

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA

MEMORIA DE TÍTULO

**EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE LA SOLUCIÓN
NUTRITIVA SOBRE LA BIOMASA DE MICROALGAS DEL
GÉNERO *CHLAMYDOMONAS***

YASMÍN CAROLINA HUN ARENAS

SANTIAGO - CHILE

2010

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA

MEMORIA DE TÍTULO

**EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE LA SOLUCIÓN
NUTRITIVA SOBRE LA BIOMASA DE MICROALGAS DEL
GÉNERO *CHLAMYDOMONAS***

**EFFECT OF NUTRITIVE SOLUTION CONCENTRATION ON THE
BIOMASS OF MICROALGAE *CHLAMYDOMONAS***

YASMÍN CAROLINA HUN ARENAS

SANTIAGO - CHILE

2010

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE LA SOLUCIÓN NUTRITIVA
SOBRE LA BIOMASA DE MICROALGAS DEL GÉNERO
CHLAMYDOMONAS

Memoria para optar al Título
Profesional de Ingeniera Agrónoma

Yasmín Carolina Hun Arenas

PROFESORES GUÍAS	Calificaciones
Sra. María Luisa Tapia F. Ingeniero Agrónomo, M. Sc.	6,5
Sr. Alejandro Riquelme E.. Bioquímico.	6,5
PROFESORES EVALUADORES	
Sr. Herman Silva R. Prof. Biología, Ph. D.	6,0
Sr. Ricardo Pertuzé C. Ingeniero Agrónomo, Ph. D.	6,8

Santiago, Chile. 2010

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres María Inés y José, a mi hermano José, a mis padrinos Estrella y Sergio, por todo el apoyo que me dieron estos años y por el esfuerzo que han hecho para que yo recibiera una buena educación, gracias a ustedes he podido llegar a ser una profesional.

A mi profesora María Luisa por su dedicación y afecto. Gracias por guiarme tanto en lo profesional como lo personal, durante estos últimos años me ha transmitido muchas cosas que me han enriquecido como persona.

A mi profesor Alejandro, siempre con la respuesta a mis preguntas, gracias por la paciencia y disposición a colaborar con el desarrollo de mi memoria y por el interés demostrado hacia mi persona.

A todos los que estuvieron involucrados en el desarrollo mi memoria, especialmente a Maritza por compartir sus conocimientos, y a Sara, Felipe, Beto y Guille, por su cariño consejos y apoyo incondicional que me han dado durante este tiempo.

Finalmente, agradecer a todos los que estuvieron presentes durante mi vida universitaria, recorrimos un camino juntos y sin ustedes llegar al final hubiera sido más difícil.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Microalgas fuente de compuestos naturales	3
Proteínas	4
Hidratos de carbono	4
Pigmentos fotosintéticos	4
Antioxidantes	4
Uso de microalgas en la industria alimenticia	5
Factores que influyen en la producción de compuestos naturales	6
Microalgas del género <i>Chlamydomonas</i>	7
MATERIALES Y MÉTODOS	9
Lugar de estudio	9
Aislamiento del material microalgal	9
Rayado en agar	10
Dilución seriada	11
Reconocimiento de la microalga aislada	12
Cultivo de <i>Chlamydomonas</i> aisladas	13
Aumento de volumen de <i>Chlamydomonas</i>	13
Cultivo de <i>Chlamydomonas</i> en tubos de ensayo	14
Cultivo de <i>Chlamydomonas</i> en matraces Erlenmeyer	14
Evaluaciones	16
Cuantificación de biomasa fresca	16
Contenido de proteínas solubles	16
Contenido de hidratos de carbono solubles	17
Contenido de pigmentos fotosintéticos	17
Determinación de la capacidad antioxidante total	17
Análisis estadístico	18

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
Condiciones ambientales	19
Aislamiento del material microalgal	19
Rayado en agar	21
Dilución seriada	21
Reconocimiento taxonómico	22
Cuantificación de biomasa fresca	23
Crecimiento poblacional de <i>Chlamydomonas</i>	23
Producción de biomasa fresca	24
Contenido de las principales biomoléculas	27
Proteínas solubles	27
Hidratos de carbono solubles	29
Pigmentos fotosintéticos	31
Determinación de la capacidad antioxidante total	35
CONCLUSIONES	37
BIBLIOGRAFÍA	38
APÉNDICE I	44
APÉNDICE II	44
ANEXO I	45

RESUMEN

Las microalgas son capaces de producir diferentes compuestos de importancia nutricional, siendo utilizadas en acuicultura, alimentación animal y nutrición humana. Esta capacidad depende, entre otros factores, de la concentración de nutrientes, lo que altera la composición bioquímica de las microalgas.

Se evaluó el efecto de la concentración de la solución nutritiva de Hoagland y Arnon II modificada sobre la biomasa fresca, contenido de algunas biomoléculas de interés y sobre la capacidad antioxidante de microalgas *Chlamydomonas*, género que es utilizado como sistema modelo de investigación en biología celular pero que hasta el momento no ha sido estudiado desde el punto de vista nutricional ni desde sus potencialidades comerciales.

Mediante la combinación de dos métodos de aislamiento: rayado en agar y dilución seriada, se logró aislar microalgas *Chlamydomonas* para su posterior cultivo en una cámara acondicionada para el crecimiento de las microalgas bajo condiciones controladas de temperatura, fotoperiodo y radiación. Durante la etapa de cultivo en matraces de 500 mL se aplicaron cinco tratamientos con distinta concentración de nutrientes (solución nutritiva de Hoagland y Arnon II modificada, al 25, 50, 100, 150 y 200%).

Se realizaron muestreos durante 31 días (día por medio), obteniendo curvas de crecimiento poblacional típicas de microorganismos, esto permitió discutir el efecto de la solución nutritiva en cuatro días representativos (días 9, 17, 25 y 31) del crecimiento poblacional. Durante estos cuatro días no se detectaron diferencias que pudieran indicar alguna tendencia o efecto de la concentración de la solución nutritiva sobre la producción de biomasa, ni sobre el contenido de proteínas solubles, hidratos de carbonos, clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides, durante el periodo de cultivo. La capacidad antioxidante tampoco se vio afectada por las distintas concentraciones de la solución nutritiva.

Sobre la base de los resultados anteriores, se podría sugerir que el mejor momento para cosechar microalgas con fines comerciales correspondería el día 25, el cuál se sitúa hacia el final de la fase de crecimiento exponencial. Durante dicho día el tratamiento con la menor concentración de la solución nutritiva no presentó diferencias en biomasa fresca producida, contenido de proteínas solubles y carotenoides, como tampoco en capacidad antioxidante, en comparación con los otros tratamientos.

De acuerdo a los resultados se puede concluir que las cinco concentraciones de la solución nutritiva permiten un adecuado crecimiento en *Chlamydomonas*, satisfaciendo sus requerimientos nutricionales para producción de biomasa fresca y de biomoléculas de interés comercial.

Palabras claves: Microalgas - Solución nutritiva - Biomasa fresca - Biomoléculas - Capacidad antioxidante.

ABSTRACT**Effect of nutritive solution concentration on the biomass of microalgae
*Chlamydomonas***

In this study was evaluated the effect of Hoagland and Arnon II nutrient solution in the production of fresh biomass, biomolecules content and the antioxidant capacity of the microalgae *Chlamydomonas*, genus that is commonly used as a research model system in cellular biology, however until now this studies didn't analyses the nutritional or economics point of view.

The population growing curves was used to analyze the effect of the nutrient solution in four days (9, 17, 25 and 31). The result didn't show effects of the nutrients solution application in the biomass production, soluble proteins, carbohydrates, chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, carotenoids and the antioxidant capacity. With this result I suggest the 25 day as the best harvest day of the microalgae with commercial purpose.

Finally, all treatment allowed an adequate growth of *Chlamydomonas*, fulfilled the nutritional requirements to fresh biomass and commercial biomolecules production.

Keywords: Microalgae - Nutrient solution - Fresh biomass - Biomolecules - Antioxidant capacity.

INTRODUCCIÓN

El término microalga no tiene sentido taxonómico alguno sino que engloba un grupo muy diversificado de microorganismos autótrofos oxigénicos, unicelulares o pluricelulares, procariontes o eucariontes (Torrentera y Tacón, 1989), y hace referencia a aquellos que contienen clorofila *a* y/u otro pigmento fotosintético similar. En este contexto, las cianobacterias o algas verde-azules se han considerado dentro del grupo de las microalgas, asimismo, quedan excluidas las bacterias fotosintéticas ya que no contienen clorofila *a* sino bacterioclorofila y realizan fotosíntesis anoxigénica (Reboloso-Fuentes *et al.*, 2001).

Corresponden a microorganismos fotosintéticos, y pese a las grandes diferencias estructurales entre microorganismos procariontes y eucariontes, fisiológicamente son muy parecidos, y poseen un metabolismo fotosintético similar al de las plantas superiores.

Al ser un grupo tan diversificado, las microalgas son muy variadas en tamaño y forma, y existen en casi todos los hábitats conocidos. La mayoría pertenece a hábitats acuáticos, tanto marinos como dulceacuícolas, ubicándose en las primeras capas de agua, hasta donde existe penetración de luz solar, mientras que otras viven en los suelos (estratos más superficiales) y rocas, e incluso en ambientes extremos como nieve y montañas, indicando una alta adaptabilidad biológica (Marxen *et al.*, 2005).

Microalgas: fuente de compuestos naturales

Las microalgas constituyen un grupo de microorganismos caracterizados por presentar gran diversidad metabólica y ser capaces de producir diferentes compuestos de importancia nutricional, farmacéutica e industrial (Hajimahmoodi *et al.*, 2010; Rosales-Loaiza, 2008; Ortega *et al.*, 2004).

Estos microorganismos son considerados como fuente de clorofila, carotenoides, ficobiliproteínas, proteínas, exopolisacáridos, ácidos grasos poliinsaturados y otros metabolitos biológicamente activos (Rosales-Loaiza *et al.*, 2008), potenciado por el hecho de poseer buen balance de aminoácidos y bajos valores de ácidos nucleicos en comparación con otras fuentes de proteína unicelular. Morris *et al.* (1999) señalan que *Chlorella vulgaris* presenta un contenido superior al 40% de proteína bruta, un 16% de carbohidratos, 9% de cenizas, 8,2% de fibra cruda, 5,7% de ácidos nucleicos y una concentración inferior al 1% de lípidos, en base a peso seco.

También reciben gran atención por sus propiedades antioxidantes (Jaime *et al.*, 2007; Miranda *et al.*, 1998) dado el creciente interés por reemplazar antioxidantes sintéticos por antioxidantes naturales, ya que se ha comprobado que los sintéticos son tóxicos y cancerígenos para animales y humanos (Li *et al.*, 2007; Jaime *et al.*, 2007).

El rol fisiológico que cumplen ciertos compuestos dentro de las microalgas, compuestos de interés para este ensayo, y su importancia comercial, se presentan a continuación:

Proteínas. Corresponden a uno de los principales componentes orgánicos de la biomasa microalgal, la que varía dentro de una misma especie según condiciones nutricionales, radiación PAR y temperatura a las que se somete el cultivo (Morris *et al.*, 1999). A nivel comercial *Chlorella* y *Chlamydomonas* son citadas como géneros empleados para la producción de proteínas y algunos aminoácidos específicos como triptofano, lisina y leucina (Andrade *et al.*, 2007; Morris *et al.*, 1999; Uribe, 1994).

Hidratos de carbono. Representan el producto primario de la fotosíntesis y actúan como principal producto de reserva. Junto a proteínas y lípidos, los hidratos de carbono son los principales componentes orgánicos de la biomasa microalgal, y varían según la especie, condiciones nutricionales, radiación PAR y temperatura de cultivo (Morris *et al.*, 1999). Desempeñan una importante función en la digestibilidad de la biomasa microalgal (Morris *et al.*, 1999).

Pigmentos fotosintéticos. Las clorofilas (clorofila *a* y clorofila *b*) son moléculas complejas finamente adaptadas a la absorción de luz, transferencia de energía y transferencia de electrones, funciones que cumplen durante la fotosíntesis (Taiz y Zeiger, 2002 b). La clorofila *a* es el principal pigmento fotosintético presente en las microalgas, el cual se complementa con la clorofila *b*, con el sistema de xantofilas y con carotenoides para captar energía luminosa, que luego de una compleja serie de reacciones se transforma en almidón.

El interés fundamental de las clorofilas radica en el color que confieren a los alimentos, siendo utilizadas como colorante natural y desde el punto de vista nutricional, por su contenido de magnesio. Actualmente se tienen reportes de que las microalgas *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Dunaliella viridis*, *Selenastrum*; *Euglena* y las cianobacterias *Spirulina* y *Anabaena* constituyen fuentes naturales de clorofilas (Ortega *et al.*, 2004).

Los carotenoides son pigmentos fotosintéticos auxiliares, y juegan un importante rol en la fotoprotección de la célula (Taiz y Zeiger, 2002 b), eliminando el exceso de energía antes de que ésta pueda dañar al microorganismo. Son pigmentos que están siendo cada vez más demandados por sus propiedades antioxidantes, por su eficiencia en la prevención de ciertas enfermedades del ser humano y como suplemento alimenticio, especialmente la luteína, que es uno de los carotenoides más utilizados.

Antioxidantes. Se refieren principalmente a pigmentos antioxidantes como clorofilas y β -carotenos (Hyun *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2008), a compuestos fenólicos como flavonoides y ácidos fenólicos, vitamina A, α -Tocoferol (vitamina E) y algunas enzimas, entre otros (Wang *et al.*, 2007). Esta capacidad se da ya que las microalgas se encuentran en permanente exposición a altos niveles de oxígeno y radicales libres, produciendo numerosos y eficientes compuestos químicos protectores contra estos agentes oxidantes para el microorganismo (Hajimahmoodi *et al.*, 2010).

Uso de microalgas en la industria alimentaria

La biomasa microalgal y sus compuestos derivados presentan un gran potencial de utilización en alimentación animal, acuicultura y nutrición humana, como también en productos para la salud (Li *et al.*, 2007), conservación de alimentos y en la industria de cosméticos (Vidal *et al.*, 2001). Los principales usos que se les ha dado a las microalgas en relación a alimentación y nutrición se presentan a continuación:

- Representan la principal fuente de alimento de organismos marinos comerciales, como larvas u organismos adultos filtradores (bivalvos) utilizados en acuicultura (Uribe, 1994).
- Se utilizan como alimento en el cultivo masivo de zooplancton (rotíferos, copépodos y artemia-salina), de manera que los nutrientes esenciales contenidos en las microalgas pasen al zooplancton y posteriormente a organismos de cultivo (Reboloso *et al.*, 2000) como crustáceos, moluscos, equinodermos y peces (Uribe, 1994).
- En alimentación animal se proporciona como complemento dietético, sustituyendo a fuentes de proteínas tradicionales como la soya, salvado de cereales y harina de pescado. Se han utilizado en alimentación de aves, cerdos y rumiantes (Becker, 1994 a). Los carotenoides, por ejemplo, están siendo cada vez más demandados por la industria agroalimentaria, ya que son utilizados como suplemento alimenticio para aves (Martínez, 2003).
- En alimentación humana, las microalgas se cultivan masivamente para ser adicionadas en pastas alimenticias y en alimentos preparados para mejorar su perfil nutritivo (Reboloso *et al.*, 2000). Se han generado numerosos estudios sobre la ingesta de carotenoides en alimentación humana o en forma de suplementos, y se ha demostrado ser beneficiosa sobre distintos sistemas, órganos y tejidos, además de aportar energía y colaborar con el metabolismo general del cuerpo humano (Martínez, 2003).

