



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
BAJA CALIFORNIA**

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
OCEANOLÓGICAS**



**RAZÓN DE PIGMENTOS ACCESORIOS/CLOROFILA *a*, CONSUMO
DE NUTRIENTES Y COMPOSICIÓN CELULAR DE TRES ESPECIES
DE MICROALGAS MARINAS CULTIVADAS EN DIFERENTES
CONDICIONES DE LUZ Y NUTRIENTES**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR
EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA**

PRESENTA

M.C. ENRIQUE VALENZUELA ESPINOZA

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA

ENERO DE 2008

RAZÓN DE PIGMENTOS ACCESORIOS/CLOROFILA *a*, CONSUMO
DE NUTRIENTES Y COMPOSICIÓN CELULAR DE TRES ESPECIES
DE MICROALGAS MARINAS CULTIVADAS EN DIFERENTES
CONDICIONES DE LUZ Y NUTRIENTES

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR
EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA:

M.C. ENRIQUE VALENZUELA ESPINOZA

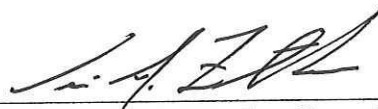
APROBADA POR:



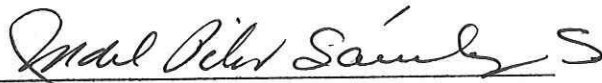
Dr. Roberto Millán Núñez
Director de Tesis



Dr. Charles C. Trees
Sinodal



Dr. José A. Zertuche González
Sinodal



Dra. María del Pilar Sánchez Saavedra
Sinodal



Dr. Rafael Hernández Walls
Sinodal

Resumen

Se evaluó el efecto de diferentes intensidades de luz y concentración de nutrientes en las razones de pigmentos accesorios/clorofila *a*, composición celular y consumo de nutrientes para tres especies de microalgas marinas: *Amphidinium carteri*, *Thalassiosira pseudonana* y *Tetraselmis suecica*, con el propósito de investigar variaciones en las razones de pigmentos, como también la necesidad de obtener información sobre la composición celular y consumo de nutrientes por microalgas que son usadas en acuicultura. Un diseño factorial de cuatro condiciones de luz (50, 150, 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y tres concentraciones de NaNO_3 y NaH_2PO_4 (bajo 441.5/18.1, medio 883/36.3, y alto 1766/72.6 μM respectivamente), fue llevado a cabo estableciendo 12 tratamientos experimentales. En general, la densidad celular de las tres especies se incrementó de bajas a altas intensidades de luz, pero irradiancias de 50 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ limitan el crecimiento de las especies. *A. carteri* incrementó su densidad celular con la intensidad de luz, y no con la concentración de nutrientes. Mientras que, *T. pseudonana*, incrementó su densidad celular con la concentración de nutrientes, y solo en la condición de alto nutriente la densidad celular fue más afectada por la intensidad de luz. En cambio, *T. suecica* incrementó su densidad celular con el incremento en la intensidad de luz y concentración de nutrientes. Cultivos de *A. carteri* expuestos a condiciones de bajo y medio nutriente fueron limitados por nutrientes al quinto y sexto día, mientras que, una mayor remoción de nutrientes se observó en 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. *T. pseudonana*, no fue limitada por nitrato y fosfato en las distintas condiciones evaluadas, sin embargo, la remoción de silicatos fue del 98% en los primeros dos días del cultivo en altas intensidades de luz. *T. suecica*, incrementó la remoción de nutrientes de bajas a altas irradiancias, denotándose que la mayor remoción de nitrato y fosfato toma lugar en menor tiempo en altas intensidades de luz, pero conforme se incrementa la concentración de nutrientes, la limitación ocurre en mayor tiempo, que en bajas concentraciones de nutrientes y bajas intensidades de luz. La concentración de proteínas por célula disminuyó en los primeros tres días para las tres especies, observándose mayor contenido en células creciendo en bajas irradiancias que en altas irradiancias. A través de las diferentes condiciones evaluadas, el contenido de proteínas por célula en *T. suecica* fue mayor que el de *A. carteri* y *T. pseudonana*. La concentración de lípidos en *A. carteri* fueron mayores en altas irradiancias, mientras que, en *T. suecica* la máxima concentración fue en bajas irradiancias. Para *T. pseudonana* solo se observaron variaciones importantes respecto a la luz en la condición baja de nutrientes. La concentración de carbohidratos por célula en *T. suecica* se incrementó con el tiempo de cultivo, con valores mayores en altas irradiancias, mientras que, en *T. pseudonana* disminuyen. Para *A. carteri*, se incrementaron en bajo nutriente, y con tendencia a disminuir en cultivos con alta concentración de nutrientes. Las razones de pigmentos fotosintéticos presentaron diferencias en las distintas intensidades de luz, con valores mayores en bajas irradiancias, manteniéndose sin cambios durante el tiempo de cultivo. Las razones de pigmentos fotoprotectores presentaron diferencias en las distintas intensidades de luz, con valores mayores en altas irradiancias, y cambios durante el tiempo de cultivo. Los resultados de este estudio indican que la intensidad de luz tuvo mayor efecto que la concentración de nutrientes en la razón de pigmentos accesorios respecto a la clorofila *a* en las diferentes especies de microalgas en cultivo.

CONTENIDO

| | Página |
|--|--------|
| Dedicatoria | II |
| Agradecimientos | III |
| Lista de figuras | IV |
| Lista de tablas | V |
| 1.- Introducción y Antecedentes | 1 |
| 2.- Hipotesis | 7 |
| 3.- Objetivo general | 7 |
| 3.1.- Objetivos específicos | 7 |
| 4.- Materiales y métodos | 8 |
| 4.1.- Especies usadas y aclimatación | 8 |
| 4.2.- Diseño experimental-cultivo | 9 |
| 4.3.- Procedimiento de muestreo y preservado de muestras | 10 |
| 4.3.1.- Muestreo para composición proximal celular | 11 |
| 4.3.2.- Muestreo para pigmentos y nutrientes | 12 |
| 4.4.- Análisis de la composición proximal celular | 13 |
| 4.4.1.- Análisis de proteínas | 13 |
| 4.4.2.- Análisis de carbohidratos | 13 |
| 4.4.3.- Análisis de lípidos | 14 |
| 4.5.- Análisis de pigmentos | 15 |
| 4.6.- Análisis de nutrientes (NO_3^- , PO_4^{3-} , $\text{Si}(\text{OH})_4$) | 16 |
| 4.6.1.- Análisis de nitrato | 16 |
| 4.6.2.- Análisis de fosfato | 17 |
| 4.6.3.- Análisis de silicato | 17 |
| 4.7.- Análisis estadístico de datos | 18 |
| 5.- Resultados | 19 |
| 5.1.- Experimento 1: Crecimiento, consumo de nutrientes, composición proximal y razón de pigmentos accesorios/clorofila <i>a</i> en <i>Amphidinium carteri</i> (Hulburt, 1957) (Dinophyceae) cultivada bajo diferentes condiciones de luz y nutrientes | 19 |
| 5.1.1.- Cultivo de <i>Amphidinium carteri</i> | 19 |
| 5.1.2.- Consumo de nutrientes (NO_3^- , PO_4^{3-}) | 21 |
| 5.1.3.- Composición proximal celular | 25 |
| 5.1.3.1.- Proteínas | 25 |
| 5.1.3.2.- Carbohidratos | 27 |
| 5.1.3.3.- Lípidos | 30 |
| 5.1.4.- Pigmentos | 32 |
| 5.1.5.- Discusión | 38 |
| 5.1.5.1.- Cultivo de <i>Amphidinium carteri</i> | 38 |
| 5.1.5.2.- Consumo de nutrientes (NO_3^- , PO_4^{3-}) | 39 |
| 5.1.5.3.- Composición proximal celular | 40 |

