

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE AGRONOMÍA

MEMORIA DE TÍTULO

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS PRINCIPALES
MICROALGAS PRESENTES EN EL SISTEMA HIDROPÓNICO DEL
TIPO RAÍZ FLOTANTE.**

SCARLETT ORIETTA CÁCERES ARAVENA

SANTIAGO - CHILE

2009

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE AGRONOMÍA

MEMORIA DE TÍTULO

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS PRINCIPALES
MICROALGAS PRESENTES EN EL SISTEMA HIDROPÓNICO DEL
TIPO RAÍZ FLOTANTE.**

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF MAIN MICROALGAE
LIVING IN THE HIDROPONIC SYSTEM.**

SCARLETT ORIETTA CÁCERES ARAVENA

SANTIAGO - CHILE

2009

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS PRINCIPALES
MICROALGAS PRESENTES EN EL SISTEMA HIDROPÓNICO DEL TIPO
RAÍZ FLOTANTE.

Memoria para optar al Título
Profesional de Ingeniero Agrónomo
Mención: Fitotecnia

Scarlett Orietta Cáceres Aravena

PROFESORES GUÍAS	Calificaciones
Sra. María Luisa Tapia F. Ingeniero Agrónomo, M. Sc.	6,5
Sr. Alejandro Riquelme E. Bioquímico.	6,5
PROFESORES EVALUADORES	
Sra. Myrna Johnston B. Prof. Biología y Cs., M. Sc.	6,3
Sra. María de la Luz Hurtado. Ingeniero Agrónomo, M. Sc.	6,7
COLABORADOR	
Sra. Ana Maria Mora Tapia Prof. Biología y Cs., M. Sc.	

Santiago, Chile. 2009

AGRADECIMIENTOS

*“La utopía está en el horizonte.
Camino dos pasos, ella se aleja dos pasos
y el horizonte se corre diez pasos más allá.
¿Entonces para que sirve la utopía?
Para eso, sirve para caminar”*

Un agradecimiento profundo a mis padres Luis y Juany, son ustedes quienes han sabido de mis frustraciones, alegrías y satisfacciones en todo este tiempo. Gracias por su apoyo incondicional. A ustedes dedico este trabajo.

Agradezco a mis profesores Alejandro y María Luisa. Ellos hicieron de este estudio un gran desafío, sin duda creo haber estado a la altura de lo planteado. Gracias por la confianza y aprecio.

Agradezco también a la profesora Ana María. Su apoyo y colaboración al inicio de este estudio fueron fundamentales para defender con propiedad lo cuestionable de este trabajo.

Finalmente a los amigos, gente maravillosa que he conocido en estos años. Gracias por la amistad y el cariño de cada uno de ustedes.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
Taxonomía de las algas	5
Clasificación y caracterización de las microalgas	6
Características del crecimiento microalgal	7
Caracterización bioquímica	8
Microalgas: Utilización y problemática	10
MATERIALES Y MÉTODOS	13
Lugar de estudio	13
Materiales	13
Metodología	15
Evaluaciones	19
Análisis estadístico	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
Condiciones ambientales del ensayo	23
Identificación taxonómica	23
Caracterización morfológica	25
Crecimiento celular en función del tiempo	28
Contenido de clorofila <i>a</i> y <i>total</i>	31
Clorofila <i>a</i>	31
Clorofila total	33
Contenido de proteína total	36
CONCLUSIONES	40
BIBLIOGRAFÍA	41
GLOSARIO	48
APÉNDICE I	49
APÉNDICE II	50

APENDICE III	51
ANEXO I	52
ANEXO II	56
ANEXO III	57

RESUMEN

El aislamiento y caracterización de las principales microalgas, en el sistema hidropónico del tipo raíz flotante fue el objetivo del presente estudio.

Estas microalgas fueron cultivadas bajo condiciones de luz y temperatura controladas. Para suministrar la luz en forma continua, se utilizaron lámparas fluorescentes del tipo luz fría cuya intensidad de radiación fotosintéticamente activa (PAR) fue de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Luego del aislamiento microalgal las cepas se inocularon en tubos con 5 mL de medio nutritivo Hoagland II-modificado (Arnon y Hoagland 1950). Las evaluaciones se realizaron cada dos días desde la inoculación del medio nutritivo hasta cumplir quince días de cultivo. De las muestras extraídas desde el sistema hidropónico se aislaron e identificaron tres cepas pertenecientes a los géneros: *Chlamydomonas*, *Chlorella* y *Monoraphidium* correspondientes a la división Chlorophyta.

El crecimiento poblacional se determinó mediante recuento celular con cámara de Neubauer de 0,100 mm de profundidad y un microscopio triocular con aumento 40X. El contenido de clorofila y proteína se determinó mediante espectrofotometría.

Luego del recuento celular, en cada género aislado se determinó la tasa de crecimiento poblacional, divisiones por días y tiempo generacional durante la fase exponencial.

La densidad celular, contenido de clorofila *a* y clorofila total que presentó el género *Monoraphidium* fue superior a los géneros *Chlamydomonas* y *Chlorella*.

El contenido de proteínas totales que presentó el género *Chlamydomonas* fue mayor a los géneros *Chlorella* y *Monoraphidium*.

De acuerdo a los resultados se puede concluir que las microalgas aisladas desde el sistema hidropónico del tipo raíz flotante pertenecen a la división Chlorophyta y que fueron las que se presentaron en forma preponderante y bajo el medio Hoagland-II modificado son capaces de desarrollarse.

Palabras claves: Microalgas, Chlorophyta, Densidad celular, Clorofila, Proteínas

ABSTRACT

The main microalgae in the root floating-type hydroponic system were isolated and characterized in the present study.

These microalgae were grown under given light and temperature controlled conditions. To provide light uninterruptedly, cool daylight fluorescent lamps with photosynthetically active radiation intensity (PAR) of $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ were used.

After microalgal isolation, the strains were inoculated in tubes with 5 mL of the modified Hoagland-II (Arnon and Hoagland 1950) nutrient medium. Evaluations were conducted every two days since inoculation of the nutrient medium until reaching 15 days. From the samples withdrawn from the hydroponic system, three strains were isolated and identified. They belonged to the *Chlamydomonas*, *Chlorella* and *Monoraphidium* genera of the Chlorophyta division.

Population growth was determined by cell count with a Neubauer counting chamber of 0,100 mm of cell depth and with a three-ocular microscope with 40X magnification. The chlorophyll and protein content was determined by spectrophotometry.

After cell count, population growth rate, cell divisions per day and generational time during the exponential phase were determined.

Cell density, chlorophyll a and total chlorophyll content shown by the *Monoraphidium* genus were greater than those of *Chlamydomonas* and *Chlorella* genera.

The total protein content shown by *Chlamydomonas* was greater than that of *Chlorella* and *Monoraphidium*.

According to the results, it can be concluded that the microalgae isolated from the floating-type hydroponic system belonged to the Chlorophyta division and were those that occurred predominantly, being able to develop under the Hoagland-II modified medium.

Key words: Microalgae, Chlorophyta, Cell density, Chlorophyll, Proteins

INTRODUCCIÓN

Taxonomía de las algas

La clasificación de las algas como parte del reino vegetal, ha presentado variadas modificaciones a través del tiempo. Hace 200 años se denominaban “algas” al conjunto de plantas, musgos, hongos y helechos, basándose en su carácter sexual. Posteriormente este término se delimitó en base a rasgos microscópicos y coloración, para luego incorporar las formas flageladas pigmentadas al sistema de clasificación (Parra y Bicudo 1996; Acleto y Zúñiga 1998).

Las algas presentan mayor diversidad vegetativa, reproductiva y de hábitat en relación a los otros grupos de plantas. Su clasificación está determinada por ciertos caracteres estables como: naturaleza de los pigmentos fotosintéticos, productos metabólicos de reserva, naturaleza química de la pared celular, número y posición de los flagelos, tipos de reproducción, ciclo de vida y hábitat. La combinación de varios caracteres delimita las divisiones y clases de las algas, pero estas clasificaciones tienen un carácter subjetivo y temporal, según el énfasis que da cada investigador a un carácter en particular (Acleto y Zúñiga 1998).

Mediante el estudio de secuencias del ARN y ADN, así como estudios bioquímicos y fisiológicos se han establecido relaciones filogenéticas dentro de las distintas clases de algas (Pérasso *et al.*, 1990; Volker *et al.*, 1999)

Según Uribe (1994), Álvarez (1994), Alveal *et al.* (1995), Parra y Bicudo (1996), Acleto y Zúñiga (1998) y Parra (2006) el término “alga”, carece de significado taxonómico y no corresponde a ninguna categoría nomenclatural, es decir, sólo es un término colectivo para

un grupo heterogéneo de individuos. A su vez, el término “microalga” hace referencia a un grupo de individuos microscópicos diferenciándose así de las “macroalgas”.

Clasificación y caracterización de las microalgas

De acuerdo al sistema de clasificación propuesto por Parra y Bicudo (1996), la división Chlorophyta está representada por 15 órdenes, los cuales son agrupados según sus características morfológicas en: a) Formas unicelulares y coloniales, b) Formas filamentosas unicelulares y c) Formas multinucleadas.

Parra y Bicudo (1996) establecen un sistema de clasificación (Cuadro 1) para las formas unicelulares y coloniales a las cuales pertenecen los órdenes Chlorococcales y Volvocales:

Cuadro 1. Clasificación para las formas unicelulares y coloniales para Órdenes Chlorococcales y Volvocales.

División	Chlorophyta	Chlorophyta	Chlorophyta
Clase	Chlorophyceae	Chlorophyceae	Chlorophyceae
Orden	Chlorococcales	Chlorococcales	Volvocales
Familia	Oocystaceae	Oocystaceae	Chlamydomonadaceae
Género	<i>Chlorella</i>	<i>Monoraphidium</i>	<i>Chlamydomonas</i>

Fuente: Parra y Bicudo 1996

De acuerdo a las características morfológicas de cada clasificación nomenclatural se pueden describir en detalle a los organismos pertenecientes a distintas familias:

Familia Oocystaceae: Presentan células de morfología variada; esférica, elipsoidal, fusiforme, acicular, ovoide entre otras. El cloroplasto es único y parietal ocupando alrededor de 2/3 de la periferia celular, un pirenoide, células aisladas que permanecen unidas sólo por la gelatinización de la pared celular materna. La reproducción es asexual formando 2 a 16 autosporas que son liberadas mediante la ruptura de la pared celular

materna (Acleto y Zúñiga 1998; Rifon-Lastra *et al.*, 2001). El género *Chlorella* contiene alrededor de 33 especies descritas (Guiry y Guiry 2007), cuyo tamaño varía de 2 a 12 μm de forma esférica o elipsoidal (Van den Hoek *et al.*, 1995). El género *Monoraphidium* está representado por alrededor de 78 especies de forma elipsoidal (Acleto y Zúñiga 1998; Guiry y Guiry 2007).

Familia Chlamydomonadaceae: Algas unicelulares generalmente biflageladas, esféricas u ovoides; flagelos isomórficos con dos células contráctiles en la base, un solo cloroplasto en forma de copa que en la parte basal contiene un pirenoide y en la parte apical un estigma. Presenta estado palmeliode, que se produce cuando entra en la fase inmóvil de su ciclo (Parra y Bicudo 1996;ACLETO Y ZÚÑIGA 1998). En el género *Chlamydomonas* están descritas 369 especies (Guiry y Guiry 2007), que presentan una fase de reproducción por división celular longitudinal como también reproducción sexual bajo ciertas condiciones ambientales (Acleto y Zúñiga 1998).

Características del crecimiento microalgal

Según una serie de investigadores (Uribe 1994; Álvarez 1994; Alveal *et al.* 1995 y González 2000) la curva de crecimiento celular está compuesta por cinco fases, las que se definen por el número de células presentes en un tiempo determinado y por las condiciones generales del cultivo: a) Fase de ajuste (las microalgas se adaptan a las nuevas condiciones de cultivo); b) Fase exponencial (la división celular se incrementa en función del tiempo, debido a la asimilación de nutrientes desde el medio y a su activo proceso de reproducción); c) Fase de retardo (la tasa de crecimiento se reduce, por lo que el tiempo para duplicar la población aumenta); d) Fase estacionaria (el factor limitante y la tasa de crecimiento están equilibrados, las densidades celulares se mantienen relativamente constantes) y e) Fase de declinación (la tasa de crecimiento es superada por la tasa de mortalidad de la población)

El crecimiento de una población microalgal depende de la interacción de factores ambientales (temperatura, radiación fotosintéticamente activa (PAR), pH y nutrición mineral entre otros); los cuales inciden en la composición bioquímica. Por lo tanto, el manejo de estos factores permite la obtención selectiva de principios activos (Uribe, 1994; Bermúdez *et al.*, 2002; Mora *et al.*, 2005).

Caracterización bioquímica de las microalgas

Las microalgas constituyen un grupo de microorganismos capaces de producir diferentes compuestos de importancia nutricional, farmacéutica o industrial, bajo adecuadas condiciones de cultivo. Entre estos compuestos se destacan clorofilas y carotenoides cuya síntesis puede ser incrementada mediante la manipulación de diversos parámetros ambientales (Ortega *et al.*, 2006). La proteína microalgal se utiliza como suplemento alimenticio por su fácil producción y potencial nutritivo (Romero y Hernández 2002)

Contenido de clorofila *a*: El contenido de clorofila *a* es utilizado a nivel de laboratorio y a escala productiva para estimar en forma indirecta la biomasa o densidad de las comunidades fitoplanctónicas tanto marinas como dulceacuícolas, debido a que es el principal pigmento fotosintético presente en las microalgas (Gregor y Marsálek 2004; Rivera 2005).

El contenido de clorofila *a* se utiliza en el estudio de sistemas acuáticos como embalses, cuencas hidrográficas, océanos y cursos de agua, como indicador del grado de contaminación. Este parámetro es un importante indicador del estado fisiológico del fitoplancton. (Pinto *et al.*, 2001).

Contenido de clorofila total: También el contenido de clorofila total es considerado un índice de productividad biológica ya que permite cuantificar el crecimiento de un organismo fotoautótrofo (Duthit *et al.*, 2007). Serpa y Calderón 2006, estudiando el efecto

de diferentes fuentes de nitrógeno en el contenido de carotenoides y clorofila en *Dunaliella salina*, informaron que el contenido de clorofila total se correlaciona positivamente con la densidad o biomasa celular, sin embargo, algunos organismos como *Chlamydomonas nivalis* bajo condiciones de estrés radiativo como por ejemplo: $5 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ó $1600 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, acumulan otros pigmentos que enmascaran la presencia de clorofila en las células, (Gorton *et al.*, 2001).

Mora *et al.* (2005) reportan que las microalgas expresan mayor eficiencia fotosintética a bajas intensidades lumínicas ($50\text{-}200 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$; PAR), incrementando así su concentración de clorofila.

