

Efecto del bioestimulante agrícola VIUSID agro en el crecimiento de dos especies de microalgas marinas

Effect of the agricultural biostimulant VIUSID agro on the growth of two species of marine microalgae

RAYDEL A. ALONSO-PÉREZ, AMALIA SANZ-LLORENTE, GISELA GIL-ESTEPE Y BARBARITO JAIME-CEBALLOS

Centro de Investigaciones Pesqueras (CIP). Calle 246 entre 5ta. Avenida y Mar. Reparto Barlovento, Municipio Playa, La Habana, CP 19100, E-mail: barbarito.ceballos@cip.alinet.cu

RESUMEN

En los gastos asociados al cultivo de microalgas, el uso de medios de cultivo como Guillard (f/2) representa entre el 30-40 % de los costos de operación y estos pueden ser disminuidos hasta siete veces mediante el uso de fertilizantes agrícolas, pues son económicos y contienen los nutrientes indispensables para el crecimiento de las microalgas. Un fertilizante que pudiera utilizarse en esta rama de la acuicultura es VIUSID agro, un promotor del crecimiento vegetal. Para ello, se evaluó el efecto del bioestimulante agrícola VIUSID agro en el crecimiento de las microalgas *Dunaliella salina* y *Thalassiosira* sp., que constituyó el objetivo del trabajo. La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de producción de alimento vivo en el Centro de Investigaciones Pesqueras (CIP). Se evaluaron dos concentraciones diferentes de VIUSID agro: 0,5 mL y 1 mL que se añadieron a 2 000 mL de agua de mar estéril para utilizarlo como medio de cultivo y el crecimiento de las microalgas se comparó con los resultados obtenidos en el medio Guillard (f/2), utilizado como control. Se realizaron conteos diarios en un microscopio óptico con un hematócrito y se determinó la concentración de células por mililitro. Como resultado se obtuvo mayor crecimiento de ambas microalgas en el medio control y fue muy superior al de los tratamientos empleados. Estos resultados se deben al bajo contenido en nitrógeno del VIUSID agro y a la presencia de metales pesados en concentraciones superiores a las que pueden tolerar las microalgas estudiadas.

Palabras clave: microalgas, *Dunaliella salina*, *Thalassiosira* sp., VIUSID agro, Guillard (f/2), nitrógeno y metales pesados.

ABSTRACT

In the expenses associated with the cultivation of microalgae, the use of culture media such as Guillard (f/2) represents between 30-40 % of the operating costs and these can be reduced up to seven times using agricultural fertilizers, since they are cheap and contain the essential nutrients for the growth of microalgae. A fertilizer that could be used in this branch of aquaculture is VIUSID agro, a plant growth promoter. For this, the effect of the agricultural biostimulant VIUSID agro on the growth of the microalgae *Dunaliella salina* and *Thalassiosira* sp., which is the objective of our study, was evaluated. The research was carried out in the live food production laboratory at the Centro de Investigaciones Pesqueras (CIP). Two different concentrations of VIUSID agro were evaluated: 0,5 mL and 1 mL that were added to 2 000 mL of sterile seawater to be used as a culture medium and the growth of the microalgae was compared with the results obtained in the Guillard medium (f/2), used as a control. Daily counts were made under a light microscope with a Neubauer grid-equipped hemacytometer and the concentration of cells per milliliter was determined. As a result, greater growth of both microalgae was obtained in the control medium and it was much higher than that of the treatments used. These results are due to the low nitrogen content of VIUSID agro and the presence of heavy metals in higher concentrations than those that can be tolerated by the microalgae studied, which limited their growth.

Keywords: microalgae, *Dunaliella salina*, *Thalassiosira* sp., VIUSID agro, Guillard (f/2), nitrogen and heavy metals.

INTRODUCCIÓN

Las microalgas son ricas en nutrientes (proteínas, carbohidratos y lípidos) y se consideran la base de la cadena trófica en la acuicultura. Son utilizadas como suplementos alimenticios en el cultivo de organismos acuícolas, en todos los estadios de moluscos bivalvos y estadios larvales o juveniles de los peces (Marella *et al.*, 2020). También son fuente de vitaminas y minerales como la vitamina A, B1, B2, C y E, ácido fólico, magnesio, hierro, yodo y calcio; esto las hace beneficiosas para el consumo, lo que a su vez contribuye a disminuir la dependencia hacia los alimentos tradicionales que no siempre contienen suficientes nutrientes y conllevan a una inadecuada tasa de crecimiento en los organismos acuáticos (Sathasivam *et al.*, 2019). Constituyen además fuentes renovables, sostenibles y económicas de biocombustibles y productos medicinales por lo que actualmente han ganado un gran interés. Cabe destacar que representan una solución potencial de diferentes problemas vigentes, como la contaminación por gases de efecto invernadero, en especial el CO₂ y contaminación de aguas (Salas, 2021; Shahid *et al.*, 2020).

El valor del cultivo de estos microorganismos radica en su papel como productores primarios de la cadena trófica; además, por su tamaño reducido y variado son de fácil captura y digestión por multitud de especies que se alimentan en forma directa o indirecta del fitoplancton (Córdoba, 2005).

Los cultivos de microalgas son considerados una tecnología de mediana complejidad. Al tratarse de organismos vivos involucran una serie de parámetros (nutrientes, luz, salinidad, pH, temperatura y aireación) que deben ser considerados, evaluados, determinados y medidos para realizar con éxito un cultivo (Escobedo & Calderón, 2021).

Con el objetivo de obtener un buen crecimiento celular es necesario el suministro de nutrientes en cantidades adecuadas. Los medios nutritivos están compuestos en esencia de macronutrientes (nutrimentos esenciales para la formación estructural de las moléculas como nitrógeno, carbono, oxígeno, fósforo, hidrógeno, magnesio, calcio, potasio y azufre), elementos traza (micronutrientes que son adquiridos por las células en cantidades mínimas, necesarios para la activación de algunas enzimas como hierro, manganeso, cobre, cobalto y molibdeno) y vitaminas (biotina, B12 y tiamina), preparados como soluciones patrones o stock y cuyas concentraciones varían según el objetivo de estudio y la especie de microalga (Silva, 2016).

Los gastos asociados al cultivo de microalgas representan un alto porcentaje del costo económico de la producción de especies destinadas al consumo humano, como el camarón y peces. El uso de medios de cultivo como el Guillard (f/2) representa entre el 30-40 % de los costos de operación del cultivo de microalgas y el resto del gasto va dirigido a

energía eléctrica y mano de obra (Jad & Nabris, 2012). Los costos que conllevan estos medios pueden ser disminuidos hasta siete veces mediante el uso de fertilizantes agrícolas, pues son económicos y contienen macronutrientes, micronutrientes y vitaminas indispensables para el crecimiento de las microalgas (Simental, 1999; Sánchez, 2020). Por las razones antes expuestas es necesario disminuir estos gastos mediante el uso de nuevas soluciones nutritivas para sustituir a las convencionales, que son utilizadas ampliamente para el cultivo de microalgas en granjas de producción acuícola (Lupio, 2017).