Con respecto a salud humana, estos microorganismos son considerados como potencial fuente de antioxidantes naturales, utilizados por el ser humano para prevenir o disminuir el daño oxidativo causado por el efecto del oxígeno reactivo sobre los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, lo que podría conllevar a enfermedades crónicas tales como enfermedades coronarias, cáncer y envejecimiento (Li *et al.*, 2007; Piñero *et al.*, 2001), patologías que en cierta manera se podrían prevenir, lo que demuestra que los antioxidantes tienen un importante efecto beneficioso sobre la salud humana (Cepoi *et al.*, 2009; Jaime *et al.*, 2007).

Factores que influyen en la producción de compuestos naturales

La capacidad de producir compuestos de interés comercial depende de la especie microalgal, de sus características fisiológicas y de las condiciones de cultivo. Esta variabilidad permite alterar o potenciar la composición bioquímica de las microalgas según lo que se busque obtener de ellas.

Para mejorar la eficiencia en cuanto a la producción de pigmentos, proteínas o de metabolitos con actividad biológica, es necesario optimizar el crecimiento de las microalgas en función de la temperatura, intensidad lumínica, fotoperiodo, salinidad, oxigenación, régimen de cosecha, manipulación genética, tipo y concentración de nutrientes (Ortega *et al.*, 2004; Tzovenis *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 1997; Uribe, 1994; Álvarez, 1994). De esta manera, se establecen cultivos dirigidos a la obtención de biomasa fresca enriquecida con compuestos de interés comercial.

En relación al factor nutricional, es conocida la necesidad de aportar nutrientes minerales y otros requerimientos para el crecimiento de las microalgas, ya que este puede ser limitado por bajos niveles de nutrientes inorgánicos. En términos generales, son macronutrientes o nutrientes limitantes del crecimiento: carbono, nitrógeno, fósforo, silicio, magnesio, potasio y calcio, los cuales se requieren en cantidades relativamente altas en comparación a los micronutrientes, hierro, manganeso, cobre, zinc, sodio, molibdeno, cloro y cobalto, los que se necesitan en menores cantidades (Chisti, 2007).

Las necesidades y exigencias nutricionales de las microalgas dependen de muchos factores, como volumen de producción de biomasa, intensidad lumínica, pH y especie a cultivar, entre otros (Torretera y Tacon, 1989).

Alteraciones en la concentración de nutrientes altera la composición bioquímica de las microalgas (Sivonen, 1990). Abalde *et al.* (1995) plantean que deficiencias de algunos nutrientes, como hierro, nitrógeno y magnesio inhiben la síntesis y acumulación de clorofila. En otro estudio, Andrade *et al.* (2007) establecen que al cultivar microalgas *Chlorella vulgaris* hasta ciertos niveles nutricionales, aumenta el contenido de proteína bruta en comparación con una nula fertilización (hasta cierta concentración de fertilizante).

Se han desarrollado diferentes formulaciones de soluciones nutritivas para el cultivo de microalgas, mediante las cuales se suministran todos los elementos esenciales para el desarrollo del ciclo vital de estos microorganismos. También se incluyen aquellos iones que, aunque no son vitales para las microalgas, se encuentran en el agua, por lo tanto se deben tomar en cuenta para la formulación de las soluciones.

Una de ellas es la solución nutritiva de Hoagland y Arnon II (Hoagland y Arnon, 1950) modificada, la cual contiene todos los elementos esenciales para el crecimiento celular microalgal. En esta solución nutritiva, las concentraciones de los elementos minerales son máximas sin provocar síntomas de toxicidad o estrés salino. Los niveles nutricionales iniciales en el medio permiten el cultivo de microalgas durante varios días sin necesidad de reemplazar los nutrientes (Taiz y Zeiger, 2002 a).

Otra propiedad importante de esta solución es que el nitrógeno es aportado como amonio (NH_4^+) y nitrato (NO_3^-). El aporte de nitrógeno en un equilibrio mixto de cationes y aniones tiende a reducir el rápido aumento de pH del medio que normalmente se observa cuando el nitrógeno se aporta sólo como anión nitrato (Taiz y Zeiger, 2002 a).

El pH de la solución nutritiva es una propiedad inherente de la composición mineral, y su óptimo se encuentra entre 5,5 y 6,0 ya que aumenta la solubilidad de sulfatos y fosfatos (Taiz y Zeiger, 2002 a), por ejemplo del H_2PO_4^- , principal forma en que el fósforo es absorbido por las microalgas; entre estos valores de pH también se evita la precipitación de Fe^{++} , Mn^{++} , Ca^{++} y Mg^{++} (Lara, 2000).

Microalgas del género *Chlamydomonas*

Las microalgas y sus compuestos derivados se están produciendo a nivel mundial, sin embargo, se estima que solo un 10% de las especies existentes han sido estudiadas con la finalidad de conocer su fisiología, perfil bioquímico y potencialidad de uso (Molina *et al.*, 2007; Reboloso-Fuentes *et al.*, 2001). Además, las microalgas representan un recurso casi sin explotar en cuanto a antioxidantes naturales dado su enorme biodiversidad, mucho mayor que la de plantas superiores. Pero no todos los grupos de microalgas pueden ser usados como fuentes naturales de antioxidantes debido a diversos factores.

El género *Chlamydomonas* corresponde a microalgas verdes de agua dulce, eucariontes unicelulares flageladas pertenecientes a la división Chlorophyta (Anexo I), que son utilizadas como sistemas modelo de investigaciones de fisiología celular y biología molecular, por ejemplo, investigaciones en movimiento celular, biosíntesis de organelos, respuesta a estímulos ambientales, funcionamiento de la fotosíntesis, entre otros aspectos de biología celular (Chlamydomonas Center, 2010; Harris, 1998), pero se han generado escasos estudios acerca de sus potencialidades nutricionales y alternativas comerciales.

Chlamydomonas presenta un ciclo de vida simple, fácilmente manipulable en laboratorio, tienen un mínimo requerimiento nutricional y un rápido crecimiento (Harris, 1998), son fácilmente cultivadas en soluciones nutritivas o en medios de agar con pH neutro (Kosourov *et al.*, 2003; Visviki, 2000), y no requieren suplementos vitamínicos o algún otro co-factor. La temperatura óptima de cultivo de estas microalgas va entre 20 y 25°C, y un fotoperiodo de 12:12, 14:10 ó 16:8 horas. Las horas de oscuridad son muy importantes

ya que las células realizan rápidas divisiones mitóticas durante la fase de oscuridad (Harris, 2001).

En un estudio previo realizado en el Laboratorio de Horticultura e Hidroponía de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, Cáceres (2009) determinó que microalgas del género *Chlamydomonas* predominaron en su mayoría en cultivos hidropónicos y presentaron mayor contenido de proteína total en relación a otras microalgas también presentes en estos cultivos, como microalgas del género *Chlorella* y *Monoraphidium*, a pesar de haber obtenido valores intermedios de densidad celular y clorofila total, indicando gran eficiencia en cuanto a la producción de proteínas por estas microalgas. Estos resultados sumados a antecedentes que señalan que microalgas del género *Chlamydomonas*, como *C. nivalis*, han sido estudiadas con respecto a su capacidad antioxidante y se ha demostrado preliminarmente que representan una potencial fuente de antioxidantes naturales (Li *et al.*, 2007), ha llevado a seleccionar a esta microalga como organismo experimental para el desarrollo de este estudio.

Por esto, y porque presentan la capacidad de producir compuestos de interés comercial, sería interesante estudiar a microalgas del género *Chlamydomonas* en relación a la biomasa fresca producida, al contenido de proteína soluble, carbohidratos solubles y al contenido de pigmentos fotosintéticos presentes en la biomasa fresca, modificando el factor nutricional (aumentando o disminuyendo la concentración de la solución nutritiva), a modo de información nutricional para determinar su posible uso en la industria alimentaria.

Hipótesis

A mayor concentración de nutrientes, manteniendo la relación de iones, aumenta la formación de biomoléculas y la capacidad antioxidante en el cultivo de microalgas del género *Chlamydomonas*.

Objetivos

1. Evaluar el crecimiento (biomasa fresca) de microalgas del género *Chlamydomonas* cultivadas en una solución nutritiva con distintas concentraciones.
2. Determinar la evolución de los contenidos de las principales biomoléculas solubles: proteínas, hidratos de carbono y pigmentos fotosintéticos (clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides totales) de microalgas del género *Chlamydomonas*.
3. Medir la capacidad antioxidante de microalgas del género *Chlamydomonas*.

MATERIALES Y MÉTODO

Lugar de estudio

El cultivo de microalgas se realizó en el Laboratorio de Hidroponía y Horticultura, y los análisis químicos en el Laboratorio de Bioquímica, ambos laboratorios pertenecientes al Departamento de Producción Agrícola de la Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. El ensayo se realizó entre mayo y noviembre del año 2009.

Aislamiento del material microalgal

Las muestras de agua utilizadas en la búsqueda de *Chlamydomonas* se colectaron del estanque de acumulación de agua para riego y de dos sistemas hidropónicos: sistemas de raíz flotante y NFT modificado, presentes en la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

Se colectaron 150 mL de material microalgal en matraces Erlenmeyer de 300 mL a los cuales se les agregó 50 mL de solución nutritiva de Hoagland y Arnon II modificada estéril (Cuadro 1) y se mantuvieron en una cámara de cultivo acondicionada para el crecimiento de microalgas.

Cuadro 1. Composición de la solución nutritiva de Hoagland y Arnon II modificada.

Fertilizante	Fórmula	Peso molecular	Concentración en la solución	Concentración en la solución
Macronutrientes		g mol⁻¹	mg L⁻¹ (ppm)	mM
Nitrato de Amonio	NH ₄ NO ₃	32,05	249,81	7,80
Nitrato de Potasio	KNO ₃	101,11	223,84	2,21
Fosfato Monopotásico	PO ₄ H ₂ K	136,09	264,49	1,94
Nitrato de Calcio	Ca(NO ₃) ₂	350,11	158,95	0,45
Micronutrientes		g mol⁻¹	mg L⁻¹ (ppm)	μM
Quelato de Hierro	Fe-EDDHA (6% Fe)	435,20	36,67	842,52
Cloruro de Manganeseo	MnCl ₂ + 2H ₂ O	161,87	1,08	66,66
Sulfato de Cobre	CuSO ₄ + 5H ₂ O	249,68	0,08	3,14
Sulfato de Zinc	ZnSO ₄ + 7H ₂ O	287,54	0,04	1,53
Molibdato de Amonio	(NH ₄) ₆ Mo ₂ O ₂₄ + 4H ₂ O	756,16	0,05	0,69

Dicha cámara de cultivo estaba equipada con 8 lámparas fluorescentes luz día-fría (F40T10RS, General Electric, Connecticut, USA) de 36 W, cuya intensidad de radiación fotosintéticamente activa (PAR) se midió a 15 y 30 cm de las fuentes lumínicas laterales y superiores, respectivamente. Este parámetro se midió con un radiómetro LI-COR 185A (Hesse, Germany).

Para regular y homogeneizar la temperatura ambiental se contó con un ventilador (TMV 2000, Telstar, USA) y con un calefactor eléctrico (HVE-332, DeLonghi, Treviso, Italy). El ventilador se encendió automáticamente entre las 10.00 y 19.00 hrs. El calefactor, mediante sensor de temperatura, se activó cuando ésta bajaba de los 19°C. Se realizaron registros diarios de temperaturas máximas y mínimas usando un termómetro de mercurio.

Las muestras con material microalgal se dejaron crecer en la cámara de cultivo por cuatro días y se procedió al aislamiento, proceso necesario para obtener un cultivo unialgal. Este proceso se llevó a cabo mediante la combinación de dos métodos: rayado en agar y dilución seriada (Cáceres, 2009; Almaguer *et al.*, 2004; Álvarez, 1994).

Ambos métodos se realizaron asépticamente en una cámara de flujo laminar (LaminAir®, Heraeus Instruments, Hanau, Germany) y todos los materiales se esterilizaron previamente mediante autoclave (Speedy Autoclave Vertil Typ HL 341 Huxley, USA) a 121 psi durante 20 minutos (Cáceres, 2009; Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2002)

Rayado en agar

Se utilizaron placas Petri de vidrio de 100 x 20 mm (estériles) con solución nutritiva Hoagland y Arnon II modificada con 1% p/v de agar (MP Biomedicals, France) hasta completar 2/3 de la altura útil de la placa.

En las placas con agar se colocó una gota de material microalgal. Mediante un asa metálica esterilizada se rayó en zig-zag en forma superficial, tal como se muestra en la Figura 1. Las placas se sellaron con Parafilm (WI 54952, Pechiney Plastic Packaging, USA) para evitar contaminación externa, y se mantuvieron durante cinco días en la cámara de cultivo.

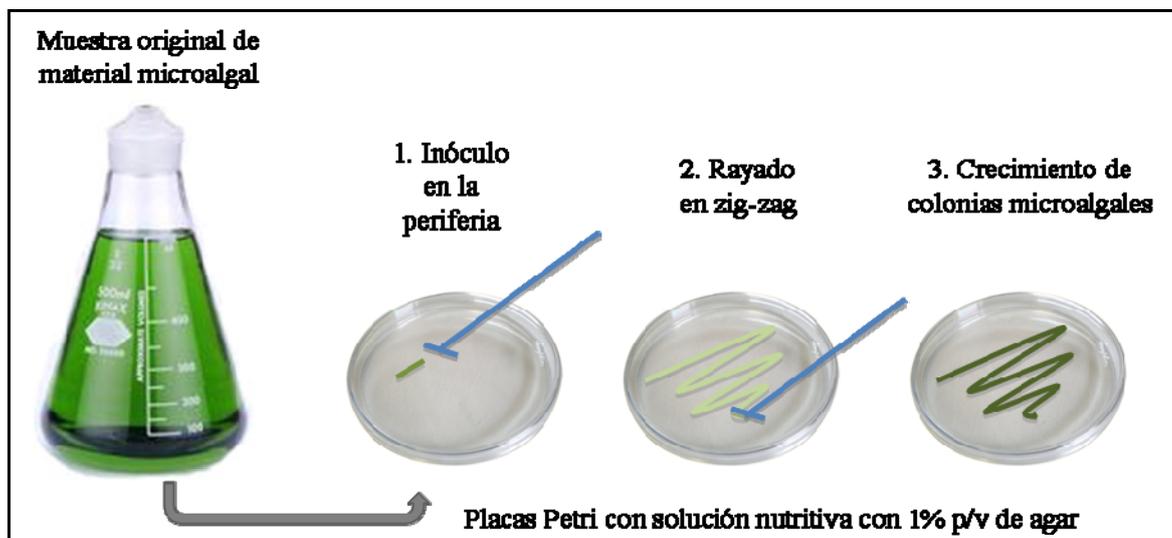


Figura 1. Diagrama del procedimiento de rayado en agar utilizado para la aislación de *Chlamydomonas*.