Contenido de proteína total: Los componentes orgánicos principales de la biomasa microalgal son las proteínas, lípidos y carbohidratos los que varían, dentro de una misma especie, según las condiciones de nutrición, radiación PAR y temperatura a las que se somete el cultivo (Morris y Moran 2002; López-Elías *et al.*, 2004).

El alto contenido proteico de las microalgas y su calidad (adecuado balance de aminoácidos y bajos valores de ácidos nucleicos en comparación con otras fuentes de proteínas), hacen factible que sean consideradas una alternativa o suplemento alimenticio tanto para la nutrición humana como animal (Morris *et al.*, 1999; Morris y Moran 2002; Romero y Hernández 2002).

Según Jonte *et al.* (2006), la producción de proteína a partir de microalgas depende fundamentalmente de los niveles nutricionales y de PAR del cultivo. Para que exista una asimilación eficiente de nitrógeno, es necesaria la participación de moléculas energéticas provenientes de la fotosíntesis para el transporte activo del nitrógeno.

A nivel comercial *Chlorella* y *Chlamydomonas* son citadas como géneros empleados para la producción de proteínas y algunos aminoácidos específicos como triptófano, lisina y leucina (Uribe 1994; Morris y Moran 2002; Andrade *et al.*, 2006).

Microalgas: Utilización y problemática

Varios autores han planteado la necesidad de dilucidar diversos aspectos de la biología de las microalgas, particularmente variabilidad morfológica, plasticidad fisiológica, atributos bioquímicos, entre otros (Alveal *et al.*, 1995; Morris *et al.*, 1999; Quintana *et al.*, 1999; Mora *et al.*, 2005). El conocimiento de la ecofisiología y taxonomía permite evaluar relaciones entre las especies y las condiciones ambientales, establecer vías de aprovechamiento de los recursos microalgales ya sea desde una perspectiva de uso directo como alimentos, o como fuentes de principios activos a nivel comercial.

En Chile actualmente se cultivan 2 tipos de microalgas (*Phaeodactylum tricornutum* y *Nannochloropsis sp*) para alimentación humana, como base para la preparación de pastas y otros alimentos con el objeto de mejorar su perfil de nutrientes (Reboloso *et al.*, 2000).

Los estudios relacionados con la taxonomía de las comunidades fitoplanctónicas datan en Chile desde hace más de un siglo, en ellos se han identificado en parte, las microalgas presentes en cursos de agua en zonas geográficas tan diversas como la Antártica, San Pedro de Atacama, Lago Peñuelas e Isla Juan Fernández (Parra 2006). En general, se puede estimar que entre 90 a 95 % de las microalgas presentes en flujos de agua dulce, pertenecen a la división Chlorophyta (Parra y Bicudo 1996).

Las microalgas son capaces de colonizar diversos ambientes, entre ellos los sistemas hidropónicos de cultivos de diversos tipos y a pesar de los esfuerzos que realizan los productores para disminuir la presencia de microalgas en el sistema de cultivo, ellas prosperan exitosamente. En sistemas hidropónicos “cerrados” (en los cuales la solución nutritiva se recircula), las microalgas son capaces de obstruir los ductos de riego, los emisores y filtros entre otros, limitando de esta forma el abastecimiento de la solución

nutritiva. También, en sistemas hidropónicos del tipo “raíz flotante”, las microalgas proliferan sobre las planchas de poliestireno expandido utilizadas como soporte del cultivo (Vänninen y Koskula 1998; Nonomura *et al.*, 2001; Schwarz y Gross 2004). Esta proliferación dificulta el manejo cultural, incidiendo en los costos de mantención y reposición del sistema (lavado y reemplazo de elementos de sostén y circulación). Por otra parte, el crecimiento de las microalgas en la superficie de las planchas permite la proliferación de insectos nocivos. Finalmente, uno de los mayores impactos en la producción hidropónica consiste en la desvalorización del producto lo que dificulta su comercialización (¹).

No obstante lo anterior, las microalgas resultan ser beneficiosas para el crecimiento de la planta, ya que el oxígeno liberado en la fotosíntesis de las microalgas previene la anaerobiosis en el sistema, secretan reguladores de crecimiento, sustancias antifúngicas y compuestos antibacterianos (Schwarz y Gross 2004).

Los estudios realizados por Schwarz y Gross (2004) determinaron que las principales especies de microalgas asociadas a los sistemas hidropónicos con recirculación de solución nutritiva, son *Chlamydomonas sp* y *Scenedesmus sp*, ambas pertenecientes a la división Chlorophyta.

En Chile, se han realizado una serie de investigaciones con respecto a microalgas marinas y algunas de uso productivo, pero hasta el momento no hay estudios sobre las microalgas en los sistemas hidropónicos de cultivos. En el presente trabajo se han caracterizado las principales microalgas que es posible encontrar en el sistema hidropónico del tipo raíz flotante.

(¹). María Luisa Tapia F. Ingeniero Agrónomo, M.Sc. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile. 2009. "Comunicación personal".

Hipótesis

Las principales microalgas encontradas en el sistema hidropónico del tipo raíz flotante, pertenecen a la división Chlorophyta.

Objetivo General

Aislar y caracterizar las principales microalgas presentes en el sistema hidropónico del tipo raíz flotante.

Objetivos específicos

- Aislar las principales microalgas presentes en el sistema hidropónico del tipo raíz flotante.
- Identificar taxonómicamente hasta el género de las principales microalgas.
- Caracterizar morfológicamente los géneros aislados.
- Determinar el crecimiento celular en función del tiempo de los géneros aislados.
- Determinar el contenido de clorofila a y clorofila total de los géneros aislados.
- Determinar el contenido de proteína total de los géneros aislados.

MATERIALES Y MÉTODO

Lugar de estudio y material algal

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Horticultura e Hidroponía y el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, entre mayo de 2007 a julio de 2008. Se colectaron microalgas desde el sistema hidropónico del tipo raíz flotante existente en la Facultad de Ciencias Agronómicas.

Materiales

- Microalgas presentes en el sistema hidropónico
- Medio nutritivo Hoagland II-modificado (Hoagland y Arnon 1950) (Anexo III)
- 3 lámparas fluorescentes luz día-fría (F40T10RS General Electric, USA)
- Radiómetro (LI-COR 185A, UK).
- Espectrofotómetro (UV-1601 Shimadzu, Japan)
- Termómetro digital (HI 98509 Hanna Instruments, USA)
- Autoclave (Vertil Type HL 341 Huxley, USA)
- Ventilador (TMV 2000, Telstar, USA)
- Agitador (Type 37600 Mixer, Thermolyne, USA)
- Ultrasonido (T 310 Transsonic, Germany)
- Cámara fotográfica digital (CyberShot S730 7,2 Megapíxeles, Japan)
- Centrifuga (Eppendorf, Centrigue 5403, Germany)
- Microscopio (L1200B, Carl Zeiss, Germany)
- Cámara de Neubauer (3H, Neubauer Bright-Line, Germany)
- Tubos Eppendorf 1mL

- 6 Gradillas plásticas
- Placas Petri de vidrio 100 x 20 mm
- Tubos de ensayo de vidrio 18 x 100 mm
- Asa metálica
- Agar (MP Biomedicals, France)
- Gabinete de crecimiento (Figura 1)
- Claves taxonómicas (Parra y Bicudo 1996)

Metodología

El material microalgal se colectó en forma aleatoria desde el sistema hidropónico del tipo raíz flotante ubicado en la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile. El material colectado fue colocado en 300 mL de medio nutritivo estéril usando un matraz de 500 mL el cual se mantuvo durante 48 horas en el gabinete de crecimiento ($24 \pm 1,2$ °C; $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR). Con el objetivo de aislar las microalgas se prepararon placas Petri con medio nutritivo Hoagland II-modificado y ajustando el pH a 5,8. Para el aislamiento de las microalgas se utilizaron dos técnicas:

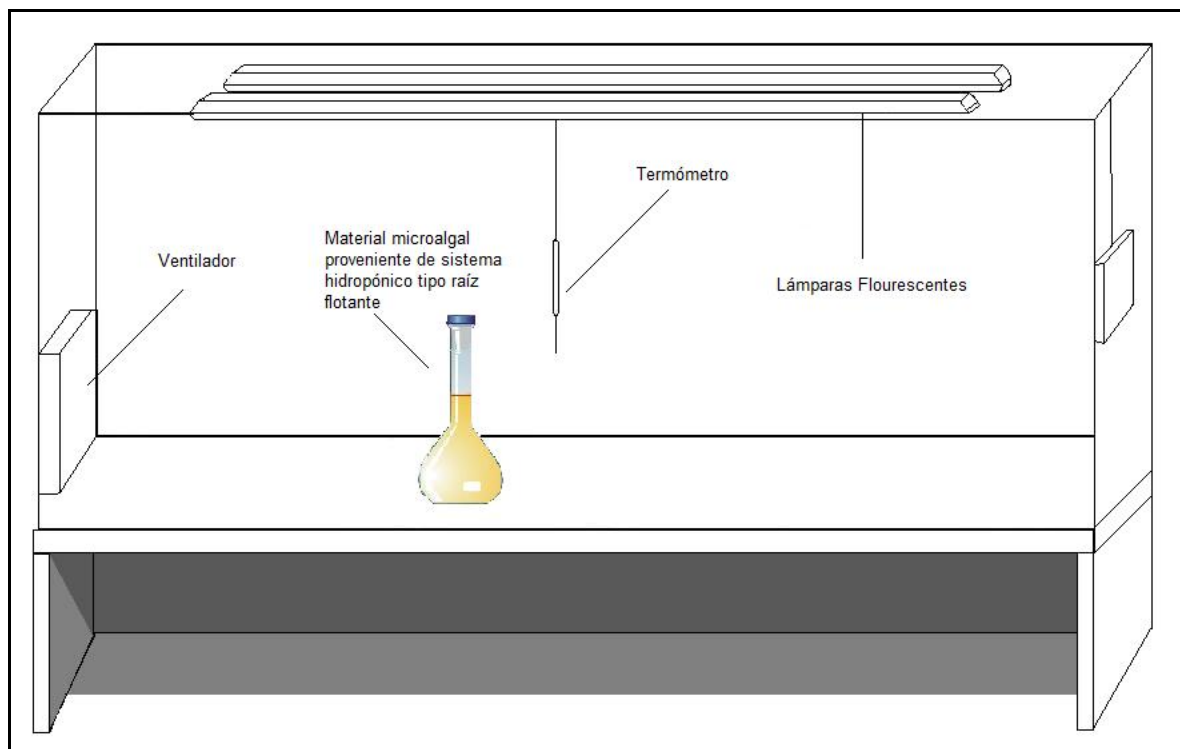


Figura 1. Gabinete de crecimiento utilizado durante el estudio.

Aislamiento por rayado en agar: Primero se realizó una separación preliminar de las microalgas por medio de la técnica del rayado en agar. Para esto se prepararon 30 placas

Petri con medio nutritivo agregando un 1% p/v de agar, hasta completar 2/3 de la placa para luego ser esterilizadas. Una vez terminada la esterilización y posterior enfriado, se colocaron en la periferia dos gotas del material algal original y mediante un asa se rayó en zig-zag sobre la superficie de la placa. Estas placas fueron mantenidas en el gabinete de crecimiento ($24 \pm 1,3 \text{ }^\circ\text{C}$; $40 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ PAR) hasta que se visualizaron las primeras colonias (Figura 2). De estas colonias se seleccionaron aquellas más evidentes y definidas para realizar con éstas un nuevo aislamiento, pero esta vez por la técnica de dilución (Alveal *et al.*, 1995).

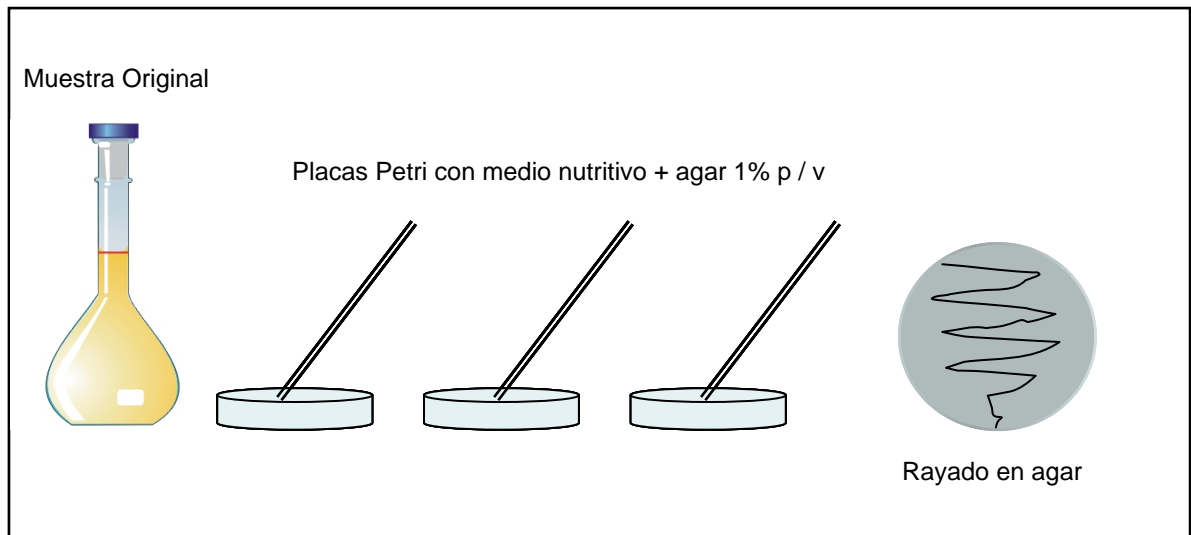


Figura 2. Diagrama procedimiento aislamiento por rayado en agar empleado en el estudio

Aislamiento por dilución: A un tubo de ensayo con 5 mL de medio nutritivo líquido estéril se agregó la colonia extraída de la placa Petri con un asa estéril, agitándolo para obtener una muestra homogénea. De este tubo N°1 se extrajo 1 mL y se agregaron 5 mL medio nutritivo líquido, obteniéndose así el tubo N°2. Este procedimiento de dilución seriada se repitió hasta obtener 4 tubos de ensayo con material microalgal diluido. De cada tubo se prepararon 3 placas Petri con medio nutritivo líquido adicionando un 1% p/v de agar, para realizar un nuevo aislamiento por rayado en agar (Figura 3). De las placas obtenidas se seleccionó la mejor dilución que permite la óptima separación entre las

distintas colonias, para posteriormente proceder a obtener los cultivos unialgales ó cepas. En el presente estudio correspondió a la dilución 1:125.