Un fertilizante que pudiera utilizarse en esta rama de la acuicultura es el VIUSID agro, un promotor del crecimiento vegetal. Es una solución para diluir en el agua de riego que contiene *Ascophyllum nodosum*, aminoácidos, fosfato potásico, vitaminas y minerales. Actúa a concentraciones extremadamente bajas, no modifica el pH del agua y contribuye al desarrollo vegetativo de la planta mediante el agrandamiento y multiplicación de las células (Torres, 2016). Todos sus componentes son sometidos a la técnica de activación molecular, con lo que aumenta considerablemente la acción biológica de las sustancias que lo componen. Se presenta como un producto totalmente natural e inocuo para el medio ambiente. Este producto actúa como biorregulador natural, aumenta en gran medida la productividad de las exportaciones agrícolas, con resultados satisfactorios desde los primeros días de aplicación. Se puede utilizar en todas las etapas de crecimiento vegetal y ayuda a fortalecer las plantas que de forma natural producen sustancias antimicrobianas, evitando así la colonización por microorganismos dañinos (Catalysis, 2018).

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del bioestimulante VIUSID agro sobre el crecimiento de las microalgas *Dunaliella salina* y *Thalassiosira* sp.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de producción de alimento vivo perteneciente al Centro de Investigaciones Pesqueras (CIP) ubicado en el municipio Playa, La Habana, Cuba durante el año 2022.

Las cepas de microalgas utilizadas pertenecían a las especies *Thalassiosira* sp. y *Dunaliella salina*, ambas obtenidas en el laboratorio donde se realizó el experimento.

Medios de cultivo

Las microalgas se cultivaron con dos medios de cultivos, el medio Guillard (f/2) (1975) que se utilizó como control y el bioestimulante VIUSID agro (Tabla 1). Para preparar los medios se utilizó agua de mar estéril.

Se evaluaron dos concentraciones diferentes de VIUSID agro 0,5 mL y 1 mL y se añadieron a 2 000 mL de agua de mar estéril. De la solución obtenida se emplearon 1 000 mL para cada uno de

los dos ensayos. Para el cultivo de la diatomea *Thalassiosira* sp. se le agregó al medio 1 mL de silicato (Fig. 1). Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 120 °C durante 20 min.

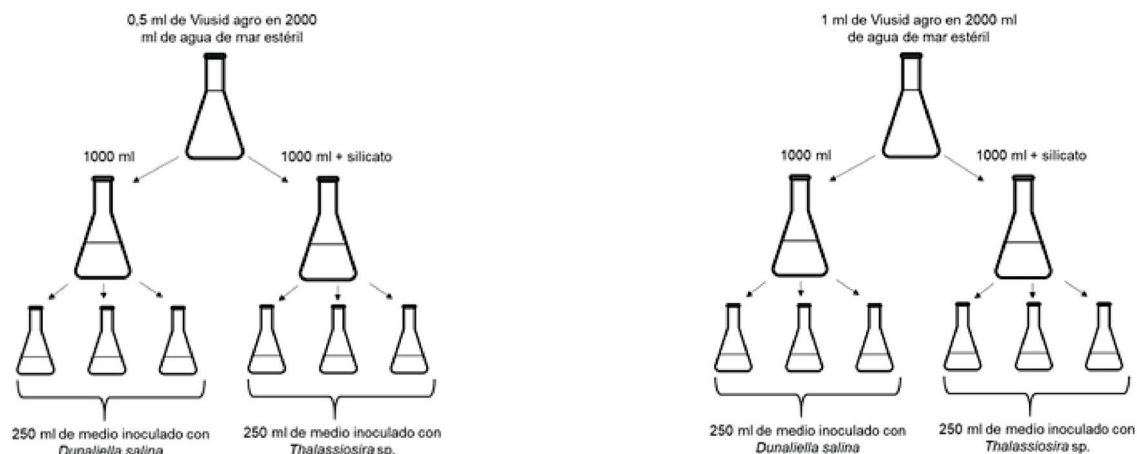


Fig. 1. Esquema explicativo del proceso de preparación de los medios de cultivo utilizados para llevar a cabo los ensayos con *Dunaliella salina* y *Thalassiosira* sp.

Tabla 1. Composición química porcentual de los componentes de los medios de cultivo utilizados en el experimento

Medio Guillard	%	VIUSID agro	%
KNO ₃	75	<i>Ascophyllum nodosum</i>	15
NaH ₂ PO ₄	5,65	K ₂ HPO ₄	5
EDTA Na ₂	4,36	C ₄ H ₆ O ₅	4,6
FeCl ₃	3,15	Glucosamina	4,6
CuSO ₄	0,010	Ácido aspártico	1,6
ZnSO ₄	0,022	Arginina	4,15
CoCL ₂	0,010	Glicina	4,35
MnCl ₂	0,180	Triptófano	0,5
Na ₂ MoO ₄	0,006	ZnSO ₄	0,115
Cianocobalamina (B12)	0,002	Ácido ascórbico (Vitamina C)	1,15
Tiamina (B1)	0,100	Pantotenato cálcico (B5)	0,115
Biotina (B8)	0,001	Piridoxina (B6)	0,225
Na ₂ SiO ₃	10	Ácido fólico (B9)	0,05
H ₃ ClO ₄	5	Cianocobalamina (B12)	0,0005
		Glicirricinato monoamónico	0,23
		Benzoato sódico	0,2
		Sorbato potásico	0,2
		Metales pesados	(mg/L)

Tabla 1. Continuación

Medio Guillard	%	VIUSID agro	%
		Cadmio	0,5
		Níquel	1,0
		Plomo	1,0
		Mercurio	0,1
		Cromo	3,0
		Zinc	200

Inóculo y condiciones experimentales del cultivo

Durante el experimento la temperatura de los cultivos se mantuvo en 25 °C, salinidad 30 ppm y la iluminación fue constante proveniente de cuatro lámparas fluorescentes de luz blanca fría de 1 000 lux, colocadas horizontalmente. La homogenización del cultivo se realizó diariamente de forma manual. Los cultivos se colocaron en estantes preparados para este tipo de actividad.

El experimento se llevó a cabo a escala de laboratorio usando matraces de 500 mL a un volumen de trabajo de 250 mL. A partir de un cultivo stock con una concentración de 8 710 000 cél./mL en el caso de *D. salina* y 751 250 cél./mL para *Thalassiosira* sp. y con ayuda de una pipeta se inoculó cada recipiente con 1 mL de la muestra.