Una vez desarrolladas las distintas colonias, mediante un asa metálica se tomaron muestras de estas para ser observadas mediante microscopio triocular (L1200B, Carl Zeiss, Germany). Esto permitió seleccionar colonias que presentaron el mayor contenido de *Chlamydomonas* para seguir con el proceso.

Dilución seriada

Para este procedimiento se utilizaron tubos de ensayo de 18 x 100 mm, en cuyo extremo se dispuso de algodón hidrófilo cubierto por gasa.

A un tubo que contenía 1 mL de solución nutritiva de Hoagland y Arnon II modificada estéril se transfirió la colonia aislada de la placa Petri, luego los tubos se mantuvieron durante cuatro días en la cámara de cultivo. El tubo se agitó manualmente periódicamente para su oxigenación.

A los cuatro días, cuando la solución microalgal contenida en el tubo presentó una coloración verde claro, se transfirió 0,1 mL a un nuevo tubo con 0,9 mL de solución nutritiva generándose una dilución de 10 veces. Este procedimiento se repitió seis veces hasta obtener una colonia unialgal en una dilución de $1:10^6$ (Figura 2).

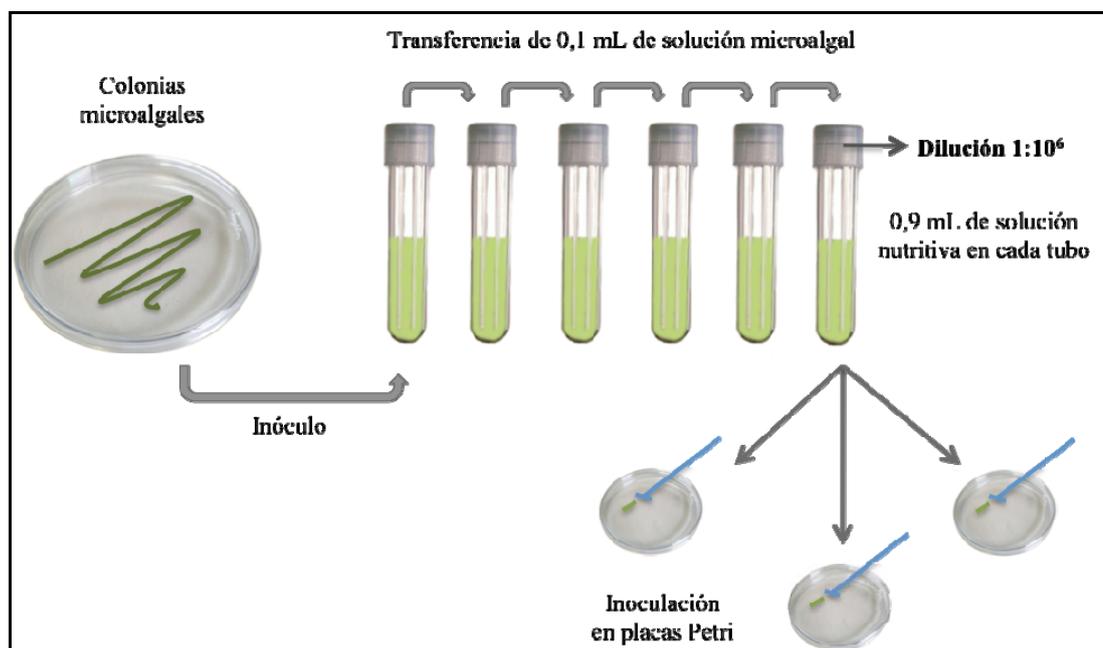


Figura 2. Diagrama del procedimiento de dilución seriada utilizado para la aislación de *Chlamydomonas*.

De cada tubo de esta dilución seriada se sacaron tres muestras que fueron nuevamente rayadas en agar para visualizar y ratificar las colonias de *Chlamydomonas*.

Reconocimiento de la microalga aislada

Cada muestra obtenida del proceso de aislamiento se observó mediante microscopio triocular (L1200B, Carl Zeiss, Jena, Germany) con aumento 100X y aceite de inmersión, y se tomaron fotografías con una cámara fotográfica digital (Olympus FE-280 8,0 Megapixel, Vietnam) para realizar la identificación de las microalgas aisladas utilizando las claves taxonómicas de Harris (2001) y Lee (1999).

Cultivo de *Chlamydomonas* aisladas

Aumento de volumen de *Chlamydomonas*

A partir del tubo que contenía la dilución 1:10⁶ del proceso de dilución seriada se realizó un aumento progresivo del volumen (Almaguer *et al.*, 2004; López-Elías *et al.*, 2004) de las *Chlamydomonas* aisladas para su posterior cultivo en tubos de ensayo y luego en matraces Erlenmeyer de 500 mL.

Partiendo de 1 mL de solución microalgal se fue adicionando solución nutritiva de Hoagland y Arnon II modificada cada tres días, tal como se muestra secuencialmente en la Figura 3, hasta obtener 64 mL de solución microalgal, volumen necesario para comenzar la producción de *Chlamydomonas* en tubos de ensayo.

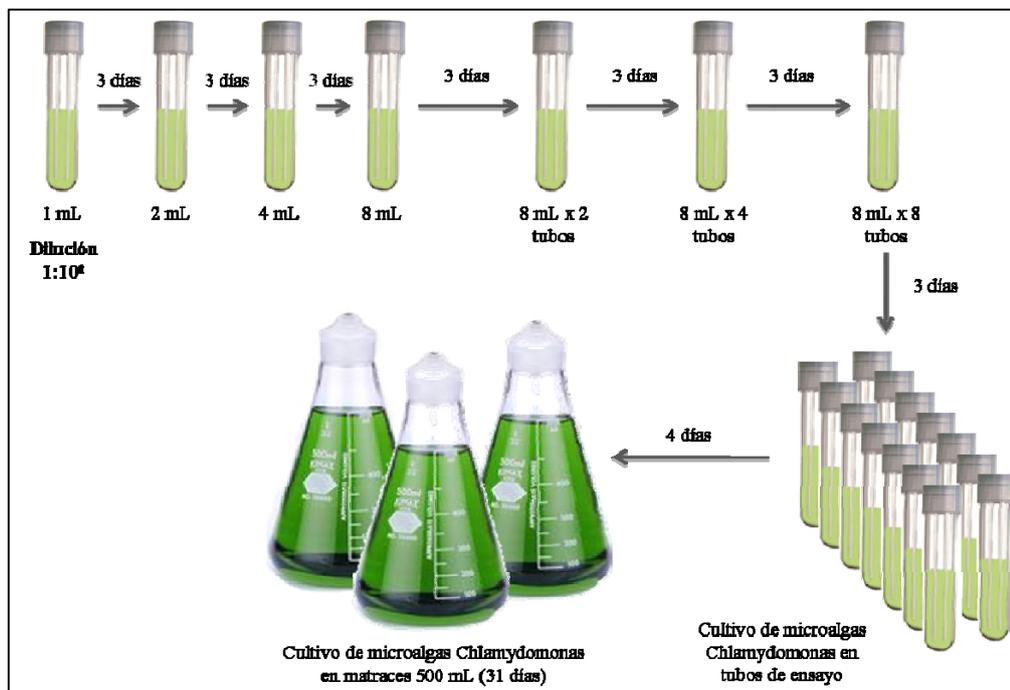


Figura 3. Diagrama representativo del aumento de volumen, con incorporación de solución nutritiva, para el cultivo de *Chlamydomonas* aisladas.

Durante todo el proceso, los tubos fueron dispuestos en la cámara de cultivo y se agitaron manualmente periódicamente para renovar la posición de las células y favorecer la oxigenación de la solución nutritiva.

Cultivo de *Chlamydomonas* en tubos de ensayo

El cultivo se inició con la inoculación en 26 tubos de ensayo estériles, transfiriéndose aseptícamente un volumen de 2 mL de solución microalgal que contenía $34,2 \pm 15$ mg de *Chlamydomonas* y 3 mL de solución nutritiva, manteniéndose durante cuatro días en la cámara de cultivo (Figura 4).



Figura 4. Cultivo de *Chlamydomonas* en tubos de ensayo después de cuatro días en la cámara de cultivo.

Durante esta etapa los tubos se agitaron manualmente periódicamente para renovar la posición de las células y así evitar autosombreamiento y favorecer la oxigenación de la solución nutritiva, la cual presentó un pH de $6,16 \pm 0,11$ y una conductividad eléctrica de $2,42 \pm 0,2$ dS m^{-1} a 25 °C.

Cultivo de *Chlamydomonas* en matraces Erlenmeyer

El cultivo obtenido al finalizar el cultivo en tubos de ensayo fue transferido a matraces Erlenmeyer estériles de 500 mL. A éstos se transfirieron aseptícamente 5 mL de solución microalgal que contenía $88,43 \pm 1,95$ mg de *Chlamydomonas* y 250 mL de solución nutritiva correspondiente a cada tratamiento.

En esta etapa del cultivo se realizó el ensayo con cinco tratamientos relacionados con las distintas concentraciones de la solución nutritiva de Hoagland y Arnon II modificada (Cuadro 2), manteniendo la relación de iones.

Cuadro 2. Concentración de la solución nutritiva (tratamientos) del ensayo, con su respectiva conductividad eléctrica (C.E., dS m^{-1} a 25 °C) y pH.

Tratamientos	Solución de Hoagland y Arnon II modificada	pH inicial	pH ajustado	C.E. inicial	C.E. post-ajuste de pH
T ₁	al 25%	7,82	6,4	1,56	1,56
T ₂	al 50%	7,23	6,4	1,85	1,85
T ₃	al 100%	6,03	6,4	2,46	2,46
T ₄	al 150%	5,62	6,4	3,13	3,13
T ₅	al 200%	5,39	6,4	3,61	3,61

El pH de la solución nutritiva se ajustó a 6,4 en cada tratamiento empleando solución ácida (38% de ácido nítrico, 12% de ácido fosfórico y 50% agua destilada, v/v) para acidificar el medio e hidróxido de amonio al 25% v/v para alcalinizarlo.

Los matraces Erlenmeyer se establecieron en la cámara de cultivo durante 31 días. Durante todo el periodo se agitaron automáticamente mediante una bomba de aire (Aquadine 12000, USA) y mangueras de silicona cinco veces al día durante 15 minutos cada vez (Figura 5).



Figura 5. Cultivo de *Chlamydomonas* en matraces Erlenmeyer de 500 mL después de 31 días en la cámara de cultivo.

La transferencia de microalgas se realizó asépticamente en una cámara de flujo laminar (LaminAir®, Heraeus Instruments, Germany) y todos los materiales se esterilizaron previamente mediante autoclave (Speedy Autoclave Vertil Typ HL 341 Huxley, USA) a 121 psi durante 20 minutos (Cáceres, 2009; Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2002).

Evaluaciones

Durante los 31 días de cultivo de *Chlamydomonas* se realizaron muestreos día por medio, dando un total de 16 muestreos.

De cada matraz Erlenmeyer se extrajeron 5 muestras de 1,5 mL de solución microalgal cada una, las que se utilizaron para determinar producción de biomasa fresca, contenido de proteína soluble, carbohidratos solubles, clorofila *a*, clorofila *b*, carotenoides totales y capacidad antioxidante total.

Cuantificación de biomasa fresca

Las *Chlamydomonas* son microalgas móviles, por lo que resulta difícil cuantificar su crecimiento a través del conteo directo con cámaras de Neubauer, de modo que se recurrió directamente a la cuantificación de la biomasa fresca producida para determinar la evolución del crecimiento poblacional.

Para cuantificar la producción de biomasa fresca se sacaron 5 muestras de 1,5 mL de solución microalgal por cada matraz, siendo esta depositada en un tubo Eppendorf de 1,5 mL. Las muestras fueron centrifugadas a 10.000xg durante 10 minutos con una centrifuga (Centrifuge 5403, Eppendorf, Hamburgo, Germany), obteniéndose así una muestra compacta de células microalgales. Se eliminó el sobrenadante y la muestra compacta fue pesada mediante una balanza analítica (AAA 100L; Adam Equipment, Connecticut, EEUU).

Contenido de proteínas solubles

La concentración de proteínas solubles se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Para este análisis se empleó una de las muestras previamente utilizada para cuantificar la producción de biomasa fresca.

A la muestra compacta de microalgas se adicionó 0,5 mL de Buffer de Lisis (50 mM Tris – HCl pH 8,0, 8 M Urea, 30 mM DTT, 5 mM EDTA 1 % PVP, 1 mM PMSF) para ser macerado durante 1 minuto y luego centrifugado a 10.000xg por 10 minutos. Del sobrenadante se extrajo entre 20 y 100 μ L a los que se le agregaron entre 780 y 700 μ L de agua destilada, respectivamente, y 200 μ L de reactivo de Bradford. Luego, mediante espectrofotómetro (UV-1601; Shimadzu, Kyoto, Japan) se midió la absorbancia a 595 nm.

Se empleó seroalbúmina bovina (BSA) para realizar la curva estándar. El contenido de proteínas solubles se expresó como μ g mL⁻¹ y en mg gPF⁻¹.

Contenido de hidratos de carbono solubles

La concentración de hidratos de carbono solubles se determinó usando el método de Dubois *et al.* (1956). Para este análisis se empleó la segunda muestra previamente utilizada para cuantificar la producción de biomasa fresca.

La muestra compacta de microalgas se maceró con 100 μL de etanol al 80% (v/v), luego se calentó durante 10 minutos a 80°C. Posteriormente, se centrifugó a 10.000xg por 10 minutos con una centrifuga (Centrifuge 5403, Eppendorf, Hamburgo, Germany).

Se tomó 100 μL de 5% (v/v) de solución de fenol y 500 μL de ácido sulfúrico concentrado al 95% y se agregó 100 μL del extracto en etanol al 80% (v/v). Esta mezcla se calentó a 90°C por 20 minutos. Una vez enfriada a temperatura ambiente se midió la absorbancia a 490 nm con un espectrofotómetro (UV-1601; Shimadzu, Kyoto, Japan).

Para realizar la curva estándar se utilizó glucosa p.a. Los resultados se expresaron en $\mu\text{g mL}^{-1}$ y en mg gPF^{-1} .

Contenido de pigmentos fotosintéticos

Para determinar el contenido de clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides se empleó la tercera muestra previamente utilizada para cuantificar la producción de biomasa fresca.

La muestra compacta de microalgas fue macerada con 1 mL de etanol al 95% (v/v) y se centrifugó a 5.000xg por 5 minutos con una centrifuga (Centrifuge 5403, Eppendorf, Hamburgo, Germany). En el sobrenadante se midió la absorbancia a 665, 649 y 470 nm con un espectrofotómetro (UV-1601; Shimadzu, Kyoto, Japan).

El contenido de los pigmentos se calculó de acuerdo a las ecuaciones publicadas por Lichtenthaler y Wellburn (1983) y se expresaron como $\mu\text{g mL}^{-1}$ y en mg gPF^{-1} .

$$\text{Chl } a \text{ } (\mu\text{g/mL}) = 13,96 \times A_{665} - 6,88 \times A_{649}$$

$$\text{Chl } b \text{ } (\mu\text{g/mL}) = 24,96 \times A_{649} - 7,32 \times A_{665}$$

$$\text{C x+c } (\mu\text{g/mL}) = (1000 \times A_{470} - 2,05 \text{ Chl } a - 114,8 \times \text{Chl } b) / 245$$

Determinación de la capacidad antioxidante total

Para este análisis se empleó la cuarta muestra previamente utilizada para cuantificar la producción de biomasa fresca.

