousa, I., Bandarra, N.M & Raymundo, A. (2008). Functional biscuits with PUFA- ω 3 from *Isochrysis galbana*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(5), 891-896.
- Greenspan P., Mayer E. P. & Fowler S. D. (1985). Nile Red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *Journal of Cell Biology* 100: 965-973.
- Guihéneuf, F. & Stengel, D.B. (2017). Interactive effects of light and temperature on pigments and n-3 LC-PUFA-enriched oil accumulation in batch-cultivated *Pavlova lutheri* using high-bicarbonate supply. *Algal Research*, 23, 113-125.
- Guihéneuf, F., Mimouni, V., Tremblin, G. & Ulmann, L. (2015). Light intensity regulates LC-PUFA incorporation into lipids of *Pavlova lutheri* and the final desaturase and elongase activities involved in their biosynthesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(4), 1261-1267.
- Guillard R. R. L. (1973) Division rates. En: Stein JR (ed) *Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 289–311
- Haas, S., Bauer, J. L., Adakli, A., Meyer, S., Lippemeier, S., Schwarz, K. & Schulz, C. (2016). Marine microalgae *Pavlova viridis* and *Nannochloropsis* sp. as n-3 PUFA source in diets for juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Journal of applied Phycology*, 28(2), 1011-1021.
- Hadi, S. I., Santana, H., Brunale, P. P., Gomes, T. G., Oliveira, M. D., Matthiensen, A., & Brasil, B. S. (2016). DNA barcoding green microalgae isolated from neotropical inland waters. *PloS one*, 11(2), e0149284.

- Hedayatkah, A., Cretoiu, M.S., Emtiazi, G., Stal, L.J. & Bolhuis, H. (2018). Bioremediation of chromium contaminated water by diatoms with concomitant lipid accumulation for biofuel production. *Journal of Environmental Management*, 227, 313-320.
- Hegel, P.; Martín, L.; Popovich, C.; Damiani, C. & Leonardi P.I. (2019). Biodiesel production from *Halamphora coffeaeformis* microalga oil by supercritical ethanol transesterification. *Chemical Engineering & Processing: Process Intensification* 145.
- Hillebrand H., Dürselen C.D., Kirschtel D., Pollinger U. & Zohary T. (1999). Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology*, 35, 403-424.
- Hu Q. (2004). Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products—major industrial species: *Arthrospira (Spirulina) platensis*. En: Richmond A. (ed) *Microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science, Oxford, pp 264–272.
- Hua H., Cobcroft J.M., Cole A., Condon K., Jerry D.R., Mangott A., Praeger C., Vucko M.J., Zeng C., Zenger K. & Strugnell J.M. (2019). The Future of Aquatic Protein: Implications for Protein Sources in Aquaculture Diets. *One Earth*, 1, 316-329.
- International Olive Council (2001) Determination of the composition and content of sterols by capillary-column gas chromatography. COI/ T.20/Doc. No. 10/Rev. 1. <http://www.internationaloliveoil.org>
- Jeffrey, S. T. & Humphrey, G. F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemie und physiologie der pflanzen*, 167(2), 191-194.
- Jiang, H. & Gao, K. (2004). Effects of lowering temperature during culture on the production of polyunsaturated fatty acids in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 40(4), 651-654.
- Jónasdóttir, S.H. (2019). Fatty acid profiles and production in marine phytoplankton. *Marine Drugs*, 17(3), 151.
- Kapoor, B., Kapoor, D., Gautam, S., Singh, R. & Bhardwaj, S. (2021). Dietary polyunsaturated fatty acids (PUFAs): Uses and potential health benefits. *Current Nutrition Reports*, 10(3), 232-242.
- Kaya, Y. & Turan, H. (2008). Fatty acids composition of Anchovy (*Engraulis encrasicolus* L. 1758) oil produced in Sinop-Turkey. *Journal of Fisheries Sciences*, 2(5), 693-697.
- Khan M.I., Shin J.H., Kim J.D. (2018). The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories* 17:36.
- Kim, J. M. & Park, M. S. (2021). Fish Oils. *Stroke Revisited: Dyslipidemia in Stroke*, 111-123.
- Kiron V., Phromkunthong W., Huntley M. & Archibald I. (2012). Marine microalgae from biorefinery as a potential feed protein source for Atlantic salmon, common carp and whiteleg shrimp. *Aquaculture Nutrition*, 18, 521-531.