Cinética de crecimiento

Recuento celular

La concentración celular del cultivo se determinó de manera directa. Se tomaron muestras diarias de 1 mL, para el caso de *D. salina* que es una microalga móvil y se fijaron con solución de lugol. Posteriormente se procedió a contarlas en un microscopio óptico con un hematocitómetro equipado con cuadrulado de Neubauer. Se contaron las células en los 16 cuadrados de cada uno de los cuatro cuadrantes de los extremos de la cámara. Antes de tomar cada muestra se agitó el cultivo para permitir que las células se distribuyeran de forma homogénea. Con los datos de concentración celular (cél./mL) de cada recuento se obtuvo la curva de crecimiento graficando en el eje de las "y" los valores de concentración y en el eje de las "x" el tiempo (en días).

Para determinar el número de cél./ mL se utilizó la siguiente fórmula:

$$\sum n \div 4 \times 1 \times 10^4.$$

n: número de células contadas en cada cuadrante.

Diseño experimental

Se realizaron cuatro tratamientos con tres réplicas cada uno y tres réplicas de control para cada microalga para un total de 18 unidades experimentales:

- Tratamiento 1: VIUSID agro 0,5 mL.
- Tratamiento 2: VIUSID agro 1 mL.
- Tratamiento 3: VIUSID agro 0,5 mL + silicato.
- Tratamiento 4: VIUSID agro 1 mL + silicato.

Análisis estadísticos

Las comparaciones realizadas fueron entre:

- Medio control del cultivo de *Dunaliella salina* y el tratamiento 1.
- Medio control del cultivo de *Dunaliella salina* y el tratamiento 2.
- Tratamiento 1 y tratamiento 2.
- Medio control del cultivo de *Thalassiosira* sp. y el tratamiento 3.
- Medio control del cultivo de *Thalassiosira* sp. y el tratamiento 4.
- Tratamiento 3 y tratamiento 4.

Se utilizó la cantidad de células por mililitro para realizar una prueba de hipótesis con el objetivo de comprobar si existen diferencias en el crecimiento de las microalgas en los medios de cultivo utilizados.

Se llevó a cabo la prueba estadística de Shapiro-Wilks para comprobar si los datos cumplen con las premisas de una distribución normal de probabilidades, y Levenne para comprobar la homogeneidad de varianzas. Cuando se corroboró una distribución normal, se utilizó la prueba paramétrica de comparación de medias de t-Student, y cuando se encontró atipicidad o no normalidad se aplicó la prueba U de Mann-Whitney, no paramétrica.

Para la realización de estas pruebas se empleó el paquete estadístico Statistica versión 10 y como nivel de significación se tomó un valor de 0,05.

RESULTADOS

pH, temperatura y salinidad

Los valores de pH de los cultivos aumentaron en la medida que transcurrieron los días (Tabla 2). La salinidad y la tem-

peratura se mantuvieron en valores constantes 30 ppm y 25 °C respectivamente. Estos parámetros se consideran adecuados para ambas microalgas.

Las pruebas estadísticas realizadas entre el medio control y los tratamientos aplicados al cultivo de ambas microalgas arrojaron un valor de probabilidad menor que el nivel de significación utilizado, por lo que se encontraron diferencias significativas. Por otro lado, el valor de probabilidad fue mayor que el nivel de significación cuando se compararon los tratamientos, por lo que las diferencias son no significativas (Tabla 3).

Tabla 2. Valor de pH de los cultivos

Tiempo (días)	1	10	20
Tratamientos	pH (promedios)		
Tratamiento 1	7,5	7,8	8,5
Tratamiento 2	7,4	7,9	8,8
Tratamiento 3	7,5	8,0	9,0
Tratamiento 4	7,5	7,9	8,7
Control (<i>D. Salina</i>)	7,5	8,1	8,8
Control (<i>Thalassiosira</i> sp.)	7,4	7,8	8,5

Tabla 3. Pruebas estadísticas realizadas sobre la concentración de células por mililitro entre los medios de cultivo utilizados en el cultivo de *Dunaliella salina* y *Thalassiosira* sp.

Comparación	Prueba estadística	Valor de probabilidad
Control – tratamiento 1	U de Mann-Whitney	0,000000
Control – tratamiento 2	t-Student	0,000000
Tratamiento 1 – tratamiento 2	U de Mann-Whitney	0,511031
Control – tratamiento 3	U de Mann-Whitney	0,000000
Control – tratamiento 4	U de Mann-Whitney	0,000001
Tratamiento 3 – tratamiento 4	t-Student	0,090381

Cinética de crecimiento

Dunaliella salina

Los mejores resultados del experimento se obtuvieron con el medio control. En la curva de crecimiento se observa una fase de adaptación de aproximadamente tres días, una fase exponencial que comenzó aproximadamente en el séptimo día y duró hasta el día 15 del cultivo. A partir de entonces comenzó a mostrar una desaceleración en el crecimiento, dan-

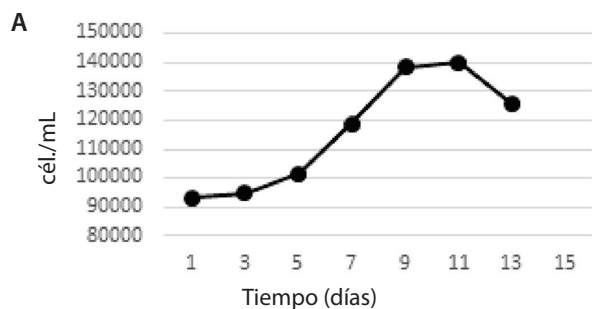
do lugar a una meseta que duró aproximadamente cuatro días, la concentración celular más alta se obtuvo en esta fase (7 222 250 cél./ mL). A partir del día 21 el cultivo comenzó a mostrar una reducción en la concentración celular entrando a la fase de muerte celular (Fig. 2C).

Para ambos tratamientos los valores obtenidos fueron muy inferiores a los del medio control como se muestra en la figura 2D. Las curvas de crecimiento mostraron un período de adaptación de 3 días aproximadamente, la fase exponencial fue de corta duración, en el tratamiento 1 fue desde el

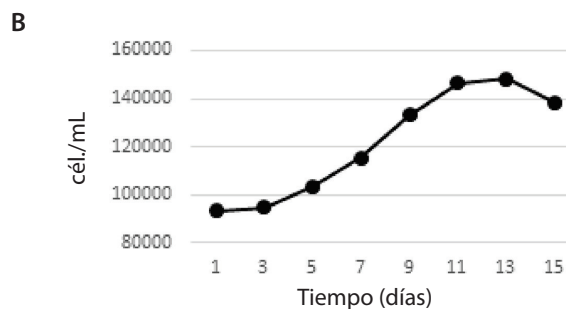
día 5 hasta el día 9 y la máxima concentración celular fue de 140 166 cél./mL en el día 11 del cultivo cuando se encontraba en fase estacionaria. Para el tratamiento 2 la fase expo-

nencial fue desde el día 5 hasta el 11 y la máxima concentración celular del cultivo fue de 148 333 cél./mL en el día 13 en la fase estacionaria también (Fig. 2 A y B).

Curva de crecimiento del Tratamiento 1 en *Dunaliella salina*.



Curva de crecimiento del Tratamiento 2 en *Dunaliella salina*.