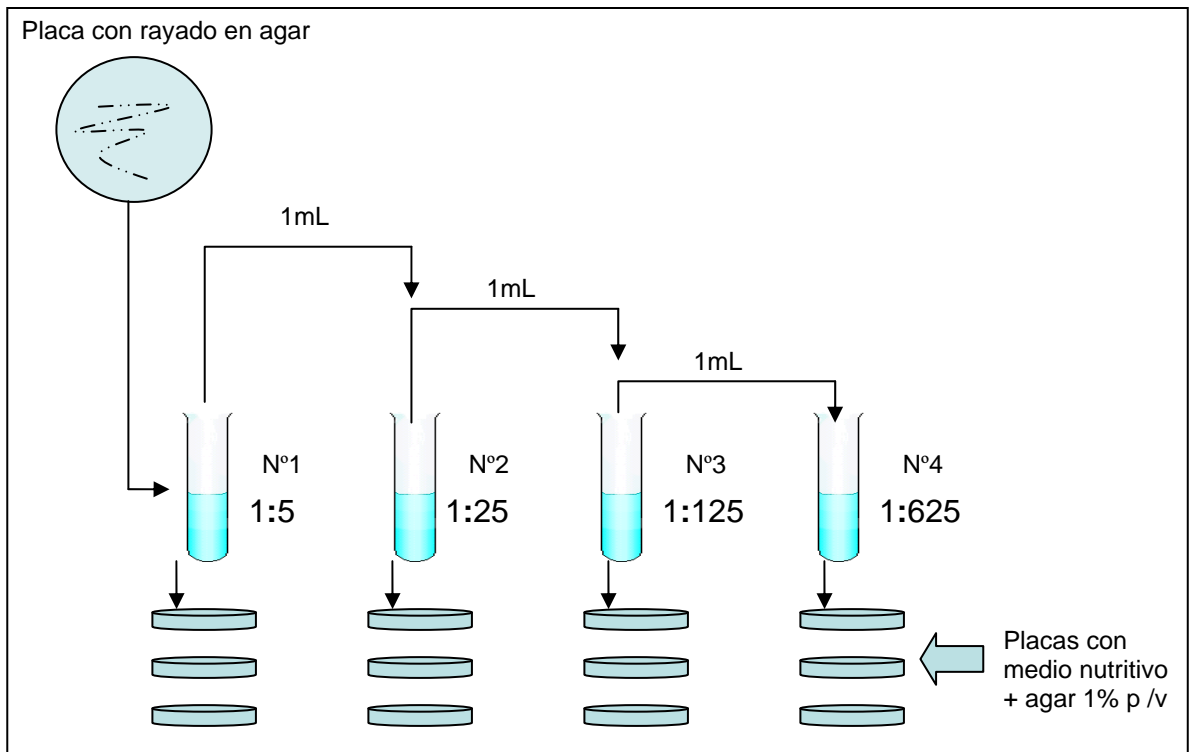


Figura 3. Diagrama procedimiento aislamiento por dilución empleado en el estudio

Establecimiento de unidades microalgales aisladas (cepas): Las tres unidades microalgales ó cepas que fue posible aislar mediante la utilización de las dos técnicas de aislamiento anteriormente descritas, se inocularon con un asa estéril tres tubos de ensayo con 5 mL de medio nutritivo líquido. Estos tubos fueron mantenidos en el gabinete de crecimiento por un día, luego mediante un espectrofotómetro se nivelaron los contenidos de microalgas para que todos los tubos tuvieran una absorbancia de $0,050 \pm 0,003$ a 700 nm (como inóculo inicial) para cada cepa según Pulz y Gross (2004) (Figura 4).

Para cada cepa aislada se calculó tres repeticiones para cada medición que se realizará durante los 15 de incubación, obteniéndose un total 72 tubos de ensayo, los cuales se depositaron en el gabinete de crecimiento (Figura 5).

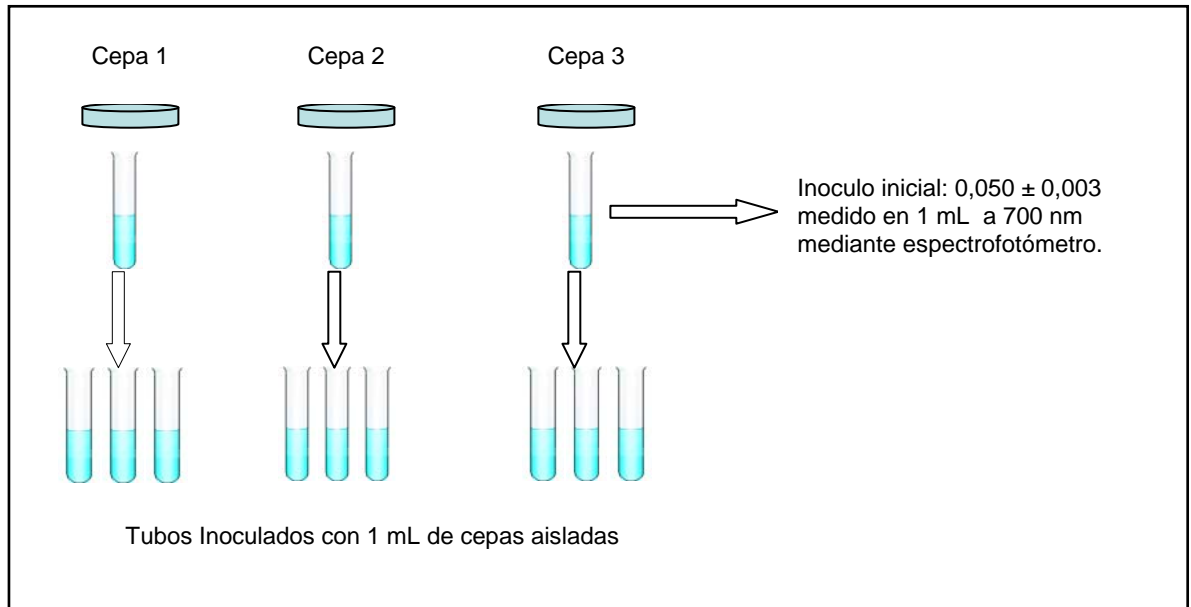


Figura 4. Establecimiento de las cepas aisladas durante el estudio

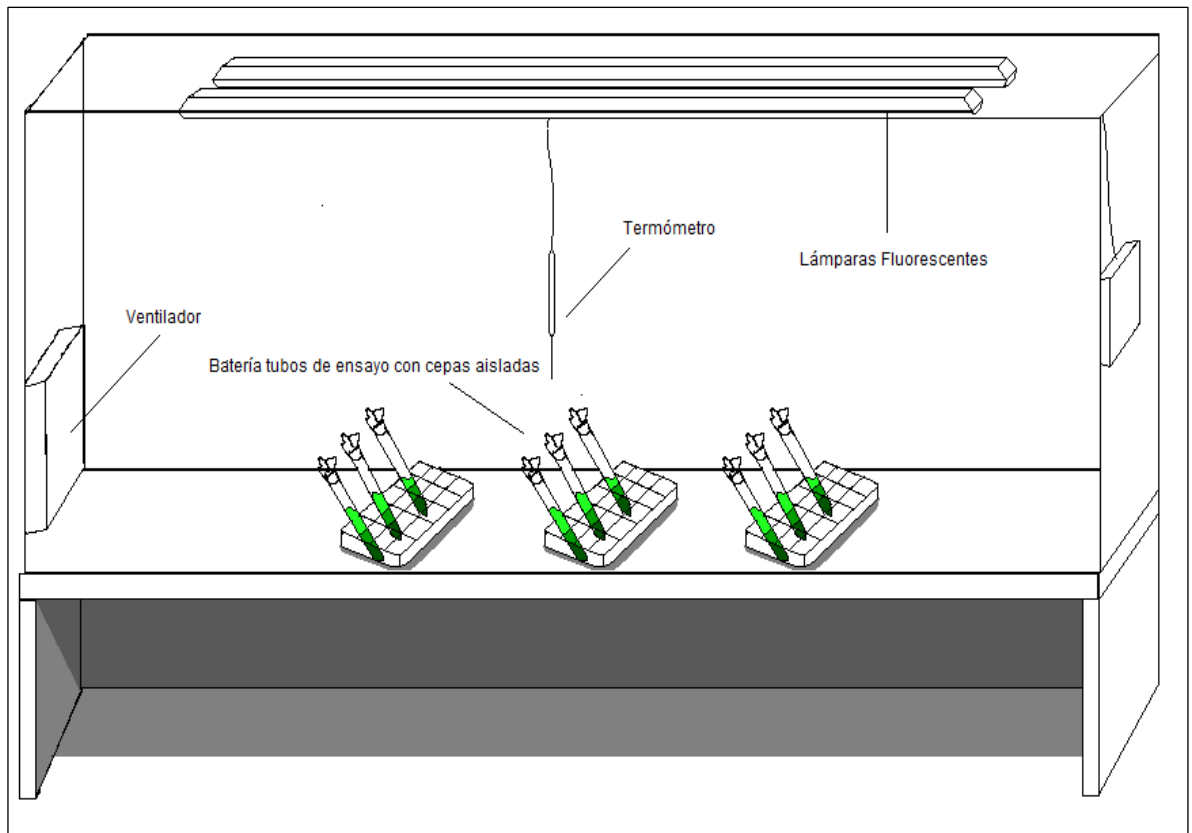


Figura 5. Diagrama gabinete de crecimiento y montaje de cepas microalgales aisladas.

Identificación y caracterización de las cepas aisladas: Mediante microscopio triocular con aumento de 100X y aceite de inmersión se tomaron fotografías para ser identificadas utilizando claves taxonómicas según Parra y Bicudo (1996) contando con la colaboración de la Ficóloga Ana María Mora.

Evaluaciones

Las cepas aisladas fueron evaluadas a los 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15 días de cultivo. Para las evaluaciones se utilizaron de cada repetición de las cepas 1 mL para el recuento celular, 1 mL para el contenido de clorofilas y 1 mL para el contenido de proteína total.

Recuento celular

Para el recuento celular se utilizó una cámara de Neubauer de 0,100 mm de profundidad y microscopio triocular con aumento de 40X. El número de células se calculó de acuerdo a la ecuación publicada por Álvarez (1994) para ser transformado en número de células·mL⁻¹

La tasa específica de crecimiento poblacional (μ), divisiones por día (Div·d⁻¹) y tiempo de generación (TG) se calcularon en la fase exponencial de acuerdo a lo publicado por Reynolds (1984)

$$\text{Número de células} \cdot \text{mL}^{-1} = \frac{\sum \text{cuatro cuadrantes de cámara Neubauer}}{4} * 10.000$$

$$\text{Tasa de crecimiento } \mu = \ln(N_f/N_o) / (T_f - T_o) \text{ (días}^{-1}\text{)}$$

$$\text{Divisiones por día Div} \cdot \text{d}^{-1} = \mu / \ln(2)$$

$$\text{Tiempo de generación TG} = 1 / (\text{Div} \cdot \text{d}^{-1})$$

Siendo: μ (tasa de crecimiento); ln (logaritmo natural); Nf (densidad celular en Tf); No (densidad celular en To); To (tiempo inicial) y Tf (tiempo final).

Determinación de la densidad celular

La densidad celular se estimó mediante mediciones de absorbancia a 700 nm con un espectrofotómetro (Pulz y Gross 2004). Empleando una batería de tubos de 1ml con distinta concentración de microalgas se determinó la relación entre nivel de absorbancia a 700 nm y el recuento celular realizado con la cámara de Neubauer. Con la relación obtenida fue posible estimar la densidad de las tres cepas durante el tiempo del estudio.

Determinación del contenido de clorofilas

El contenido de clorofilas (Cl *a*, Cl *b* y Cl total) se determinó en 1 mL de cada repetición por cepa. Cada mL fue colocado en un tubo Eppendorf y centrifugado a 5000xg durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y al precipitado se agregó 500 µL de etanol al 80%, para luego colocarlo dentro de un baño de ultrasonido durante 10 minutos, para romper las membranas celulares, después se volvió a centrifugar a 5000xg durante 10 minutos. Al sobrenadante obtenido se midió la absorbancia a 663 y 645 nm usando un espectrofotómetro. El contenido de clorofilas se calculó de acuerdo a las ecuaciones publicadas por Arnon (1958) expresándose en mg·mL

$$Cl\ a\ (mg \cdot mL^{-1}) = 12,7 \times A_{663} - 2,69 \times A_{645}$$

$$Cl\ total\ (mg \cdot mL^{-1}) = 8,02 \times A_{663} - 20,21 \times A_{645}$$

Determinación del contenido de proteína total

El contenido de proteína total se determinó en 1mL de cada repetición por cepa aislada. Cada mL fue colocado en un tubo Eppendorf y se centrifugó a 3000xg durante 15 minutos. El sobrenadante se eliminó y al precipitado se agregó 200 µL del buffer de lisis, luego se homogeneizó por agitación vigorosa durante 30 segundos. Después se volvió a centrifugar, pero esta vez a 10.000xg durante 3 minutos. Del sobrenadante se extrajo 20 µL a los que se agregaron 780 µL de agua destilada y 200 µL de reactivo de Bradford (Bradford 1976). Luego se midió la absorbancia a 595 nm con un espectrofotómetro.

El contenido de proteínas se estimó usando una curva estándar realizada con seroalbúmina bovina (BSA), para finalmente transformar los valores en $\mu\text{g/mL}$.

Análisis estadístico

Se realizó un muestreo aleatorio simple en el sistema hidropónico, la unidad experimental correspondió a la cepa aislada con tres repeticiones.

Para evaluar las distintas unidades microalgales que fue posible aislar, se construyeron curvas de evolución en el tiempo y éstas se compararon entre sí.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Condiciones ambientales del ensayo

Durante los 15 días que duró el estudio de las cepas aisladas, la radiación (PAR) fue de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con luz continua. Los promedios de temperatura ambiente mínima y máxima fueron de $17,5 \pm 1,3 \text{ }^\circ\text{C}$ y $22,8 \pm 1,2 \text{ }^\circ\text{C}$ respectivamente (Apéndice I). De acuerdo a la información disponible, las condiciones del ensayo fueron apropiadas para obtener un buen crecimiento y desarrollo de las unidades microalgales (FAO 2006).

Identificación taxonómica

Del material microalgal colectado desde el sistema hidropónico, se observaron distintos tipos de microalgas pertenecientes a las divisiones Euglenophyta, Cyanophyta y Chlorophyta. Mediante la observación microscópica fue posible identificar los representantes por cada división mencionada. De la división Chlorophyta se observaron 8 representantes, de la división Euglenophyta se encontraron 2 representantes y de la división Cyanophyta vieron 2 representantes.

De la división mayoritaria, Chlorophyta, con la asesoría de la Ficóloga Ana María Mora se identificaron cuatro géneros: *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Monoraphidium* y *Klebsormidium*. De estos, se lograron aislar los tres primeros, clasificándose según las claves taxonómicas de Parra y Bicudo (1996).

Ejemplo de sistema hidropónico del tipo raíz flotante, ataque de microalgas a nivel radical y algunas microalgas encontradas durante el estudio se observan en las Figuras 6 y 7.