- Koley, S., Mathimani, T., Bagchi, S. K., Sonkar, S., & Mallick, N. (2019). Microalgal biodiesel production at outdoor open and polyhouse raceway pond cultivations: A case study with *Scenedesmus accuminatus* using low-cost farm fertilizer medium. *Biomass and Bioenergy*, 120, 156-165.
- Koroleff, F. (1976). Determination of nutrients: 6. Silicon, En: Grasshoff, K. (Ed.) *Methods of Seawater Analysis*. pp. 149-158.
- Krohn, I., Menanteau-Ledouble, S., Hageskal, G., Astafyeva, Y., Jouannais, P., Nielsen, J. L. & Streit, W. R. (2022). Health benefits of microalgae and their microbiomes. *Microbial Biotechnology*, 15 (7), 1966– 1983
- Lall, S. P. & A. Dumas. (2015). Nutrients requirement of cultured fishes. En *Feeds and feeding practices in aquaculture*, ed. Davis, D. A, 53–109. Cambridge, UK: Woodhead Publishing.
- Larsson A. (2014). AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics*, 30, 3276–3278
- Lee Y.K. (2016). Microalgae Cultivation Fundamentals. En: Faizal Bux y Yusuf Chisti (Eds) *Algae Biotechnology Products and Processes*, pp 1-20.
- Levasseur W., Perré P. & Pozzobon V. (2020). A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. *Biotechnology Advances*, 41,107545.
- Li P., Mai K, Trushenski J. & Wu G. (2009). New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. *Amino Acids*, 37,43–53.
- Li, H., Yang, G., Sun, Y., Wu, S. & Zhang, X. (2007). *Cylindrotheca closterium* is a species complex as was evidenced by the variations of rbcL gene and SSU rDNA. *Journal of Ocean University of China*, 6(2), 167-174
- Li, J., Pora, B. L., Dong, K. & Hasjim, J. (2021). Health benefits of docosahexaenoic acid and its bioavailability: A review. *Food Science & Nutrition*, 9(9), 5229-5243
- Liang Y., Maeda Y., Yoshino T., Matsumoto M. Y. & Tanaka T. (2014). Profiling of Polar Lipids in Marine Oleaginous Diatom *Fistulifera solaris* JPCC DA0580: Prediction of the Potential Mechanism for Eicosapentaenoic Acid-Incorporation into Triacylglycerol. *Marine Drugs* 12, 3218-3230.
- Liang Y., Mai K. & Sun S. (2002). Effects of harvest stage on the total lipid and fatty acid composition of four *Cylindrotheca* strains. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 20,157–16.
- Lombardi A.T. & Wangersky P.J. (1995). Particulate lipid class composition of three marine phytoplankters *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* (Tahiti) and *Dunaliella tertiolecta* grown in batch culture. *Hydrobiologia*, 306,1–6.

- Lu X., Sun H., Zhao W., Cheng K. Chen F. & Liu B. (2018). Hetero-Photoautotrophic Two-Stage Cultivation Process for Production of Fucoxanthin by the Marine Diatom *Nitzschia laevis*. *Marine Drugs*, 1,219.
- Lu, Q., Li, H., Xiao, Y. & Liu, H. (2021). A state-of-the-art review on the synthetic mechanisms, production technologies, and practical application of polyunsaturated fatty acids from microalgae. *Algal Research*, 55, 102281.
- Lu, Y., Zhou, W., Wei, L., Li, J., Jia, J., Li, F., Smith, S.M. & Xu, J. (2014). Regulation of the cholesterol biosynthetic pathway and its integration with fatty acid biosynthesis in the oleaginous microalga *Nannochloropsis oceanica*. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 1-15.
- Lunn, J. & Theobald, H. E. (2006). The health effects of dietary unsaturated fatty acids. *Nutrition Bulletin*, 31(3), 178-224.
- Luo X., Su P. & Zhang W. (2015). Advances in microalgae-derived phytosterols for functional food and pharmaceutical applications. *Marine Drugs*, 13,4231–4254.
- Ma, Q. L., Zhu, C., Morselli, M., Su, T., Pelligrini, M., Lu, Z., Jones, M., Denver, P., Castro, D., Gu, X., Relampagos, F., Caoili, K., Teter, B., Frautschy, S.A. & Cole, G. M. (2020). The Novel Omega-6 Fatty Acid Docosapentaenoic Acid Positively Modulates Brain Innate Immune Response for Resolving Neuroinflammation at Early and Late Stages of Humanized APOE-Based Alzheimer's Disease Models. *Frontiers in Immunology*, 2364.
- Machado, L., Carvalho, G., & Pereira, R. N. (2022). Effects of innovative processing methods on microalgae cell wall: prospects towards digestibility of protein-rich biomass. *Biomass*, 2(2), 80-102.
- Maeda, Y., Nojima, D., Yoshino, T., & Tanaka, T. (2017). Structure and properties of oil bodies in diatoms. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 372(1728), 20160408
- Maher, S. & Losic, D. (2022). Surface Bioengineering of Nanostructured Diatom Biosilica and Their Applications in Drug Delivery. En: *Advanced Porous Biomaterials for Drug Delivery Applications*. pp. 49-80. CRC Press.
- Maisashvili A., Bryant H., Richardson J., Anderson D., Wickersham T. & Drewery M. (2015). The values of whole algae and lipid extracted algae meal for aquaculture. *Algal Research*, 3,133–142.
- Maltsev, Y. & Maltseva, K. (2021). Fatty acids of microalgae: Diversity and applications. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 20(2), 515-547.
- Marella, T. K., & Tiwari, A. (2020). Marine diatom *Thalassiosira weissflogii* based biorefinery for co-production of eicosapentaenoic acid and fucoxanthin. *Bioresource Technology*, 307, 123245.
- Markou, G. & Nerantzis, E. (2013). Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1532-1542.