Curva de crecimiento del control de *Dunaliella salina*

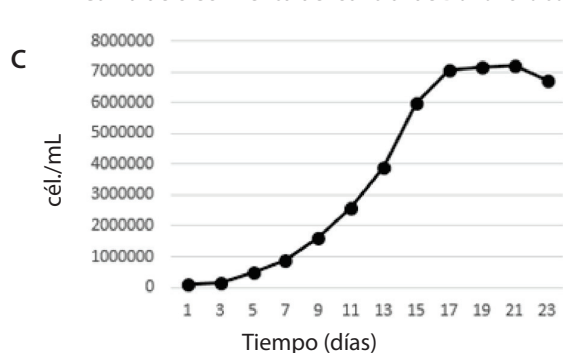


Gráfico comparativo entre las curvas de crecimiento de los tratamientos aplicados vs control de *Dunaliella salina*

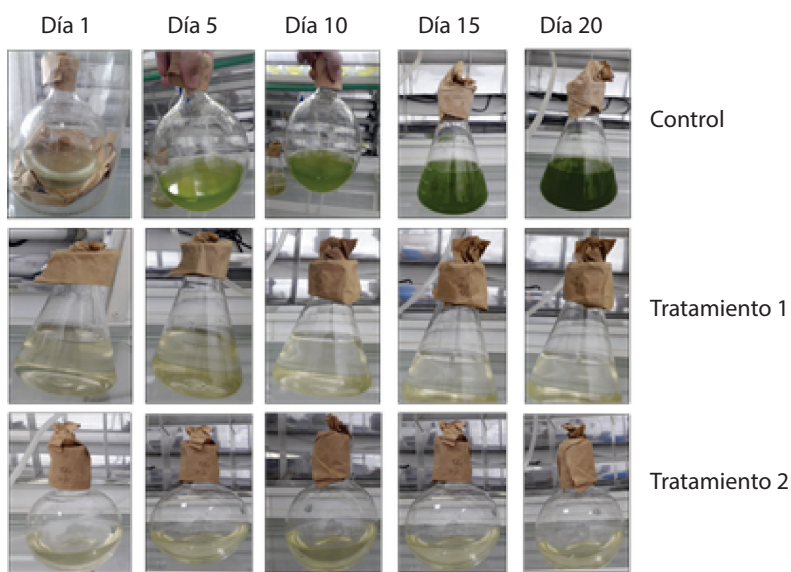
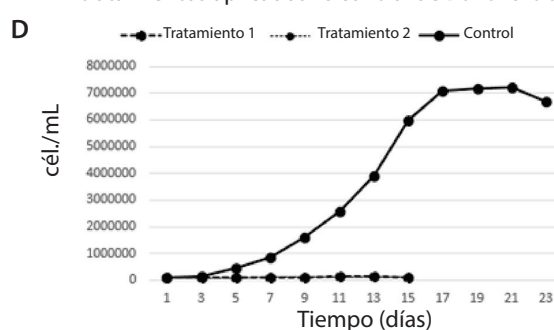


Fig. 2. Cambio en la coloración de los medios utilizados en el cultivo de *Dunaliella salina*. Según los días de cultivo y los tratamientos aplicados.

Thalassiosira sp.

Los mejores resultados del experimento al igual que con la especie anterior se obtuvieron con el medio control. La fase de adaptación del cultivo tuvo una duración de aproxi-

madamente tres días, seguido de una fase exponencial que comenzó aproximadamente en el día 7 hasta el día 15 del cultivo, a partir de la cual comenzó a mostrar una desaceleración en el crecimiento, dando lugar a una meseta que duró aproximadamente 3 días, la máxima concentración

celular se obtuvo en esta etapa (1 42 500 cél./mL). A partir del día 19 el cultivo comenzó a mostrar una reducción en la concentración celular entrando a la fase de muerte celular (Fig. 3C).

Los resultados obtenidos en los tratamientos aplicados a esta microalga fueron muy inferiores a los del medio control. Las curvas de crecimiento mostraron un período de adaptación aproximadamente de 3 días, la fase exponencial fue de corta duración, en ambos tratamientos tuvo lugar desde el día 5 hasta el día 9 y la máxima concentración celular fue de 12 500 cél./mL para el

tratamiento 3 y de 11 600 cél./mL para el tratamiento 4. Luego de esta fase tuvo lugar una reducción en número de células indicando la etapa de muerte celular (Fig. 3 A y B).

En el cultivo de *Thalassiosira* sp. con medio Guillard f/2 (control) se observó un cambio en la coloración, marrón en este caso por ser una diatomea. La mayor intensidad se observó en el día 20, indicando una alta concentración celular. En ninguno de los tratamientos utilizando el VIUSID agro se observó cambio en la coloración.