La muestra compacta de microalgas fue macerada con 100 μL de metanol 80% (v/v) y luego centrifugado a 15.000xg por 15 minutos con una centrifuga (Centrifuge 5403, Eppendorf, Hamburgo, Germany). El sobrenadante se consideró como la fracción

hidrofílica y fue traspasado a un nuevo tubo. Luego, el precipitado fue resuspendido con 100 μL de hexano, nuevamente macerado y centrifugado a 15000xg por 15 minutos, este segundo sobrenadante se consideró como la fracción liposoluble.

Ambas fracciones se utilizaron para determinar la capacidad antioxidante total por el método de decoloración del ABTS⁺ (2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (Re *et al.*, 1999). Para esto se tomó, para cada fracción, 50 μL de muestra del sobrenadante, 10 μL ABTS⁺ y 690 μL de etanol 20% (v/v). Se dejó reposar durante 6 minutos y luego se midió absorbancia a 490 nm con un espectrofotómetro (UV-1601; Shimadzu, Kyoto, Japan).

La curva estándar se realizó con Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid) y los resultados finales se expresaron como equivalentes de este radical (mg Trolox mL^{-1}) y como % de inhibición al ABTS⁺.

Análisis estadístico

El estudio se realizó bajo un diseño completamente al azar considerando cinco tratamientos y 20 repeticiones para estimar la biomasa fresca, y cuatro repeticiones para el caso de las biomoléculas y capacidad antioxidante. La unidad experimental correspondió a un matraz de 500 mL con 255 mL de solución microalgal y la unidad muestral fue de 1,5 mL de solución microalgal.

Los resultados se sometieron a un Análisis de Varianza (ANDEVA) y cuando se presentaron diferencias significativas se realizó un Análisis de Rango Múltiple SNK a un nivel de significancia del 5% ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Condiciones ambientales

Durante el aislamiento de *Chlamydomonas* y su posterior cultivo, la temperatura mínima correspondió a $19,8 \pm 1,3$ °C y la máxima $23,9 \pm 1,7$ °C. Se mantuvo un fotoperiodo de 12 horas, con una radiación PAR de $91,83 \pm 6,24$ $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

El pH de la solución nutritiva se ajustó periódicamente a 6,4, valor ideal para el cultivo de *Chlamydomonas* (Kosourov, 2003; Visviki, 2000), sin interferir con la solubilidad ni con la disponibilidad de nutrientes para el crecimiento y reproducción de estas microalgas (Taiz y Zeiger, 2002 a; Lara, 2000).

Aislamiento del material microalgal

Las adecuadas condiciones de fotoperiodo, temperaturas (mínimas y máximas) e intensidad lumínica mantenidas durante este ensayo, permitieron una rápida adaptación y reproducción de las *Chlamydomonas* en comparación al crecimiento de otros géneros de microalgas (Harris, 2001; Uribe 1994).

Sin embargo, durante el aislamiento de *Chlamydomonas* se visualizaron distintos tipos de microorganismos, pertenecientes principalmente a las divisiones Chlorophyta, Ciliophora, Euglenophyta y Chrysophyta. Algunas imágenes se pueden observar en la Figura 6.

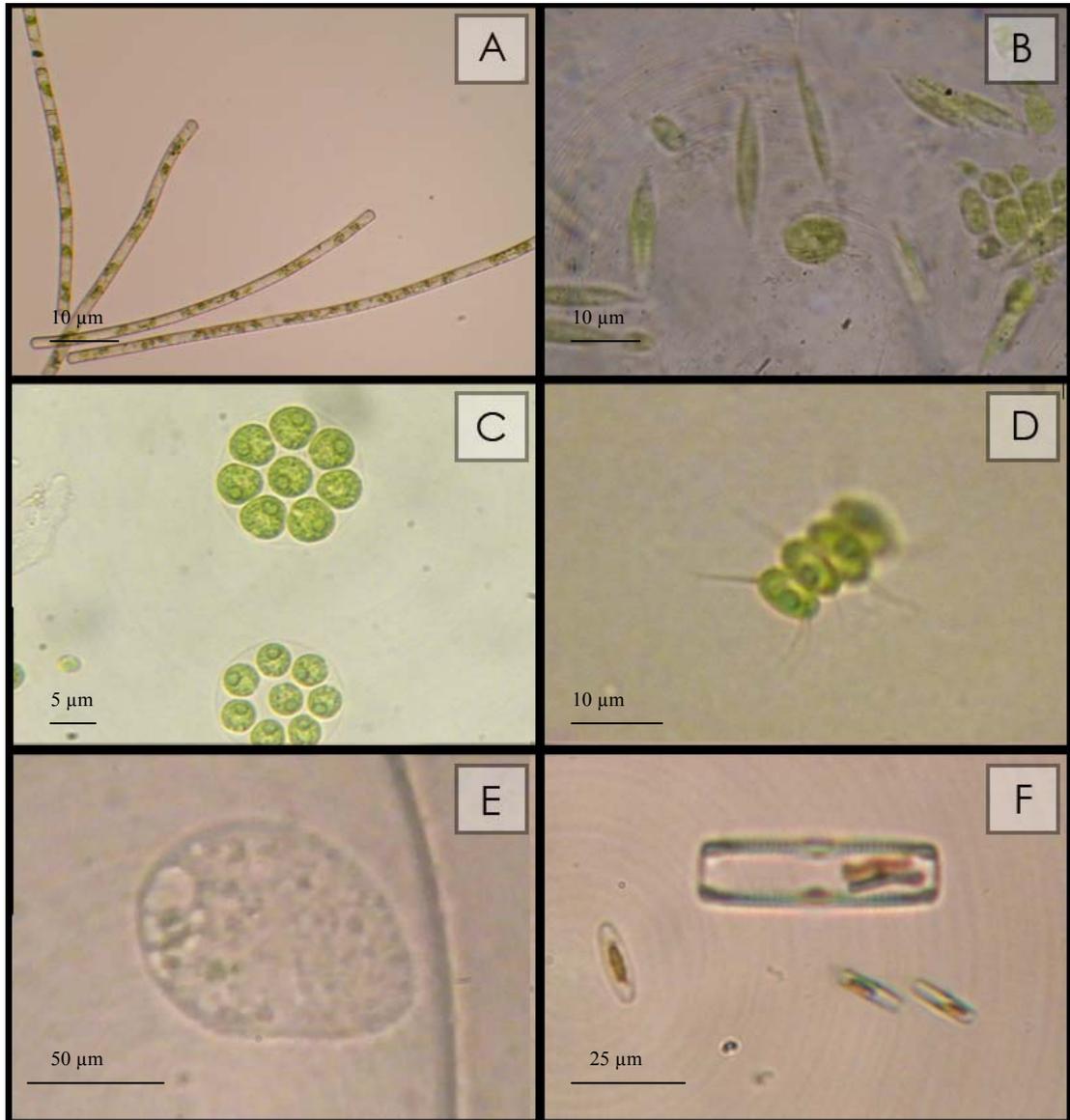


Figura 6. Microorganismos observados durante el aislamiento de *Chlamydomonas*. 100X. Divisiones Chlorophyta (A, B, C, D), Ciliophora (E) y Chrysophyta (F).

Rayado en agar

A los cinco días después de realizar el rayado en agar, se visualizaron las primeras colonias (Figura 7A), permitiendo prontamente un repique a nuevas placas con medio nutritivo (1% p/v de agar) o para seguir con el procedimiento de dilución seriada.

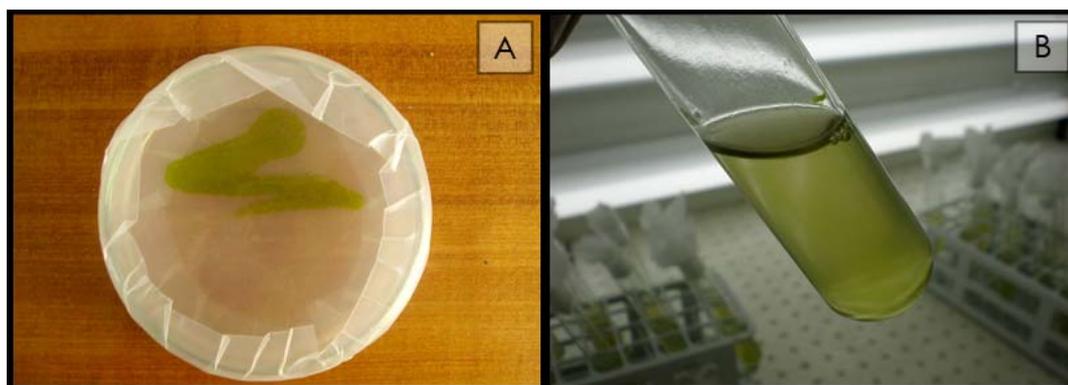


Figura 7. Crecimiento de microalgas durante el rayado en agar después de cinco días (A) y durante la dilución seriada a cuatro días en la cámara de cultivo (B).

Rayados sucesivos redujo la posibilidad de contaminación con bacterias y permitió aislar las *Chlamydomonas*. Cuando las muestras alcanzaban aproximadamente un 75% de *Chlamydomonas* por colonia observada, se consideró como colonia apta para ser transferida a tubos de ensayo con solución nutritiva para el proceso de dilución seriada.

Dilución seriada

En el caso de dilución seriada, las microalgas se dejaron crecer cuatro días entre cada repique, momento en que la solución microalgal contenida en el tubo ya presentaba coloración verde (Figura 7B). Este procedimiento se repitió seis veces hasta obtener una colonia al 98% de *Chlamydomonas*, porcentaje considerado aceptable para realizar el presente ensayo.

Reconocimiento taxonómico

Por la combinación de los métodos ya descritos, se logró aislar microalgas *Chlamydomonas*, obteniéndose un cultivo con 98% de representantes de estos microorganismos. La clasificación taxonómica de estas microalgas se presenta en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Clasificación taxonómica de *Chlamydomonas* según Lee, 1999.

Clasificación taxonómica	
Reino	Plantae
División	Chlorophyta
Clase	Chlorophyceae
Orden	Volvocales
Familia	Chlamydomonadaceae
Género	<i>Chlamydomonas</i>

El género *Chlamydomonas* puede distinguirse dado las características morfológicas particulares que presenta. Entre estas se encuentran: simetría radial con dos flagelos anteriores (10 a 12 μm de largo), son unicelulares móviles con un cloroplasto basal con forma de copa el cual rodea uno o más pirenoides (Harris, 2001; Lee, 1999). Las células son uninucleadas, con dos vacuolas contráctiles en la base de los flagelos y pueden o no presentar un estigma en el cloroplasto (Lee, 1999). Usualmente, el protoplasto se encuentra rodeado por una visible pared celular. Las *Chlamydomonas* presentan un diámetro polar aproximado de 10 μm , variando significativamente a través del ciclo celular (Harris, 2001).

Según las características visibles bajo microscopio óptico (Figura 8) y con claves taxonómicas (Harris, 2001; Lee, 1999), se logró identificar colonias pertenecientes a este género y así llegar a obtener un cultivo unialgal.

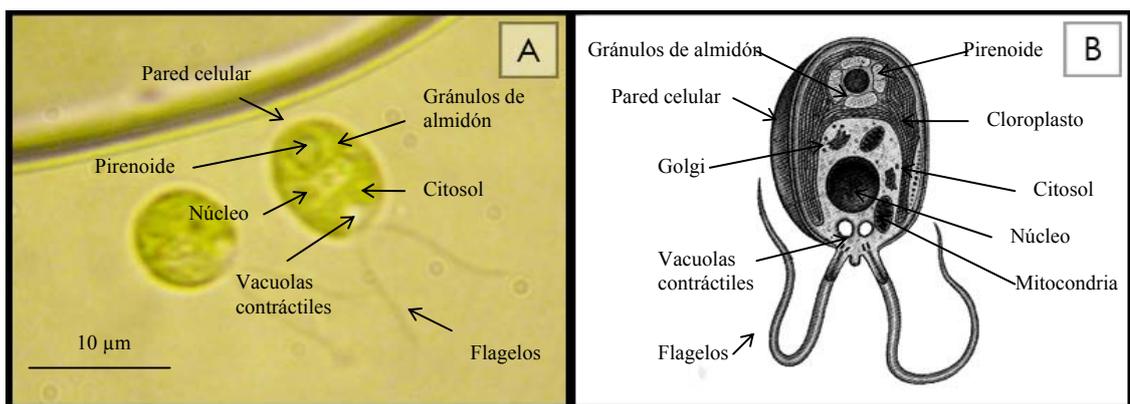


Figura 8. Estructuras celulares reconocidas durante el ensayo, 100X (Fotografía del autor) (A) y diagrama presentado por Jochem (2001) para el género *Chlamydomonas* (B).

Cuantificación de biomasa fresca

Crecimiento poblacional de *Chlamydomonas*

El crecimiento poblacional de las microalgas presentó la misma tendencia en los distintos tratamientos evaluados, lográndose diferenciar tres fases de crecimiento poblacional típicas de cultivos de microorganismos (Figura 9), tal como lo han observado González (2000), Loreto *et al.* (2003) y Uribe (1994). Las ecuaciones y R^2 de las curvas de tendencia se presentan en el Apéndice I.

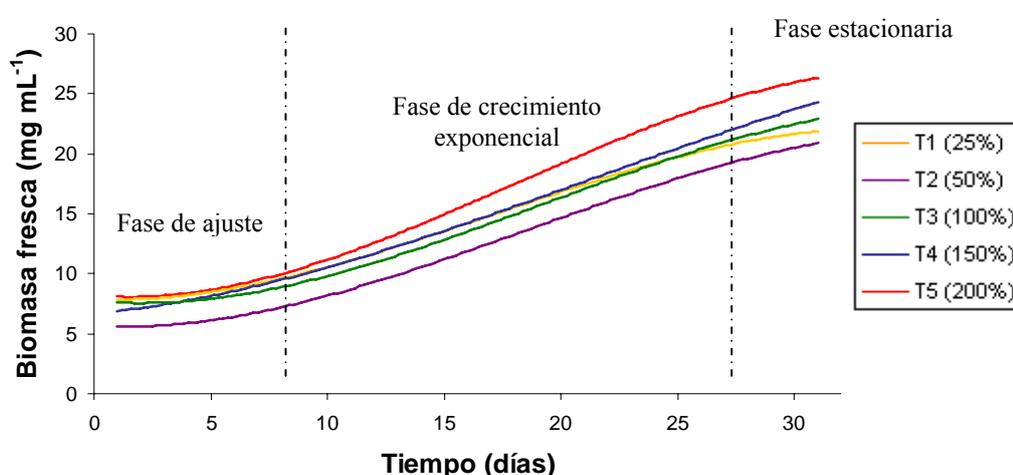


Figura 9. Curvas de crecimiento poblacional de *Chlamydomonas* cultivadas con distintas concentraciones de la solución nutritiva de Hoagland y Arnon II modificada.