| | |
|---|-----|
| 5.1.5.4.- Pigmentos | 42 |
| 6.- Resultados | 46 |
| 6.1.- Experimento 2: Crecimiento, consumo de nutrientes, composición proximal y razón de pigmentos accesorios/clorofila <i>a</i> en <i>Thalassiosira pseudonana</i> Hasle y Heimdal (Bacillariophyceae) cultivada bajo diferentes condiciones de luz y nutrientes | 46 |
| 6.1.1.- Cultivo de <i>Thalassiosira pseudonana</i> | 46 |
| 6.1.2.- Consumo de nutrientes (NO_3^- , PO_4^{3-} , $\text{Si}(\text{OH})_4$) | 49 |
| 6.1.3.- Composición proximal celular | 55 |
| 6.1.3.1.- Proteínas | 55 |
| 6.1.3.2.- Carbohidratos | 58 |
| 6.1.3.3.- Lípidos | 61 |
| 6.1.4.- Pigmentos | 64 |
| 6.1.5.- Discusión | 70 |
| 6.1.5.1.- Cultivo de <i>Thalassiosira pseudonana</i> | 70 |
| 6.1.5.2.- Consumo de nutrientes (NO_3^- , PO_4^{3-} , $\text{Si}(\text{OH})_4$) | 71 |
| 6.1.5.3.- Composición proximal celular | 73 |
| 6.1.5.4.- Pigmentos | 76 |
| 7.- Resultados | 79 |
| 7.1.- Experimento 3: Crecimiento, consumo de nutrientes, composición proximal y razón de pigmentos accesorios/clorofila <i>a</i> en <i>Tetraselmis suecica</i> (Kylin) Butcher (Prasinophyceae) cultivada bajo diferentes condiciones de luz y nutrientes | 79 |
| 7.1.1.- Cultivo de <i>Tetraselmis suecica</i> | 79 |
| 7.1.2.- Consumo de nutrientes (NO_3^- , PO_4^{3-}) | 82 |
| 7.1.3.- Composición proximal celular | 87 |
| 7.1.3.1.- Proteínas | 87 |
| 7.1.3.2.- Carbohidratos | 91 |
| 7.1.3.3.- Lípidos | 94 |
| 7.1.4.- Pigmentos | 98 |
| 7.1.5.- Discusión | 108 |
| 7.1.5.1.- Cultivo de <i>Tetraselmis suecica</i> | 108 |
| 7.1.5.2.- Consumo de nutrientes (NO_3^- , PO_4^{3-}) | 110 |
| 7.1.5.3.- Composición proximal celular | 113 |
| 7.1.5.4.- Pigmentos | 116 |
| 8.- Conclusiones | 119 |
| 9.- Referencias | 122 |

DEDICATORIA

A la memoria de mis padres: Carmen Valenzuela Mendoza y Balvaneda Espinoza Valenzuela, quienes con su esfuerzo y dedicación hicieron posible mi formación personal y profesional.

A mi esposa Sandra Wood Peralta, quién me alentó a seguir adelante y por su incondicional apoyo.

A mis hijos: Paulina, Roberto, Enrique y Ricardo quienes siempre se mostraron comprensivos y por compartir su tiempo.

A mis queridos hermanos

A mis compañeros y amigos

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma de Baja California por el apoyo otorgado a los proyectos de investigación a través de las convocatorias internas y al Instituto de Investigaciones Oceanológicas por las facilidades brindadas para realizar los estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar los estudios de Doctorado en Ciencias en Oceanografía Costera.

Al Dr. Roberto Millán Núñez por la oportunidad de trabajar con el y por ayudarme a coordinar este proyecto y otros que continuarán, por su colaboración y dedicación durante el desarrollo de este trabajo; su ayuda fue crucial.

A los miembros del comité de tesis: Dr. Charles C. Trees, Dr. José A. Zertuche González, Dra. María del Pilar Sánchez Saavedra y Dr. Rafael Hernández Walls quienes con sus excelentes observaciones e interesantes discusiones contribuyeron a mejorar este trabajo.

Agradezco al personal del Centro Hidro-Óptico y Sensores Remotos de la Universidad Estatal de San Diego-USA, por el procesado de muestras en HPLC. Al Dr. Charles C. Trees por todo el apoyo y el tiempo dedicado a este trabajo.

A mi compañero de trabajo Ocean. Filiberto Núñez Cebrero por su invaluable ayuda durante estos años de estudio.

Hago también extensivo mi agradecimiento a todas aquellas personas que de una u otra manera estuvieron involucradas en este proyecto, por su ayuda e interesantes críticas. A todos Gracias.

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1. Cambios en densidad celular de *Amphidinium carteri* en cultivos estáticos con diferentes irradiancias y tres concentraciones de nutrientes: a) 441.5/18.1; b) 883/36.3; c) 1766/72.6 μM de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$. La barra vertical indica el error estándar (n=2). 20
- Figura 2. Cambios en concentración de nitrato en cultivos estáticos de *Amphidinium carteri* en diferentes irradiancias y tres concentraciones de nutrientes: a) 441.5/18.1; b) 883/36.3; c) 1766/72.6 μM de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$. La barra vertical indica el error estándar (n=2). 23
- Figura 3. Cambios en concentración de fosfato en cultivos estáticos de *Amphidinium carteri* en diferentes irradiancias y tres concentraciones de nutrientes: a) 441.5/18.1; b) 883/36.3; c) 1766/72.6 μM de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$. La barra vertical indica el error estándar (n=2). 24
- Figura 4. Contenido promedio de proteínas en *Amphidinium carteri* cultivada en 2.9 L bajo diferentes irradiancias y tres combinaciones de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$: a) bajo nutriente 441.5/8.1; b) medio nutriente 883/36.3, y c) alto nutriente 1766/72.6 μM . La barra vertical indica el error estándar (n=2). 26
- Figura 5. Contenido promedio de carbohidratos en *Amphidinium carteri* cultivada en 2.9 L bajo diferentes irradiancias y tres combinaciones de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$: a) bajo nutriente 441.5/8.1; b) medio nutriente 883/36.3, y c) alto nutriente 1766/72.6 μM . La barra vertical indica el error estándar (n=2). 29
- Figura 6. Contenido promedio de lípidos en *Amphidinium carteri* cultivada en 2.9 L bajo diferentes irradiancias y tres combinaciones de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$: a) bajo nutriente 441.5/8.1; b) medio nutriente 883/36.3, y c) alto nutriente 1766/72.6 μM . La barra vertical indica el error estándar (n=2). 31
- Figura 7. Razón promedio de pigmentos accesorios/clorofila *a* de *Amphidinium carteri*, en cultivos estáticos en diferentes irradiancias y 441.5/18.1 μM de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$. La barra vertical indica el error estándar (n=2). 35
- Figura 8. Razón promedio de pigmentos accesorios/clorofila *a* de *Amphidinium carteri*, en cultivos estáticos en diferentes irradiancias y 883/36.3 μM de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$. La barra vertical indica el error estándar (n=2). 36
- Figura 9. Razón promedio de pigmentos accesorios/clorofila *a* de *Amphidinium carteri*, en cultivos estáticos en diferentes irradiancias y 1766/72.6 μM de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$. La barra vertical indica el error estándar (n=2). 37

- Figura 10. Cambios en densidad celular de *Thalassiosira pseudonana* en cultivos estáticos con diferentes irradiancias y tres concentraciones de nutrientes: a) 441.5/18.1; b) 883/36.3; c) 1766/72.6 μM de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$. La barra vertical indica el error estándar (n=2). 48
- Figura 11. Cambios en concentración de nitrato en cultivos estáticos de *Thalassiosira pseudonana* en diferentes irradiancias y tres concentraciones de nutrientes: a) 441.5/18.1; b) 883/36.3; c) 1766/72.6 μM de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$. La barra vertical indica el error estándar (n=2). 52
- Figura 12. Cambios en concentración de fosfato en cultivos estáticos de *Thalassiosira pseudonana* en diferentes irradiancias y tres concentraciones de nutrientes: a) 441.5/18.1; b) 883/36.3; c) 1766/72.6 μM de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$. La barra vertical indica el error estándar (n=2). 53
- Figura 13. Cambios en concentración de silicato en cultivos estáticos de *Thalassiosira pseudonana* cultivada en diferentes irradiancias y tres concentraciones de nutrientes: a) 441.5/18.1; b) 883/36.3; c) 1766/72.6 μM de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$. La barra vertical indica el error estándar (n=2). 54
- Figura 14. Contenido promedio de proteínas en *Thalassiosira pseudonana* cultivada en 2.9 L bajo diferentes irradiancias y tres combinaciones de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$: a) bajo nutriente 441.5/8.1; b) medio nutriente 883/36.3, y c) alto nutriente 1766/72.6 μM . La barra vertical indica el error estándar (n=2). 57
- Figura 15. Contenido promedio de carbohidratos en *Thalassiosira pseudonana* cultivada en 2.9 L bajo diferentes irradiancias y tres combinaciones de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$: a) bajo nutriente 441.5/8.1; b) medio nutriente 883/36.3, y c) alto nutriente 1766/72.6 μM . La barra vertical indica el error estándar (n=2). 60
- Figura 16. Contenido promedio de lípidos en *Thalassiosira pseudonana* cultivada en 2.9 L bajo diferentes irradiancias y tres combinaciones de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$: a) bajo nutriente 441.5/8.1; b) medio nutriente 883/36.3, y c) alto nutriente 1766/72.6 μM . La barra vertical indica el error estándar (n=2). 63
- Figura 17. Razón promedio de pigmentos accesorios/clorofila *a* de *Thalassiosira pseudonana*, en cultivos estáticos en diferentes irradiancias y 441.5/18.1 μM de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$. La barra vertical indica el error estándar (n=2). 67
- Figura 18. Razón promedio de pigmentos accesorios/clorofila *a* de *Thalassiosira pseudonana*, en cultivos estáticos en diferentes irradiancias y 883/36.3 μM de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$. La barra vertical indica el error estándar (n=2). 68
- Figura 19. Razón promedio de pigmentos accesorios/clorofila *a* de *Thalassiosira pseudonana*, en cultivos estáticos en diferentes irradiancias y 1766/72.6 μM de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$. La barra vertical indica el error estándar (n=2). 69