Martín L. A., Popovich C. A., Martínez A. M., Damiani M. C. & Leonardi P. I. (2016). Oil assessment of *Halamphora coffeaeformis* diatom growing in a hybrid two-stage system for biodiesel production. *Renewable Energy* 92, 127–135.

Martín L.A., Popovich C., Martínez A.M., Scodelaro Bilbao P., Damiani C. & Leonardi P.I. (2018). Hybrid two-stage culture of *Halamphora coffeaeformis* for biodiesel production: growth phases, nutritional stages and biorefinery approach. *Renewable Energy*, 118,984-992.

Martínez-Fernández, E., Acosta-Salmón, H. & Rangel-Dávalos, C. (2004). Ingestion and digestion of 10 species of microalgae by winged pearl oyster *Pteria sterna* (Gould, 1851) larvae. *Aquaculture*, 230(1-4), 417-423.

Martínez-Fernández, E., Acosta-Salmón, H. & Southgate, P. C. (2006). The nutritional value of seven species of tropical microalgae for black-lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera*, L.) larvae. *Aquaculture*, 257(1-4), 491-503.

Matos A.P., Feller R., Moecke E., De Oliveira J., Junior A., Bianchini Derner R. & Santanna E. (2016). Chemical characterization of six microalgae with potential utility for food application. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 93,963–972.

Mayers, J. J., Ekman Nilsson, A., Svensson, E. & Albers, E. (2016). Integrating microalgal production with industrial outputs—reducing process inputs and quantifying the benefits. *Industrial Biotechnology*, 12(4), 219-234.

Medlin, L., Elwood, H. J., Stickel, S., & Sogin, M. L. (1988). The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene*, 71(2), 491-499.

Mejri, S. C., Tremblay, R., Audet, C., Wills, P. S. & Riche, M. (2021). Essential fatty acid requirements in tropical and cold-water marine fish larvae and juveniles. *Frontiers in Marine Science*, 8, 680003.

Menden-Deuer S. & Lessard E.J. (2000). Carbon to volume relationships for dinoflagellates, diatoms, and other protist plankton. *Limnology & Oceanography*, 45(3),569–579.

Miles, E. A., Childs, C. E. & Calder, P. C. (2021). Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs) and the developing immune system: a narrative review. *Nutrients*, 13(1), 247.

Milke, L. M., Bricelj, V. M. & Parrish, C. C. (2004). Growth of postlarval sea scallops, *Placopecten magellanicus*, on microalgal diets, with emphasis on the nutritional role of lipids and fatty acids. *Aquaculture*, 234(1-4), 293-317.

Minhas, A. K., Hodgson, P., Barrow, C. J. & Adholeya, A. (2016). A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids. *Frontiers in Microbiology*, 7, 546.

Mitra, M., Patidar, S. K. & Mishra, S. (2015). Integrated process of two-stage cultivation of *Nannochloropsis* sp. for nutraceutically valuable eicosapentaenoic acid along with biodiesel. *Bioresource Technology*, 193, 363-369.

- Montagnes D.J.S. & Franklin M. (2001). Effect of temperature on diatom volume, growth rate, and carbon and nitrogen content: reconsidering some paradigms. *Limnology Oceanography*, 46,2008–2018.
- Moore, E. R., Bullington, B. S., Weisberg, A. J., Jiang, Y., Chang, J., & Halsey, K. H. (2017). Morphological and transcriptomic evidence for ammonium induction of sexual reproduction in *Thalassiosira pseudonana* and other centric diatoms. *PLoS One*, 12(7), e0181098.
- Moreau, R. A., Nyström, L., Whitaker, B. D., Winkler-Moser, J. K., Baer, D. J., Gebauer, S. K. & Hicks, K. B. (2018). *Phytosterols and their derivatives: Structural diversity, distribution, metabolism, analysis, and health-promoting uses. Progress in Lipid Research*, 70, 35–61.
- Mühlroth, A., Li, K., Røkke, G., Winge, P., Olsen Y., Hohmann-Marriott, M. F., Vadstein, O. & Bones, A. M. (2013). Pathways of lipid metabolism in marine algae, co-expression network, bottlenecks and candidate genes for enhanced production of EPA and DHA in species of Chromista. *Marine Drugs*, 11(11), 4662-4697.
- Murphy J., Riley J.P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 27, 3136.
- Murthy, G. S. (2011). Overview and assessment of algal biofuels production technologies. En *Biofuels* (pp. 415-437). Academic Press.
- Narala, R. R., Garg, S., Sharma, K. K., Thomas-Hall, S. R., Deme, M., Li, Y. & Schenk, P. M. (2016). Comparison of microalgae cultivation in photobioreactor, open raceway pond, and a two-stage hybrid system. *Frontiers in Energy Research*, 4, 29.
- Nauroth, J. M., Liu, Y. C., Van Elswyk, M., Bell, R., Hall, E. B., Chung, G. & Arterburn, L. M. (2010). Docosahexaenoic acid (DHA) and docosapentaenoic acid (DPA-6) algal oils reduce inflammatory mediators in human peripheral mononuclear cells *in vitro* and paw edema *in vivo*. *Lipids*, 45(5), 375-384.
- Negrisol E.S., Maistro M., Incarbone I., Moro L.D., Valle, M., Broady P. & Andreoli C. (2004). Morphological convergence characterizes the evolution of Xanthophyceae (Heterokontophyta): evidence from nuclear SSU rDNA and plastidial rbcL genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33, 156–170.
- Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., Von Haeseler, A. & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268-274.
- Norambuena F., Lewis M., Hamid N.K.A., Hermon K., Donald J.A. & Turchini G.M. (2013). Fish oil replacement in current aquaculture feed: is cholesterol a hidden treasure for fish nutrition? *PLoS One*, 8,e81705.
- Norsker N. H., Barbosa M. J., Vermuë M. H. & Wijffels R. H. (2011). Microalgal production--a close look at the economics. *Biotechnology advances*, 29(1),24-7.