Figura 6. Sistema hidropónico del tipo raíz flotante (A) y ataque de microalgas a nivel radical (B) Fuente: Fotografías del autor

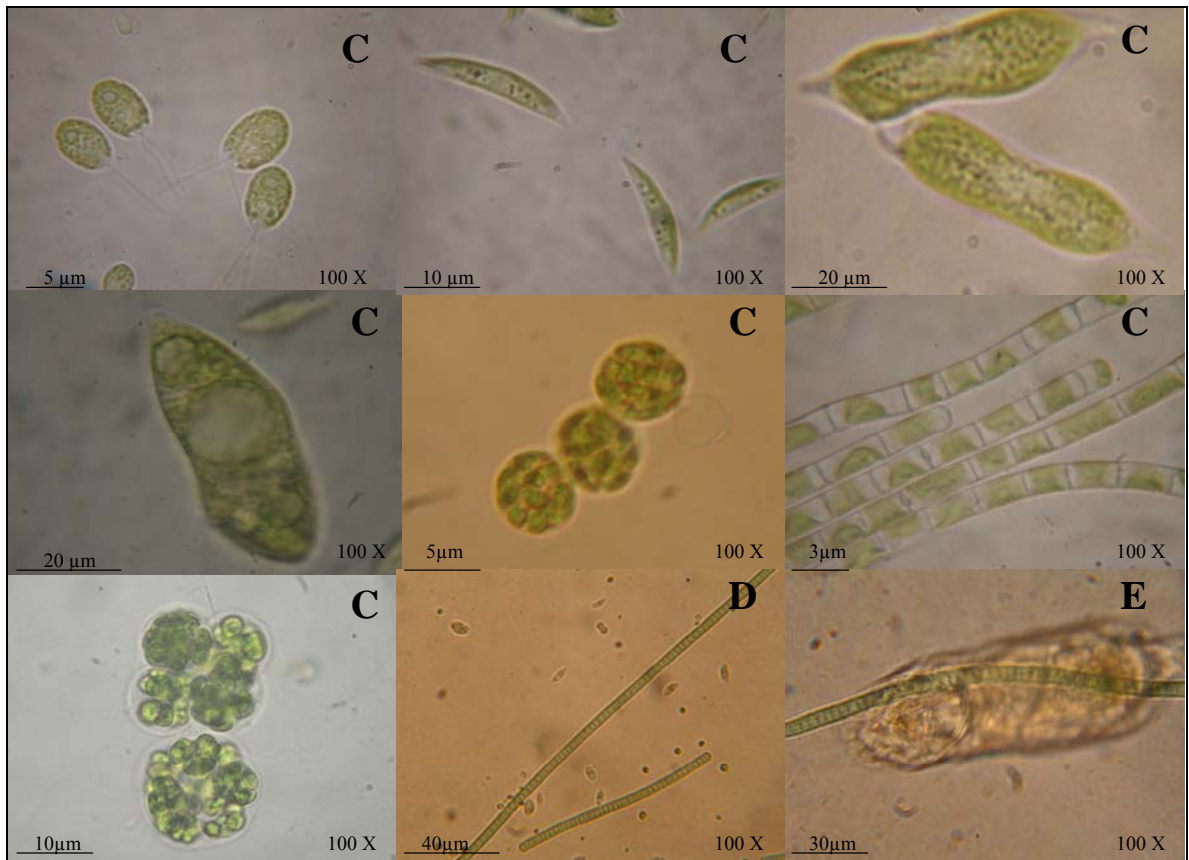


Figura 7. Algunas microalgas encontradas en el sistema hidropónico del tipo raíz flotante en el estudio. División Chlorophyta (C) División Cyanophyta (D) y División Euglenophyta (E). Fuente: Fotografías del autor

Según Parra y Bicudo (1996) las microalgas se clasifican de acuerdo a caracteres establecidos como naturaleza de los pigmentos fotosintéticos, presencia y número de

flagelos, metabolitos de reserva entre otros, para dar lugar a divisiones y clases según el énfasis que los investigadores le otorgan a estos caracteres (Anexo I y II).

La clasificación taxonómica según Parra y Bicudo (1996) para las microalgas reconocidas durante el estudio se presenta a continuación:

División	Chlorophyta	Chlorophyta	Chlorophyta	Cyanophyta	Euglenophyta
Clase	Chlorophyceae	Chlorophyceae	Chlorophyceae	Cyanophyceae	Euglenophyceae
Orden	Chlorococcales	Chlorococcales	Volvocales	Nostocales	Euglenales
Familia	Oocystaceae	Oocystaceae	Chlamydomonadaceae	Sin identificar	Sin identificar
Género	<i>Chlorella</i>	<i>Monoraphidium</i>	<i>Chlamydomonas</i>	Sin identificar	Sin identificar

Caracterización morfológica

Los géneros aislados se identificaron de acuerdo a sus características morfológicas distintivas. *Chlamydomonas* fue el primer género clasificado, sus flagelos y estigma permitieron su rápida identificación. El segundo que se identificó correspondió a *Chlorella* su forma, tamaño y coloración dada por el único cloroplasto que posee permitieron su reconocimiento. Por último, el tercer género fue motivo de discusión respecto a su identificación y clasificación ya que las características morfológicas coincidían con los géneros: *Scenedesmus*, *Selenastrum* y *Monoraphidium*. Por esto que se solicitó la colaboración de la Red Venezolana de Investigación en Microalgas (RedVIM), la cual identificó la cepa aislada como *Monoraphidium* ⁽²⁾ siendo esta información corroborada por las claves taxonómicas de Parra y Bicudo (1996).

⁽²⁾. Jorge Zegarra. Biotecnología en microalgas. Red Venezolana de Investigación en Microalgas (RedVIM). 2008. "Comunicación personal".

Descripción del género *Chlamydomonas*: Células biflageladas, forma ovoide, unicelulares, se reconocen estigma, pirenoide, cloroplasto, núcleo, células contráctiles y flagelos. Las estructuras celulares reconocidas se comparan con el diagrama presentado por Van den Hoek *et al.* (1995) (Figura 8).

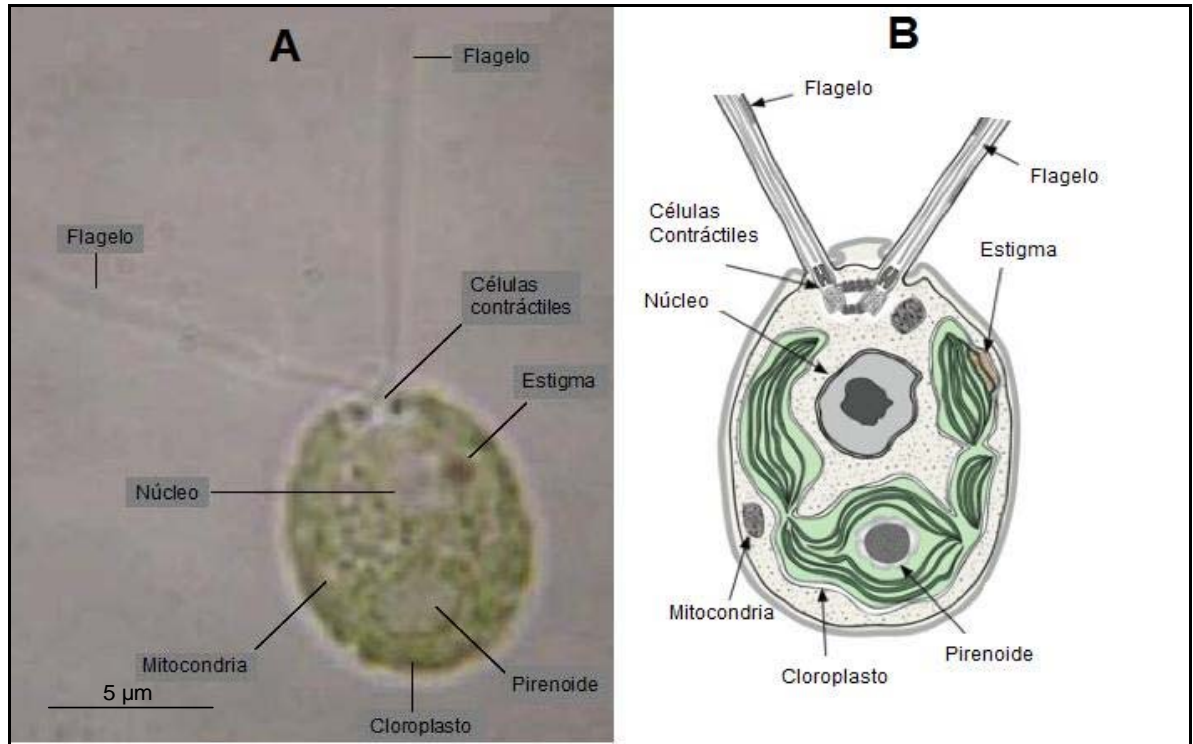


Figura 8. Estructuras celulares reconocidas para el género *Chlamydomonas* (A) 100X (Fotografía del autor) y diagrama presentado por Van den Hoek *et al.* (1995) (B).

Descripción del género *Chlorella*: Células esféricas, de coloración verde, se reconocen pirenoides, cloroplastos, envoltura gelatinosa y autosporas. En la Figura 9 se observan las similitudes morfológicas entre las microalgas aisladas en el estudio y las microalgas pertenecientes al Catálogo de microalgas de la Universidad de Sevilla, España (2009).

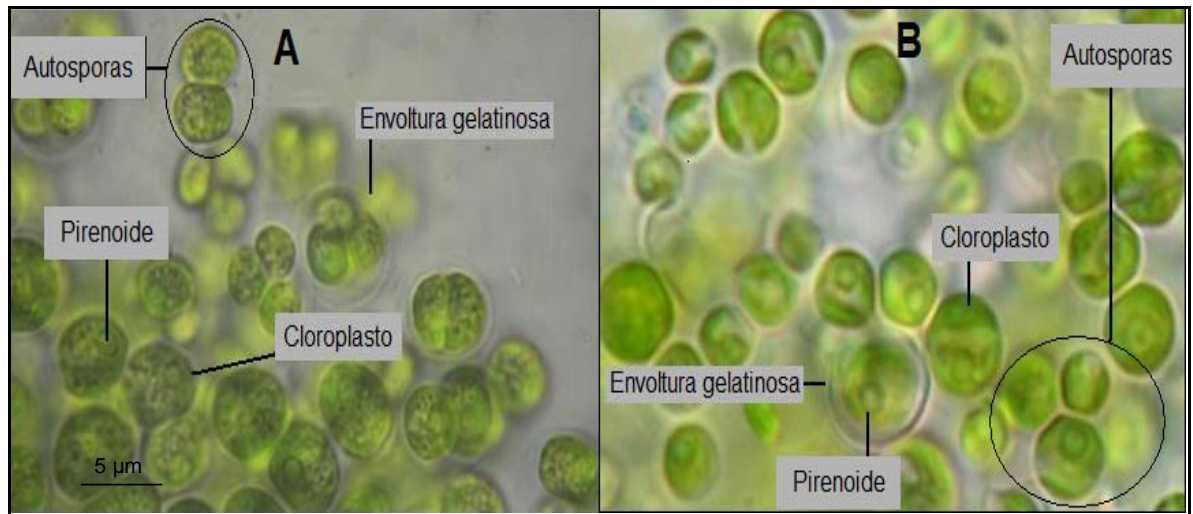


Figura 9. Similitudes morfológicas del género *Chlorella* entre microalgas aisladas (A) 100X (Fotografía del autor) y Catálogo de microalgas de la Universidad de Sevilla, España (B). Fuente: Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Universidad de Sevilla 2009.

Descripción del género *Monoraphidium*: Consta de células fusiformes, de color verde, se reconocen cloroplastos, formas unicelulares y autosporas. En la Figura 10 se observan las similitudes morfológicas entre las microalgas aisladas en este estudio y las microalgas pertenecientes al Catálogo microalgas de la Universidad de Sevilla, España (2009).

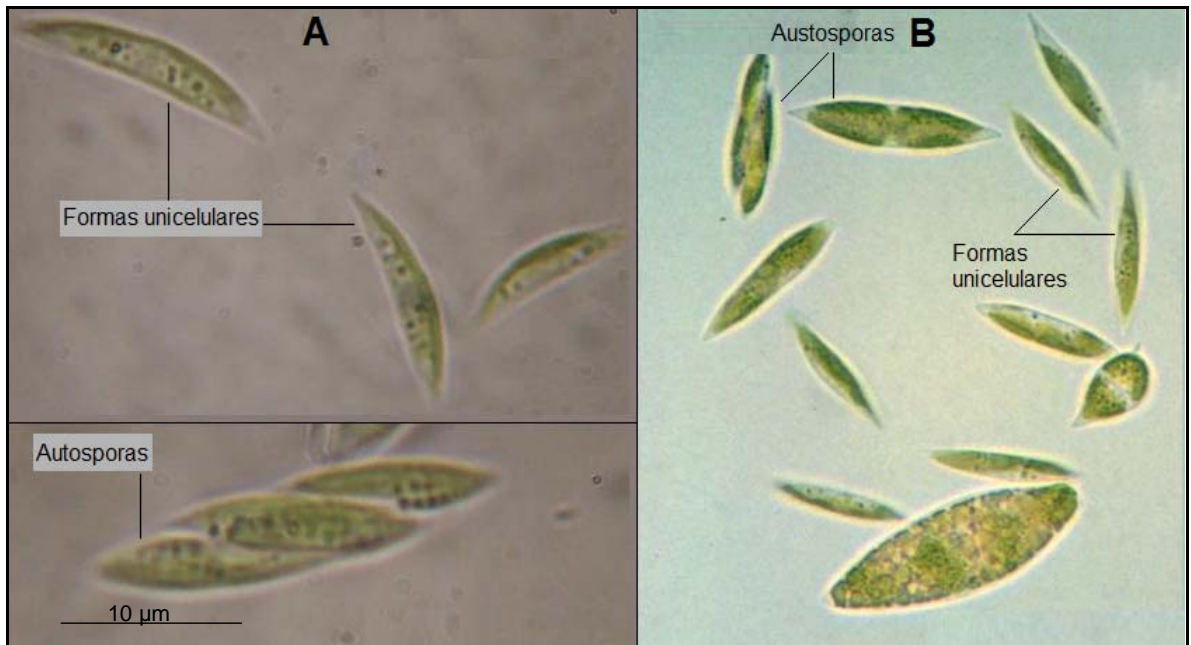


Figura 10. Similitudes morfológicas del género *Monoraphidium* entre microalgas aisladas (A) 100X (Fotografía del autor) y Catálogo de microalgas de la Universidad de Sevilla, España (B). Fuente: Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Universidad de Sevilla 2009.

Crecimiento celular en función del tiempo (Densidad celular).

El crecimiento celular mantuvo una tendencia similar en los tres géneros aislados. Mediante la tasa de crecimiento se diferenciaron tres fases típicas del crecimiento microalgal. Una fase de ajuste o inicial que duró cuatro días, seguida por una fase exponencial que se prolongó por ocho días, y a partir del día trece una fase de retardo (Figura 11).