- Figura 20. Cambios en densidad celular de *Tetraselmis suecica* en cultivos estáticos con diferentes irradiancias y tres concentraciones de nutrientes: a) 441.5/18.1; b) 883/36.3; c) 1766/72.6 μM de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$. La barra vertical indica el error estándar (n=2). 81
- Figura 21. Cambios en concentración de nitrato en cultivos estáticos de *Tetraselmis suecica* en diferentes irradiancias y tres concentraciones de nutrientes: a) 441.5/18.1; b) 883/36.3; c) 1766/72.6 μM de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$. La barra vertical indica el error estándar (n=2). 85
- Figura 22. Cambios en concentración de fosfato en cultivos estáticos de *Tetraselmis suecica* en diferentes irradiancias y tres concentraciones de nutrientes: a) 441.5/18.1; b) 883/36.3; c) 1766/72.6 μM de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$. La barra vertical indica el error estándar (n=2). 86
- Figura 23. Contenido promedio de proteínas en *Tetraselmis suecica* cultivada en 2.9 L bajo diferentes irradiancias y tres combinaciones de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$: a) bajo nutriente 441.5/8.1; b) medio nutriente 883/36.3, y c) alto nutriente 1766/72.6 μM . La barra vertical indica el error estándar (n=2). 90
- Figura 24. Contenido promedio de carbohidratos en *Tetraselmis suecica* cultivada en 2.9 L bajo diferentes irradiancias y tres combinaciones de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$: a) bajo nutriente 441.5/8.1; b) medio nutriente 883/36.3, y c) alto nutriente 1766/72.6 μM . La barra vertical indica el error estándar (n=2). 93
- Figura 25. Contenido promedio de lípidos en *Tetraselmis suecica* cultivada en 2.9 L bajo diferentes irradiancias y tres combinaciones de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$: a) bajo nutriente 441.5/8.1; b) medio nutriente 883/36.3, y c) alto nutriente 1766/72.6 μM . La barra vertical indica el error estándar (n=2). 97
- Figura 26. Razón promedio de pigmentos accesorios/clorofila *a* de *Tetraselmis suecica*, en cultivos estáticos en diferentes irradiancias y 441.5/18.1 μM de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$. La barra vertical indica el error estándar (n=2). 101
- Figura 27. Razón promedio de pigmentos accesorios/clorofila *a* de *Tetraselmis suecica*, en cultivos estáticos en diferentes irradiancias y 883/36.3 μM de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$. La barra vertical indica el error estándar (n=2). 104
- Figura 28. Razón promedio de pigmentos accesorios/clorofila *a* de *Tetraselmis suecica*, en cultivos estáticos en diferentes irradiancias y 1766/72.6 μM de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$. La barra vertical indica el error estándar (n=2). 107

LISTA DE TABLAS

Página

| | |
|--|----|
| Tabla I. Razón promedio de pigmentos accesorios/clorofila α de <i>Amphidinium carteri</i> cultivado en diferentes condiciones de luz y nutrientes. | 34 |
| Tabla II. Valores promedio de la tasa de crecimiento específica de <i>Thalassiosira pseudonana</i> cultivada en diferentes irradiancias y concentración de nutrientes. | 47 |

1. Introducción

El fitoplancton marino contiene pigmentos fotosintéticos cuya función es la absorción de la energía luminosa en diferentes longitudes de onda, y transferir esta a los centros de reacción donde es utilizada para procesos fotoquímicos (Masojidek *et al.*, 2004). Estos pigmentos están divididos en tres grupos: clorofilas (*a*, *b*, *c*₁, *c*₂, *c*₃), carotenoides (carotenos y sus derivados oxigenados conocidos como xantofilas), y biliproteínas (aloficocianinas, ficocianinas, ficoeritrinas). La clorofila *a* es el pigmento universal del fitoplancton eucariota y es el componente celular más confiable, que ha sido utilizado para conocer la biomasa del fitoplancton tanto en el ambiente marino como en condiciones de cultivo. Sin embargo, la razón de la clorofila *a* respecto a otros componentes celulares no es constante, debido a que la concentración celular de la clorofila *a* depende de la composición de especies y el estado foto-adaptativo del fitoplancton presente en las muestras. También, el contenido de pigmentos de células del fitoplancton cambia cuando estas experimentan fotoaclimatación o cuando son expuestas a condiciones de estrés, por ejemplo limitación de luz o nutrientes (Goericke y Montoya, 1998). Otro inconveniente que se tiene al usar la clorofila *a*, es que para efecto de cálculo, se considera el total de las algas, sin considerar especies individuales, entonces no se conoce con cuánto contribuye cada taxa a la clorofila *a* para los cálculos de productividad primaria.

La necesidad de mediciones más precisas de la biomasa de fitoplancton usando la clorofila *a* justifica que se continúe investigando de cómo cambios en las características del fitoplancton tienen un impacto en el proceso fotosintético y contenido de clorofila *a*. Varios pigmentos accesorios (carotenoides fotosintéticos y carotenoides fotoprotectores), le permiten a las células del fitoplancton ampliar su ventana óptica mejorando su eficiencia

de absorción y capacidad de adaptación, lo cual protege el aparato fotosintético del exceso de luz (Bidigare *et al.*, 1990; Hoepffner y Sathyendranath, 1991). Además, ciertos pigmentos son únicos para grupos taxonómicos específicos, por ejemplo: prasinoxantina presente en algunas prasinofitas y peridínina en la mayoría de los dinoflagelados. Otros son encontrados principalmente en uno o pocos grupos: 19'-hexanoyloxyfucoxantina presente en primnesiofitas y algunos dinoflagelados, y fucoxantina en diatomeas, crisofitas, primnesiofitas y rafidofitas. La cuantificación de estos pigmentos proporciona la base para calcular la contribución de grupos de fitoplancton en lo individual a la cantidad total de clorofila *a* lo que permite conocer la relación entre el contenido celular de pigmentos accesorios y clorofila *a* en diferentes especies (Henriksen *et al.*, 2002).

Experimentos de campo y laboratorio han hecho uso de diferentes técnicas para conocer la razón de pigmentos accesorios respecto a la clorofila *a*. Los primeros trabajos para calcular la contribución de distintos grupos algales, usando pigmentos específicos fueron hechos por análisis de regresión lineal múltiple entre pigmentos accesorios y clorofila *a* (Gieskes *et al.*, 1988), usando la clorofila *a* como la variable dependiente y la concentración de pigmentos accesorios como variable independiente. Los coeficientes de regresión pueden ser usados como estimación de la razón pigmentos accesorios:clorofila *a*, lo cual permite el cálculo de la contribución de cada grupo mayor algal a la biomasa total del fitoplancton, expresada como equivalentes de clorofila *a*. Sin embargo, una desventaja de esta técnica es que la razón de pigmentos puede cambiar como resultado de días de larga duración, que modifican el ambiente de luz y disponibilidad de nutrientes (Goericke y Montoya, 1998; Mackey *et al.*, 1998).

Otro método para calcular la biomasa de diferentes grupos algales usando datos de pigmentos es el programa CHEMTAX, el cual fue desarrollado por Mackey *et al.* (1996). Este usa un factor de análisis y algoritmos descendentes para encontrar el mejor ajuste a los datos, basado en cálculos iniciales de razones apropiadas de pigmentos accesorios: clorofila *a* que pueden estar presentes en las muestras. La aplicación del programa CHEMTAX para muestras costeras y estuarinas es limitada debido a la falta de información sobre razones de pigmentos para estas áreas.

Los métodos cromatográficos modernos, son usados para el cálculo de clorofilas y carotenoides. Este procedimiento no solo determina la biomasa de fitoplancton, sino también la biomasa de grupos específicos de microalgas de concentraciones de taxón-carotenoides específicos tales como fucoxantina (diatomeas), peridinina (dinoflagelados) y zeaxantina (procariotes fotooxitrofos). En consecuencia, la aplicación de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para análisis de pigmentos de fitoplancton ha disminuido la incertidumbre para mediciones de clorofila *a* y feopigmentos, también como pigmentos accesorios, dado que los compuestos son físicamente separados e individualmente cuantificados.