- Olivares-Rubio, H. F., Cabrera, L. I., Godínez-Ortega, J. L., Salazar-Coria, L. & Vega-López, A. (2017). *Halamphora oceanica* (Catenulaceae, Bacillariophyta), a new species from the epipelagic region of the southwestern Gulf of Mexico. *Phytotaxa*, 317(3), 188-198.
- Oliver, L., Dietrich, T., Marañón, I., Villarán, M. C. & Barrio, R. J. (2020). Producing omega-3 polyunsaturated fatty acids: A review of sustainable sources and future trends for the EPA and DHA market. *Resources*, 9(12), 148.
- Oostlander, P. C., van Houcke, J., Wijffels, R. H. & Barbosa, M. J. (2020). Optimization of *Rhodomonas* sp. under continuous cultivation for industrial applications in aquaculture. *Algal Research*, 47, 101889.
- Orset, S. & Young, A. J. (1999). Low-temperature-induced synthesis of α -carotene in the microalga *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 35(3), 520-527.
- Pajot, A., Hao Huynh, G., Picot, L., Marchal, L. & Nicolau, E. (2022). Fucoxanthin from algae to human, an extraordinary bioresource: Insights and advances in up and downstream processes. *Marine Drugs*, 20(4), 222.
- Paliwal, C., Mitra, M., Bhayani, K., Bharadwaj, S. V., Ghosh, T., Dubey, S. & Mishra, S. (2017). Abiotic stresses as tools for metabolites in microalgae. *Bioresource Technology*, 244, 1216-1226.
- Patel, A., Desai, S. S., Mane, V. K., Enman, J., Rova, U., Christakopoulos, P. & Matsakas, L. (2022). Futuristic food fortification with a balanced ratio of dietary ω -3/ ω -6 omega fatty acids for the prevention of lifestyle diseases. *Trends in Food Science & Technology*, 120, 140-153.
- Peña Díaz, A., Arroyo Begovich, A., Gómez Puyou, A. & Tapia Ibarquengoytia, R. (2004). *Bioquímica*. Editorial Limusa, México.
- Pereira, H., Páramo, J., Silva, J., Marques, A., Barros, A., Maurício, D. & Varela, J. (2018). Scale-up and large-scale production of *Tetraselmis* sp. CTP4 (Chlorophyta) for CO₂ mitigation: From an agar plate to 100-m³ industrial photobioreactors. *Scientific Reports*, 8(1), 1-11.
- Peter, A. P., Koyande, A. K., Chew, K. W., Ho, S. H., Chen, W. H., Chang, J. S. & Show, P. L. (2022). Continuous cultivation of microalgae in photobioreactors as a source of renewable energy: Current status and future challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 154, 111852.
- Piepho M., Martin-Creuzburg D. & Wacker A. (2012) Phytoplankton sterol contents vary with temperature, phosphorus and silicate supply: a study on three freshwater species. *European Journal of Phycology*, 47,138–145.
- Pleadin, J., Lesic, T., Kresic, G., Baric, R., Bogdanovic, T., Oraic, D. & Zrncic, S. (2017). Nutritional quality of different fish species farmed in the Adriatic Sea. *Italian Journal of Food Science*, 29(3).
- Pletikapić, G., Berquand, A., Radić, T.M. & Svetličić, V. (2012). Quantitative nanomechanical mapping of marine diatom in seawater using peak force tapping atomic force microscopy 1. *Journal of Phycology*, 48(1), 174-185.