Como se aprecia en la Figura 9, el crecimiento poblacional se inicia con una fase de ajuste que se extendió hasta el día 9, en donde se presentó una baja tasa de crecimiento en relación a las otras dos fases, tal como se aprecia en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Tasa de crecimiento media diaria obtenida por cada tratamiento durante las fases de crecimiento.

Tratamientos	Tasa de crecimiento (mg mL ⁻¹ d ⁻¹)		
	Ajuste	Exponencial	Estacionaria
T1 (25%)	-0,125	0,300	-0,142
T2 (50%)	-0,195	0,491	0,067
T3 (100%)	0,150	0,575	-0,292
T4 (150%)	0,035	0,597	0,300
T5 (200%)	-0,500	0,763	0,400

La fase de ajuste correspondió a un periodo de adaptación a las nuevas condiciones del medio tal como lo describen González (2000) y Uribe (1994) en donde la mayoría de las células estaban viables pero sin capacidad de dividirse rápidamente (Prieto *et al.*, 2005). Los valores negativos presentados durante esta fase se deben posiblemente a que las *Chlamydomonas*, durante la etapa de cultivo en tubos de ensayo, se cultivaron con solución nutritiva de Hoagland y Arnon II modificada con una concentración al 100%, y al ser transferidas a los matraces se generó un estrés nutricional que provocó la disminución de la biomasa fresca por diferencia de concentraciones, viéndose más pronunciado en T₅ (200%), tratamiento con la mayor concentración de la solución nutritiva.

Luego se presentó una fase de crecimiento exponencial (Figura 9) que duró 17 días, desde el día 10 al 26, en donde las células comenzaron a asimilar los nutrientes del medio y el proceso de reproducción se encontró activo, tal como lo señala González (2000). Como se puede apreciar en el Cuadro 4, en esta fase, la tasa de crecimiento es mayor que la tasa de crecimiento presentada en la fase de ajuste en los distintos tratamientos.

Una tercera fase se presentó a partir del día 27 (Figura 9), en donde no hubo incremento significativo de la población, siendo en algunos casos la tasa de crecimiento negativa (Cuadro 3). La curva tiende a estabilizarse debido, probablemente, a que las microalgas comienzan a interferirse entre sí en la captación de luz, tal como lo señala Álvarez (1994). En estas condiciones, la población comienza a disminuir el incremento poblacional entrando así en una fase estacionaria. Sin embargo, T₄ y T₅ (150 y 200%) presentaron una alta tasa de crecimiento en comparación con los tratamientos T₁, T₂ y T₃ (25, 50 y 100%), lo que podría deberse a que dichos tratamientos presentaron mayor concentración de nutrientes al inicio del cultivo (Anexo II), por lo que éstos podrían estar disponibles en mayor cantidad hacia el final del cultivo en comparación con los otros tratamientos.

Producción de biomasa fresca

En el Cuadro 5 se presenta la biomasa fresca obtenida en cuatro días representativos del crecimiento poblacional de *Chlamydomonas*. El día 9 representa el fin de la fase de ajuste, los días 17 y 25 representan el día intermedio y el día final de la fase de crecimiento exponencial, y el día 31 es el último día de cultivo de las microalgas.

Cuadro 5. Biomasa fresca producida durante cuatro días representativos del crecimiento poblacional de *Chlamydomonas*.

Trat.	Biomasa fresca (mg mL ⁻¹)							
	Día 9		Día 17		Día 25		Día 31	
T1 (25%)	08,08 ± 3,21	a	12,80 ± 1,50	a	19,05 ± 1,32	a	21,45 ± 2,54	ab
T2 (50%)	06,05 ± 1,00	a	07,93 ± 2,94	b	19,68 ± 1,31	a	19,95 ± 2,11	a
T3 (100%)	10,25 ± 1,70	a	10,13 ± 2,48	ab	19,83 ± 2,28	a	21,55 ± 3,51	ab
T4 (150%)	08,25 ± 1,52	a	10,03 ± 1,68	ab	21,20 ± 2,31	a	22,80 ± 0,67	ab
T5 (200%)	08,38 ± 1,53	a	12,50 ± 1,68	a	23,03 ± 2,11	a	25,68 ± 2,46	b

Letras distintas en sentido vertical indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos.

Como se observa en el Cuadro 5, durante el día 9 no se presentó diferencia significativa entre la biomasa fresca producida de cada tratamiento, lo que podría explicarse por lo siguiente: este día representa el final de la fase de ajuste y durante esta fase las microalgas se encontraban en un estado de adaptación a las nuevas condiciones del medio, sin comenzar aún con una alta tasa de crecimiento (Cuadro 3). El presentar o no mayor disponibilidad de nutrientes en la solución nutritiva, no estaría generando diferencias ya que las microalgas aún no asimilaban completamente el medio en el que se encontraban, fenómeno también observado por González (2000) y Uribe (1994).

Como también se aprecia en el Cuadro 5, los días 17 y 31 presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, pero estas diferencias no aluden alguna tendencia o efecto de la concentración de la solución nutritiva sobre la producción de biomasa fresca, lo que tampoco se observa el día 25, en donde no se presentaron diferencias entre los tratamientos. Estos resultados no concuerdan con la literatura ya que una mayor concentración de nutrientes implica una mayor concentración inicial de nitrógeno y fósforo (Apéndice II), principales nutrientes que influyen en el crecimiento de las microalgas según su disponibilidad y proporción, tal como lo mencionan Chisti (2007), Serpa y Calderón (2006) y Prieto *et al.* (2005).

La diferencia entre los resultados obtenidos con la literatura podría deberse a que durante el cultivo de las *Chlamydomonas* existió un adecuado nivel de nutrientes disponible en todos los tratamientos, permitiendo así un crecimiento celular similar, incluso al último día. Las microalgas habrían consumido sólo los nutrientes necesarios para su crecimiento, independiente de que existiera una mayor disponibilidad, basándose en los requerimientos nutricionales propios de la especie. Si este fuera el caso, eventualmente, los tratamientos con la menor concentración de la solución nutritiva podrían agotar sus nutrientes antes que los tratamientos con mayor concentración, por lo que posterior a esto se podrían presentar diferencias en la biomasa fresca producida, marcando así un efecto de la concentración de la solución nutritiva en el tiempo.

En la literatura no existen antecedentes concretos en cuanto a los requerimientos nutricionales de las microalgas, sólo una estimación, y menos aún para el caso particular de *Chlamydomonas*, pero se podría tener referencia de los requerimientos nutricionales basándose en antecedentes de otros ensayos con respecto a otras microalgas. Estos antecedentes no son comparables con *Chlamydomonas*, pero sí permiten tener una estimación de los niveles utilizados generalmente para el cultivo de estos microorganismos.

En el caso de *Anabaena* PCC 7120, Loreto *et al.* (2003) determinaron que una mayor producción de biomasa es estimulada por un aumento en la cantidad de nitrato disponible, sin embargo, estos autores trabajaron con concentraciones entre 0,044 y 0,175 mM de NO_3 al inicio del cultivo, valores bastante inferiores a los utilizados en el presente ensayo, los cuales fluctuaron entre 0,407 y 3,258 mM de NO_3 (Apéndice II) dependiendo del tratamiento. En otro estudio con *Synechococcus sp.*, Rosales *et al.* (2006) obtuvieron un comportamiento similar al presentado por *Anabaena* PCC 7120, estos autores estudiaron el

efecto del NO_3 , pero también a bajas concentraciones, entre 0 y 0,263 mM, por lo que se podría corroborar el hecho que durante el presente ensayo, las *Chlamydomonas* se cultivaron con un adecuado nivel de nitrógeno y otros nutrientes durante todo el cultivo dada la alta concentración inicial de NO_3 utilizada en relación a estos estudios.

El nitrógeno es el nutriente más importante en la producción de biomasa fresca, este influye en la tasa de producción fotosintética, en la tasa de división celular y en la composición celular, constituyendo entre el 1 y el 10% aproximadamente de la biomasa, dependiendo de la especie y de la disponibilidad de nitrógeno en el medio (Grobbelaar, 2004), así al aumentar la cantidad de nitrógeno disponible, principalmente como nitrato, se estimula una mayor producción de biomasa. Este comportamiento se ha observado también en algunas especies de microalgas como *Rhodomonas sp.* (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2005) y en cianobacterias *Synechococcus sp.* (Rosales *et al.*, 2006) y *Anabaena* PCC 7120 (Loreto *et al.*, 2003). Por otro lado, existen antecedentes donde se señala que déficit de nitrógeno en el medio produce una disminución del crecimiento, como lo demuestran trabajos realizados en cianobacterias *Oscillatoria agardhii* (Sivonen, 1990).

Otro nutriente que influye en la producción de biomasa es el fósforo, que juega un rol importante en procesos metabólicos celulares, mediante la formación de componentes estructurales y funcionales necesarios para el crecimiento y desarrollo de las microalgas, como transferencia de energía y síntesis de ácidos nucleicos, entre otros (Hu, 2004). Aunque la biomasa de microalgas contiene menos del 1% de fósforo, a menudo limita el crecimiento, ya que precipita fácilmente cuando interacciona con algunos iones, por ejemplo CO_2 y Fe^{+3} , quedando no disponible para su absorción por parte de las microalgas, tal como lo menciona Grobbelaar (2004).

Taiz y Zeiger (2002 b) señalan, que al igual que el fósforo, el potasio influye en la producción de biomasa. Este nutriente tiene una función importante en la regulación del potencial osmótico de las células vegetales, y es un activador de enzimas implicadas en respiración y fotosíntesis. Así como el potasio, el magnesio, manganeso y hierro, forman parte de reacciones químicas o cumplen alguna función dentro del metabolismo básico de la célula, por lo que un adecuado suministro de éstos nutrientes influiría positivamente en el crecimiento de las microalgas.

Al realizar cultivos microalgales de grandes volúmenes, con fines económicos, se debe tener presente que el mejor momento para realizar cosechas corresponde hacia el final de la fase de crecimiento exponencial (día 25) ya que las células se encuentran jóvenes y en activa división celular. Como ya se presentó, durante el día 25 no se presentaron diferencias en la biomasa fresca producida por los tratamientos, por lo que utilizar T_1 (25%), tratamiento con menor concentración de la solución nutritiva, constituye una alternativa si se utilizara la solución nutritiva de Hoagland y Arnon II modificada para la producción de microalgas.

Contenido de las principales biomoléculas

Proteínas solubles

En el Cuadro 6 se presentan los contenidos de proteínas solubles registrados durante los días 9, 17, 25 y 31 del crecimiento poblacional de *Chlamydomonas* por volumen de solución microalgal y su concentración en base a peso fresco.

Cuadro 6. Contenido de proteínas solubles ($\mu\text{g mL}^{-1}$) y su concentración en base a peso fresco (mg gPF^{-1}) registrado durante el cultivo de *Chlamydomonas*.

Trat.	Proteínas solubles							
	Día 9		Día 17		Día 25		Día 31	
	$\mu\text{g mL}^{-1}$							
T1 (25%)	25,6 ± 1,2	a	39,0 ± 4,5	a	66,4 ± 14,1	a	61,6 ± 20,2	a
T2 (50%)	21,7 ± 1,6	b	37,4 ± 5,8	a	50,9 ± 04,5	a	74,1 ± 14,0	ab
T3 (100%)	34,0 ± 1,7	c	45,6 ± 4,3	ab	59,8 ± 10,2	a	66,6 ± 11,6	ab
T4 (150%)	19,4 ± 2,7	d	52,7 ± 4,6	b	74,1 ± 07,2	a	81,4 ± 10,5	ab
T5 (200%)	21,6 ± 1,9	b	50,7 ± 6,2	b	65,5 ± 09,9	a	92,3 ± 6,49	b
	mg gPF^{-1}							
T1 (25%)	4,6 ± 1,2	a	5,8 ± 0,2	a	5,1 ± 0,9	a	4,6 ± 1,8	a
T2 (50%)	4,9 ± 1,7	a	6,6 ± 1,3	a	4,9 ± 1,3	a	5,6 ± 0,5	a
T3 (100%)	4,6 ± 0,8	a	6,3 ± 1,3	a	4,7 ± 1,1	a	4,7 ± 1,5	a
T4 (150%)	3,9 ± 1,4	a	7,1 ± 0,8	a	4,7 ± 0,7	a	5,3 ± 0,6	a
T5 (200%)	4,3 ± 1,5	a	6,6 ± 0,9	a	4,1 ± 0,4	a	5,4 ± 0,5	a

Letras distintas en sentido vertical indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos.

Como se observa en el Cuadro 6, hacia el final del cultivo el contenido de proteínas solubles ($\mu\text{g mL}^{-1}$) aumentó en todos los tratamientos estudiados. López-Elías *et al.* (2004) y Jonte *et al.* (2006) establecen una relación directa entre la producción de biomasa fresca y el contenido de proteínas.

Al analizar los contenidos de proteínas solubles ($\mu\text{g mL}^{-1}$) durante los cuatro días expuestos en el Cuadro 6, se observa que los tratamientos que presentaron mayor contenido de proteínas solubles fueron los siguientes: el día 9 fue T₃ (100%), con 34,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, siendo diferente a los otros tratamientos. El día 17 fue T₄ (150%), con 52,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$, siendo estadísticamente igual a T₃ y T₅ (100 y 200%, respectivamente). Durante el día 25 no se presentaron diferencias significativas, por lo que no hubo un tratamiento con mayor contenido de estas biomoléculas. Finalmente, durante el día 31, T₅ (200%) fue el tratamiento que presentó mayor contenido con 92,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$, siendo estadísticamente igual a T₂, T₃ y T₄ (25, 50 y 150%, respectivamente).

Estos resultados no aluden alguna relación entre la concentración de la solución nutritiva y el contenido de proteínas solubles ($\mu\text{g mL}^{-1}$) durante el periodo de cultivo, lo que también se observa en la concentración en base a peso fresco (mg gPF^{-1}) (Cuadro 6), ya que en ninguno de los días expuestos se presentaron diferencias, por lo que no se generó mayor acumulación de proteínas solubles en las células en algún tratamiento en particular.

Este comportamiento no concuerda con el presentado por microalgas *Scenedesmus sp.* (Quevedo *et al.*, 2008) en donde una mayor concentración de nutrientes en el medio, especialmente nitrógeno, da como resultado mayor contenido de proteínas solubles, lo que también se ha observado en las cianobacterias *Synechococcus sp.* (Rosales *et al.*, 2006), *Anabaena* PCC 7120 (Loreto *et al.*, 2003) y en *Chroococcidiopsis sp.* (Billi y Grilli, 1996). Por otro lado, Kilham *et al.* (1997) obtuvieron bajos niveles de proteínas en microalgas *Ankistrodesmus falcatus* en medios con limitada disponibilidad de nitrógeno.

En el caso de *Scenedesmus sp.*, las microalgas se cultivaron en un sistema de producción con reposición de células, y a los 40 días se presentaron $138,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de proteínas con una mayor concentración de la solución nutritiva (139 ppm de nitrógeno total y 19 ppm de fósforo) en comparación con el tratamiento que presentó la menor concentración de nutrientes (con 19 ppm de nitrógeno total y 0,02 ppm de fósforo) que obtuvo $78,8 \mu\text{g mL}^{-1}$.