La técnica HPLC ha sido una valiosa herramienta que facilita la separación, identificación y cuantificación de los compuestos pigmentarios del fitoplancton. Este método, ha revelado que la divinil clorofila *a* y *b* están solo presentes en proclorofitas (Goericke y Repeta, 1992). Los feopigmentos fluorométricamente determinados son subestimados en la presencia de clorofila *b* (Vernet y Lorenzen, 1987), y la incertidumbre en determinar la concentración de clorofila *a* es variable en tiempo y espacio (Trees *et al.*,

1985; Smith *et al.*, 1987; Hoepffner y Sathyendranath, 1992; Bianchi *et al.*, 1995; Tester *et al.*, 1995).

Estudios de laboratorio y campo han mostrado que la razón de pigmentos accesorios individuales respecto a la clorofila *a* pueden variar en función de la composición taxonómica y el estado fisiológico, así como también por la concentración de nutrientes, intensidad de luz, composición espectral y fotoperíodo (Bidigare *et al.*, 1990; Mille *et al.*, 1993; Morel *et al.*, 1993; Bricaud *et al.*, 1995). Además, se ha demostrado que, junto a los pigmentos accesorios individuales, un selecto grupo de compuestos pigmentarios pueden también tener un alto grado de variabilidad relativo a la clorofila *a* (Gieskes *et al.*, 1988; Everitt *et al.*, 1990; Mackey *et al.*, 1996), indicando cambios en la estructura de la comunidad del fitoplancton tanto en su distribución horizontal y vertical.

La biomasa del fitoplancton en cualquier cuerpo de agua cambia de acuerdo a condiciones ambientales, características fisiológicas de los diferentes grupos (Kjørboe, 1993) e interacciones ecológicas entre los niveles tróficos (Harris, 1986). Así que diversas poblaciones presentes en un momento dado, reflejan su máxima capacidad en el consumo de nutrientes y utilización de la luz. Este acoplamiento entre condiciones físico-químicas y la estructura de la comunidad del fitoplancton es reflejado en adaptaciones fisiológicas y morfológicas para las diferentes escalas del movimiento de agua, a lo cual esta sujeto el fitoplancton (Estrada y Bardalet, 1997).

Cuando los nutrientes son escasos, por ejemplo, condiciones oligotróficas, la biomasa del fitoplancton es dominada por pequeñas células procariotas (Chisholm *et al.*, 1988; Olson *et al.*, 1990). Las células que crecen en condiciones bajas de nutrientes y alta irradiancia tienen alta concentración de pigmentos accesorios, incluyendo pigmentos

fotoprotectores, en relación a aquellas que crecen donde el nutriente es abundante (Sosik y Mitchell, 1991; Geider *et al.*, 1993; Stuart *et al.*, 1998).

Procesos físicos que proveen nutrientes a la zona eufótica (mezcla vertical, surgencias), permitirán que proliferen células más grandes, complementando grupos de pequeño tamaño (Yentsch y Phinney, 1989; Chisholm, 1992). Del mismo modo, un tiempo considerable en la respuesta numérica de filtro-alimentadores permitirá células más grandes en la estructura de la comunidad fitoplanctónica (Thingstad y Sakshaug, 1990; Kiørboe, 1993; Reigman *et al.*, 1993; Carr, 1998).

Para conocer como la luz modifica la respuesta a cambios temporales en la capacidad de asimilación de amonio, nitrato, fosfato, y silicato por fitoplancton en cultivo, es necesario conocer la interacción de esta variable en el ambiente de cultivo, debido a que es de primordial importancia en acuicultura (Parslow *et al.*, 1984). Estudios al respecto han evaluado la tasa de renovación y concentración de nutrientes para modificar la productividad y composición bioquímica en cultivos ciclostáticos de microalgas marinas (Fabregas *et al.*, 1995). Debido a la importancia de la dinámica del fitoplancton ante fluctuaciones en el suministro de nutrientes, estudios recientes han enfatizado la importancia de conocer la respuesta a la temperatura, nitrógeno, limitación por luz, composición de pigmentos y su efecto en las propiedades ópticas de distintas especies de fitoplancton en cultivos de laboratorio (Sciandra *et al.*, 2000; Stramski *et al.*, 2002; Henriksen *et al.*, 2002; Platt *et al.*, 2003). Estos estudios indican que la tasa de crecimiento del fitoplancton varía ante distintas condiciones ambientales y consideran que los nutrientes, luz (intensidad, composición espectral y fotoperíodo), temperatura, e interacciones entre los niveles tróficos son condiciones que hacen variar la tasa de

crecimiento de las células del fitoplancton y por tanto, modifican la concentración de clorofila α , la cual es utilizada para el cálculo la biomasa del fitoplancton. Por lo tanto, para adecuadas estimaciones de biomasa a partir de pigmentos es necesario tener un mejor conocimiento referente a los cambios en la concentración de clorofila α y pigmentos accesorios en diferentes fases de crecimiento de diferentes especies en cultivo, en distintos niveles de irradiancia y concentración de nutrientes. Asimismo, también es necesario conocer acerca de sus características fisiológicas básicas de las distintas especies en cultivo con respecto a la asimilación de nutrientes, debido a que los nutrientes son uno de los factores importantes en el crecimiento del fitoplancton, que influyen directamente en la tasa de crecimiento, composición celular (proteínas, lípidos y carbohidratos), concentración de clorofila α , así como también en su productividad.

En este trabajo, se estudia la interacción de diferentes condiciones de irradiancia y nutrientes en el crecimiento, composición celular (proteínas, lípidos y carbohidratos), y contenido de pigmentos (clorofila α y pigmentos accesorios) de tres especies de microalgas marinas. La importancia es conocer los cambios en la razón de pigmentos accesorios respecto a la clorofila α , y la importancia de estos cambios en la calidad celular de las especies que comúnmente se utilizan en la acuicultura.

2. Hipótesis

Cambios simultáneos en la irradiancia y la concentración de nutrientes afectan de manera diferente la tasa de crecimiento de diferentes especies de microalgas marinas mantenidas en cultivos estáticos.

La razón de pigmentos accesorios/clorofila α en diferentes especies de microalgas cambia en función de la irradiancia y/o concentración de nutrientes.

Las diferencias en la composición celular debido a diferentes irradiancias y/o concentración de nutrientes usados para el cultivo son específicas para cada especie.

Diferentes especies de microalgas tienen distintos requerimientos de nutrientes durante su crecimiento.

3. Objetivo General:

El objetivo central de este estudio es conocer los cambios de los pigmentos accesorios respecto a la concentración de clorofila α , composición bioquímica (proteínas, lípidos y carbohidratos), y consumo de nutrientes en diferentes especies de microalgas (*Amphidinium carteri*, *Thalassiosira pseudonana*, y *Tetraselmis suecica*) al cultivarlas en distintas irradiancia y concentración de nutrientes en condiciones de laboratorio.

3.1 Objetivos Específicos

Conocer el efecto de diferentes condiciones luz y nutrientes en la densidad celular, la composición bioquímica (proteínas, lípidos y carbohidratos), las razones de pigmentos accesorios respecto a la clorofila α en tres especies de microalgas marinas.

Determinar en las diferentes especies de microalgas las razones de pigmentos accesorios respecto a la clorofila α , la composición bioquímica y los cambios respecto al de cultivo en diferentes condiciones de luz y nutrientes.

Determinar el consumo diario de nutrientes (NO_3^- , PO_4^{3-} , Si(OH)_4) de diferentes especies de microalgas cultivadas en diferentes condiciones de luz y nutrientes.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Especies usadas y aclimatación

Tres especies de microalgas marinas fueron elegidas para este estudio: El dinoflagelado *Amphidinium carteri* (Hulburt) Dinophyceae, la diatomea céntrica *Thalassiosira pseudonana* (Hasle y Heimdal) Bacillariophyceae, y la fitoflagelada *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butcher Prasinophyceae. Estas especies se obtuvieron de la colección de cultivos del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California. El cultivo inicial de cada una de las especies se llevó a cabo mediante la preparación de 150 mL de medio f/2 de Guillard (1975) en matraces Erlenmeyer. Previo a la preparación del medio, el agua de mar se filtró a través de 1 y 0.65 μm y se irradió con lámparas ultravioleta de 25 W. Al medio de cultivo se le adicionó Tris-buffer para minimizar el efecto de pH. Éstos medios se esterilizaron en autoclave a 121 °C, 15 libras de presión por pulgada cuadrada durante 15 minutos. Después, cada matraz recibió bajo condiciones asépticas vitaminas estériles (tiamina, biotina y B_{12}) especificadas en el medio f/2 y un inóculo de 5 mL de cada una de las especies. Cada cultivo inicial se mantuvo en 19 ± 1 °C por un tiempo de 7 días para *A. carteri* y *T. suecica* y de 3 días para el caso de *T. pseudonana*, con iluminación continua a una

irradiancia fotosintéticamente activa de $150 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, suministrada por lámparas de luz de día General Electric de 75 Watt. Ésta irradiancia fue una de las cuatro usadas en los experimentos y cada una de las especies se cultivó bajo esta condición por dos semanas para su aclimatación. La irradiancia se midió en la superficie externa de los matraces Erlenmeyer con un irradiómetro PAR (modelo QLS-100, 4π sensor, Biospherical Instruments).