- Ponis, E., Probert, I., Veron, B., Le Coz, J. R., Mathieu, M. & Robert, R. (2006). Nutritional value of six Pavlovophyceae for *Crassostrea gigas* and *Pecten maximus* larvae. *Aquaculture*, 254(1-4), 544-553.
- Popovich C. A., Damiani C., Constenla D. & Leonardi P. I. (2012). Lipid quality of the diatoms *Skeletonema costatum* and *Navicula gregaria* from the South Atlantic Coast (Argentina): evaluation of its suitability as biodiesel feedstock. *Journal Applied Phycology* 24,1–10.
- Popovich, C. A., Faraoni, M. B., Sequeira, A., Daglio, Y., Martín, L. A., Martínez, A. M., Damiani, C., Matulewicz, C. & Leonardi, P. I. (2020). Potential of the marine diatom *Halamphora coffeaeformis* to simultaneously produce omega-3 fatty acids, chrysolaminarin and fucoxanthin in a raceway pond. *Algal Research*, 51, 102030.
- Popovich, C.A.; Pistonesi, M.; Hegel, P.; Constenla, D.; Barnech Bielsa, G.; Martín, L.A.; Damiani M.C. & Leonardi, P.I. (2019). Unconventional alternative biofuels: quality assessment of biodiesel and its blends from marine diatom *Navicula cincta*. *Algal Research* 39.
- Potijun, S., Yaisamlee, C. & Sirikhachornkit, A. (2021). Pigment production under cold stress in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Agriculture*, 11(6), 564.
- Pouličková, A., Mann, D. G. & Mann, D. G. (2019). Diatom sexual reproduction and life cycles. *Diatoms: Fundamentals and applications*, 245-272.
- Prato, E., Portacci, G. & Biandolino, F. (2010). Effect of diet on growth performance, feed efficiency and nutritional composition of *Octopus vulgaris*. *Aquaculture*, 309(1-4), 203-211.
- Pulz, O. (2001). Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(3), 287-293.
- Qiao H, Cong C., Sun C., Li B., Wang J. & Zhang L. (2016). Effect of culture conditions on growth, fatty acid composition and DHA/EPA ratio of *Phaeodactylum tricornutum*. *Aquaculture*, 452,311–317.
- Radha, S., Fathima, A. A., Iyappan, S. & Ramya, M. (2013). Direct colony PCR for rapid identification of varied microalgae from freshwater environment. *Journal of applied phycology*, 25(2), 609-613.
- Rampen S.W., Abbas B.A., Schouten S. & Sinninghe Damsté J.S. (2010). A comprehensive study of sterols in marine diatoms (Bacillariophyta): implications for their use as tracers for diatom productivity. *Limnology Oceanography*, 55,91–105.
- Randhir, A., Laird, D. W., Maker, G., Trengove, R. & Moheimani, N. R. (2020). Microalgae: a potential sustainable commercial source of sterols. *Algal Research*, 46, 101772.
- Remize, M., Brunel, Y., Silva, J. L., Berthon, J. Y. & Filaire, E. (2021). Microalgae n-3 PUFAs production and use in food and feed industries. *Marine Drugs*, 19(2), 113.

- Robertson, R. C., Guihéneuf, F., Bahar, B., Schmid, M., Stengel, D. B., Fitzgerald, G. F. & Stanton, C. (2015). The anti-inflammatory effect of algae-derived lipid extracts on lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human THP-1 macrophages. *Marine Drugs*, 13(8), 5402-5424.
- Rodríguez-Pesantes, D., Lodeiros, C., Márquez, A., Revilla, J. & Sonnenholzner, S. (2020). Microalgal diet evaluation in the larval development and substrate selection for settlement in the rock oyster *Striostrea prismatica* (Gray, 1825). *Aquaculture Research*, 51(12), 4938-4947.
- Round, F.E., Crawford, R.M. & Mann, D.G. (1990). *The Diatoms: Biology & Morphology of the genera*. Cambridge University Press, Cambridge 747 pp.
- Ryabushko, L.I., Balycheva, D. S., Bondarenko, A. V., Zheleznova, S. N., Begun, A. A. & Stonik, I. V. (2019). Different aspects of studying a diatom *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann et Lewin 1964 in natural and laboratory conditions. *Marine Biological Journal*, 4(2), 52-62.
- Ryckebosch E., Bruneel C., Termote-Verhalle R., Goiris K., Muylaert K. & Foubert I. (2014). Nutritional evaluation of microalgae oils rich in omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids as an alternative for fish oil. *Food Chemistry*, 160,393–400.
- Saini, R. K. & Keum, Y. S. (2018). Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance—A review. *Life sciences*, 203, 255-267.
- Salem Jr, N. & Van Dael, P. (2020). Arachidonic acid in human milk. *Nutrients*, 12(3), 626.
- Samantaray S.S., Sangeetha V., Abinaya S. & Ramaprabhu S. (2020). Diatom frustule-graphene based nanomaterial for room temperature hydrogen storage. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45, 764-776.
- Sanaa M.M., Shanab S.M.M., Hafez R.M. & Fouad A.S. (2018). A review on algae and plants as potential source of arachidonic acid. *Journal of Advanced Research*, 11,3–13.
- Santigosa, E., Brambilla, F. & Milanese, L. (2021). Microalgae oil as an effective alternative source of EPA and DHA for gilthead seabream (*Sparus aurata*) aquaculture. *Animals*, 11(4), 971.
- Santin, A., Balzano, S., Russo, M. T., Palma Esposito, F., Ferrante, M. I., Blasio, M., Cavalletti, E. & Sardo, A. (2022). Microalgae-Based PUFAs for Food and Feed: Current Applications, Future Possibilities, and Constraints. *Journal of Marine Science and Engineering*, 10(7), 844.
- Sarthou G., Timmermans R.K.R. Blain S. & Treguer P. (2005). Growth physiology and fate of diatoms in the ocean: a review. *Journal of Sea Research*., 53,25-42.
- Savio S., Farrotti S., Paris D., Arnaiz E., Díaz I., Bolado S., Muñoz R., Rodolfo C. & Congestri R. (2020). Value-added co-products from biomass of the diatoms *Staurosirella pinnata* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Algal Research* 47.