La diferencia entre lo obtenido por Quevedo *et al.* (2008) y el presente ensayo radica en la diferencia de concentraciones utilizadas para el cultivo de las microalgas. La máxima concentración utilizada por Quevedo *et al.* (2008) en cuanto a nitrógeno total y fósforo (139 y 19 ppm, respectivamente) se encuentra dentro del rango de nutrientes utilizado en este ensayo (Apéndice II), el que va entre 36,48 y 291,84 ppm de nitrógeno total y entre 15 y 120 ppm de fósforo, acercándose más a los valores de los tratamientos con la menor concentración de la solución nutritiva, lo que hace suponer que durante el presente ensayo, en todos los tratamientos las microalgas se cultivaron en medios en donde los nutrientes estuvieron disponibles en niveles suficientes para la producción de proteínas solubles.

Si este fuera el caso, podría existir un efecto de la concentración de la solución nutritiva en el tiempo, ya que los tratamientos con menor concentración agotarían anticipadamente los nutrientes en relación a los tratamientos con mayor concentración, lo que provocaría algún efecto sobre el contenido de proteína soluble de esas microalgas.

El nitrógeno y el azufre son importantes para la producción de proteínas solubles, ya que forman parte de un gran número de compuestos orgánicos como aminoácidos, amidas, proteínas, ácidos nucleicos, nucleótidos y coenzimas, tal como lo señalan Taiz y Zeiger (2002 b), González (2000) y Becker (1994 b). Según Hu (2004), el nitrógeno es un constituyente esencial en la estructura y funcionalidad de proteínas en microalgas unicelulares, de manera que para su producción es necesario nitrógeno en cantidades suficientes, tal como lo menciona Becker (1994 b). Por otro lado, la deficiencia de nitrógeno induce una baja producción de proteínas solubles y genera un proceso de degradación, a fin de movilizar este nutriente hacia rutas metabólicas inherentes al crecimiento y síntesis de otras macromoléculas (Lewitus y Caron, 1990).

Si se quisiera obtener una biomasa con alto contenido de proteínas solubles con fines comerciales, se deberían realizar cosechas hacia el final de la fase de crecimiento exponencial de la población microalgal, ya que en ese momento existe un alto contenido de estas biomoléculas. Durante el día 25, último día de la fase de crecimiento exponencial, no se presentaron diferencias entre el contenido de proteínas solubles de los tratamientos, por lo que utilizar T₁ (25%) es una alternativa si se utilizara la solución nutritiva de Hoagland y Arnon II modificada para la producción de microalgas.

Hidratos de carbono solubles

En el Cuadro 7 se presentan los contenidos de hidratos de carbono registrados durante los días 9, 17, 25 y 31 del crecimiento poblacional de *Chlamydomonas* por volumen de solución microalgal y su concentración en base a peso fresco.

Cuadro 7. Contenido de hidratos de carbono solubles ($\mu\text{g mL}^{-1}$) y su concentración en base a peso fresco (mg gPF^{-1}) registrado durante el cultivo de *Chlamydomonas*.

Trat.	Hidratos de carbono solubles							
	Día 9		Día 17		Día 25		Día 31	
	$\mu\text{g mL}^{-1}$							
T1 (25%)	41,9 ± 13,0	a	102,4 ± 008,8	a	751,5 ± 225,1	a	1775,9 ± 736,3	a
T2 (50%)	50,9 ± 25,3	a	265,4 ± 086,6	b	1988,0 ± 459,9	c	1585,1 ± 524,7	a
T3 (100%)	36,9 ± 20,3	a	376,7 ± 057,1	b	1313,0 ± 078,2	ab	1069,3 ± 225,3	a
T4 (150%)	46,0 ± 10,1	a	226,5 ± 080,6	b	796,9 ± 253,5	a	1270,7 ± 069,7	a
T5 (200%)	53,3 ± 05,2	a	313,0 ± 201,6	b	1681,3 ± 309,4	bc	1723,2 ± 182,2	a
	mg gPF^{-1}							
T1 (25%)	3,8 ± 1,0	a	40,5 ± 09,7	a	59,2 ± 15,7	a	69,2 ± 01,5	ab
T2 (50%)	4,3 ± 2,5	a	55,6 ± 12,4	a	148,6 ± 51,1	b	88,7 ± 10,9	b
T3 (100%)	5,5 ± 2,1	a	45,4 ± 17,3	a	110,2 ± 31,3	ab	53,9 ± 13,2	a
T4 (150%)	11,0 ± 2,1	a	50,6 ± 19,9	a	84,6 ± 25,6	ab	54,0 ± 08,0	a
T5 (200%)	10,6 ± 4,1	a	37,2 ± 5,71	a	122,0 ± 33,2	ab	61,6 ± 01,2	a

Letras distintas en sentido vertical indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos.

Como se observa en el Cuadro 7, el contenido de hidratos de carbono solubles ($\mu\text{g mL}^{-1}$) aumentó a medida que transcurrió el periodo de cultivo en todos los tratamientos estudiados, indicando aparentemente una relación entre biomasa fresca producida y el contenido de hidratos de carbono solubles.

Como también se aprecia en el Cuadro 7, los contenidos de hidratos de carbono solubles ($\mu\text{g mL}^{-1}$) presentaron distintos comportamientos en el tiempo: el día 9 los tratamientos no presentaron diferencias en cuanto al contenido de esta biomolécula, mientras que en el día 17 sólo T₁ (25%) presentó diferencias, presentando el menor contenido de hidratos de

carbono solubles con $102,4 \mu\text{g mL}^{-1}$. El día 25 el tratamiento que presentó mayor contenido fue T₂ (50%) con $1988 \mu\text{g mL}^{-1}$, siendo estadísticamente igual a T₅ (200%) con $1681,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ de hidratos de carbono solubles. Finalmente, en el día 31 tampoco se presentaron diferencias entre los tratamientos.

Al igual que en el caso del contenido de proteína soluble ($\mu\text{g mL}^{-1}$), los resultados no aluden la existencia de alguna relación entre la concentración de la solución nutritiva y el contenido de hidratos de carbono solubles ($\mu\text{g mL}^{-1}$) durante el periodo de cultivo, lo que no concuerda con lo descrito por Grobbelaar (2004), quien establece que a mayores niveles de nutrientes en el medio se genera mayor contenido de hidratos de carbono, lo que estaría relacionado con el contenido de fósforo, nutriente que influye en la composición de la biomasa a producir, incidiendo sobretodo en el contenido de los hidratos de carbono.

Por otro lado, también se ha observado que varias microalgas (*Scenedesmus sp.* y *Spirulina sp.*) son capaces de producir altos contenidos de hidratos de carbono cuando se cultivan en condiciones limitadas de nitrógeno (Hu, 2004; Becker, 1994 b; Arad *et al.*, 1988). Para Arad *et al.* (1988), 1 mM de NO₃ corresponde a una concentración limitante de nitrógeno, sin embargo, en el presente ensayo las concentraciones de NO₃ fluctuaron entre 0,41 y 3,26 mM (Apéndice II), donde los tratamientos con menor concentración de la solución nutritiva se encuentran inferiores al valor descrito como limitante por los autores, pero como no se observó que algún tratamiento haya presentado un contenido considerablemente menor al resto, se podría deducir que durante este ensayo no existieron limitaciones nutritivas en ninguno de los tratamientos y que 1 mM de NO₃ no corresponde a un valor limitante para *Chlamydomonas*.

Los resultados de concentración en base a peso fresco (mg gPF^{-1}) obtenidos, apoyan el supuesto que durante el ensayo no se presentaron limitaciones nutritivas. Como se aprecia en el Cuadro 7, tampoco se observa que algún tratamiento haya presentado mayor acumulación de hidratos de carbono en comparación al resto. Esta acumulación ocurre cuando las microalgas se encuentran en condiciones nutricionales limitantes, por lo que la célula comienza a acumular productos de reserva. Excepto el día 31, la concentración de hidratos de carbono en base a peso fresco (mg gPF^{-1}) tiende a aumentar en los tratamientos con menor concentración de la solución nutritiva, lo que podría indicar que hacia el final del cultivo, los nutrientes comenzaron a ser limitantes en dichos tratamientos, generando mayor acumulación de hidratos de carbono y una considerable disminución de la tasa de crecimiento media diaria (Cuadro 4).

Existen antecedentes que dicen que el mejor momento para cosechar microalgas con alto contenido de hidratos de carbonos con fines comerciales corresponde al comienzo de la fase de crecimiento exponencial, ya que ocurre mayor acumulación de estas biomoléculas (Hu, 2004), sin embargo, según los resultados obtenidos durante este ensayo, el mejor momento es el día 25. Si se buscara mayor rendimiento y mayor concentración de hidratos de carbono, el mejor tratamiento es T₂ (50%) ya que presentó mayor contenido y mayor concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$ y mg gPF^{-1} , respectivamente) de hidratos de carbono, al igual que T₅ (200%), sin embargo, T₂ (50%) requiere menores nutrientes que T₅ (200%).

Pigmentos fotosintéticos

En el Cuadro 8 se presentan los contenidos de clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides por volumen de solución microalgal, registrados durante los días 9, 17, 25 y 31 del crecimiento poblacional de las microalgas *Chlamydomonas*.

Cuadro 8. Contenidos de clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides ($\mu\text{g mL}^{-1}$) registrados durante el cultivo de *Chlamydomonas*.

Trat.	Pigmentos fotosintéticos ($\mu\text{g mL}^{-1}$)							
	Día 9		Día 17		Día 25		Día 31	
Clorofila <i>a</i>								
T1 (25%)	1,97 ± 0,18	ab	2,68 ± 0,75	a	10,53 ± 2,86	a	40,05 ± 11,47	a
T2 (50%)	1,43 ± 0,37	a	2,88 ± 0,42	a	12,11 ± 1,23	a	42,70 ± 10,22	a
T3 (100%)	3,13 ± 0,29	c	4,36 ± 0,60	b	11,93 ± 2,55	a	45,24 ± 9,93	a
T4 (150%)	1,90 ± 0,38	ab	4,26 ± 0,12	b	14,80 ± 1,10	a	53,43 ± 10,97	a
T5 (200%)	2,31 ± 0,59	b	4,70 ± 0,73	b	20,47 ± 2,81	b	56,45 ± 16,81	a
Clorofila <i>b</i>								
T1 (25%)	1,26 ± 0,16	ab	1,77 ± 0,39	a	7,27 ± 2,26	a	21,18 ± 8,97	a
T2 (50%)	0,85 ± 0,22	a	1,76 ± 0,44	ab	9,51 ± 3,61	a	31,32 ± 8,29	ab
T3 (100%)	1,46 ± 0,16	b	2,79 ± 0,37	bc	8,32 ± 1,79	a	26,50 ± 5,27	ab
T4 (150%)	1,18 ± 0,26	ab	2,33 ± 0,61	abc	11,42 ± 1,40	ab	33,88 ± 4,97	ab
T5 (200%)	1,14 ± 0,21	ab	2,96 ± 0,61	c	14,11 ± 2,51	b	39,96 ± 9,43	b
Carotenoides								
T1 (25%)	0,005 ± 0,004	a	0,234 ± 0,074	a	1,554 ± 0,389	a	3,454 ± 1,403	a
T2 (50%)	0,023 ± 0,010	ab	0,320 ± 0,044	a	1,560 ± 0,092	a	4,690 ± 0,892	a
T3 (100%)	0,061 ± 0,032	ab	0,370 ± 0,147	a	1,287 ± 0,218	a	4,466 ± 1,167	a
T4 (150%)	0,014 ± 0,007	ab	0,518 ± 0,124	ab	1,501 ± 0,168	a	4,892 ± 0,368	a
T5 (200%)	0,096 ± 0,082	b	0,661 ± 0,178	b	1,942 ± 0,338	a	6,011 ± 2,401	a

Letras distintas en sentido vertical indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos.

Como se observa en el Cuadro 8, los contenidos de clorofila *a* ($\mu\text{g mL}^{-1}$) se incrementaron a medida que evolucionó el cultivo de las microalgas en todos los tratamientos estudiados, al igual que en el caso de la diatomea *Amphora sp.* (Almaguer *et al.*, 2004), relacionándose con la biomasa fresca, información que permite estimar en forma indirecta el crecimiento de un organismo fotoautótrofo, tal como concuerdan Serpa y Calderón (2006), Rivera *et al.* (2005) y Gregor y Marsálek (2004).

Al analizar los contenidos de clorofila *a* ($\mu\text{g mL}^{-1}$) se puede destacar que durante los días 17 y 25 se presentó cierta tendencia al aumento de este pigmento en los tratamientos con mayor concentración de la solución nutritiva. El día 17, T₅ (200%) presentó el mayor contenido de clorofila *a* con $4,70 \mu\text{g mL}^{-1}$, siendo estadísticamente igual a T₃ y T₄ (100 y 150%, respectivamente). El día 25, T₅ (200%) vuelve a presentar mayor contenido de clorofila *a* con $20,47 \mu\text{g mL}^{-1}$. Sin embargo, esta tendencia no se observa en los otros dos días, por lo que no se puede establecer un efecto de la concentración de la solución nutritiva durante el cultivo de las microalgas sobre el contenido de clorofila *a*.

Lo mismo ocurre con el contenido de clorofila *b* ($\mu\text{g mL}^{-1}$), en donde sólo se observa dicha tendencia el día 25, donde T₅ (200%) presentó el mayor contenido de clorofila *b* con 14,11 $\mu\text{g mL}^{-1}$, siendo estadísticamente igual a T₄ (150%).

Con respecto a los carotenoides (Cuadro 8), se puede destacar que durante el día 17 se presentó, como en el caso de las clorofilas, cierta tendencia al aumento de carotenoides en los tratamientos con mayor concentración de la solución nutritiva, ya que T₄ y T₅ (150 y 200%) presentaron los mayores contenidos con 0,518 y 0,661 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Aunque durante los otros días los resultados obtenidos no permiten establecer un efecto concreto de la concentración de la solución nutritiva sobre el contenido de carotenoides.

En este ensayo, se esperaba que al aumentar la concentración de la solución nutritiva se presentara mayor contenido de clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides durante todo el cultivo de *Chlamydomonas*, ya que existen autores que establecen que un incremento en la producción de pigmentos fotosintéticos es proporcional al incremento de la concentración de nitrógeno del medio, como se ha observado en las cianobacterias *Synechococcus* (Rosales *et al.*, 2006), *Anabaena sp.* PCC 7120 (Loreto *et al.*, 2003) y *Chroococidiopsis sp.* (Billi y Grilli, 1996).

Rosales *et al.* (2006), obtuvieron mayores contenidos de clorofilas al ser cultivadas con 0,263 mM de NO₃ en comparación con menores concentraciones de NO₃. Durante este ensayo, como ya se había mencionado anteriormente, las concentraciones fluctuaron entre 0,41 y 3,26 mM de NO₃ (Apéndice II), valores superiores a los utilizados por Rosales *et al.* (2006), por lo que la diferencia radica en que en el presente ensayo se utilizaron concentraciones suficientes para la producción de estos pigmentos, no generando mayores diferencias entre los tratamientos.