4.2 Diseño experimental-cultivo

Para evaluar el efecto de la irradiancia y del consumo de nutrientes en el crecimiento, composición celular y razón de pigmentos accesorios/clorofila *a* un diseño factorial de 4 condiciones de luz (50, 150, 300 y $750 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y tres concentraciones de nitrato y fosfato relativas al medio f/2: bajo contenido de nutriente con 441.5/18.1, medio contenido de nutriente con 883/36.3, y alto contenido de nutriente con 1766/72.6 μM de NaNO_3 y NaH_2PO_4 respectivamente, fue llevado a cabo estableciendo 12 tratamientos experimentales. La razón nitrato/fosfato se mantuvo en 24.3. La concentración de silicatos usada para el cultivo de *Thalassiosira pseudonana*, se mantuvo en 107 μM en las distintas condiciones evaluadas en esta especie.

Los cultivos de cada especie se iniciaron en matraces Erlenmeyer, con un volumen de 200 mL de medio por duplicado para cada tratamiento. El tratamiento del agua de mar, la adición de Tris-buffer, la esterilización del medio de cultivo y la adición de vitaminas se realizó como se indica arriba. Cada matraz recibió 10 mL de inóculo de cada una de las especies. El periodo de cultivo en Erlenmeyer para *A. carteri* y *T. suecica* fue por 7 días mientras que *T. pseudonana* se cultivó por 3 días. La irradiancia de crecimiento para cada

especie en esta etapa fue $150 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Cada especie se transfirió a matraces Fernbach, en los cuales se llevaron a cabo todos los experimentos (2.9 L de medio, n=2 por cada tratamiento). Estos se esterilizaron de la misma manera descrita arriba. Cada unidad experimental en Fernbach recibió 200 mL de inóculo (obtenido del cultivo en Erlenmeyer) bajo condiciones asépticas. El cultivo de *A. carteri* y *T. suecica* fue por 7 días excepto *T. pseudonana* la cual se cultivo por 5 días. Los cultivos se mantuvieron en temperatura de cuarto de $19 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, salinidad de 33 partes por mil. El pH de los cultivos se midió diario con un potenciómetro Altex y se ajustó en un intervalo de 7.2-8.5 mediante la adición discontinua (mañana-tarde), de dióxido de carbono a razón de 270 mL por minuto, medido con un flujometro integrado al cilindro de almacenamiento de CO_2 . Tanto los cultivos en Erlenmeyer como los cultivos en Fernbach no se le suministraron aireación y se agitarán diario de manera manual.

Muestras diarias (n=2) de un mililitro por especie de microalga, de cada condición experimental, se cuantificaron en un contador de partículas Beckman Coulter Multisizer 3. Las tasas de crecimiento promedio (μ) para cada especie fueron calculadas durante fase logarítmica usando la siguiente expresión:

$$\mu = \ln(N_1) - \ln(N_0) / t_1 - t_0$$

Donde μ es la tasa de crecimiento específica por día. N_1 es la densidad celular en tiempo 1 (t_1) y N_0 es la densidad celular en tiempo 0 (t_0).

4.3. Procedimiento de muestreo y preservado de muestras

Cada tratamiento experimental de cultivo fue muestreado por duplicado para cada una de las especies y variaciones en el volumen de muestreo fueron debidas a la densidad celular de cada especie en diferentes condiciones experimentales y fases de crecimiento.

El muestreo para composición celular (proteínas, lípidos y carbohidratos), de clorofila *a*, carotenoides fotosintéticos, carotenoides fotoprotectores y nutrientes (NO_3^- , PO_4^{3-} y SiO_2), se realizó durante 7 días para *A. carteri* y *T. suecica* y 5 días para *T. pseudonana*.

4.3.1. Muestreo para composición proximal celular

El volumen de muestreo para *A. carteri* varió entre 50 y 25 mL durante los tres primeros y últimos 4 días de cultivo de cada condición experimental. Sin embargo, para *T. suecica* muestras de 50 mL fueron filtradas por 7 días para el tratamiento de 50 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ el volumen de muestra fue de 50 y 30 mL durante los 4 primeros y últimos 3 días de cultivo, en cambio el volumen muestreado en la condición de 300 y 750 varió de 50, 25 y 20 mL para los tres primeros, cuarto y últimos 3 días de cultivo, excepto que en 750 fueron hechos en los dos primeros, tercer-cuarto y últimos 3 días. En el caso de *T. pseudonana* el volumen de muestreo fue de 50 mL para todas las condiciones experimentales. Todas las muestras se filtraron a través de filtros Whatman de microfibra de vidrio GF/F de 47 mm de diámetro y 0.7 μm de retención de partícula, aplicando un vacío de 30 cm de mercurio mediante una bomba operada de forma manual. Previo al filtrado, los filtros se pesaron e incineraron a 450 °C por 4 horas en una mufla Thermolyne 1400. El material retenido en los filtros se mantuvieron en el sistema de filtración y se lavaron con formato de amonio al 2.25 %, se colocaron en bolsas de papel aluminio y se preservaron a -20 °C en un ultra-congelador hasta su análisis.

4.3.2. Muestreo para pigmentos y nutrientes

Para *A. carteri* se filtraron 10 mL los tres primeros días y 5 mL en los últimos 4 días de cultivo de cada condición experimental. En el experimento de *T. suecica* muestras de 10 mL fueron filtradas para las condiciones de 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, en cambio para las condiciones de 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ el volumen de muestreo varió entre 10 y 5 mL durante los tres primeros y últimos 4 días, excepto que en la condición de 750 el muestreo de 5 mL ocurrió entre el 3 y 7 día de cultivo. El volumen de muestreo para *T. pseudonana* permaneció en 10 mL para todos los tratamientos. Los volúmenes específicos de muestreo de los cultivos fueron filtrados aplicando baja presión (15 cm de mercurio) a través de filtros Whatman de microfibra de vidrio GF/F de 25 mm de diámetro y 0.7 μm de retención de partícula. Individualmente, cada filtro junto con el material retenido se envolvió en papel aluminio y se preservó en nitrógeno líquido para ser analizados dentro de los primeros tres meses después de haber realizado el muestreo.

Las muestras (n=2 por tratamiento) para análisis de nutrientes se obtuvieron del medio removido de los volúmenes filtrados para pigmentos arriba especificados por especie. De cada muestra (8 mL) se almacenó en frascos de polipropileno y se preservaron a -20 °C en un ultra-congelador hasta su análisis.

4.4 Análisis de la composición proximal celular

4.4.1. Análisis de proteínas

Las muestras (n=2 por tratamiento) contenidas en los filtros se colocaron en tubos de ensayo con tapa. Para la extracción de proteínas se les agregó 5 mL de hidróxido de sodio 1 N y se colocaron en baño a temperatura de 100 °C por 10 minutos (Raush, 1981). Los primeros extractos obtenidos, se trasvasaron a tubos de ensayo limpios. Se hizo una segunda extracción como se indicó anteriormente y se recuperó el segundo extracto. Se enfrió el volumen total de extracto para después centrifugar a 1500 RPM por 10 minutos. Alícuotas de 300 µL del extracto de cada condición experimental fueron removidas y vertidas en tubos. A las muestras contenidas en los tubos, se le agregó 1.7 mL de agua desionizada y 3 mL del reactivo de Bradford. Después de 2 minutos y antes de 1 hora se midió la absorbancia de las muestras a 595 nm en cubetas de 1 cm contra un blanco por reactivos en un espectrofotómetro Beckman serie 500. Previo al análisis, la cantidad de proteínas (mg) se graficó contra la absorbancia correspondiente que resultó de una curva estándar por triplicado con seroalbumina-bovina usada para determinar la proteína en las muestras desconocidas (Bradford, 1976).

4.4.2. Análisis de carbohidratos

Muestras por duplicado de cada condición experimental fueron colocadas en tubos de ensayo. A cada muestra se le adicionó 10 mL de ácido sulfúrico 2N y se taparon. Después se colocaron en baño a temperatura de 90 °C por dos horas. Una vez completada la extracción se enfrían a temperatura ambiente. Del extracto de cada muestra, se pipetea 200 µL y se incorporan a tubos de ensayo, se les agregó 1.8 mL de agua desionizada, 1

mL de fenol al 5%, y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se dejó reposar por 30 minutos y después de este tiempo se midió la absorbancia de las muestras a 490 nm en un espectrofotómetro Beckman serie 500. Previo al análisis se realizó una curva estándar por triplicado con D-Glucosa para determinar los carbohidratos en las muestras problema (Kochert, 1978a).