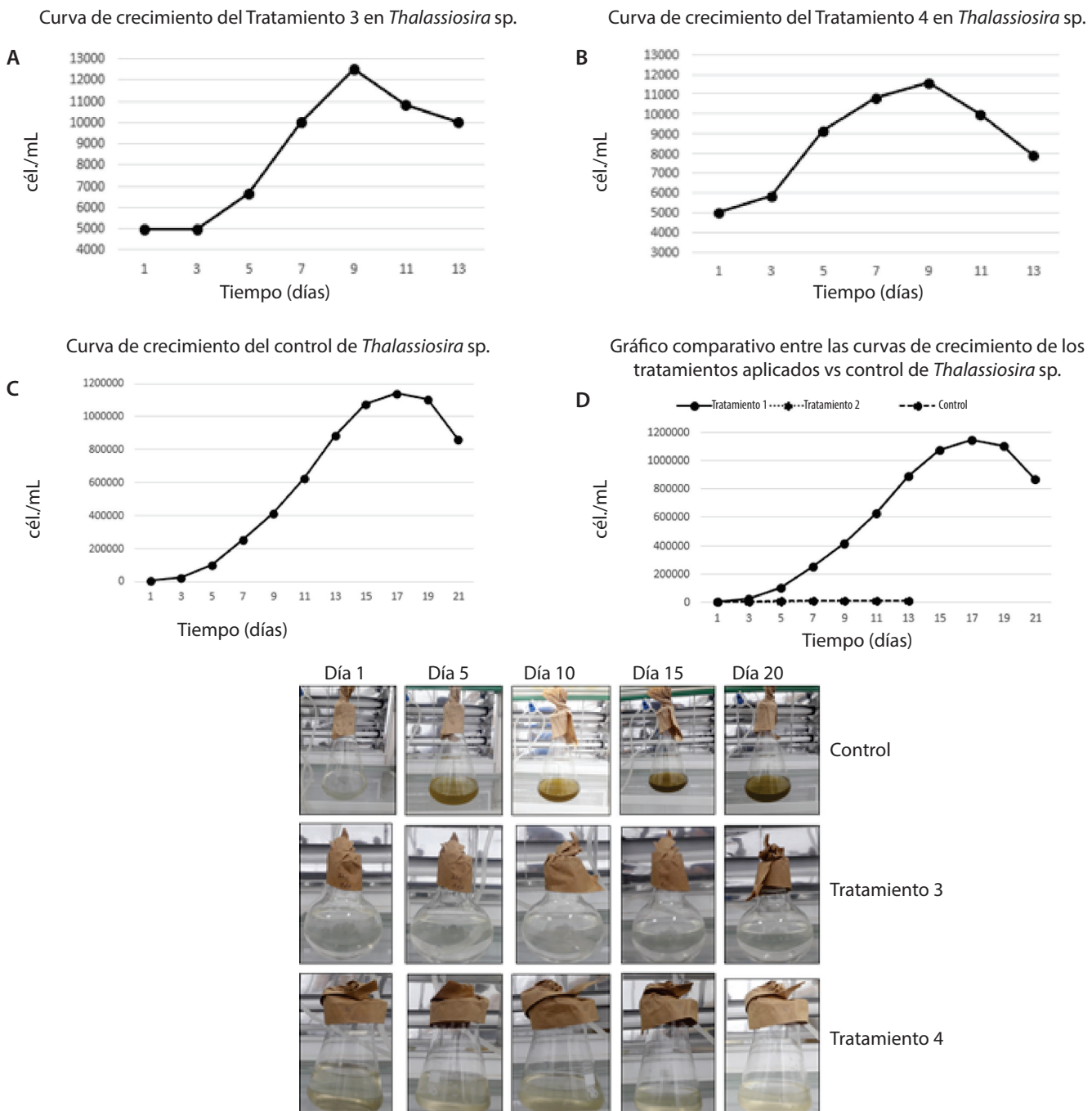


Fig. 3. Cambio en la coloración de los medios utilizados en el cultivo de *Thalassiosira* sp. según los días de cultivo y los tratamientos aplicados.

DISCUSIÓN

El uso de VIUSID agro como medio de cultivo alternativo para las microalgas es un tema reciente y no se encontraron referencias sobre su uso con estos fines en la literatura revisada. Una consideración importante en la formulación de medios de cultivo no convencionales con fertilizantes agrícolas, es la capacidad de las células de microalgas de utilizar diferentes formas de nutrientes (Simental & Saavedra, 2002). Las diferencias encontradas entre el medio control y los tratamientos se deben a la composición bioquímica del mismo.

Los nutrientes más importantes en un sistema de cultivo de microalgas son el carbono (C), nitrógeno (N), y fósforo (P), estos dos últimos son los que generalmente limitan el crecimiento en los medios de cultivo (Camacho, 2022). Las

células de las microalgas son capaces de utilizar formas de nitrógeno orgánicamente combinadas, especialmente aminoácidos, urea y purinas (Fábregas *et al.*, 1987).

El VIUSID agro contiene un 1,8 % de nitrógeno total, proveniente fundamentalmente de los aminoácidos que contiene (triptófano, glicina, aspartato y arginina). Además, este bioestimulante, tiene un 15 % del extracto del alga parda *Ascophyllum nodosum* que aporta más nitrógeno al medio alrededor de 1-1,5 %, este proviene también de los aminoácidos presentes en el extracto (Hurtado *et al.*, 2009). Por lo tanto, el N total de este medio es de un 3-3,5 % que es muy inferior al del control (10 %), por lo que constituye un nutriente limitante. En el caso de *Dunaliella salina* la limitación de nitrógeno tiene efectos en su morfología celular volviendo a la célula más redonda, como se observa en la figura 4.

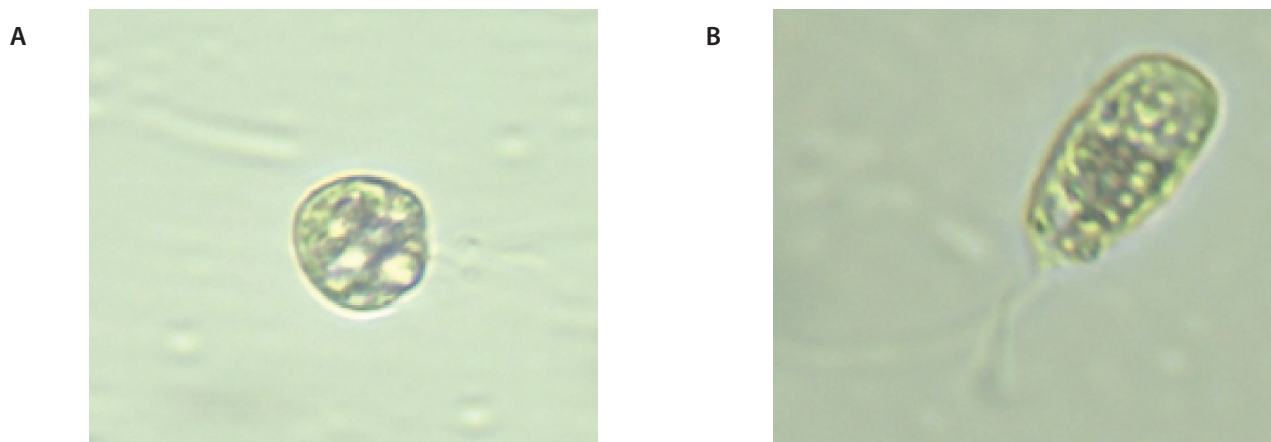


Fig. 4. Morfología celular de la microalga *Dunaliella salina* en los medios de cultivo utilizados. (A) célula cultivada en el medio que contenía VIUSID agro. (B) célula cultivada en el medio Guillard (f/2).

Las microalgas poseen varios mecanismos para adquirir el nitrógeno de los aminoácidos, puede ser a través de canales o transportadores que facilitan el movimiento de aminoácidos hacia el interior de la célula donde pueden degradarse enzimáticamente, ya sea por conversión en otros aminoácidos a través de la transaminación o por la liberación y posterior asimilación de amonio (NH_4). Algunas microalgas poseen enzimas extracelulares que desaminan los restos amino, liberando amonio que puede transportarse a través de la membrana celular y posteriormente asimilarse a través del ciclo GS-GOGAT. Además, algunos aminoácidos son inestables cuando están presentes en solución acuosa y se exponen a la luz, formando NH_4 , urea y otros aminoácidos a lo largo del tiempo (Pattison *et al.*, 2012; Tegeder & Ward, 2014).

No existe evidencia que demuestre la existencia de la enzima aminoácido oxidasa extracelular en *Dunaliella salina* ni en *Thalassiosira sp.*, por lo que los aminoácidos presentes en el VIUSID no pueden ser desaminados y liberar amonio

al medio. En cuanto a la captación directa de aminoácidos del medio, no se ha encontrado ningún transportador en *Thalassiosira sp.* Sin embargo, *Dunaliella salina* sí presenta un transportador en la membrana celular para la histidina (Fisher & Cowdell, 1982; Porras, 2018).

En los estudios realizados por Murphee *et al.* (2017) evaluaron el crecimiento de *Dunaliella salina* usando aminoácidos como única fuente de nitrógeno y determinaron que solamente la glutamina, histidina, triptófano y cisteína producen cierto crecimiento en esta microalga.