- Saxena, A., Mishra, B., Sindhu, R., Binod, P. & Tiwari, A. (2022). Nutrient acclimation in benthic diatoms with adaptive laboratory evolution. *Bioresource Technology*, 351, 126955.
- Sayanova O., Mimouni V., Ulmann L., Morant-Manceau A., Pasquet V., Schoefs B. & Napier J.A. (2017). Modulation of lipid biosynthesis by stress in diatoms. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 372, 20160407
- Scholz B. & Liebezeit G. (2012). Biochemical characterization and fatty acid profiles of 25 benthic marine diatoms isolated from the Solthörn tidal flat (southern North Sea) *Journal of Applied Phycology* 25(2).
- Schüler, L. M., Schulze, P. S., Pereira, H., Barreira, L., León, R. & Varela, J. (2017). Trends and strategies to enhance triacylglycerols and high-value compounds in microalgae. *Algal Research*, 25, 263-273.
- Scodelaro Bilbao P. G., Damiani C., Salvador G. A. & Leonardi P. I. (2016). *Haematococcus pluvialis* as a source of fatty acids and phytosterols: potential nutritional and biological implications. *Journal Applied Phycology* 28, 3283–3294.
- Scodelaro Bilbao P., Lucas M., Popovich C. Almeyda, D., Chamorro V. & Leonardi P. (2020). Assessment of *Halimnobia coffeaeformis* Growth and Biochemical Composition for Aquaculture Purposes. *Journal of Marine Science and Engineering*.
- Shah M.R., Lutz G.A., Alam A., Sarker P., Chowdhury K., Parsaeimehr A., Liang Y. & Daroch M. (2018). Microalgae in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry. *Journal of Applied Phycology*, 30,197–213.
- Silva-Aciaras F. R. & Riquelme C.E. (2008). Comparisons of the growth of six diatom species between two configurations of photobioreactors. *Aquacultural Engineering*, 38(1),26-35.
- Simental, J. A. & Sánchez-Saavedra, M. P. (2003). The effect of agricultural fertilizer on growth rate of benthic diatoms. *Aquacultural Engineering*, 27(4), 265-272.
- Simonetto, M., Infante, M., Sacco, R. L., Rundek, T. & Della-Morte, D. (2019). A novel anti-inflammatory role of omega-3 PUFAs in prevention and treatment of atherosclerosis and vascular cognitive impairment and dementia. *Nutrients*, 11(10), 2279.
- Simopoulos, A. P. (2002). Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *Journal of the American College of Nutrition*, 21(6), 495-505.
- Simpson R.J., Neuberger M.R. & Liu T.Y. (1976). Complete amino acid analysis of proteins from a single hydrolysate. *Journal of Biological Chemistry*, 251,1936– 1940.
- Sørensen M., Gerd B., KjellR. & Bente R. (2016). Microalga *Phaeodactylum tricorutum* in feed for Atlantic salmon (*Salmo salar*). Effect on nutrient digestibility, growth and utilization of feed. *Aquaculture*, 460.

- Steinberg, C. E. (2022). Essential Fatty Acids 'Fueling Versus Controlling'. En *Aquatic Animal Nutrition* (pp. 673-721). Springer, Cham.
- Stock, W., Vanellander, B., Rüdiger, F., Sabbe, K., Vyverman, W., & Karsten, U. (2019). Thermal niche differentiation in the benthic diatom *Cylindrotheca closterium* (Bacillariophyceae) complex. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1395.
- Strickland, J. D. H. & Parsons, T. R. (1972). A practical handbook of seawater analysis. Ottawa.
- Swanson, D., Block, R. & Mousa, S. A. (2012). Omega-3 fatty acids EPA and DHA: health benefits throughout life. *Advances in Nutrition*, 3(1), 1-7.
- Syazwina, S. S., Basri, E. M. & Maznah, W. O. (2022). Biomass, proximate biochemical composition and fatty acid profiles associated with the growth phase of *Chlorella salina* Butcher and *Isochrysis maritima* Billard and Gayral isolated from the coastal waters of Penang, Malaysia. *Aquaculture International*, 30(2), 899-918.
- Taipale, S., Peltomaa, E. & Salmi, P. (2020). Variation in ω -3 and ω -6 polyunsaturated fatty acids produced by different phytoplankton taxa at early and late growth phase. *Biomolecules*, 10(4), 559.
- Tallima, H. & El Ridi, R. (2018). Arachidonic acid: physiological roles and potential health benefits—a review. *Journal of Advanced Research*, 11, 33-41.
- Tan, K. W. M. & Lee, Y. K. (2016). The dilemma for lipid productivity in green microalgae: importance of substrate provision in improving oil yield without sacrificing growth. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 1-14.
- Tatsuzawa, H. & Takizawa, E. (1995 a). Changes in fatty acid composition of *Pavlova lutheri* (Prymnesiophyceae) affected by culturing conditions. *Fisheries science*, 61(2), 363-364.
- Tatsuzawa, H. & Takizawa, E. (1995 b). Changes in lipid and fatty acid composition of *Pavlova lutheri*. *Phytochemistry*, 40(2), 397-400.
- Thanuthong, T., Francis, D. S., Manickam, E., Senadheera, S. D., Cameron-Smith, D. & Turchini, G. M. (2011). Fish oil replacement in rainbow trout diets and total dietary PUFA content: II) Effects on fatty acid metabolism and in vivo fatty acid bioconversion. *Aquaculture*, 322, 99-108.
- Thomas, M., Pasquet, A., Aubin, J., Nahon, S. & Lecocq, T. (2021). When more is more: taking advantage of species diversity to move towards sustainable aquaculture. *Biological Reviews*, 96(2), 767-784.
- Thompson P.A., Guo M., Harrison P.J. & Whytee J.N.C. (1992). Effects of variation in temperature on the fatty acid composition of eight species of marine phytoplankton. *Journal of Phycology*, 28,488–497.
- Tibbetts, S. M., Patelakis, S. J., Whitney-Lalonde, C. G., Garrison, L. L., Wall, C. L. & MacQuarrie, S. P. (2020). Nutrient composition and protein quality of microalgae meals produced from the marine prymnesiophyte *Pavlova* sp. 459 mass-cultivated in enclosed