4.4.3. *Análisis de lípidos*

Muestras por duplicado fueron colocadas en tubos de ensayo y para la extracción de lípidos se adicionó una mezcla de cloroformo-metanol-agua (1:2:1, v/v/v; 5 mL)) (Bligh y Dyer, 1959). Durante el proceso de extracción, las muestras contenidas en los tubos se colocaron en baño a temperatura de 40 °C por 1 hora. Enfriadas las muestras, se añadió a cada una 1 mL de cloruro de potasio 0.1N, se dejó reposar por 1 hora. Al término de este tiempo, se formó la fase clorofórmica que contenía los lípidos. Se extrajo esta fase de cada muestra y se transfirió a un nuevo tubo de ensayo. El solvente que contenía la muestra se removió en una estufa a 40 °C aplicando repetidamente un vacío de 25 libras. Al extracto contenido en los tubos se les añadió 3 mL de dicromato de potasio al 2% y 4.5 mL de agua desionizada. Se colocaron de nuevo en baño a temperatura de 40 °C por 15 minutos. Cuando las muestras se enfriaron, se midió la absorbancia de cada una a 590 nm en un espectrofotómetro Beckman serie 500. Para determinar el contenido de lípidos en las muestras, se realizó una curva estándar por triplicado con ácido esteárico (Pande *et al.*, 1963).

4.5. Análisis de pigmentos

Los filtros de fibra de vidrio que contenían las muestras ($n=2$ por tratamiento) de cultivos de microalgas fueron analizados en el laboratorio del Centro de Hidro-Óptica y Sensores Remotos (CHORS, por sus siglas en inglés) en San Diego, California. El protocolo que se siguió para HPLC es el descrito por Trees *et al.* (2000) y consistió en descongelar y poner los filtros que contenían la muestra en 4 mL en acetona al 100% para la extracción de clorofila a y pigmentos accesorios. Después de 24 horas de extracción en un congelador a -20 °C, las muestras fueron sonicadas por 10 segundos usando una punta de microsonda en un ciclo de 60%. Luego fueron extraídos de nuevo por 24 horas. Las partículas de vidrio generadas por el sonicado, fueron removidas del extracto por centrifugación y filtración usando filtros de 0.2 μm . Se utilizó cantaxantina como estándar interno para corregir los cambios en volumen durante el proceso de extracción (la cantaxantina normalmente no es encontrada en las muestras), dado que la cantaxantina es un carotenoide que no fluoresce, este no afecta el análisis de fluorescencia. Se utilizó el método estándar fluorométrico de Holm-Hansen *et al.* (1965) para calcular la concentración de clorofila y feopigmentos en un alícuota de 100 μ del extracto pigmentario. Estas concentraciones también se corrigieron por cambios en el volumen de extracción usando el estándar interno cantaxantina.

Las clorofilas y carotenoides fueron separados mediante HPLC (Wright *et al.*, 1996) con una columna ODS-2 C18, utilizando un sistema de gradiente con tres solventes con un flujo de 1 mL min^{-1} . La separación de los pigmentos requirió 25 minutos, siendo los picos de los pigmentos detectados mediante un detector de absorción (ThermoQuest UV6000 scanning diode array detector), de 190 a 800 nm, con una resolución de 1 nm.

Además, un detector de fluorescencia TermoQuest FL 3000 fue utilizado para detectar y cuantificar varios productos de degradación de clorofila, que ocurren a muy bajas concentraciones. Se utilizó el protocolo de la NASA para el análisis de HPLC (Trees *et al.*, 2000).

4.6. Análisis de nutrientes (NO_3^- , PO_4^{3-} , $Si(OH)_4$)

4.6.1. Análisis de nitrato

En todas las muestras del cultivo de las diferentes especies, la concentración de nitrato, fosfato y silicato excedieron los límites de detección de los métodos de análisis de agua de mar (Parson *et al.*, 1985). Entonces, muestras (n=2) de cada condición experimental se diluyeron en agua de mar sintética en una proporción que permitiera cuantificar su concentración. Para el análisis de nitrato las muestras se ajustaron en el intervalo de 0.8-20 μ M. Muestras de 25 mL previamente diluidas, se les agregó 0.5 mL de una solución concentrada de cloruro de amonio. De cada muestra se vertieron 5 mL en la columna de reducción que contenía limaduras de cadmio recubiertas con cobre y se eliminaron, se agregaron otros 5 mL los cuales se usaron para lavar cada tubo de ensayo donde se colectó la muestra. Se añadieron los 15 mL restantes a la columna, se colectaron 10 mL en un tubo de ensayo y se drenó el resto de la solución antes de añadir los 5 mL de la siguiente réplica. El nitrato de cada muestra se redujo cuantitativamente a nitrito. A esta muestra se le agregó 200 μ L de la solución de sulfanilamida, se agitó y se esperó que la reacción ocurriera por un periodo de 2 a 8 minutos pero que no excediera de 8. Luego se añadió 200 μ L de la solución de naftiletildiamina y se mezcló inmediatamente. Después de diez minutos y antes de dos horas, se midió la absorbancia de las muestras en cubetas

de 1 cm a una longitud de onda de 543 nm haciendo correcciones por blanco. La concentración de cada muestra se determinó en base a una curva estándar hecha por triplicado con nitrato de potasio (Parson *et al.*, 1985).

4.6.2. Análisis de fosfato

El análisis se realizó por duplicado en cada condición experimental. Previo al análisis, las muestras se diluyeron en agua de mar sintética en una proporción que permitiera cuantificar su concentración (0.3-5.1 μM). De las muestras diluidas se tomaron 25 mL, se añadió a cada una 2.5 mL de una mezcla de ácido molibdico, ácido ascórbico y tartrato de antimonio y potasio. El complejo resultante fue reducido para dar una solución de color azul. Después de 5 minutos, y preferentemente dentro de las primeras 2-3 horas se midió la absorbancia de las muestras en cubetas de 1 cm a una longitud de onda de 885 nm haciendo correcciones por blanco. Para determinar la concentración de cada muestra, se realizó una curva estándar por triplicado con fosfato monobásico de potasio anhidro (Parson *et al.*, 1985).

4.6.3. Análisis de silicato

Las muestras (n=2) de cada condición experimental se diluyeron en agua de mar sintética para ajustar su concentración en el intervalo de 0.5 a 107 μM de silicato. De las muestras diluidas se tomaron 5 mL. Se le añadió a cada muestra 2.5 mL de molibdato más 3.75 mL de reactivo reductor que consistió en mezclar 100 mL de metol sulfito con 60 mL de ácido oxálico y 60 mL de una solución de ácido sulfúrico preparada al 50 %. La mezcla del reactivo reductor se preparó para usarlo inmediatamente en el análisis. Las muestras se

dejaron en reposo por espacio de 2-3 horas (aunque la reacción generalmente se completa en 1 hora, excepto cuando hay altas concentraciones de silicatos, las soluciones deben de medirse dentro de 6 horas). Después de este tiempo, se midió la absorbancia de las muestras en cubetas de 1 cm a una longitud de onda de 810 nm haciendo correcciones por blanco. Para determinar la concentración de cada muestra se realizó una curva estándar por triplicado con silicofluoruro de sodio (Parson *et al.*, 1985).

4.7. *Análisis estadístico de datos*

Un análisis de varianza de dos vías fue usado para determinar el efecto individual y combinado de diferentes concentraciones de nutrientes y distintas condiciones de luz en las variables dependientes de densidad celular y razón de pigmentos para las distintas especies estudiadas. Para determinar diferencias estadísticamente significativas de las variables independientes ($P < 0.05$) se realizó un procedimiento de comparaciones múltiples (prueba de Tukey). Asimismo, se utilizó un anova de tres vías para conocer diferencias significativas en las variables dependientes proteínas, lípidos y carbohidratos para las distintas condiciones de nutrientes, luz y tiempo de cultivo. Para aquellos valores que fueron significativamente afectados por variables independientes ($P < 0.05$), se llevó a cabo una prueba de comparaciones múltiples (Tukey).

5. RESULTADOS

5.1. Experimento 1: Crecimiento, consumo de nutrientes, composición proximal y razón de pigmentos accesorios/clorofila *a* en *Amphidinium carteri* (Hulburt, 1957) (Dinophyceae) cultivada bajo diferentes condiciones de luz y nutrientes.

5.1.1. Cultivo de *A. carteri*

En los cultivos con baja concentración de nutrientes, la densidad celular de *A. carteri* no presentó cambios significativos durante los primeros dos días (Fig. 1a), aunque durante este mismo periodo, en todas las condiciones evaluadas, *A. carteri* siempre mostró lento crecimiento en irradiancias de $750 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 1a, b y c). En las condiciones de más baja irradiancia (50 y $150 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$), la fase de crecimiento exponencial ocurrió durante los primeros cinco días con tasa de crecimiento específica entre 0.5 y 0.6 , mientras que en altas irradiancias (300 y $750 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) el crecimiento se observó entre el tercer y cuarto día de cultivo, donde la tasa de crecimiento específica varió de 0.6 a 1.3 .