Los nutrientes son un factor influyente en la producción de los pigmentos fotosintéticos, según Görl *et al.* (1998) los diversos nutrientes tienen un marcado efecto sobre la formación de clorofilas en microalgas y que deficiencias de hierro, nitrógeno y magnesio inhiben la síntesis y acumulación de estas biomoléculas, como también lo mencionan Abalde *et al.* (1995). El contenido de carotenoides también se ve disminuido cuando existen deficiencias de nitrógeno, lo que sugiere una reducción de la actividad fotosintética de las microalgas (Hu, 2004).

El fósforo es otro nutriente importante para la producción de pigmentos fotosintéticos, ya que su deficiencia provoca síntomas similares a los observados en cultivos microalgales deficientes de nitrógeno, en donde el contenido de clorofila tiende a disminuir, por ejemplo, microalgas del género *Dunaliella* disminuyen la actividad del PSII (Fotosistema II) y por ende la fotosíntesis (Hu, 2004).

El hierro es un cofactor en muchas reacciones redox biológicamente esenciales, como respiración y fotosíntesis, y su deficiencia inhibe la formación de clorofilas. En *Chlamydomonas reinhardtii*, deficiencias de hierro no sólo generan una degradación del PSI (Fotosistema I) sino que también reestructuran el LHCI (Complejo Captador de Luz I),

disminuyendo la eficiencia durante la fotosíntesis, tal como lo mencionan Naumann *et al.* (2005) y Moseley *et al.* (2002).

En el Cuadro 9 se presentan las concentraciones de clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides en base a peso fresco, registrados durante los días 9, 17, 25 y 31 del crecimiento poblacional de *Chlamydomonas*.

Cuadro 9. Concentraciones de clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides en base a peso fresco (mg gPF^{-1}) registrados durante el cultivo de *Chlamydomonas*.

Trat.	Pigmentos fotosintéticos (mg gPF^{-1})							
	Día 9		Día 17		Día 25		Día 31	
	Clorofila <i>a</i>							
T1 (25%)	0,39 ± 0,11	ab	0,50 ± 0,12	a	0,95 ± 0,20	a	2,60 ± 0,73	a
T2 (50%)	0,19 ± 0,06	a	0,39 ± 0,05	a	1,08 ± 0,13	ab	3,44 ± 0,51	a
T3 (100%)	0,56 ± 0,06	b	0,54 ± 0,08	a	0,91 ± 0,17	a	3,05 ± 0,80	a
T4 (150%)	0,27 ± 0,09	a	0,57 ± 0,24	a	1,14 ± 0,13	ab	3,24 ± 0,56	a
T5 (200%)	0,37 ± 0,11	ab	0,54 ± 0,11	a	1,39 ± 0,05	b	3,93 ± 0,84	a
	Clorofila <i>b</i>							
T1 (25%)	0,37 ± 0,10	b	0,34 ± 0,09	a	0,65 ± 0,19	a	1,57 ± 0,48	a
T2 (50%)	0,12 ± 0,07	a	0,29 ± 0,03	a	0,70 ± 0,13	a	2,15 ± 0,20	a
T3 (100%)	0,31 ± 0,13	b	0,35 ± 0,07	a	0,64 ± 0,14	a	1,79 ± 0,44	a
T4 (150%)	0,25 ± 0,08	ab	0,35 ± 0,14	a	0,82 ± 0,06	ab	2,06 ± 0,23	a
T5 (200%)	0,28 ± 0,09	ab	0,34 ± 0,06	a	0,96 ± 0,07	b	2,50 ± 0,35	a
	Carotenoides							
T1 (25%)	0,0012 ± 0,0004	a	0,0453 ± 0,0114	a	0,127 ± 0,036	a	0,271 ± 0,075	a
T2 (50%)	0,0054 ± 0,0020	a	0,0466 ± 0,0114	a	0,146 ± 0,015	a	0,359 ± 0,033	a
T3 (100%)	0,0191 ± 0,0101	b	0,0496 ± 0,0113	a	0,099 ± 0,014	a	0,350 ± 0,057	a
T4 (150%)	0,0039 ± 0,0011	a	0,0824 ± 0,0334	a	0,110 ± 0,023	a	0,303 ± 0,027	a
T5 (200%)	0,0136 ± 0,0061	b	0,0536 ± 0,0132	a	0,130 ± 0,010	a	0,463 ± 0,026	b

Letras distintas en sentido vertical indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos.

Como se observa en el Cuadro 9, durante los cuatro días los tratamientos que presentaron mayor concentración de clorofila *a* fueron los que también presentaron mayor concentración de clorofila *b*, aunque en valores más bajos, por ejemplo, el día 31, T₅ (200%) fue el que presentó mayor concentración de clorofila *a* (sin considerar que no existieron diferencias con los otros tratamientos) con 3,93 mg gPF^{-1} y también mayor concentración de clorofila *b* con 2,50 mg gPF^{-1} . Lo que también ocurre con el resto de los tratamientos durante los cuatro días, a medida que disminuye la concentración de clorofila *a*, estableciéndose una relación directa entre estos pigmentos.

Muchas microalgas presentan la característica de acumular gran cantidad de carotenoides cuando crecen en condiciones limitadas de nitrógeno, que a menudo se ve acompañada por una disminución en la concentración de clorofilas de las células, según lo describen, Hu (2004) y Becker (1994 b), pero como se observa en el Cuadro 9, esto no sucedió.

No existió una disminución de las clorofilas, sino al contrario, a medida que evolucionó el cultivo, hubo un aumento de la concentración de carotenoides junto con un aumento en la concentración de clorofilas en todos los tratamientos. Lo que también se observa diariamente, ya que dentro del mismo día, los tratamientos que presentaron mayor acumulación de carotenoides también presentaron mayor acumulación de clorofilas, y así con el resto de los tratamientos a medida que va disminuyendo la concentración de carotenoides. Dado lo anterior, se podría inferir que en ninguno de ellos se presentaron deficiencias de nitrógeno durante el periodo de cultivo de *Chlamydomonas* (Hu, 2004).

Si se quisiera obtener una biomasa con alto contenido de clorofilas *a* y clorofilas *b* con fines comerciales, se deberían realizar cosechas hacia el final de la fase de crecimiento exponencial de la población microalgal (día 25), ya que existe un alto contenido de estas biomoléculas. Durante ese día, el mejor tratamiento, considerando el contenido de ambas clorofilas, fue T₅ (200%), por lo que se debería utilizar una solución nutritiva más concentrada para obtener una biomasa con mayor contenido de estos pigmentos. Por otro lado, si se buscara obtener una biomasa con mayor calidad, es decir con mayor concentración de clorofilas *a* y clorofila *b* en base a peso fresco, el mejor tratamiento fue T₄ (150%), ya que acumula igual cantidad de clorofilas que T₅ (200%).

Para el caso de los carotenoides, el tratamiento que produce el mayor contenido y la mayor concentración en base a peso fresco fue T₁ (25%), siendo la mejor alternativa si se utilizara la solución nutritiva de Hoagland y Arnon II modificada para la producción de microalgas.

Determinación de la capacidad antioxidante total

Al determinar la capacidad antioxidante de *Chlamydomonas* se obtuvo una bajísima capacidad proveniente de la fracción liposoluble, por lo que se consideró como capacidad antioxidante total a la proveniente de la fracción hidrofílica del macerado microalgal. Esto podría deberse a los bajos niveles de antioxidantes liposolubles en las microalgas como α -Tocoferol y β -carotenos, o por la complejidad que presenta el mecanismo de extracción para la determinación de la capacidad antioxidante. Durante los últimos años, la investigación con respecto a la determinación de la capacidad antioxidante se ha enfocado principalmente a encontrar mecanismos más eficientes de extracción que considere el más amplio espectro de antioxidantes, tal como lo han hecho Hyun *et al.* (2010) Cepoi *et al.* (2009) y Wang *et al.* (2007) en la determinación de esta capacidad en microalgas.

En el Cuadro 10 se presenta la capacidad antioxidante total, registrada durante los días 9, 17, 25 y 31 del crecimiento poblacional de *Chlamydomonas*.

Cuadro 10. Capacidad antioxidante total (mg Trolox mL⁻¹) registrada durante el cultivo de *Chlamydomonas*.

Trat.	Capacidad Antioxidante (mg Trolox mL ⁻¹)							
	Día 9		Día 17		Día 25		Día 31	
T1 (25%)	1,12 ± 0,16	a	09,77 ± 2,94	ab	08,38 ± 3,64	a	18,41 ± 6,04	a
T2 (50%)	2,97 ± 0,77	a	05,11 ± 2,32	a	06,04 ± 1,99	a	16,90 ± 6,40	a
T3 (100%)	1,45 ± 0,45	a	05,35 ± 1,13	a	13,67 ± 5,48	a	16,62 ± 3,94	a
T4 (150%)	1,96 ± 0,85	a	12,74 ± 4,53	b	16,07 ± 1,57	a	22,23 ± 3,08	a
T5 (200%)	1,82 ± 0,73	a	14,05 ± 4,12	b	14,59 ± 1,98	a	18,13 ± 4,66	a

Letras distintas en sentido vertical indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos.

Como se observa en el Cuadro 10, la capacidad antioxidante presentó diferencias significativas sólo el día 17, en donde T₅ (200%) presentó el mayor contenido de antioxidantes expresados en equivalentes de Trolox, con 14,05 mg Trolox mL⁻¹, siendo igual estadísticamente a T₃ y a T₄ (100 y 150%), con 9,77 y 12,74 mg Trolox mL⁻¹ respectivamente. Dada estos resultados, se podría decir que no se logra establecer una tendencia en cuanto a la concentración de la solución nutritiva y el contenido de antioxidantes de *Chlamydomonas*.

En el Cuadro 10 también se aprecia que la capacidad antioxidante aumentó a medida que evolucionó el cultivo de *Chlamydomonas*, lo que podría estar relacionado con el mayor contenido de clorofilas y carotenoides (importantes fuentes naturales de antioxidantes) presentado durante ese día (Cuadro 8) por todos los tratamientos estudiados.

Si se analiza desde el punto de vista del contenido de clorofilas y carotenoides, pigmentos con comprobada capacidad antioxidante (Hyun *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2008), se podría decir que a mayor contenido de estos pigmentos fotosintéticos deberían existir mayor contenido de antioxidantes, tal como lo menciona Jaime *et al.* (2007). Pero existen

situaciones en donde la acumulación de antioxidantes es mucho mayor, como lo que ocurre cuando las microalgas se encuentran en situaciones de estrés fisiológico, por ejemplo, en un medio con alto contenido de oxígeno, o con altas temperaturas de cultivo o prolongada exposición a alta intensidad luminosa, por lo que se necesitaría disminuir considerablemente el contenido de nutrientes en la solución para que existiera mayor capacidad antioxidante. Esto ocurre en el caso de microalgas del género *Dunaliella*, las cuales acumulan masivamente carotenoides cuando son inducidas a reducir el crecimiento de la población por disminución de los nutrientes disponibles según informan Jaime *et al.* (2007).

Dado lo anterior, se podría corroborar el supuesto de que en ningún tratamiento existieron limitaciones en cuanto a la disponibilidad de nutrientes durante el periodo de cultivo de *Chlamydomonas*, ya que los tratamientos con menor concentración de la solución nutritiva no presentaron diferencias con el resto de los tratamientos.

Otra manera de expresar la capacidad antioxidante es mediante el porcentaje de inhibición al ABTS⁺, el cual se refiere a la resistencia que genera la biomasa microalgal al inducirle un daño oxidativo mediante un agente oxidante, en este caso, el radical ABTS⁺ (Cuadro 11). Por ende, a mayor % de inhibición al ABTS⁺, mayor es la capacidad antioxidante que presentan las microalgas.

Cuadro 11. Capacidad antioxidante total expresada en % inhibición ABTS⁺, registrada durante el cultivo de microalgas *Chlamydomonas*.

Trat.	% Inhibición ABTS ⁺			
	Día 9	Día 17	Día 25	Día 31
T1 (25%)	12,05 a	37,41 a	26,38 a	52,27 a
T2 (50%)	15,50 a	24,42 b	22,60 a	48,99 a
T3 (100%)	15,72 a	25,09 b	34,98 a	48,37 a
T4 (150%)	12,25 a	39,89 a	38,86 a	57,26 a
T5 (200%)	15,26 a	45,05 a	36,46 a	51,66 a

Letras distintas en sentido vertical indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos.

Como se aprecia en el Cuadro 11, durante el día 31 se registraron los más altos porcentaje de inhibición al ABTS⁺. Valores entre 48,37 y 57,27% inhibición ABTS⁺ son relativamente altos en comparación con otras microalgas. En *Spirulina platensis*, Cepoi *et al.* (2009) han registrado valores de 38-48% inhibición ABTS⁺ y en *Nostoc linckia* estos valores han llegado a 44-56%, dependiendo de la extracción utilizada, por lo que se podría considerar a las *Chlamydomonas* como potenciales fuentes de antioxidantes naturales.

Si se realizaran cosechas para obtener estos valores de inhibición al ABTS⁺, el mejor tratamiento para reducir sería T₁ (25%) ya que no presentó diferencias con los otros tratamientos. Lo mismo ocurre con la capacidad antioxidante expresada en equivalentes de Trolox, por lo que T₁ (25%) es una alternativa si se utilizara la solución nutritiva de Hoagland y Arnon II modificada para la producción de microalgas.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede concluir que durante el periodo de cultivo de las microalgas *Chlamydomonas*:

- A mayor concentración de la solución nutritiva no aumenta la formación de las biomoléculas solubles: proteínas, hidratos de carbono, clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides, ni la capacidad antioxidante, por lo que se rechaza la hipótesis.
- Las cinco concentraciones de solución nutritiva Hoagland y Arnon II modificada permiten un adecuado crecimiento de microalgas del género *Chlamydomonas* y producción de biomoléculas solubles: proteínas, hidratos de carbono, clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides.
- Las microalgas del género *Chlamydomonas* son un potencial producto agroalimentario con buenos contenidos nutricionales y propiedades antioxidantes.

BIBLIOGRAFIA

- Abalde, J., A. Cid, P. Fidalgo, E. Torres y C. Herrero. 1995. Microalgas: Cultivo y Aplicaciones. Monografías 26, Universidad de la Coruña, España. 210 p.
- Almaguer, Y., E. Alfonso y S. Leal. 2004. Aislamiento y cultivo de dos especies de diatomeas bentónicas. *Revista de Investigaciones Marinas* 25(1): 57-64.
- Álvarez, H. 1994. Introducción al Método Ficológico. pp.19-27. *In: Folleto de Algas. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Ecuador.* 47p.
- Andrade, R., R. Torres, E. Montes y A. Fernández. 2007. Obtención de harina a partir del cultivo de *Chlorella vulgaris* y su análisis proteico. *Temas Agrarios* 12(1): 50-57.
- Arad, S., D. Friedman and A. Rotem. 1988. Effect of nitrogen on polysaccharide production in *Porphyridium sp.* *Applied and Environmental Microbiology* 54(10): 2411-2414.
- Becker, E. 1994 a. Applications of algae. pp. 150-275. *In: Microalgae: Biotechnology and Microbiology.* 40th ed. Cambridge University Press. Cambridge. UK. 293p.
- Becker, E. 1994 b. Culture media. pp. 9-41. *In: Microalgae: Biotechnology and Microbiology.* 40th ed. Cambridge University Press. Cambridge. UK. 293p.
- Billi, D. and M. Grilli. 1996. Effects of nitrogen limitation and starvation on *Chroococcidiopsis sp.* *New Phytologist* 133: 563-571.
- Bradford, M. 1976. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brown, M. S. Jeffrey, J. Volkman and G. Dunstan. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151: 315-331
- Cáceres, S. 2009. Aislamiento y caracterización de las principales microalgas presentes en el sistema hidropónico del tipo raíz flotante. Memoria Ingeniera Agrónoma. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 55p.
- Cepoi, L., L. Rudi, V. Miscu, A. Cojocari, T. Chiriac and D. Sadovnic. 2009. Antioxidative activity of ethanol extracts from *Spirulina platenses* and *Nostoc linckia* measured by various methods. *Analele Universitatii din Oradea, Fascicula Biologie TOM. XVI/2* 43-48.