En VIUSID agro están presentes tres de estos aminoácidos: el triptófano, histidina y cisteína. Estos últimos provienen del extracto de *Ascophyllum nodosum* que contiene el bioestimulante. Todos ellos experimentan fotooxidación oxidativa, un proceso de degradación abiótica, que ocurre a través del ataque nucleofílico de aminas primarias por el oxígeno atmosférico catalizado por la presencia de luz y calor. En el caso del triptófano y la cisteína, el producto final de esta

reacción es el amonio. El NH_4 liberado puede cruzar la membrana celular a través de una proteína de transporte hacia la célula, donde se asimila a través de la vía GS-GOGAT, ambas microalgas pueden utilizar esta fuente de nitrógeno. La histidina a diferencia del resto no produce amonio, pero sí urea como producto final. No obstante, para utilizar este componente como fuente de nitrógeno se requieren al menos dos componentes: una proteína de transporte de membrana y la subsiguiente degradación enzimática en $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ y NH_4 que después puede asimilarse a través de la vía GS-GOGAT. En *D. salina* existe un transportador de urea y las enzimas urea carboxilasa y alofanato hidrolasa, que permiten el metabolismo de la urea (Fan *et al.*, 2012; Murphree *et al.*, 2017).

En el caso de *Thalassiosira* sp. la entrada de urea ocurre por transporte activo mediado por una proteína específica para este compuesto. Una vez dentro de la célula es degradada por la enzima ureasa que provoca la hidrólisis de la urea, que involucra dos etapas. La primera, estrictamente enzimática, produce amonio y carbonato, mientras que la segunda involucra la descomposición espontánea no catalizada del carbonato para producir otra molécula de amonio y ácido carbónico. El amonio obtenido se asimila por la vía GS-GOGAT. La enzima ureasa es una metaloproteína que se activa por la interacción de dos átomos de níquel (Ni), este metal traza está presente en el medio a concentraciones adecuadas, por lo que esta diatomea puede usar eficientemente la urea (Mazzei *et al.*, 2018).

El fósforo es otro macronutriente esencial para las microalgas. Cumple funciones biológicas básicas, como un elemento estructural en los ácidos nucleicos y los fosfolípidos, actúa como facilitador en el metabolismo energético y la activación de intermediarios metabólicos. Es, además, un componente en las cascadas de transducción de señales y la regulación de enzimas. (Nausch *et al.*, 2018).

La principal fuente de fósforo (P) que presenta el VIUSID agro es el fosfato dipotásico (K_2HPO_4), el cual es excelente para los cultivos de microalgas y se encuentra en una concentración similar a la del medio control, por lo que constituye un nutriente no limitante (Sathasivam & Juntawong, 2013).

Un paso primario y crítico en la utilización del fósforo es su absorción por las células vivas a través de las membranas plasmáticas. Tanto *Dunaliella salina* como *Thalassiosira* sp. presentan transportadores que permiten el paso de este compuesto, por lo que pueden asimilarlo (Sathasivam & Juntawong, 2013; Díaz *et al.*, 2019).

En el medio de cultivo utilizado el nitrógeno es un nutriente limitante y las microalgas de estudio tienen estrategias ecológicas diferentes para enfrentarse a esta situación, lo que afecta las tasas de absorción de otros nutrientes como el fosfato y el silicato (Verlag, 1982).

El consumo de nitrógeno y fósforo por parte de las células de *Dunaliella salina* es máximo al comienzo del crecimiento del cultivo y la adquisición de estos nutrientes ocurre de manera independiente, es decir, que no existe una influencia mutua de las concentraciones de nitrógeno y fósforo en su consumo. Además, es proporcional a la concentración de estos macronutrientes en el medio. Esta capacidad de *Dunaliella salina* le permitió cierto crecimiento a pesar de que el nitrógeno se encontraba a una baja concentración.

Por otro lado, en *Thalassiosira* sp. existe una influencia de la concentración de nitrógeno sobre la absorción de fosfato. En condiciones limitantes de nitrógeno esta microalga asimila este compuesto a un ritmo que supera los requisitos normales de crecimiento. Esto provoca que la utilización de nutrientes inorgánicos como el fosfato se reduzca hasta que se agote la fuente de nitrógeno o se asimilen cantidades suficientes de nitrógeno para permitir que la célula reanude los procesos metabólicos normales. La reducción de iones en las tasas de absorción de fosfato, y posiblemente otros procesos metabólicos, permite a la célula canalizar la mayor parte de la energía celular disponible hacia la absorción y asimilación de nitrógeno, hasta que se supere la deficiencia (Conway & Harrison, 1977).

En los estudios realizados por Rocha *et al.* (2010) evaluaron el crecimiento de *Thalassiosira* sp. en medios limitantes de nitrógeno y determinaron que la reducción en la absorción de fosfato (nutriente no limitante en el cultivo) no fue impulsada por la disminución de la disponibilidad de este nutriente, sino que estaba relacionada en cambio con la disminución de recursos celulares (incluida la energía) a medida que el nitrato se hizo cada vez menos disponible.

La limitación de nitrógeno también tiene efectos sobre el ciclo celular de las microalgas, durante la fase G1 las células adquieren las cantidades de nitrógeno adecuadas para completar el ciclo celular, pero como este nutriente es deficiente en el medio provoca que esta fase se prolongue mucho más e incluso impide que las células continúen dividiéndose (Rocha, 2004).

En estudios realizados por Yizhong & Liu (2018) se evaluaron los efectos de las limitaciones de macronutrientes (nitrógeno, fósforo y azufre) y la intensidad de la luz para las acumulaciones de carbohidratos de *Chlorella* sp. Los resultados mostraron que la limitación de nitrógeno influyó en la progresión del ciclo celular. Esto coincide con los resultados del presente estudio.

De los metales pesados presentes en el VIUSID agro el zinc (Zn) es el que se encuentra a una mayor concentración de aproximadamente 200 mg/L, que es muy superior a los niveles en que pueden desarrollarse ambas microalgas. El zinc (Zn) es un micronutriente que desempeña un papel fundamental en varias vías fisiológicas del fitoplancton. Es un

cofactor para enzimas como la anhidrasa carbónica (CA), que está involucrada en la adquisición de carbono y la fosfatasa alcalina, y la nucleotidasa, que permiten la escisión extracelular del fósforo a partir de compuestos orgánicos. Cuando se encuentra en altas concentraciones resulta altamente tóxico, puesto que interfiere en las reacciones enzimáticas responsables de la biosíntesis de los metabolitos indispensable para las microalgas, compite con otros metales por sitios de unión en proteínas lo que interfiere en la funcionalidad de estas (Kaamoush *et al.*, 2022; Shaked *et al.*, 2006).