Según se observa en la figura 11, el género *Monoraphidium* mantuvo la densidad celular más alta respecto a *Chlamydomonas* y *Chlorella*, siendo su valor máximo 7×10^6 células·mL⁻¹ alcanzado el día quince de cultivo, en comparación a los valores de *Chlamydomonas* 5×10^6 células·mL⁻¹ y *Chlorella* 4×10^6 células·mL⁻¹ registrados en la misma fecha

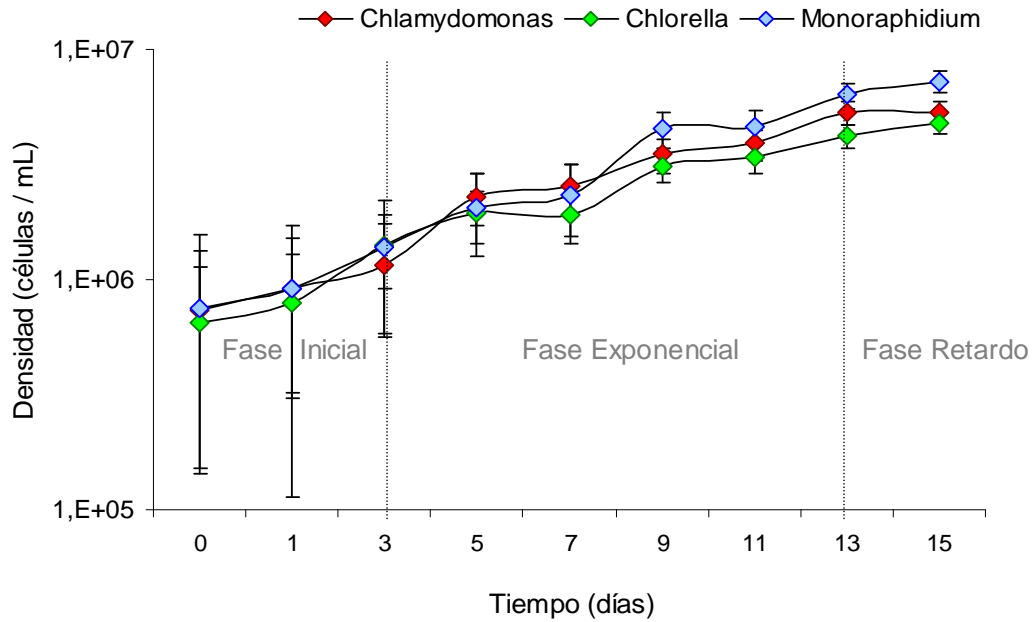


Figura 11. Evolución del crecimiento celular en los géneros aislados *Chlamydomonas*, *Chlorella* y *Monoraphidium*.

Al analizar las tasas de crecimiento poblacional (μ) de los tres géneros aislados durante la fase exponencial, *Monoraphidium* presentó una tasa de 0,14; *Chlamydomonas* 0,10 y *Chlorella* 0,13. Estos valores son menores a los reportados por Álvarez y Gallardo (1989) en *Chlorella saccharophila* y *Scenedesmus acutus*, pertenecientes al orden Chlorococcales bajo condiciones de laboratorio y con medio nutritivo específico para microalgas dulceacuícolas.

Trabajos realizados por Carrera (2006) y Rodríguez *et al.* (2007) con microalgas marinas pertenecientes a la familia Chlamydomonadaceae con medios nutritivos específicos para microalgas marinas muestran tasas de crecimiento poblacional superiores a 0,20. Si bien el medio nutritivo utilizado en este estudio permite un crecimiento sostenido de la población microalgal, en comparación a medios específicos para estos organismos, el incremento de la población es inferior.

Las divisiones por día y el tiempo de generación (Cuadro 2) son superiores a las encontradas por Salomón *et al.* (2003) y Quevedo *et al.* (2008) evaluando distintos medios

de cultivo específicos para microalgas dulceacuícolas. Los valores obtenidos en $\text{Div}\cdot\text{d}^{-1}$ y TG durante el estudio indicarían que las condiciones nutricionales limitan el potencial de crecimiento poblacional, de esta manera el tiempo que demora la población en duplicar su número es superior en comparación a un medio nutritivo específico.

Cuadro 2. Valores de divisiones por día ($\text{Div}\cdot\text{d}^{-1}$) y tiempo de generación (TG) correspondiente a la fase exponencial de las microalgas *Chlamydomonas*, *Chlorella* y *Monoraphidium* durante el estudio.

Género	Tasa de crecimiento Fase Exponencial (μ)	Divisiones por día ($\text{Div}\cdot\text{d}^{-1}$) (días)	Tiempo de Generación (TG)
<i>Chlamydomonas</i>	0,10	0,144	6,93
<i>Chlorella</i>	0,13	0,187	5,33
<i>Monoraphidium</i>	0,14	0,202	4,95

El género *Monoraphidium* presenta durante la fase exponencial, mayor tasa de crecimiento, también mayores divisiones celulares por día y como consecuencia de lo anterior, menor tiempo de generación poblacional, lo que podría indicar que en este género las fases de crecimiento (inicial, exponencial, retardo, estacionaria y declinación) se cumplirían en un menor tiempo, en comparación a los géneros *Chlamydomonas* y *Chlorella*.

En *Chlamydomonas*, *Chlorella* y *Monoraphidium*, la tasa de crecimiento (μ) a partir del día trece disminuyó en promedio un 77,24% lo que indica que dichos géneros bajo las condiciones del estudio comenzaron la fase de retardo. Esto concuerda con Uribe (1994) el cual reporta que en la fase de retardo, la tasa de crecimiento se reduce aumentando así el tiempo para duplicar la población bajo condiciones de laboratorio.

Rodríguez *et al.* 2007 y Quevedo *et al.* 2008, concuerdan en que la fase de crecimiento exponencial en las microalgas se presenta al tercer o cuarto día después de inoculado el medio nutritivo y puede prolongarse por cuatro días; sin embargo, si se controla la densidad

celular mediante dilución del medio y la concentración de nutrientes permanece estable, esta etapa podría extenderse por un mayor tiempo.

En promedio la densidad celular que se obtuvo en el género *Monoraphidium* fue un 15% superior al género *Chlamydomonas* y un 26,5% superior al género *Chlorella*, la tasa de crecimiento del género *Monoraphidium* durante el periodo comprendido entre el día cinco y trece de cultivo fue un 25% superior a la tasa de crecimiento de *Chlamydomonas* y un 29,1% superior a *Chlorella* en igual periodo.

Contenido de clorofila *a* y clorofila total

Clorofila *a*

Los géneros mantienen un comportamiento similar durante los siete primeros días de cultivo, para luego aumentar en el caso del género *Monoraphidium* hasta alcanzar un valor máximo de $9,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, para *Chlamydomonas* $3,4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y para *Chlorella* de $3,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura 12).

El género *Monoraphidium* presentó en promedio durante los quince días de cultivo un valor de clorofila *a* de $3,6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, seguido por el género *Chlamydomonas* con un valor de $1,6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y finalmente el género *Chlorella* con un valor promedio de $1,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

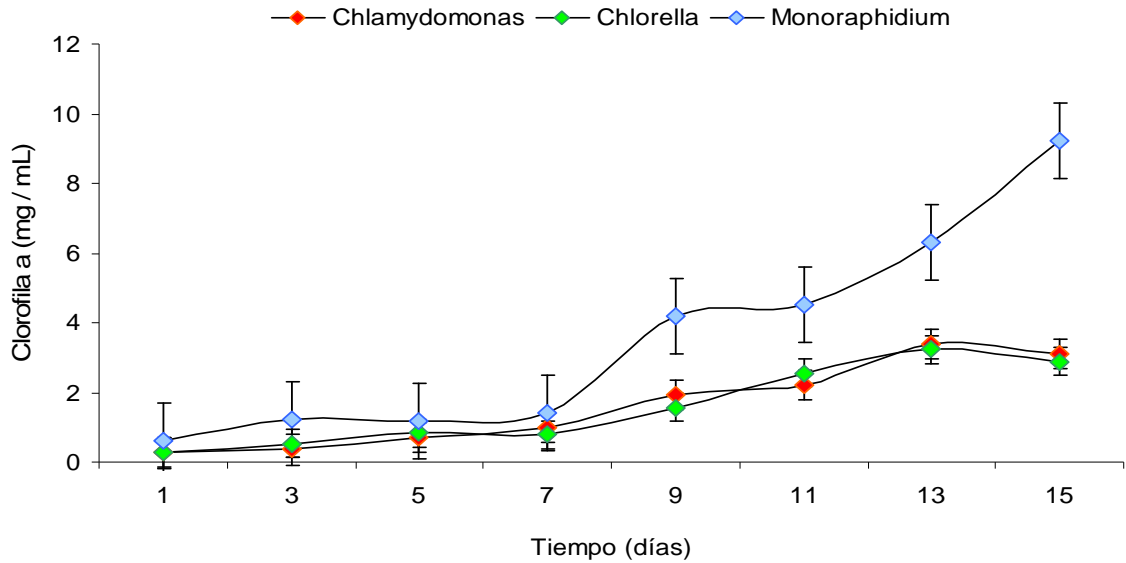


Figura 12. Evolución del contenido de clorofila *a* en los géneros aislados *Chlamydomonas*, *Chlorella* y *Monoraphidium*.

Este comportamiento concuerda con lo reportado por Bermúdez *et al.*, (2002) estudiando la microalga marina *Chroomonas* y con lo reportado por Ortega *et al.*, (2006) estudiando el crecimiento y contenido de pigmentos en *Chlorella sp* los cuales indican que el contenido de clorofila *a* es inversamente proporcional a la intensidad lumínica del cultivo, es decir, que a mayor intensidad lumínica menor es el contenido de clorofilas en las células. En este estudio la radiación PAR permaneció constante durante los quince días de cultivo, por lo que las variaciones de luminosidad del cultivo son atribuibles al crecimiento sostenido de las células en cada género, en las cuales se habría generado un “auto-sombreamiento”, esto habría ocurrido en el género *Monoraphidium*.

En un cultivo microalgal donde se observan células “verdes” y no hay cambios de coloración, la producción y concentración de clorofila *a* es mayor que la producción de otros pigmentos secundarios como por ejemplo astaxantina, estos pigmentos secundarios indican que las condiciones del cultivo como por ejemplo nutricionales, principalmente nitrogenadas son limitantes (Domínguez 2003). Durante este estudio los tres géneros aislados presentaron un incremento en la producción de clorofila *a* y no se observaron

cambios en la coloración del cultivo, lo que indicaría que las condiciones nutricionales no fueron limitantes para el crecimiento microalgal.

Clorofila total

El contenido de clorofila total sigue la misma tendencia que el contenido de clorofila a para los géneros aislados. En la figura 13 se puede observar el comportamiento de los géneros respecto al contenido de clorofila total, en el género *Chlamydomonas* la clorofila total aumentó en función del tiempo hasta el día trece del cultivo, para luego disminuir en un 19,13%. El contenido inicial de clorofila total fue de $0,48 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, para finalizar con un $4,87 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. En promedio el valor alcanzado durante el estudio para este género es de $2,7 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$

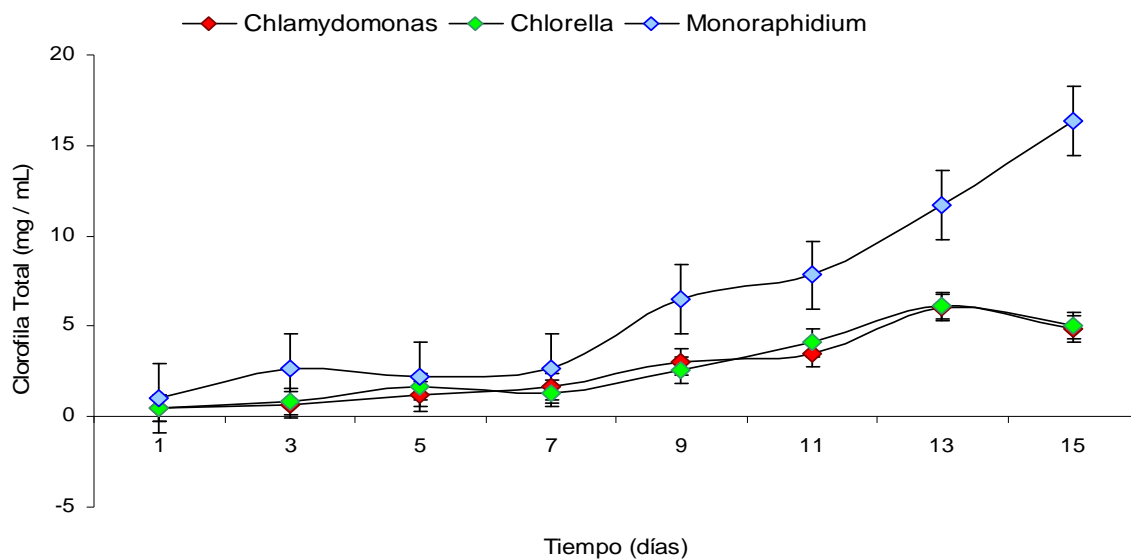


Figura 13. Evolución del contenido de clorofila total en los géneros *Chlamydomonas*, *Chlorella* y *Monoraphidium*.

En *Chlorella* el contenido de clorofila total se incrementó en función del tiempo hasta el día trece del cultivo, a partir de este día el contenido de este pigmento disminuyó en un 1,1%. El contenido inicial de clorofila total fue de $0,48 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para finalizar con un valor de $5,09 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, este aumento indicaría que las condiciones fisiológicas del cultivo fueron favorables ya que permitieron un incremento normal de este pigmento.

En el género *Monoraphidium* en promedio se obtuvo un contenido de clorofila total de 6,36 mg·mL⁻¹, el valor inicial de este pigmento fue de 1,01 mg·mL⁻¹ para finalizar el cultivo con 16,34 mg·mL⁻¹

Relación entre densidad celular y contenido de clorofila total: En los géneros aislados se observa que la densidad celular y el contenido de clorofila total están estrechamente relacionados, el incremento de ambas variables se produce hasta el día trece de cultivo (Apéndice II). El comportamiento observado durante este estudio concuerda con estudios realizados por Serpa y Calderón 2006, en los cuales establecen que el contenido de clorofila se correlaciona positivamente con la densidad o biomasa celular.

Mora *et al.*, 2005 indican que la concentración de este pigmento es mayor a elevadas densidades celulares, siendo la clorofila total un indicador directo del crecimiento microalgal. Este comportamiento se explica ya que a elevadas densidades celulares las células requieran sintetizar mayores cantidades de pigmento para poder captar la energía radiante suficiente y así contrarrestar el efecto de “auto-sombreamiento” (Rosales *et al.*, 2007) (Figura 14).