Chlamydomonas Center. Junio 2010. About Chlamydomonas. [en línea] Disponible en: <<http://www.chlamy.org/info.html>> Consultado el 28 Junio 2010.

Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25: 294-306.

Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith. 1956. Colorimetric methods of determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-356.

González, A. 2000. Alternativas en el cultivo de microalgas. Memoria Acuicultora. Escuela Superior Politécnica del Litoral, Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador. 81p.

Görl, M., J. Sauer, T. Baier and K. Forchhammer. 1998. Nitrogen starvation-induced chlorosis in *Synechococcus* PCC 7942: adaptation to long-term survival. *Microbiology* 144: 2449-2458.

Gregor, J. and B. Marsálek. 2004. Freshwater phytoplankton quantification by chlorophyll *a*: a comparative study of in vitro, in vivo and in situ methods. *Water Research* 38: 517-522.

Grobbelaar, J. 2004. Mass Cultivation of Microalgae. Algal Nutrition. Mineral Nutrition. pp.97-115. *In*: Richmond, A. (Ed). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science, Iowa, USA. 566p.

Hajimahmoodi, M., M. Ali, N. Mohammadi, N. Soltani, M. Reza and N. Nafissi. 2010. Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. *Journal of Applied Phycology* 22: 43-50.

Harris, E. 1998. Introduction to Chlamydomonas. pp.1-11. *In*: Rochaix, J., M. Goldschmidt-Clermont and S. Merchant (Eds). *Advance in Photosynthesis: The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. 737p.

Harris, E. 2001. Chlamydomonas as a model organism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 363-406.

Hoagland, D. and D. Arnon. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiments Station. The College of Agriculture University of California. Circular N° 347. 32p.

Hu, CC., JT. Lin, FJ. Lu, FP. Chou and DJ. Yang. 2008. Determination of carotenoids in *Dunaliella salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract. *Food Chemistry* 109: 439-446.

- Hu, Q. 2004. The Microalgae: With Reference to Mass-Cultivation. Environmental Effects on Cell Composition. pp.83-94. *In*: Richmond, A. (Ed). Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Science, Iowa, USA. 566p.
- Huppe, H. and D. Turpin. 1994. Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45: 577-607.
- Hyun, K., S. Woo, C. Young, B. Hun, Y. Rim y CH. Pan. 2010. Effect of pressurized liquids on extraction of antioxidants from *Chlorella vulgaris*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 4756-4761.
- Jaime, L., J. Mendiola, E. Ibáñez, P. Martín-Alvarez, A. Cifuentes, G. Reglero and F. Señoráns. 2007. β -Carotene isomer composition of sub- and supercritical carbon dioxide extracts. Antioxidant activity measurement. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 10585-10590.
- Jochem, F. 2001. Chlorophyceae: The Real Green Algae. Department of Biological Sciences, Florida International University, USA. [en línea] Disponible en <http://www.jochemnet.de/fiu/bot4404/BOT4404_28.html> Consultado el 16 Julio 2010.
- 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. Scientific Electronic Library Online. [en línea] Disponible en <<http://www.revistas.luz.edu.ve/index.php/mc/article/viewFile/29/18>> Consultado el 19 Agosto 2010.
- Kilham, S., D. Kreeger, C. Goulden and S. Lynn. 1997. Effects of nutrient limitation on biochemical constituents of *Ankistrodesmus falcatus*. *Freshwater Biology* 38: 591-596.
- Kosourov, S., M. Seibert and M.L. Ghirardi. 2003. Effects of extracellular pH on the metabolic pathways in sulfur-deprived, H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii* cultures. *Plant and Cell Physiology* 44(2): 146-155.
- Lara, A. 2000. Manejo de la solución nutritiva en la producción de tomate en hidroponía. *Terra* 17(3): 221-229.
- Lee, R. 1999. Evolution of the chloroplast. Chlorophyta. pp.171-282. *In*: Phycology. 3rd ed. United Kingdom at the University Press, Cambridge, UK. 614p.
- Lewitus, A. and D. Caron. 1990. Relative effects of nitrogen and phosphorus depletion and light intensity on the pigmentation, Chemicals composition and volumen of *Pyrenomonas salina* (Cryptophyceae). *Marine Ecology Progress Series* 61: 171-181.

- Li, HB., KW. Cheng, CC. Wong, KW. Fan, F. Chen and Y. Jiang. 2007. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae. *Food Chemistry* 102: 771-776.
- Lichtenthaler, H. and A. Wellburn. 1983. Determination of total carotenoids and chlorophyll *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*. 603: 591-592.
- López-Elías, J., D. Voltolina, M. Nieves-Soto y L. Figueroa-Ortiz. 2004. Producción y composición de microalgas en laboratorios comerciales del noroeste de México. *In*: Cruz, L., D. Ricque, M. Nieto, D. Villareal., U. Scholz y M. González. *Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 16-19 Noviembre. Hermosillo, Sonora, México. 636-649.
- Loreto, C., N. Rosales, J. Bermúdez y E. Morales. 2003. Producción de pigmentos y proteínas de la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 en relación a la concentración de nitrógeno e irradiancia. *Gayana Botánica* 60(2): 83-89.
- Martínez, J. 2003. Carotenoides a partir de microalgas. Oficina de Transferencia de Tecnología. Publicación electrónica R+D C SIC. [en línea] Disponible en <<http://www.ott.csic.es/rdcsic/rdcscisp/rdbi18esp.htm>> Consultado el 28 Junio 2010.
- Marxen, K., K. Vanselow, S. Lippemeier and R. Hintze. 2005. A photobioreactor system for computer controlled cultivation of microalgae. *Journal of Applied Phycology* 17: 535-549.
- Miranda, M., R. Cintra, S. Barros and J. Mancini-Filho. 1998. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 31: 1075-1079.
- Molina L., L. Jonte, R. Mora, J. Ortega y E. Morales. 2007. Influencia de la salinidad sobre el crecimiento de la microalga *Rhodospirillum rubrum* (Rhodophyta) en cultivos discontinuos. *Revista de la Facultad de Agronomía, Universidad de Zulia, Venezuela*. Suplemento N° 24(1): 249-253.
- Morris, H.J., M.M. Quintana, A. Almarales y L. Hernández. 1999. Composición bioquímica y evaluación de la calidad proteica de la biomasa autotrófica de *Chlorella vulgaris*. *Revista Cubana de Alimentación y nutrición* 13(2): 123-128.
- Moseley, J., T. Allinger, S. Herzog, P. Hoerth, E. Wahinger, S. Merchant and M. Hippler. 2002. Adaptation to Fe-deficiency requires remodelling of the photosynthetic apparatus. *The European Molecular Biology Organization Journal* 21(24): 6709-6720.
- Naumann, B., E. Stauber, A. Busch and F. Sommer. 2005. N-terminal processing of Lhca3 is a key step in remodelling of the photosystem I-Light-harvesting complex under iron

- deficiency in *Chlamydomonas reinhardtii*. The Journal of Biological Chemistry 280(21): 20431-20441.
- Ortega, J., R. Moronta y E. Morales. 2004. Influencia del acetato sobre el crecimiento y contenido de pigmentos de la microalga *Chlorella sp.* Ciencia 12(1): 25-31.
- Piñero J., P. Bermejo and A. Villar del Fresno. 2001. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. Il Farmaco 56: 497-500.
- Prieto, M., M. Mogollon, A. Castro y L. Sierra. 2005. Efecto del medio y condiciones de cultivo en la productividad de tres diatomeas marinas con potencial acuícola. MVZ-Córdoba 10(1): 544-554.
- Quevedo, C. S. Morales y A. Acosta. 2008. Crecimiento de *Scenedesmus sp.* en diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalgal. Vitae, Revista de la facultad de Química Farmacéutica 15(1): 25-31.
- Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and C. Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine 26: 1231-1237.
- Reay, D., D. Nedwell, J. Priddle and J.C. Ellis-Evans. 1999. Temperature dependence of inorganic uptake: Reduced affinity for nitrate at suboptimal temperatures in both algae and bacteria. Applied and Environmental Microbiology 65(6): 2577-2584.
- Reboloso, M.M., F. Acién, J. Sánchez, M. Gil y J. Guil. 2000. Composición nutritiva de la biomasa de la microalga *Porphyridium cruentum*. Food Science and Technology International 6(2): 129-135.
- Reboloso-Fuentes, M.M., F. Camacho, A. Navarro and J. Guil-Guerrero. 2001. Biomass nutrient profiles of the microalga *Nannochloropsis* spp. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49: 2966-2972.
- Rivera, C., A. Zapata, A. Pinilla, J. Donato, B. Chaparro y P. Jiménez. 2005. Comparación de la estimación de la clorofila-a mediante los métodos espectrofotométrico y fluorométrico. Acta biológica Colombiana 10(2): 95-103.
- Rosales N., L. Jonte y E. Morales. 2006. Crecimiento y composición bioquímica de *Synechococcus sp.* modulados por nitrato de sodio. Boletín del centro de investigaciones biológicas 40(2): 120-132.
- Rosales-Loaiza, N., M. Guevara, C. Lodeiros y E. Morales. 2008. Crecimiento y producción de metabolitos de la cianobacteria marina *Synechococcus sp.* (Chroococcales) en función de la irradiancia. Revista de Biología Tropical 56(2): 421-429.

- 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(1,2): 93-99.
- Sivonen, K. 1990. Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 56(9): 2658-2666.
- Taiz, L. y E. Zeiger. 2002 a. Transport and Translocation of Water and Solutes. Mineral Nutrition. pp.67-86. *In: Plant Physiology*. 3th ed. Sinauer Associates, Los Angeles, USA.
- Taiz, L. y E. Zeiger. 2002 b. Biochemistry and Metabolism. Photosynthesis: The Light Reactions. pp.111-143. *In: Plant Physiology*. 3th ed. Sinauer Associates, Los Angeles, USA.
- Torrentera, L. y A. Tacón. 1989. La Producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura. Apoyo a las actividades regionales de acuicultura para America Latina y el Caribe. Food and Agriculture Organization. Project reports – No.12. 90p.
- Tzovenis, I., N. de Pauw and P. Sorgeloos. 2003. Optimisation of T-ISO biomass production rich in essential fatty acids I. Effect of different light regimes on growth and biomass production. *Aquaculture* 216: 203-222.
- Uribe, E. 1994. Tecnología de Cultivo de Microalgas. p 49-74. *In: 7º Curso Internacional Cultivo de Moluscos*. Coquimbo, Chile. Departamento de Acuicultura, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Católica del Norte, Coquimbo, Chile.
- Valenzuela-Espinosa, E., F. Lafarga-De la Cruz, R. Millán-Núñez y F. Núñez-Cebrero. 2005. Crecimiento, consumo de nutrientes y composición proximal de *Rhodomonas sp.* cultivada con medio f/2 y fertilizantes agrícolas. *Ciencias Marinas* 31(1A): 79-89.
- Valenzuela-Espinosa, E., R. Millán-Núñez y F. Núñez-Cebrero. 2002. Protein, carbohydrate, lipids and chlorophyll *a* content in *Isochrysis aff. Galbana* (clone T-Iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. *Aquaculture Engineering* 25: 207-216.
- Vidal, A., M. Motidome, J. Mancini-Filho, A. Fallarero, M. Midori, L. Brandao y A. Lapa. 2001. Actividad antioxidante y ácidos fenólicos del alga marina *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin) Howe. *Revista Brasileña de Ciencias Farmacéuticas* 37(3): 373-382.
- Visviki, D. 2000. The pH tolerance of *Chlamydomonas applanata* (Volvocales, Chlorophyta). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 38: 147-151.
- Wang, L., B. Pan, J. Sheng, J. Xu and Q. Hu. 2007. Antioxidant activity of *Spirulina platensis* extracts by supercritical carbon dioxide extraction. *Food Chemistry* 105: 36-41.

APÉNDICE I

Ecuaciones y R^2 de las curvas de tendencia expuestas en la Figura 9, curvas que representan el crecimiento poblacional de *Chlamydomonas*.

Tratamiento	Ecuación	R^2
T1 (25%)	$y = -0,0008x^3 + 0,0425x^2 - 0,0739x + 7,881$	0,8296
T2 (50%)	$y = -0,0008x^3 + 0,0427x^2 - 0,096x + 5,6197$	0,8144
T3 (100%)	$y = -0,0008x^3 + 0,0468x^2 - 0,1789x + 7,7261$	0,8605
T4 (150%)	$y = -0,0004x^3 + 0,0246x^2 + 0,1771x + 6,6898$	0,8549
T5 (200%)	$y = -0,001x^3 + 0,0564x^2 - 0,1621x + 8,196$	0,8635

APÉNDICE II

Composición inicial de los elementos de la solución nutritiva utilizada para el cultivo de microalgas *Chlamydomonas* en cada tratamiento.

Elemento	Concentración inicial del elemento					Concentración inicial del elemento				
	T1 (25%)	T2 (50%)	T3 (100%)	T4 (150%)	T5 (200%)	T1 (25%)	T2 (50%)	T3 (100%)	T4 (150%)	T5 (200%)
			mM					ppm		
N	1,03	2,06	4,12	6,18	8,24	36,48	72,96	145,92	218,88	291,84
NH4	0,62	1,25	2,49	3,74	4,98	11,23	22,46	44,92	67,38	89,84
NO3	0,41	0,81	1,63	2,44	3,26	25,25	50,50	101,00	151,50	202,00
K	1,02	2,05	4,09	6,14	8,18	40,00	80,00	160,00	240,00	320,00
Ca	1,00	2,01	4,02	6,03	8,03	40,25	80,50	161,00	241,50	322,00
P	0,48	0,97	1,94	2,91	3,87	15,00	30,00	60,00	90,00	120,00
S	0,13	0,25	0,50	0,76	1,01	4,04	8,08	16,15	24,23	32,30
			μM					ppm		
Fe	111,91	223,83	447,65	671,48	895,30	0,63	1,25	2,50	3,75	5,00
Mn	14,11	28,21	56,43	84,64	112,85	0,08	0,16	0,31	0,47	0,62
Zn	1,91	3,82	7,65	11,47	15,30	0,01	0,03	0,05	0,08	0,10
Cu	1,18	2,36	4,72	7,08	9,44	0,01	0,02	0,03	0,05	0,06
Mo	0,78	1,56	3,13	4,69	6,25	0,01	0,02	0,03	0,05	0,06

ANEXO I

Clasificación taxonómica según Lee (1999).