La densidad celular se incrementó con un aumento en la irradiancia, pero no respecto a la concentración de nutrientes. Una mayor respuesta en la densidad celular de *A. carteri* fue observada en $300 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 1a, b y c). Aunque diferencias en la densidad celular fueron observadas, estas no fueron estadísticamente significativas entre las diferentes condiciones de nutrientes ($P > 0.05$) e irradiancias ($P > 0.05$) y el efecto de diferentes condiciones de nutrientes no dependió de la condición de la luz. Por consiguiente, no hubo una interacción estadísticamente significativa entre nutrientes e irradiancia ($P > 0.05$). En el cuarto y quinto día de cultivo, la fase de lento crecimiento se

observó y la tasa de crecimiento específica disminuyó en todos los tratamientos, indicando el inicio de la fase estacionaria del ciclo de crecimiento de *A. carteri*.

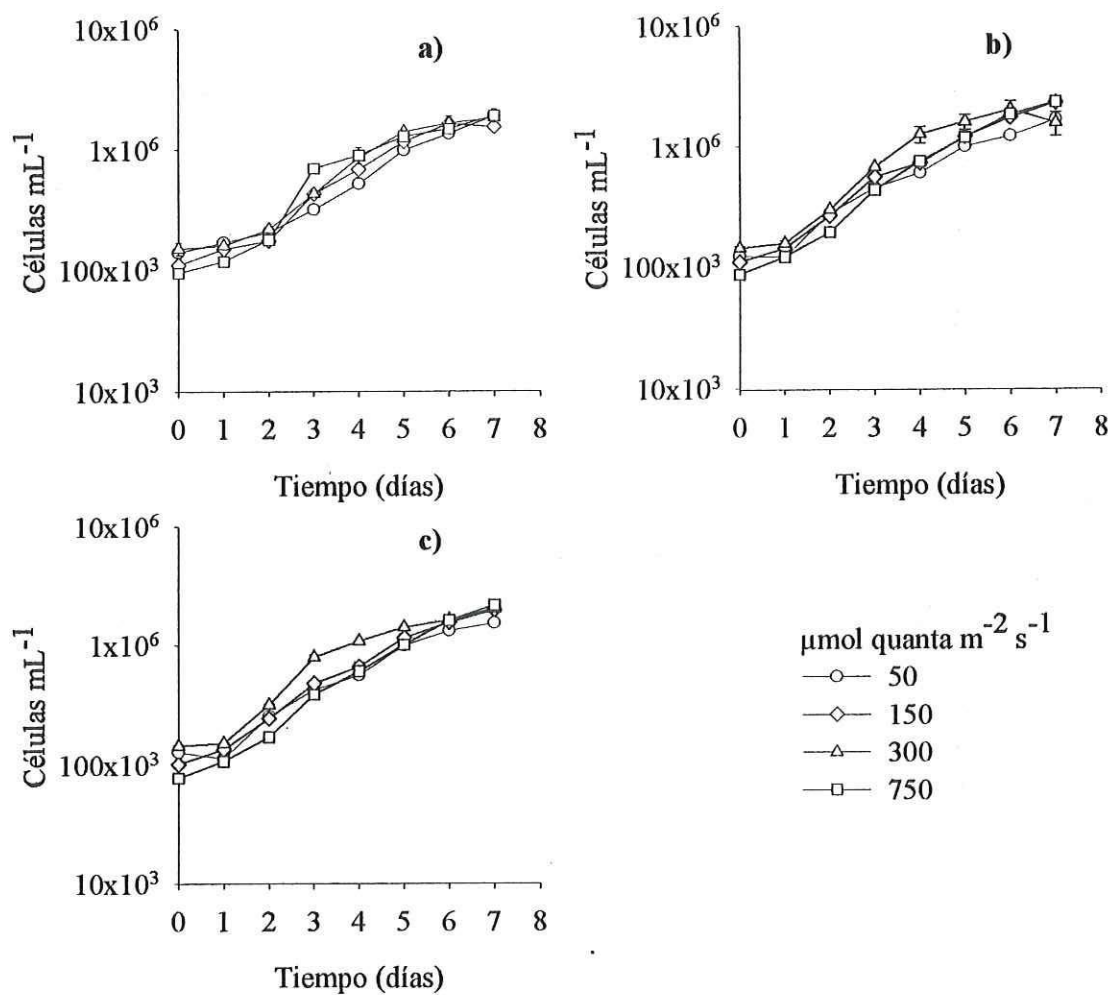


Figura 1. Cambios en densidad celular de *Amphidinium carteri* en cultivos estáticos con diferentes irradiancias y tres concentraciones de nutrientes: a) 441.5/18.1; b) 883/36.3; c) 1766/72.6 μM de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$. La barra vertical indica el error estándar (n=2).

5.1.2. Consumo de nutrientes (NO_3^- , PO_4^{3-})

Para los cultivos mantenidos en las cuatro irradiancias y baja condición de nutrientes, el consumo de nitrato y fosfato no fue afectado por la intensidad de luz. Aunque ambos nutrientes disminuyeron durante el crecimiento exponencial, solo variaciones menores en la tasa de consumo de nitrato y fosfato fueron observadas (Fig. 2a; 3a). Estas variaciones fluctuaron de 432 a 433 y de 12.6 a 16.9 μM de nitrato y fosfato respectivamente, las cuales representaron cambios del 97.8-98% y 70-93% respectivamente de la concentración inicial, indicando que en el quinto día tanto el nitrato como el fosfato se encuentran en concentraciones limitante para el crecimiento de *A. carteri*.

Para la condición media de nutrientes (Fig. 2b; 3b) el consumo fue dos veces más alto que en la condición baja de nutrientes, aunque la densidad celular no se incrementó cuando esta condición de nutrientes fue mayor. Sin embargo, durante los primeros cinco días en la irradiancia de 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, el consumo promedio de nitrato y fosfato fue 817 (92%) y 32 (90%) μM respectivamente. Durante este mismo periodo de tiempo, el consumo promedio en irradiancias de 150 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mostró poca variación (800 y 28; 766 y 27 μM de nitrato y fosfato respectivamente) y coincidió con las densidades celulares en ambos tratamientos (Fig. 1b). Cuando *A. carteri* se cultivó en 50 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se redujo la cantidad de nitrato y fosfato (593 y 22 μM) consumido por el crecimiento celular.

Bajo condiciones altas de nutrientes e irradiancias de 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, el consumo de nutrientes durante los primeros cinco días fue similar (613-676 μM de nitrato y 41-40 μM de fosfato). Sin embargo, este consumo de nutrientes fue menor que aquellos cultivos donde se usó el doble de concentración de nutrientes. En 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$,

el consumo de nutrientes fue mayor (800 y 42 μM de nitrato y fosfato respectivamente) que en irradiancia de 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ donde solo 576 y 25 μM de nitrato y fosfato fueron removidos del medio (Fig. 2c; 3c).

Para el sexto y séptimo día de cultivo, tomado en cuenta las primeras dos condiciones de nutrientes (441.5/18.1; 883/36.3 μM de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) en todas las condiciones de luz evaluadas, el nutriente comenzó a ser limitante cuando se compara con la condición mayor de nutrientes (1766.72.6 μM de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$), donde no hubo efecto de limitación de nutrientes para el crecimiento de *A. carteri* (Fig. 2 y 3). El análisis estadístico indicó que no hubo efecto interactivo entre las condiciones de luz y nutrientes ($P > 0.05$) y se observó que solo la luz modificó la tasa de crecimiento de *A. carteri*.