- photobioreactors for potential use in salmonid aquafeeds. *Journal of Applied Phycology*, 32(1), 299-318.
- Tocher D.R. (2015). Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. *Aquaculture*, 449,94–107.
- Tocher, D. R. (2010). Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquaculture Research*, 41(5), 717-732.
- Tocher, D. R. (2015). Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. *Aquaculture*, 449, 94-107.
- Tocher, D. R., Betancor, M. B., Sprague, M., Olsen, R. E. & Napier, J. A. (2019). Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids, EPA and DHA: bridging the gap between supply and demand. *Nutrients*, 11(1), 89.
- Tonon T., Harvey D., Larson T.R. & Graham I.A. (2002). Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. *Phytochemistry*, 61(1),15-24.
- Tortosa-Caparrós, E., Navas-Carrillo, D., Marín, F. & Orenes-Piñero, E. (2017). Anti-inflammatory effects of omega 3 and omega 6 polyunsaturated fatty acids in cardiovascular disease and metabolic syndrome. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(16), 3421-3429.
- Toth, P. P., Chapman, M. J., Parhofer, K. G. & Nelson, J. R. (2022). Differentiating EPA from EPA/DHA in cardiovascular risk reduction. *American Heart Journal Plus: Cardiology Research and Practice*, 100148.
- Turchini G.M., Torstensen B.E. & Ng W.K. (2009) Fish oil replacement in finfish nutrition. *Reviews in Aquaculture*, 1,10–57.
- Turchini, G. M., Trushenski, J. T. & Glencross, B. D. (2019). Thoughts for the future of aquaculture nutrition: realigning perspectives to reflect contemporary issues related to judicious use of marine resources in aquafeeds. *North American Journal of Aquaculture*, 81(1), 13-39.
- Ulbricht, T. L. V, & Southgate, D. A. T. (1991). Coronary heart disease: seven dietary factors. *The Lancet*, 338(8773), 985-992.
- Van Lenning, K., Latasa, M., Estrada, M., Sáez, A. G., Medlin, L., Probert, I. & Young, J. (2003). Pigment signatures and phylogenetic relationships of the Pavlovophyceae (Haptophyta). *Journal of Phycology*, 39(2), 379-389.
- Vanormelingen, P., Vanellander, B., Sato, S., Gillard, J., Trobajo, R., Sabbe, K. & Vyverman, W. (2013). Heterothallic sexual reproduction in the model diatom *Cylindrotheca*. *European Journal of Phycology*, 48(1), 93-105.
- Véron B., Billard C., Dauguet J.C & Hartmann M.A. (1996). Sterol composition of *Phaeodactylum tricornutum* as influenced by growth temperature and light spectral quality. *Lipids*, 31,989–994.