En los estudios realizados por Kaamoush *et al.* (2022) evaluaron el efecto de diferentes metales sobre el crecimiento de *Dunaliella salina* y encontraron que niveles superiores a 5 mg/L de zinc resultan inhibitorios para el crecimiento de esta microalga, pero en todas las concentraciones de zinc probadas el crecimiento de *Dunaliella salina* no se inhibió por completo, esto explicaría que a pesar de las altas concentraciones de este metal el cultivo nunca llegó a cero.

Thalassiosira sp. muestra una menor tolerancia a este metal; según Kayser (1977) determinaron que concentraciones superiores a 0,1 mg/L inhiben el crecimiento de *Thalassiosira rotula*. Las altas concentraciones de zinc también interfieren en la captación de silicio (Si) por las células, debido a alteraciones en la permeabilidad de la membrana. El Si tiene un papel importante en el metabolismo de esta microalga, porque la división celular vegetativa no puede tener lugar sin la formación de valvas de las células hijas y el crecimiento celular tampoco (Anu *et al.*, 2018).

La limitación de nitrógeno también influye en los daños ocasionados por este metal. En medios deficientes de este nutriente se produce una mayor acumulación de zinc insoluble en los orgánulos celulares lo que aumenta la toxicidad. Además, en medios enriquecidos en nitrato se estimula la síntesis de proteínas desintoxicantes de metales, por ejemplo, glutatión y fitoquelatina (Anu *et al.*, 2018).

El VIUSID agro también contiene metales no esenciales para las microalgas (cadmio, mercurio y plomo) y que pueden resultar tóxicos incluso a bajas concentraciones para algunas especies de microalgas (Schaller *et al.*, 2010).

Para la microalga verde *Dunaliella salina* la concentración de estos metales se encontró dentro de los rangos de tolerancia de esta especie (Muhaemin, 2004; Musika *et al.*, 2005; Belghith *et al.*, 2015).

En el caso de la diatomea el plomo y el mercurio se encuentran en concentraciones adecuadas para esta microalga (Wua *et al.*, 2012 y Hollibaugh *et al.*, 1980). Pero el cadmio se encuentra a niveles que resultan tóxicos para esta especie. Este metal es lipofílico, lo que facilita su unión a las proteínas de la membrana celular, por lo que puede ser absorbido por la célula. Una vez dentro puede unirse al ADN interrumpiendo la replicación de este, también induce la apoptosis dentro

del ciclo celular. Además, se ha demostrado que el cadmio inhibe la biosíntesis de clorofila induciendo el proceso de clorosis e inactiva el centro de reacción del Fotosistema II (Wahyu *et al.*, 2020).

El aumento de los valores de pH en el experimento se debe principalmente al proceso de fotosíntesis. El dióxido de carbono es ácido en el agua y las microalgas lo absorben durante los períodos de iluminación cuando realizan la fotosíntesis, lo que vuelve el medio más alcalino a la medida que disminuyen los valores de CO₂ (Fimbres *et al.*, 2010).

CONCLUSIONES

El medio de cultivo a base de VIUSID agro tuvo un efecto negativo sobre la concentración de células por mililitro de las especies *Dunaliella salina* y *Thalassiosira* sp. con respecto al medio Guillard (f/2) utilizado como control en este ensayo.

De las dos especies utilizadas, la microalga verde *Dunaliella salina* demostró una mayor tolerancia al VIUSID agro, debido a su uso más eficiente de las fuentes de nitrógeno y fósforo que presenta el bioestimulante y menor sensibilidad a los metales pesados.

Las diferentes fases de las curvas de crecimiento de ambas microalgas fueron más evidentes en el medio Guillard (f/2) utilizado como control y la duración de la fase exponencial significativamente superior a los medios que contenían VIUSID agro, siendo el agotamiento de nutrientes la causa fundamental de este comportamiento.

RECOMENDACIONES

Utilizar el fertilizante VIUSID agro en otras especies de microalgas como *Chlorella* sp. y *Tetraselmis* sp., esta última presenta una alta tolerancia al zinc que es el metal de mayor concentración en el bioestimulante.

Utilizar otras dosis del bioestimulante diferentes a las utilizadas en nuestro experimento.

REFERENCIAS

- Anu, R., Nandan, B., Jayachandran, S., Don, X., Midhun, N. & Mohan, A. (2018). Toxicity effects of zinc on two marine diatoms, under varying macronutrient environment, *Marine Environmental Research*, 18, 30-50.
- Belghith, T., Khaled, A., Bellassoued, K., Abdelfatteh, E. & Ayadi, H. (2015). Physiological and biochemical response of *Dunaliella salina* to cadmium pollution. *J. Appl. Phycol.*, 28, 991-999.
- Camacho, D. (2022). Revisión sistemática y caracterización de microalgas incorporadas como alimento vivo en cultivos de especies bioacuáticas en Ecuador, 2010-2021.
- Catalysis (2018). VIUSID agro, promoter of growth. *Agricultural Science and Technol.*, 8, 157-167.