Si bien en los tres géneros se obtuvieron altas relaciones entre sus densidades poblacionales y el contenido de clorofila total (Apéndice III), *Monoraphidium* es reportado como modelo para estudios a nivel citoplasmático (Aparicio *et al.*, 1994; Giraldes *et al.*, 2000; Mora *et al.*, 2002) y no como potencial fuente de clorofilas, actualmente *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Dunaliella*, *Euglenas*, *Spirulina* y *Anabaena* son citados como los principales géneros utilizados para la extracción de este pigmento (Alveal *et al.*, 1995; Mora *et al.*, 2005; Ortega *et al.*, 2006).

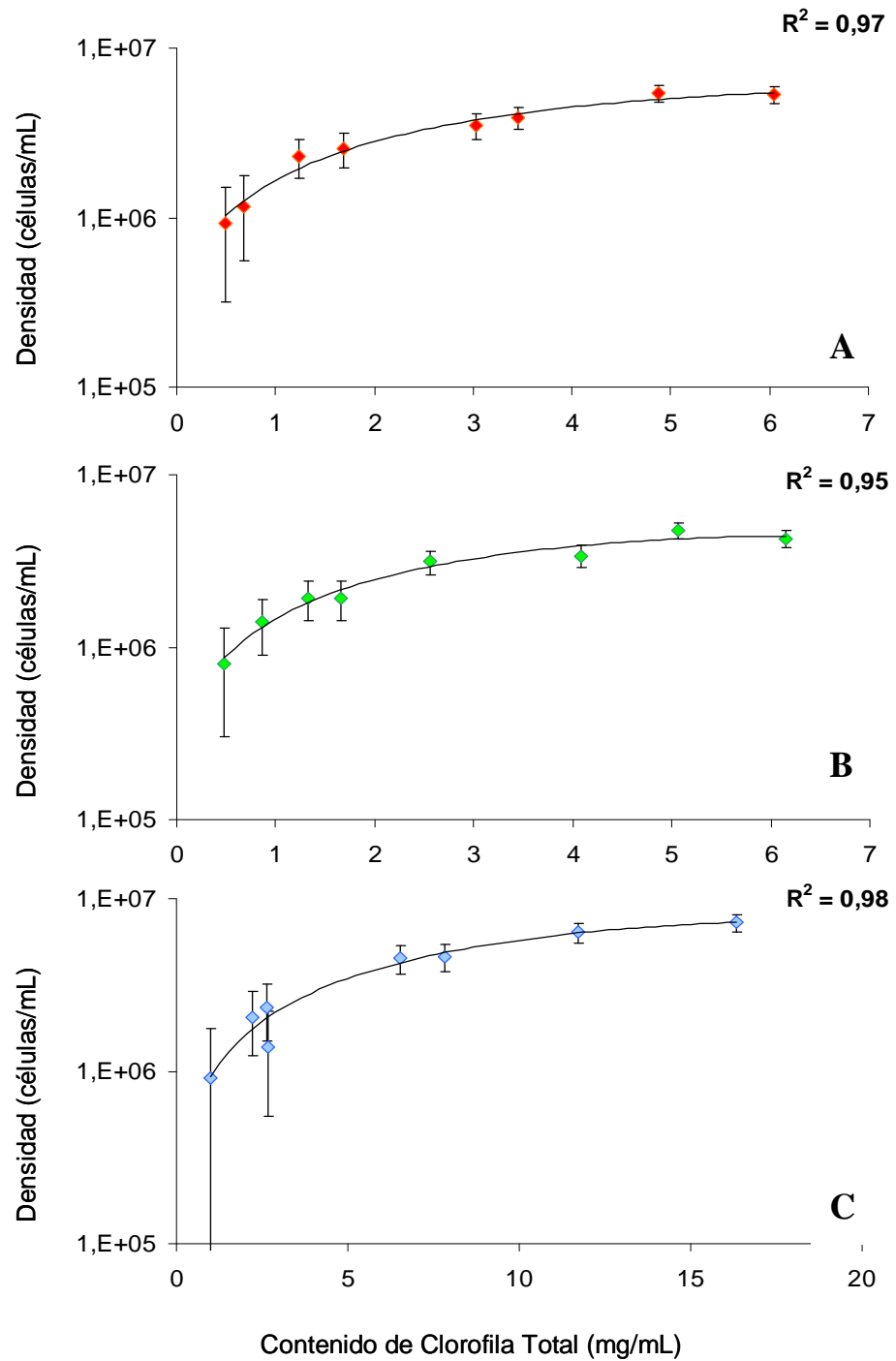


Figura 14. Relación entre la densidad celular y el contenido de clorofila total en los géneros *Chlamydomonas* (A), *Chlorella* (B) y *Monoraphidium* (C) durante el estudio.

Contenido de proteína total

El contenido de proteína total mostró diferencias en los géneros aislados, así, en el género *Chlamydomonas* el contenido de proteína total promedio alcanzado fue $20,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, con un valor máximo de $28,4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ registrado el día quince de cultivo. El contenido promedio de proteína total alcanzado por *Chlorella* durante los quince días de cultivo fue $16,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, siendo el valor máximo alcanzado al finalizar el cultivo $19,4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. En el género *Monoraphidium* el contenido promedio de proteína alcanzado durante los quince días de cultivo fue $17,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, siendo el valor máximo de $19,1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ registrado el día siete de cultivo, para luego comenzar a disminuir hasta $16,6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Tanto en el género *Chlamydomonas* como en el género *Chlorella*, aparentemente los niveles alcanzados por la densidad celular no afectaron de manera negativa la producción de proteína, este comportamiento concuerda con lo reportado por López-Elías *et al.* (2004) y Jonte *et al.* (2006) los cuales estudiando la producción de biomasa microalgal a nivel de laboratorio, establecen una relación entre el contenido de proteínas y el efecto de “auto-sombreamiento” entre las células a altas densidades, es decir, mientras mayores son las densidades celulares del cultivo, menor es la producción de proteína microalgal. Este efecto habría ocurrido en el género *Monoraphidium*, en el cual, hasta el día siete de cultivo se presenta un incremento en el contenido de proteína y a partir de esta fecha, el contenido de proteína comienza a disminuir (Figura 15), dicho comportamiento concuerda con el incremento a partir del día siete de la densidad celular.

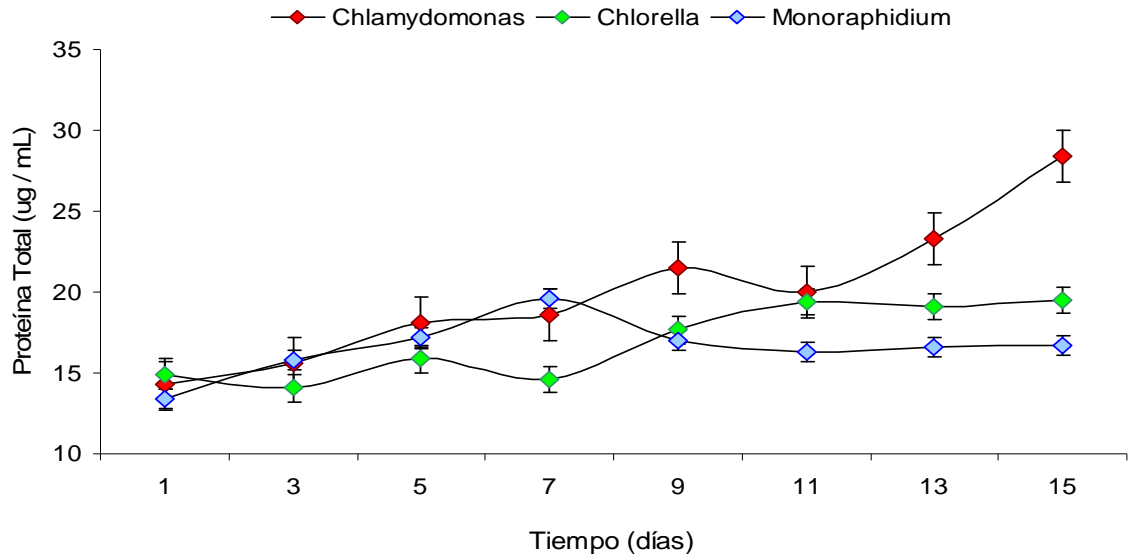


Figura 15. Evolución del contenido de proteína total de los géneros aislados *Chlamydomonas*, *Chlorella* y *Monoraphidium*.

Relación entre la densidad celular y contenido de proteína total: Tanto en el género *Chlamydomonas* como en el género *Chlorella*, se observa que la densidad celular y el contenido de proteína total están estrechamente relacionados, el incremento de ambas variables se produce hasta el día quince en *Chlamydomonas* y *Chlorella*, en el género *Monoraphidium* la relación entre la densidad celular y el contenido de proteína total sólo es directa en la mitad del ciclo, aparentemente el nivel alcanzado por la población microalgal afectó la producción de proteínas (Apéndice II). Los coeficientes de determinación para la relación densidad celular/contenido de proteína total alcanzada por los géneros aislados durante los quince días de cultivo se presentan en el apéndice III.

En la Figura 16 se observan las relaciones entre las densidades celulares y el contenido de proteína total para los géneros aislados durante.

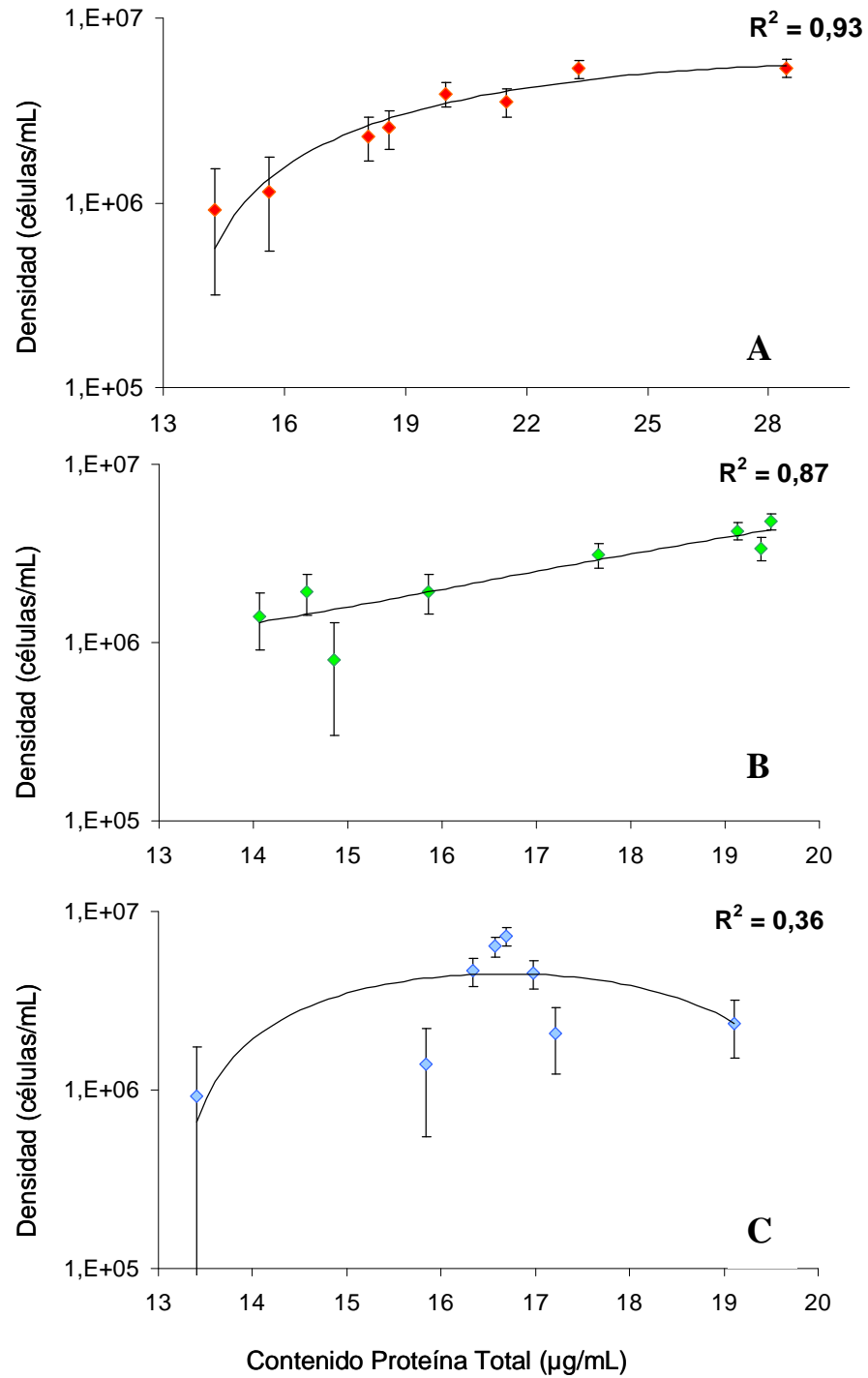


Figura 16. Relación entre la densidad celular y el contenido de proteína total en los géneros aislados *Chlamydomonas* (A), *Chlorella* (B) y *Monoraphidium* (C) durante el estudio.

De los resultados discutidos anteriormente se desprende que la densidad celular, tasa de crecimiento en la fase exponencial, contenido de clorofila *a* y clorofila total que se obtuvo en el género aislado *Monoraphidium* fueron superiores a los obtenidos para los géneros *Chlamydomonas* y *Chlorella*. Finalmente el contenido promedio de proteína total que se obtuvo en el género *Chlamydomonas* fue superior a los géneros *Chlorella* y *Monoraphidium*, esto indicaría que el contenido de proteína/célula de este género es inferior respecto a *Chlamydomonas* y *Chlorella*.

CONCLUSIONES

Sobre la base de las condiciones en las cuales se realizó este estudio, se puede concluir que:

- Las principales microalgas presentes en el sistema hidropónico del tipo raíz flotante pertenecen a la División Chlorophyta y pertenecen a los géneros *Chlamydomonas*, *Chlorella* y *Monoraphidium*.
- El medio nutritivo Hoagland II-modificado permite el crecimiento de microalgas, sin embargo este crecimiento poblacional es inferior a medios específicos utilizados en ellas, aumentando así el tiempo generacional.
- La clorofila total podría ser utilizada para estimar el crecimiento celular siendo una herramienta alternativa al recuento celular.
- En *Chlamydomonas* y *Chlorella* existe una tendencia a incrementar la densidad celular y en el contenido de proteína total durante los quince días de cultivo. En *Monoraphidium* esta tendencia se evidencia hasta el día siete.

BIBLIOGRAFIA

ACLETO, C y R. ZUÑIGA. 1998. Introducción a las algas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima Perú. 383 p.

ALVAREZ, H. 1994. Introducción al Método Ficológico. Capítulo III. Escuela Superior Politécnica del Litoral, Ecuador 375 p.

ALVAREZ, M y T. GALLARDO. 1989. Dinámica temporal de las microalgas de un tratamiento terciario de aguas residuales urbanas a escala de laboratorio. Botánica Complutense, Universidad de Complutense de Madrid. Madrid. España. 14: 65-74.