- Volkman J.K. (2016) .Sterols in microalgae. En: Borowitzka MA, Beardall J, Raven J (eds). *The physiology of microalgae*. Springer, Cham, pp 485–505
- Volkman J.K., Barrett S.M., Dunstan G.A. & Jeffrey S.W. (1992). C30-C32 alkyl diols and unsaturated alcohols in microalgae of the class Eustigmatophyceae. *Organic Geochemistry*, 8,131–138.
- Volkman, J. (2003). Sterols in microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(5), 495-506.
- Volkman, J. K. (2016). Sterols in microalgae. *The physiology of microalgae*, 485-505.
- Volkman, J. K., Kearney, P. & Jeffrey, S. W. (1990). A new source of 4-methyl sterols and 5 α (H)-stanols in sediments: prymnesiophyte microalgae of the genus *Pavlova*. *Organic Geochemistry*, 15(5), 489-497.
- Von Schacky, C. & Harris, W. S. (2007). Cardiovascular risk and the omega-3 index. *Journal of Cardiovascular Medicine*, 8, S46-S49.
- Vonshak, A. (1985). Micro-algae: laboratory growth techniques and outdoor biomass production. En *Techniques in bioproductivity and photosynthesis* (pp. 188-200).
- Wang J.K., Seibert M. 2017. Prospects for commercial production of diatoms. *Biotechnology for Biofuels*.
- Wang S., Sirbu D., Thomsen L., Kuhnert N., Ullrich M.S. & Thomsen C. 2019. Comparative lipidomic studies of *Scenedesmus* sp. (Chlorophyceae) and *Cylindrotheca closterium* (Bacillariophyceae) reveal their differences in lipid production under nitrogen starvation. *Journal of Phycology*, 55,1246–1257.
- Wang S., Verma S.K., Said I.H., Thomsen L., Ullrich M.S. & Kuhnert N. (2018). Changes in the fucoxanthin production and protein profiles in *Cylindrotheca closterium* in response to blue light-emitting diode light. *Microbial cell factory*, 17,110–122.
- Wang S., Zhang L., Yang G., Zhu B. & Pan K. (2015). Purification of a diatom and its identification to *Cylindrotheca closterium*. *J Ocean Univ China*, 14,357–361.
- Weihrauch J. I., Posati L. P., Anderson B. A. & Exler J. (1977) Lipid conversion factors for calculating fatty acid contents of foods. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 54,36–40.
- Wu, J., Gu, X., Yang, D., Xu, S., Wang, S., Chen, X. & Wang, Z. (2021). Bioactive substances and potentiality of marine microalgae. *Food Science & Nutrition*, 9(9), 5279-5292.
- Xia, D., Qiu, W., Wang, X. & Liu, J. (2021). Recent advancements and future perspectives of microalgae-derived pharmaceuticals. *Marine Drugs*, 19(12), 703.
- Xu, Z., Yan, X., Pei, L., Luo, Q. & Xu, J. (2008). Changes in fatty acids and sterols during batch growth of *Pavlova viridis* in photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*, 20(3), 237-243.

- Yang Y. J., Du L., Hosokawa M., Miyashita K., Kokubun Y., Arai H. & Taroda H. (2017). Fatty acid and lipid class composition of the microalga *Phaeodactylum tricorutum*. *Journal of Oleo Science* 66:363–368.
- Yang, R., Wei, D. & Xie, J. (2020). Diatoms as cell factories for high-value products: chrysolaminarin, eicosapentaenoic acid, and fucoxanthin. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(7), 993-1009.
- Yang, Y., Du, L., Hosokawa, M., & Miyashita, K. (2020). Total lipids content, lipid class and fatty acid composition of ten species of microalgae. *Journal of Oleo Science*, 69(10), 1181-1189.
- Yao L., Gerde J.A., Lee S.L., Wang T., Harrata K.A. (2015). Microalgae lipid characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63,1773–1787.
- Yi Z., Xu M., Di X., Brynjolfsson S. & Fu W. (2017). Exploring valuable lipids in diatoms. *Frontiers in Marine Science*, 4,17.
- Yu E. T., Zendejas F. J., Lane P. D., Gaucher S., Simmons B. A. & Lane TW. (2009). Triacylglycerol accumulation and profiling in the model diatoms *Thalassiosira pseudonana* and *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae) during starvation. *Journal of Applied Phycology* 21, 669–681
- Zarrinmehr, M. J., Farhadian, O., Heyrati, F. P., Keramat, J., Koutra, E., Kornaros, M. & Daneshvar, E. (2020). Effect of nitrogen concentration on the growth rate and biochemical composition of the microalga, *Isochrysis galbana*. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 46(2), 153-158.
- Zhou W., Lu Q., Han P. & Li J. (2020). Microalgae Cultivation and Photobioreactor Design, Ed. Abu Yousuf. Microalgae Cultivation for Biofuels Production. Chapter 3. Academic Press, 31-50.
- Zhu T., Ai Q., Mai K., Xu W., Zhou H. & Liufu Z. (2014). Feed intake, growth performance and cholesterol metabolism in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) fed defatted fish meal diets with graded levels of cholesterol. *Aquaculture*, 428-429,290–296.
- Zhu T., Corraze G., Plagnes-Juan E., Quillet E., Dupont-Nivet M. & SkibaCassy S. (2018). Regulation of genes related to cholesterol metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a plant-based diet. *The American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 314,58–70.
- Zhu, C. J., Lee, Y. K. & Chao, T. M. (1997). Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1. *Journal of Applied Phycology*, 9(5), 451-457.
- Zienkiewicz, K., Du, Z. Y., Ma, W., Vollheyde, K. & Benning, C. (2016). Stress-induced neutral lipid biosynthesis in microalgae—molecular, cellular and physiological insights. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861(9), 1269-1281.

Zulu N.N., Zienkiewicz K., Vollheyde K. & Feussner I. (2018). Current trends to comprehend lipid metabolism in diatoms. *Progress in lipid research*, 70,1–16.