- Conway, H. L. & Harrison, P. J. (1977). Marine diatoms grown in chemostats under silicate or ammonium limitation. IV. Transient response of *Chaetoceros debilis*, *Skeletonema costatum*, and *Thalassiosira gravida* to a single addition of the limiting nutrient. *Mar. Biol.*, 43, 33-43.
- Córdoba, J. (2005). Efecto del medio y condiciones de cultivo en la productividad de tres diatomeas marinas con potencial acuícola. *MVZ*, 10, 544-554.
- Díaz, J., Steffen, R., Sanders, J. G., Tang, Y. & Duhamel, S. (2019). Preferential utilization of inorganic polyphosphate over other bioavailable phosphorus sources by the model diatoms *Thalassiosira* sp. *Environmental microbiology*, 21(7), 2415-2425.
- Escobedo, M. J. & Calderón, A. C. (2021). Microalgal biomass with high potential for the biofuels production. *Scientia Agropecuaria*, 12, 265-282.
- Fábregas, J., Toribio, L., Abalde, J., Cabezas, A. & Herrero, C. (1987). Aproximación a la producción de biomasa de la microalga marina *Tetraselmis suecica* utilizando fertilizante común de jardín y extracto de suelo como suministro económico de nutrientes en cultivos discontinuos. *Acuicultura*, 6, 141-150.
- Fan, C., Chou, C. Y., Tong, L. & Xiang, S. (2012). Crystal structure of urea carboxylase provides insights into the carboxyl transfer reaction. *J. Biol. Chem.*, 287, 9389-9398.
- Fimbres, O. D.; Mercado C.L.R.; Murguía, L.A.; López E.J.A. (2010): Crecimiento y biomasa de *Dunaliella* sp. cultivada en medios limitantes en nitrógeno. *BIOtecnia*, XII (3), 34-39.
- Fisher, N. & Cowdell, R. (1982). Growth of marine planktonic diatoms on inorganic and organic nitrogen. *Marine Biology*, 72, 147-155.
- Hollibaugh, T., Seibert, R. & Thomas, W. (1980). A Comparison of the Acute Toxicities of Ten Heavy Metals to Phytoplankton from Saanich Inlet, B.C. Canada. 10:93-105.
- Hurtado, A., Yunque, D. A., Tibulos, K. T. & Critchley, A. T. (2009). Use of Acadian marine plant extract powder from *Ascophyllum nodosum* in tissue culture of *Kappaphycus* varieties. *J. Appl Phycol.*, 21, 633-639.
- Jad, K. A. & Nabris, E. (2012). Development of Cheap and Simple Culture Medium for the Microalgae *Nannochloropsis* sp. Based on Agricultural Grade Fertilizers Available in the Local Market of Gaza Strip (Palestine). *Journal of Al Azhar University -Gaza (Natural Sciences)*, 14(1), 61-76.
- Kaamoush, A., Nagwa, A., Mohamed, Y. & Omar, C. (2022). Evaluación toxicológica ambiental (in vitro) de cobre, zinc y ciburtrina sobre el crecimiento y contenido de aminoácidos del alga marina *Dunaliella salina*. *Mar. Biol.*, 49, 23-32.
- Kaysner, H. (1977). Effect of zinc sulphate on the growth of mono- and multispecies culture of some marine plankton. *Algae*, 30, 682-696.
- Lupio, E.Z. (2017). Crecimiento e inducción a la carotenogénesis de la microalga *Dunaliella* sp. en diferentes condiciones de cultivo. *Biología Tropical*, 10, 14-35.
- Marella T., Pacheco, I., Saldivar, R., Dixit, S. & Tiwari, A. (2020). Wealth from waste: diatoms as tools for phycoremediation of wastewater and for obtaining value from the biomass. *Sci. Total Environ*, 724, 137-960.
- Marella T., Pacheco, I., Saldivar, R., Dixit, S. & Tiwari, A. (2020). Wealth from waste: diatoms as tools for phycoremediation of wastewater and for obtaining value from the biomass. *Sci. Total Environ*, 724, 137-960.
- Muhaemin, M. (2004). Toxicity and bioaccumulation of lead in *Chlorella* spp. and *Dunaliella* spp. *Journal of Coastal Development*, 8, 27-33.
- Murphee, C. A., Dums, J. T., Jain, S. K., Zhao, C., Young, D. Y., Khoshnoodi, N., Tikunov, A., Macdonald, J., Pilot, G. & Sederoff, H. (2017). Los aminoácidos son un fertilizante ineficaz para *Dunaliella* spp. *Ciencia de las plantas*, 8, 847.
- Musika, C., Thongra-ar, W. & Chomrung, A. (2005). Toxicity of mercury and copper to marine phytoplankton, *Dunaliella salina*, *Tetraselmis* sp. and *Chaetoceros calcitrans*. *Technol.*, 27(4), 915-928.
- Nausch, M., Achterberg, E., Bach, L., Brussaard, C., Crawford, D. & Fabian, J. (2018). Concentrations and uptake of dissolved organic phosphorus compounds in the Baltic Sea. *Front Mar Sci.*, 5, 386.
- Pattison, D. I., Rahmanto, A. S. & Davies, M. J. (2012). Photooxidation of proteins. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 11, 38-53.
- Porras, M. (2018). Nutrición nitrogenada en algas. *MVZ*, 34, 1323-1340.
- Rocha, C. (2004). Recovery of *Thalassiosira weissflogii* from nitrogen and silicon starvation. *Limnol. Oceanogr.*, 49(1), 245-255.
- Rocha, L., Terbrüggen, A., Völker, C. & Hohn, S. (2010). Response to and recovery from nitrogen and silicon starvation in *Thalassiosira weissflogii*: growth rates, nutrient uptake and C, Si and N content per cell. *Mar Ecol. Prog. Ser.*, 412(1), 57-68.
- Salas, R. G. (2021). Microalgas: ecología, repercusión en la salud y nutrición. *Universidad y Sociedad*, 13(3), 297-302.
- Sánchez, A. (2020). Efecto de diferentes fertilizantes comerciales en el crecimiento y porcentaje de nitrógeno en dos especies de microalgas. *EAFIT*, 15, 30-38.
- Sathasivam, R. & Juntawong, N. (2013). Medio modificado para mejorar el crecimiento de las cepas de *Dunaliella* sp., 67-73.

- Sathasivam, R., Radhakrishnan, N., Hashem, A. & Allah, E. (2019). Microalgae metabolites: a rich source for food and medicine. *Saudi J Biol Sci.*, 26(4), 709-722.
- Schaller J, Weiske, A., Mkandawire, M. & E. Gert (2010). Invertebrates control metals and arsenic sequestration as ecosystem engineers. *Chemosphere*, 79, 169-173.
- Shahid, A., Malik, S., Zhu, H., Xu, J., Nawaz, M. Z., Nawaz, S., Alam, M. A. & Mehmood, M. A. (2020). Cultivating microalgae in wastewater for biomass production, pollutant removal, and atmospheric carbon mitigation; a review. *Science of the Total Environment*.
- Shaked, Y., Xu, Y., Leblanc, K. & Morel, F. (2006). Zinc availability and alkaline phosphatase activity in *Emiliania huxleyi*: implications for Zn-P co-limitation in the ocean. *Limnol. Oceanogr.*, 51, 299-309.
- Silva, A. M. (2016). Evaluación de fertilizantes agrícolas en la productividad de la microalga *Chlorella sorokiniana*. *Agronomía Mesoamericana*, 27(2), 265.
- Simental, J. A. (1999). *Producción masiva de diatomeas bentónicas empleando fertilizantes agrícolas y su efecto en la calidad de biomasa y en la composición proximal*. Ensenada Baja California, México, 115 pp.
- Simental, J. & Saavedra, M. (2002). El efecto de los fertilizantes agrícolas en la tasa de crecimiento de las diatomeas bentónicas. *Science*, 62 pp.
- Tegeder, M. & Ward, J. (2014). Molecular evolution of plant AAP and LHT amino acid transporters. *Evol. Transporters Plants*, 3, 84.
- Torres, R. M. (2016). *Evaluación de VIUSID-Agro en la producción de Jitomate (Lycopersicon esculentum)*. ISSN.10:40:62.
- Verlag, S. (1982). Nitrate Uptake and Assimilation in *Thalassiosira weissflogii* and *Phaeodactylum tricornutum*: Interactions with Photosynthesis and with the Uptake of Other Ions. *Marine Biology*, 69, 21-30.
- Wua, Y., Zeng, A., Jianan, Y., Qub, Y. & Xiong, W. (2012). Mercury effects on *Thalassiosira weissflogii*: Applications of two-photon excitation chlorophyll fluorescence lifetime imaging and flow cytometry. *Aquatic Toxicology*, 133-140.
- Yizhong, Y. & Liu, H. (2018). Enhancing Carbohydrate Productivity of *Chlorella* sp. AE10 in Semi-continuous Cultivation and Unraveling the Mechanism by Flow Cytometry. *Appl Biochem Biotechnol.*, 185(2), 419-433.