ALVEAL M., E. FERRARIO, E. OLIVEIRA y E. SAR. 1995. Manual de Métodos Ficológicos. Universidad de Concepción, Concepción, Chile 863 p.

ANDRADE, R., R. TORRES., E. MONTES y C. FERNÁNDEZ. 2006. Obtención de harina a partir del cultivo de *Chlorella vulgaris* y su análisis proteico. Temas Agrarios 12 (1): 50-57.

APARICIO, P., F. WITT, M. RAMIREZ, M. QUIÑONEZ and T. BALANDIN. 1994. Blue-light-induced pH changes associated with NO_3^- , NO_2^- and Cl^- uptake by the green alga *Monoraphidium braunii*. Plant Cell and Environment. 17: 1323-1330.

ARNON, E. 1958. Chloroplast and Photosynthesis pp. 181-233, The Photochemical Apparatus. The Brookhaven National Laboratory. 366p. [en línea] Disponible en <http://kb.osu.edu/dspace/bitstream/1811/4704/V60N04_231.pdf> (Consultado 29 julio 2009).

BERMÚDEZ, J.L., C. LODEIROS y E. MORALES. 2002. Producción de biomasa de la microalga marina *Chroomonas sp.*, en función del pH, intensidad luminosa y salinidad. Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras. Santa Marta. Colombia. 31: 167-185.

BRADFORD, M. 1976 [en línea]. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254 [en línea] Disponible en <<http://www.xtal-protocols.de/ref/reference.html>> (Consultado 29 julio 2009).

CARRERA, J. 2006. Efecto de diferentes concentraciones de productos zeolíticos sobre el cultivo de las microalgas marinas *Tetraselmis suecica* y *Chaetoceros sp.* Tesis de grado. Universidad Federico Villareal, Facultad de Ocenografía y Acuicultura, Lima, Perú. 120p.

DOMINGUEZ, A. 2003. Comparación de la producción de pigmentos carotenoides por *Haematococcus pluvialis* y *Phaffia rhodozyma*. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F, México. 144p.

DUTHIT, R., M. KAMPEL y R. BUSS. 2007. Variabilidad de la concentración de clorofila en las aguas adyacentes a la plataforma cubana y su relación con las pesquerías de langostas (*Panulirus argus*). XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, Florianópolis, Brasil. Instituto Nacional de Pesquisa Espaciais (INPE) 4699-4706.

FOOD and AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO), 2006. La producción de alimento vivo y su importancia para la acuicultura. Departamento de Pesca. Capítulo II Cultivo de Microalgas 30p.

GIRÁLDEZ, N., P. APARICIO and M. QUIÑONES. 2000. Limiting CO₂ levels induce a blue light-dependent HCO₃⁻ uptake system in *Monoraphidium braunii*. *Journal of Experimental Botany*. 51 (345): 807-815.

GONZALEZ, A. 2000. Alternativas en el cultivo de microalgas. Tesis de grado. Escuela Superior Politecnica del Litoral, Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Ecuador. 88 p.

GORTON, H.L. W.E. WILLIAMS and T.C. VOGELMANN. 2001. The light environment and cellular optics of the snow alga *Chlamydomonas nivalis* (Bauer) Wille. *Protochemistry and Photobiology*. 73 (6): 611-620.

GREGOR, J. and B. MARSÁLEK. 2004. Freshwater phytoplankton quantification by chlorophyll *a*. A Comparative study of in vitro, in vivo and in situ methodology. *Water Research*. (38): 517-522.

GUIRY, M.D and G.M. GUIRY. 2007. Phylum Chlorophyta taxonomy browser. Algae Base. World-Wide electronic publication. National University of Ireland. Galway. [en línea] Disponible en <<http://www.algaebase.org>> (Consultado 12 febrero 2009)

HOAGLAND, D. and D. ARNON. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station. The College of Agriculture University of California. EE.UU. (347) 32 p.

JONTE, L., N. ROSALES., B.BRICEÑO y E. MORALES. 2006. La salinidad y la irradiancia modulan el crecimiento de la cianobacteria *Synechocystis minuscula* en cultivos discontinuos. [en línea] Disponible en <http://C:/SciELO/serial/mc/v3n1/body/art_02.htm> (Consultado 10 mayo 2009).

LÓPEZ-ELÍAS, J., D. VOLTOLINA, M. NIEVES-SOTO y L. FIGUEROA. 2004. Producción y composición de microalgas en laboratorios comerciales del noreste de México. VII Simposium Internacional de nutrición Acuícola. 16-19 noviembre. Hermosillo, Sonora, México. 639-649.

MORA, C., F. WITT, P. APARICIO and M. QUIÑONES. 2002. Independent induction of two blue light-dependent monovalent anion transport systems in the plasma membrane of *Mionoraphidium braunii*. *Journal of Experimental Botany*. 53 (337): 1909-1918.

MORA, R., R. MORONTA, J. ORTEGA y E. MORALES. 2005. Crecimiento y producción de pigmentos de la microalga nativa *Chlorella sp* aislada de la represa de Tulé, Municipio de Mara, Estado de Zulia, Venezuela. *Ciencia*. 12 (2): 1-9.

MORRIS, H., M. QUINTANA, A. ALMARALES y L. HERNANDEZ. 1999. Composición bioquímica y evaluaciones de la calidad proteica de la biomasa autotrófica de *Chlorella vulgaris*. *Cuban Journal of Food and Nutrition*. 13(2): 123-128.

MORRIS, H y L. MORAN. 2002. Determinación del contenido de triptófano en suplementos nutricionales de microalgas mediante espectrofotometría derivativa. *Revista Cubana de Química*. 16 (1): 65-70.

NONOMURA, T., Y. MATSUDA, M. BINGO, M. ONISHI, K. MATSUDA, S. HARADA and H. TOYODA. 2001. Algicidal effect of 3-(3 indolyl) butanoic acid, a control agent of the bacterial kilt pathogen, *Ralstonia solanacearum*. *Crop Protection*. 20: 935-939.

ORTEGA, J. R. MORONTA y E. MORALES. 2006. Influencia del acetato sobre el crecimiento y contenido de pigmentos de la microalga *Chlorella sp*. *Ciencia*. 12 (1) 1-11.

PARRA, O. y C. BICUDO. 1996. Introducción a la biología y sistemática de las algas continentales. Universidad de Concepción, Concepción, Chile 268p.

PARRA, O. 2006. Estado de conocimiento de las algas dulceacuícolas de Chile (Excepto Bacillariophyceae). *Gayana* 70 (1): 8-15.

PÉRASSO, R., A. BAROIN and A. ADAETTE. 1990. The emergente of eukaryotic algae within the protists. A molecular phylogeny base ribosomal RNA secuencing. *Experimental Phycology*. 1-19.

PINTO, A., E. VON SPERLING and R. MOREIRA. 2001. Chlorophyll *a* determination via continuous measurement of plankton fluorescence. *Methodology Developmet. Water Research*. 35 (16): 3977-3981.

PULZ, O and W. GROSS. 2004. Valuable products from biotecnology of microalgae. *Applied Microbiology Biotechnology*. 65: 635-648.

QUEVEDO, C., S. MORALES y A. COSTA. 2008. Crecimiento de *Scenedesmus sp* en diferentes medio de cultivo para la producción de proteína microalgal. *VITAE*, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antiquia, Medellín, Colombia. 15: 25-31.

QUINTANA. M., L. HERNANDEZ, H, MORRIS and M. FERNANDEZ. 1999. Contenido de algunas vitaminas en cultivos de microalga *Chorella sp*. *Cuban Journal of Food and Nutrition*. 13 (1): 9-13.

REBOLLOSO. M.M., F. ACIÉN, J. SÁNCHEZ, M.GIL and J.L. GUIL. 2000. Nutrient composition of the biomasa of microalgae *Porphyridium cruetum*. *Food Science and Technology*. 9: 129-135.

RED VENEZOLANA DE INVESTIGACIÓN EN MICROALGAS. [en línea] Disponible en <<http://redvim.com.ve>> (Consultado 14 mayo 2008)

REYNOLDS, C. 1984. The ecology of freshwater phytoplankton. Cambridge University Press. 384 p.

RIFON-LASTRA, A y A. NOGUEROL-SEOANE. 2001. Algunas Chlorellaceae nuevas o poco citadas para la Península Ibérica. Botánica Complutensis, Universidad Complutense de Madrid. Madrid. España.. 25: 166-177

RIVERA, C., A. ZAPATA, G. PINILLA, J. DONATO, B. CHAPARRO y P. JIMENEZ. 2005. Comparación de la estimación de la clorofila *a* mediante los métodos espectrofotométrico y fluométrico. Acta Biológica Colombiana. 10 (2): 95-103.

RODRIGUEZ, L., J. JUSCAMAITA y J. VARGAS. 2007. Efecto del medio EM-Bokashi en el cultivo de la microalga marina *Tetraselmis suecica* K. Ecología Aplicada 6 (1): 111-116.

ROMERO, T y D. HERNÁNDEZ. 2002. Contenido proteico y digestibilidad de la pasta de *Chlorella sp* acidulada. Revista de Investigación Marítima 23 (3): 215-219.

ROSALES, N., J. BERMÚDEZ., R. MORONTA y E. MORALES. 2007. Gallinaza: Un residual avícola como fuente alternativa de nutrientes para la producción de biomasa microalgal. Revista Colombiana de Biotecnología 9 (1): 41-48.

SALOMÓN, R., I. ALBARRACIN y G. PIO. 2003. Sensibilidad de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus quadricauda* a la Cipermetrina. Fase preliminar. Revista de Toxicología. Argentina.1-15. [en línea] Disponible:<<http://www.sertox.com.ar/retel/default.htm> > (Consultado 9 marzo 2009).

SCHWARZ, D and W. GROSS. 2004. Algae affecting lettuce growth in hydroponic systems. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. 79 (4): 554-559.

SERPA, R y A. CALDERÓN. 2006. Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno en el contenido de carotenoides y clorofila de cuatro cepas peruanas de *Dunaliella salina* TEOD. *Ecología Aplicada*. 5 (1): 93-99.

URIBE, E. 1994. "Cultivo de peces marinos" - Cultivo de Microalgas, material docente. Departamento de Acuicultura. Facultad de Ciencias del Mar. Universidad Católica del Norte. Coquimbo. Chile: 50-73.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA. Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis. [en línea] Disponible en <<http://www.ibvf.cartuja.csic.es>> (Consultado 19 marzo 2009).

VAN DEN HOEK, C., D.G. MANN and H.M. JAHNS. 1995. *Algae. An Introduction to Phycology*. Cambridge University Press. 610 p.

VÄNNINEN, I and H. KOSKULA. 1998. Effect of hydrogen peroxide on algal growth cucumber seedlings and the reproduction of shore flies (*Scatella stagnalis*) in rockwool. *Crop Protection*. 17: 547-553.

VOLKER, A., R. HUSS, C. FRANK, E.C. HARTMANN, M. HIRMER, A. KLOBOUCEK, B.M. SEIDEL, P. WENZELER and E. KESSLER. 1999. Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of genus *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta). *Journal Phycology* 35: 587-598.

GLOSARIO

Autosporas	Esporas inmóviles iguales en caracteres a la célula que las originó
Cloroplasto	Organelo celular de doble membrana en donde se ubican los pigmentos fotosintéticos.
“Células” contráctiles	Organelo celular donde emergen los flagelos.
División	Taxón menos inclusivo que un Reino pero más inclusivo que todos los taxa; es equivalente a Phylum.
Especie	Unidad o categoría taxonómica básica; grupo de organismos de similar morfología que al cruzarse producen descendencia fértil.
Estado palmeliode	Estado temporal de formas monococales que consisten en conjuntos de células rodeadas por una vaina gelatinosa común.
Estigma	Corpúsculo pigmentado, localizado en el interior del cloroplasto y que está asociado a la orientación del movimiento flagelar, también llamado organelo fotorreceptor; también llamado mancha ocular.
Ficología	Estudio de algas.
Fitoplancton	Componente vegetal del plancton.
Flagelo	Apéndice celular elongado u organelo que permite a los microorganismos y células reproductivas moverse libremente.
Pirenoide	Región diferenciada del cloroplasto asociada con la síntesis de almidón.

Fuente: Parra y Bicudo 1996

APENDICE I

Promedio de temperaturas mínimas y máximas en el período de estudio.

Día de cultivo	T° mínima	T° máxima
1	18	24
2	17	23
3	15	22
4	19	23
5	17	25
6	19	25
7	16	24
8	18	25
9	17	23
10	19	24
11	17	23
12	19	25
13	16	21
14	18	22
15	18	23

APÉNDICE II

Densidad celular, contenido de clorofila a, clorofila total, proteína total y relaciones de los géneros aislados durante el estudio.

Género	Días	Densidad celular (células·mL ⁻¹)	Clorofila a (mg·mL ⁻¹)	Clorofila Total (mg·mL ⁻¹)	Proteína Total (μg·mL ⁻¹)
<i>Chlamydomonas</i>	1	918.000 ± 36.059	0,260 ± 0,05	0,493 ± 0,10	14,2 ± 1,92
	3	1.154.667 ± 57.735	0,359 ± 0,05	0,680 ± 0,11	15,6 ± 0,42
	5	2.294.676 ± 130.512	0,712 ± 0,13	1,238 ± 0,18	18,0 ± 0,50
	7	2.554.700 ± 336.502	1,005 ± 0,16	1,687 ± 0,10	18,5 ± 0,41
	9	3.504.670 ± 126.623	1,942 ± 0,18	3,030 ± 0,23	21,4 ± 0,93
	11	3.894.566 ± 170.098	2,220 ± 0,33	3,454 ± 0,58	20,0 ± 0,34
	13	5.311.433 ± 1.383.630	3,376 ± 0,89	5,575 ± 0,45	23,3 ± 0,90
	15	5.374.766 ± 637.050	3,096 ± 0,08	5,559 ± 0,53	28,4 ± 0,78
<i>Chlorella</i>	1	797.333 ± 75.056	0,276 ± 0,02	0,481 ± 0,03	14,8 ± 1,48
	3	1.400.700 ± 70.946	0,527 ± 0,04	0,866 ± 0,13	14,0 ± 2,09
	5	1.930.643 ± 337.095	0,836 ± 0,22	1,652 ± 0,32	15,8 ± 0,46
	7	1.927.400 ± 205.508	0,783 ± 0,03	1,320 ± 0,14	14,5 ± 0,90
	9	3.124.000 ± 230.651	1,573 ± 0,26	2,563 ± 0,59	17,6 ± 1,44
	11	3.387.333 ± 217.332	2,564 ± 0,38	4,080 ± 0,76	19,3 ± 0,25
	13	4.244.000 ± 988.989	3,225 ± 0,99	5,148 ± 0,69	19,1 ± 0,25
	15	4.764.000 ± 233.024	2,892 ± 0,39	5,092 ± 0,11	19,4 ± 0,75
<i>Monoraphidium</i>	1	918.667 ± 281.129	0,600 ± 0,02	1,007 ± 0,10	13,4 ± 1,24
	3	1.385.333 ± 30.551	1,206 ± 0,11	2,660 ± 0,11	15,8 ± 0,76
	5	2.062.000 ± 308.058	1,193 ± 0,24	2,207 ± 0,45	17,2 ± 1,69
	7	2.342.000 ± 330.454	1,397 ± 0,15	2,642 ± 0,53	19,6 ± 0,10
	9	4.502.000 ± 30.000	4,180 ± 0,36	6,525 ± 0,30	16,9 ± 0,26
	11	4.635.334 ± 188.237	4,512 ± 0,33	7,822 ± 0,94	16,3 ± 1,27
	13	6.362.000 ± 1.347.479	6,289 ± 0,29	11,706 ± 1,13	16,5 ± 0,24
	15	7.292.000 ± 252.389	9,239 ± 0,23	16,336 ± 1,13	16,6 ± 0,21

APENDICE III

Relaciones entre densidad celular, clorofila total y proteína total en los géneros aislados durante los quince días de cultivo.

Género	Coefficiente de determinación Densidad/Clorofila Total (R ²)	Coefficiente de determinación Densidad/Proteína Total (R ²)
<i>Chlamydomonas</i>	0,979	0,932
<i>Chlorella</i>	0,952	0,871
<i>Monoraphidium</i>	0,980	0,360

ANEXO I

Clasificación de las microalgas de acuerdo a caracteres establecidos

Clase	Pigmentos fotosintéticos	Estructura del cloroplasto	Pared celular	Metabolitos de reserva	Flagelo	Caracteres citológicos especiales
Cyanophyceae (algas azules o verde -azules) 60% dulceacuícolas	Clorofila <i>a</i> , c-ficocianina, c- ficoeritrinina, alloficocianina, β- caroteno, xantofilas	Sin cloroplastos, tilacoides libres en el citoplasma, ficobiliproteína en ficobilisomas sobre la superficie externa de los tilacoides	Generalmente con 4 capas de mucopéptidos como componentes principales: ácido murámico, glucosalina, alamina, ácido glutámico y α diaminopimérico; rodeado por vaina compuesta por ácidos pécticos y mucopolisacáridos	α -1-4 glucano ramificado, cianoficina (proteína compuesta solo por aminoácidos, arginina y aspártico)	Ausentes	Sin organelos envueltos por membranas
Prochlorophyceae	Clorofila <i>a</i> y <i>b</i> , β caroteno, xantofilas.	Sin cloroplastos, pigmentos en tilacoides libres en el citoplasma	Presente, con vaina mucilaginoso	α -1-4 glucanos, no ramificados y ramificados	Ausentes	Sin organelos envueltos por membranas
Chlorophyceae (algas verdes) 95% dulceacuícolas	Clorofila <i>a</i> y <i>b</i> , β caroteno, xantofilas (luteína, violaxantina, zeaxantina, anteraxantina y neoxantina)	Variable en forma y numero de cloroplastos, con 2 membranas, 2 a 5 tilacoides por lamela, generalmente con pirenoides	Celulosa, hidroxiprolinas glicósidas, xilano, en algunos géneros calcificada	Gránulos de almidón dentro de los cloroplastos, envainando los pirenoides	1 a 8, iguales apicalmente insertados	Estigma, células multinucleadas y cenocitos son comunes
Charophyceae 90% dulceacuícolas	Clorofila <i>a</i> y <i>b</i> , β caroteno, xantofilas (luteína, violaxantina, zeaxantina, anteraxantina y neoxantina)	Numerosos elipsoidales, en hileras longitudinales rodeando la vacuola central, número variable de tilacoides por lamela, sin pirenoides	Celulósica, calcificada en algunas especies	Gránulos de almidón dentro de los cloroplastos	2, iguales o no insertados subapicalmente, cubiertos por pequeñas escamas	Células multinucleadas

Fuente: Parra y Bicudo 1996

Clase	Pigmentos fotosintéticos	Estructura del cloroplasto	Pared celular	Metabolitos de reserva	Flagelo	Caracteres citológicos especiales
Chrysophyceae (algas amarillas) dulceacuícolas 80%	Clorofila <i>a</i> y <i>c</i> , β caroteno, xantofilas (fucoxantina, diadinoxantina)	1 a 2, con 4 membranas, 3 tilacoides por lamela, con o sin pirenoides	Celuloso-péctico, salificado o calcificadas, a veces sin pared celular	Crisolaminarina (β -1-3 glucano)	2, iguales o desiguales, uno largo pantonemático, dirigido anteriormente, el otro acronemático dirigido hacia atrás o lateralmente a menudo reducido o ausente	Estigma dentro del cloroplasto cuando lo presentan
Xanthophyceae (algas verdes-amarillas) 85% dulceacuícolas	Clorofila <i>a</i> y <i>c</i> , β caroteno, xantofilas (diadinoxantina, diatoxantina, heteroxantina, neoxantina)	1 a varios laminados o discoideos con 4 membranas, 3 tilacoides por lamela, algunos con pirenoides internos multilamelares	Celulósica, en algunos de dos piezas superpuesta (forma de H en filamentos)	Lípidos y posiblemente polisacáridos	2, desiguales, insertados apicalmente o lateralmente, generalmente el flagelo largo dirigido anteriormente y el otro hacia atrás	Estigma en cloroplasto
Bacillariophyceae (diatomeas) 50% dulceacuícolas	Clorofila <i>a</i> y <i>c</i> , β caroteno, xantofilas (fucoxantina, diatoxantina, heteroxantina, neoxantina)	Variable en número y forma, 1 a 2 laminados, con 4 membranas y 3 tilacoides por lamela, con pirenoide	Silíceica de dos piezas	Crisolaminarina (β -1-3 glucano)	Solamente en gametos masculinos de diatomeas céntricas	
Phaeophyceae (algas café) 1% dulceacuícolas	Clorofila <i>a</i> y <i>c</i> , β caroteno, xantofilas (fucoxantina, zeaxantina, anteraxantina, violaxantina)	Variable en número y forma, con 4 membranas, 2 a 6 tilacoides por lamela, pirenoides adheridos al cloroplasto por un corto pedicelo	Capa interna celulósica, capa externa mucilaginoso	β -1-3 glucano	2, desiguales, insertados lateralmente, generalmente el flagelo largo dirigido hacia adelante y el otro hacia atrás vestigial en algunos géneros	Estigma (en gametos masculinos), un reducido cloroplasto localizado cerca de la inserción del flagelo, vesícula carente de membrana y que contienen polifenoles

Fuente: Parra y Bicudo 1996

Clase	Pigmentos fotosintéticos	Estructura del cloroplasto	Pared celular	Metabolitos de reserva	Flagelo	Caracteres citológicos especiales
Eustimatophyceae	Clorofila <i>a</i> , β caroteno, xantofilas (vaucheriaxantina, diatoxantina, heteroxantina, violaxantina)	1, parietal, con 4 membranas, 3 tilacoides por lamela, pirenoide esférico o poliédrico sobre la superficie interna del cloroplasto	Fibrilar- mucilaginoso, composición no determinada	Vesículas lamelas rodeando al pirenoide o en el citoplasma	1 inserto subapicalmente, dirigido hacia adelante	Estigma en zoospora, independiente del cloroplasto
Haptophyceae 40% dulceacuícola	Clorofila <i>a y c</i> , α caroteno, xantofilas (flucoxantina, diatoxantina, diadinoxantina)	2, con 4 membranas 3 tilacoides por lamela 1 pirenoide por cloroplasto	Ausente, cuerpo celular cubierto con escamas orgánicas o calcificadas	β -1-3 glucano	2 insertados apicalmente o centralmente iguales	
Dinophyceae (dinoflagelados) 7% dulceacuícolas	Clorofila <i>a y c</i> , β caroteno, xantofilas (peridina, dinoxantina, diadinoxantina)	Numerosos, variables en forma, 3 membranas, 3 tilacoides por lamela, pirenoide con forma variable	Membranas concéntricas, capa de vesículas tecaes con o sin placas tecaes celulósicas de esporas variables	Gránulos de almidón en el citoplasma	2 flagelos insertos apicalmente subapicalmente heterodinámicos, o 2 emergiendo de depresiones ventrales	Núcleo grande, cromosomas condensados en todos los estados, centrómero y huso ausente, estigma con forma variada
Cryptophyceae 50% dulceacuícolas	Clorofila <i>a y c</i> , α caroteno, xantofilas	1 a 2 por célula, parietales, 4 membranas, tilacoides en pares no bien definidos en espacios intraticoidales, pirenoides presentes	Pared celular ausente, periplasto granular o fibrilar	Gránulos de almidón en matriz pericoplástica cercana al pirenoide	2 iguales o desiguales, emergen desde la depresión ventral	Estigma dentro del cloroplasto
Euglenophyceae 97% dulceacuícolas	Clorofila <i>a y b</i> , β caroteno, xantofilas (astaxantina neoxantina, diadinoxantina)	Variable en número y forma, 3 membranas 3 tilacoides por lamela, con o sin pirenoide	Ausente, membrana compuesta de fibras proteínicas superpuestas	β -1-3 glucano, gránulos en el citoplasma	2 iguales o no, con bastones paraflagelares, emergen de la invaginación subapical	Estigma separado del cloroplasto

Fuente: Parra y Bicudo 1996

Clase	Pigmentos fotosintéticos	Estructura del cloroplasto	Pared celular	Metabolitos de reserva	Flagelo	Caracteres citológicos especiales
Rhodophyceae (algas rojas) 2% dulceacuícolas	Clorofila <i>a</i> , β caroteno, xantofilas (luteína, zeaxantina, antheraxantina, violaxantina) r y c – ficocianina	Estrellados discoideos o laminares con 2 membranas, tilacoides simples no apilados, algunas veces rodeados por tilacoides simples periféricos, con o sin pirenoides	Capa fibrilar interna, capa externa no fibrilar, matriz mucilaginoso amorfa de galactanos sulfatados, calcificación en algunos géneros	Almidón α -1-4 glucanos, en gránulos externos al cloroplasto, azúcares	Ausente	
Prasinophyceae 30% dulceacuícolas	Clorofila <i>a</i> y <i>b</i> , α β caroteno, xantofilas	Generalmente único, lobulado, también numerosos, discoideos, con 2 membranas, 2 a 4 tilacoides, pirenoide	Cuando está presente es no celulósica, cuerpo celular cubierto por escamas orgánicas o encerrado en una teca orgánica	Gránulos de almidón dentro del cloroplasto, en ocasiones envainando el pirenoide.	1,2 o más iguales a menudo emergiendo de una depresión apical, cubierto con escamas orgánicas	Tricocistos en algunas especies
Chlorarachniophyceae	Clorofila <i>a</i> y <i>b</i>	Numerosos cloroplastos, cada uno con pirenoide, 3 tilacoides por lamela, con 4 membranas	Ausente	Almidón	Sólo en zoosporas	Mitocondria con crestas tubulares
Chloromonadophyceae	Clorofila <i>a</i> y <i>b</i> , β caroteno, xantofilas (fucoxantina)	Numeroso, discoideos, con 4 membranas, 3 tilacoides por lamela, pirenoide ausente	Ausente	Desconocidos	2 desiguales, apicalmente, uno dirigido hacia delante, el otro hacia atrás acronemático	Estigma ausente

Fuente: Parra y Bicudo 1996

ANEXO II

Clasificación de las microalgas en divisiones y clases según algunos autores

Papenfuss 1955	Morris 1967	Chapman y Chapman 1977	Bold & Wynne 1985	Van den Hoek 1995
Schizophycophyta	Cyanophyta	Cyanophyta	Cyanophyta	Cyanophyta
Schizophyceae	Cyanophyceae	Cyanophyceae	Cyanophyceae	Prochlorophyta
Chlorophycophyta	Chlorophyta	Chlorophyta	Phochlorophyta	Glaucophyta
Chlorophyceae	Chlorophyceae	Chlorophyceae	Phochlorophyceae	Rhodophyta
Charophycophyta	Charophyceae	Prasinophyceae	Chlorophyta	Heterokontophyta
Charophyceae	Xanthophyta	Charophyceae	Chlorophyceae	Chrysophyceae
Chrysophycophyta	Xanthophyceae	Euglenophyta	Charophyta	Parmophyceae
Chrysophyceae	Chrysophyta	Euglenophyceae	Charophyceae	Sarcinochrysidophyceae
Xanthophyceae	Chrysophyceae	Chloromonadophyta	Euglenophyta	Xantophyceae
Bacillariophyceae	Haptophyceae	Chloromonadophyceae	Euglenophyceae	Eustigmatophyceae
Cryptophyceae	Bacillariophyta	Xanthophyta	Phaeophyta	Bacillariophyceae
Pyrrhophycophyta	Bacillariophyceae	Xanthophyceae	Phaeophyceae	Raphidophyceae
Dinophyceae	Pyrrhophyta	Cryptophyta	Chrysophyta	Distyochophyceae
Chloromonadophyceae	Desmophyceae	Cryptophyceae	Chrysophyceae	Phaeophyceae
Phaeophycophyta	Dinophyceae	Pyrrhophyta	Prymnesiophyceae	Haptophyta
Phaeophyceae	Cryptophyta	Desmophyceae	Xantophyceae	Cryptophyta
Euglenophycophyta	Cryptophyceae	Dinophyceae	Eustigmatophyceae	Dinophyta
Euglenophyceae	Euglenophyta	Chrysophyta	Raphidophyceae	Euglenophyta
Rhodophycophyta	Euglenophyceae	Chrysophyceae	Bacillariophyceae	Chlorophyta
Rhodophyceae	Phaeophyta	Haptophyceae	Pyrrhophyta	Prasinophyceae
	Phaeophyceae	Bacillariophyta	Ebriophyceae	Chlorophyceae
	Rhodophyta	Bacillariophyceae	Ellobiophyceae	Ulvophyceae
	Rhodophyceae	Phaeophyta	Syndiniophyceae	Cladophorophyceae
		Phaeophyceae	Dinophyceae	Bryopsidophyceae
		Rhodophyta	Desmophyceae	Dasycladophyceae
		Rhodophyceae	Rhodophyta	Trentepohliophyceae
			Rhodophyceae	Pleurostrophyceae
			Cryptophyta	Zygnematophyceae
				Klebsormidiophyceae
				Charophyceae

ANEXO III

Medio nutritivo Hoagland II-modificado (Hoagland y Arnon 1950), utilizado durante el estudio.

Elemento	Contenido (ppm)
N-NO ₃	155,660
N-NH ₄	34,140
P	61,960
K	177,090
Mg	37,010
Ca	166,740
B	0,220
Mn	0,610
Cu	0,040
Mo	0,050
Fe	2,000
Zn	0,050

Fuente: Laboratorio Hidroponía y Horticultura. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile.