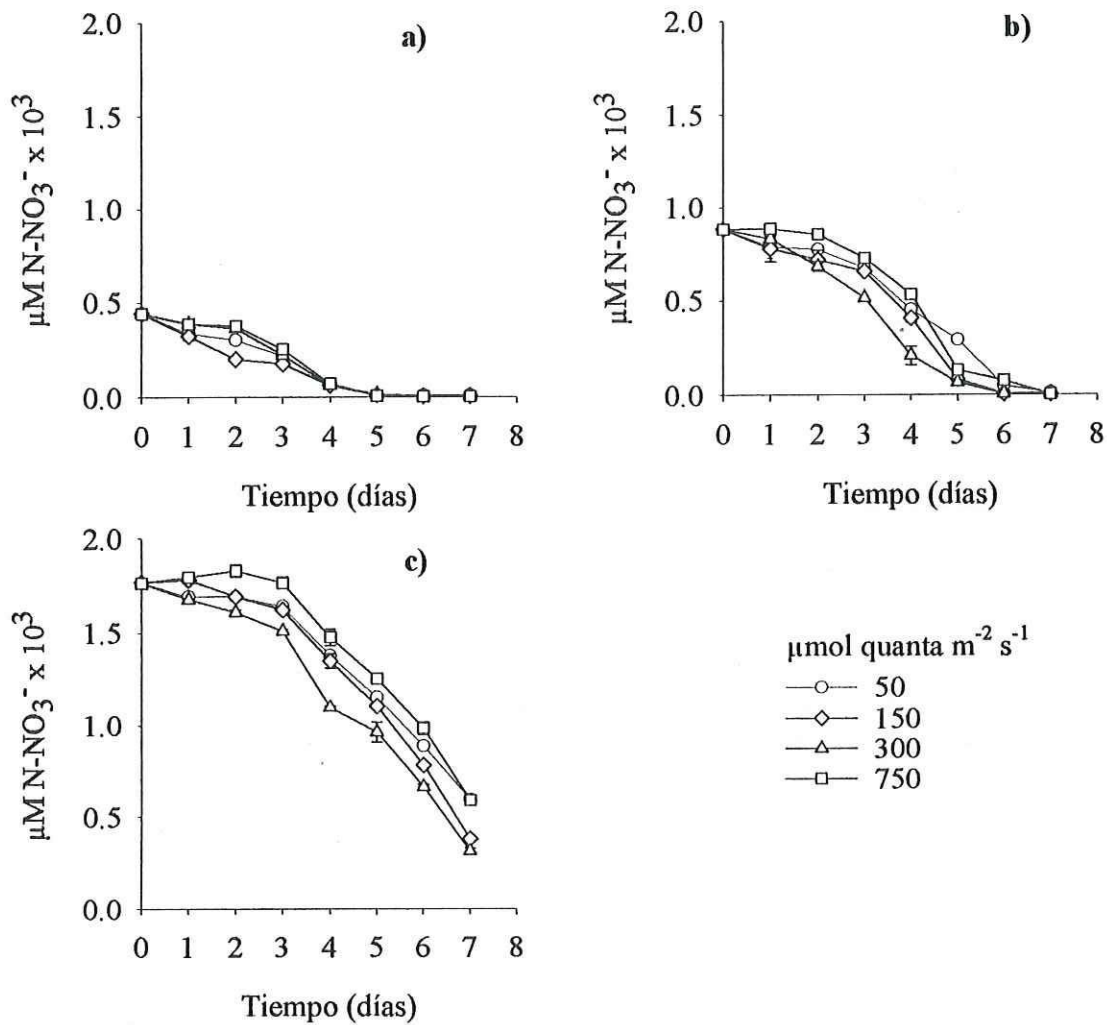


Figura 2. Cambios en concentración de nitrato en cultivos estáticos de *Amphidinium carteri* en diferentes irradiancias y tres concentraciones de nutrientes: a) 441.5/18.1; b) 883/36.3; c) 1766/72.6 μM de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$. La barra vertical indica el error estándar (n=2).

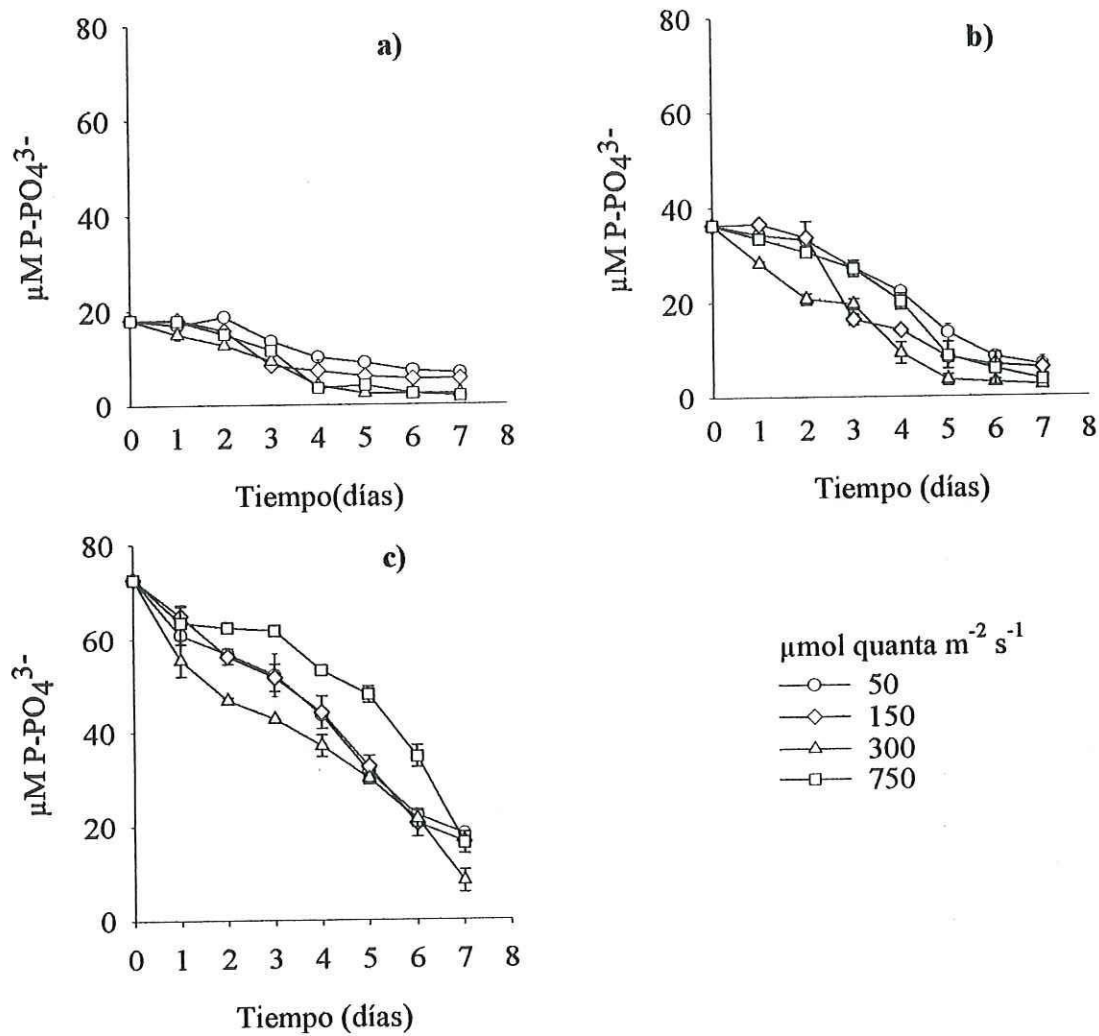


Figura 3. Cambios en concentración de fosfato en cultivos estáticos de *Amphidinium carteri* en diferentes irradiancias y tres concentraciones de nutrientes: a) 441.5/18.1; b) 883/36.3; c) 1766/72.6 μM de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$. La barra vertical indica el error estándar (n=2).

5.1.3. Composición proximal celular

5.1.3.1. Proteínas

Las proteínas fueron el componente más abundante en las células de *Amphidinium carteri* en todas las condiciones evaluadas, independientemente del nivel de irradiancia o concentración de nutrientes (Fig. 4). Durante el tiempo de cultivo, la concentración de proteínas en bajas irradiancias (50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) siempre fue mayor que en altas irradiancias (300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Al comparar el contenido de proteínas en las distintas condiciones de nutrientes no se encontraron diferencias significativas entre la condición baja y media de nutrientes ($P > 0.05$). Sin embargo, diferencias significativas fueron encontradas entre alto contenido de nutriente contra las condiciones medio y bajo nutriente ($P < 0.001$). En el primer día de cultivo, el contenido promedio de proteínas fue significativamente afectado ($P < 0.001$) por la interacción entre nutrientes y luz entre los tratamientos. Se observó también, la mayor concentración de estas macromoléculas en las condiciones de 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con valores iniciales promedio de 239.4 ± 1.8 pg cél^{-1} para bajo nutriente (Fig. 4a). En la condición de medio nutriente para 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ el promedio inicial fue 357 ± 23.9 y 284 ± 0.13 pg cél^{-1} respectivamente (Fig. 4b), estos valores son mayores que aquellos de bajo nutriente pero menores respecto a la condición de alto nutriente, donde el promedio inicial de proteína en 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fueron 390 ± 22.5 y 338 ± 7.2 pg cél^{-1} respectivamente (Fig. 4c). Durante la fase logarítmica, las proteínas empezaron a disminuir con el tiempo de cultivo y solo en los días tres y cuatro se mostró un efecto significativo ($P < 0.05$) entre nutrientes y luz. Después del cuarto día, se observó poca variación en el contenido de proteínas con

respecto al tiempo del cultivo, y no hubo un efecto significativo ($P > 0.05$) entre los factores en los diferentes tratamientos. Al final del periodo de cultivo los valores promedio de proteínas en *A. carteri* fueron similares, aunque el efecto de la luz fue evidente en el contenido de proteínas.

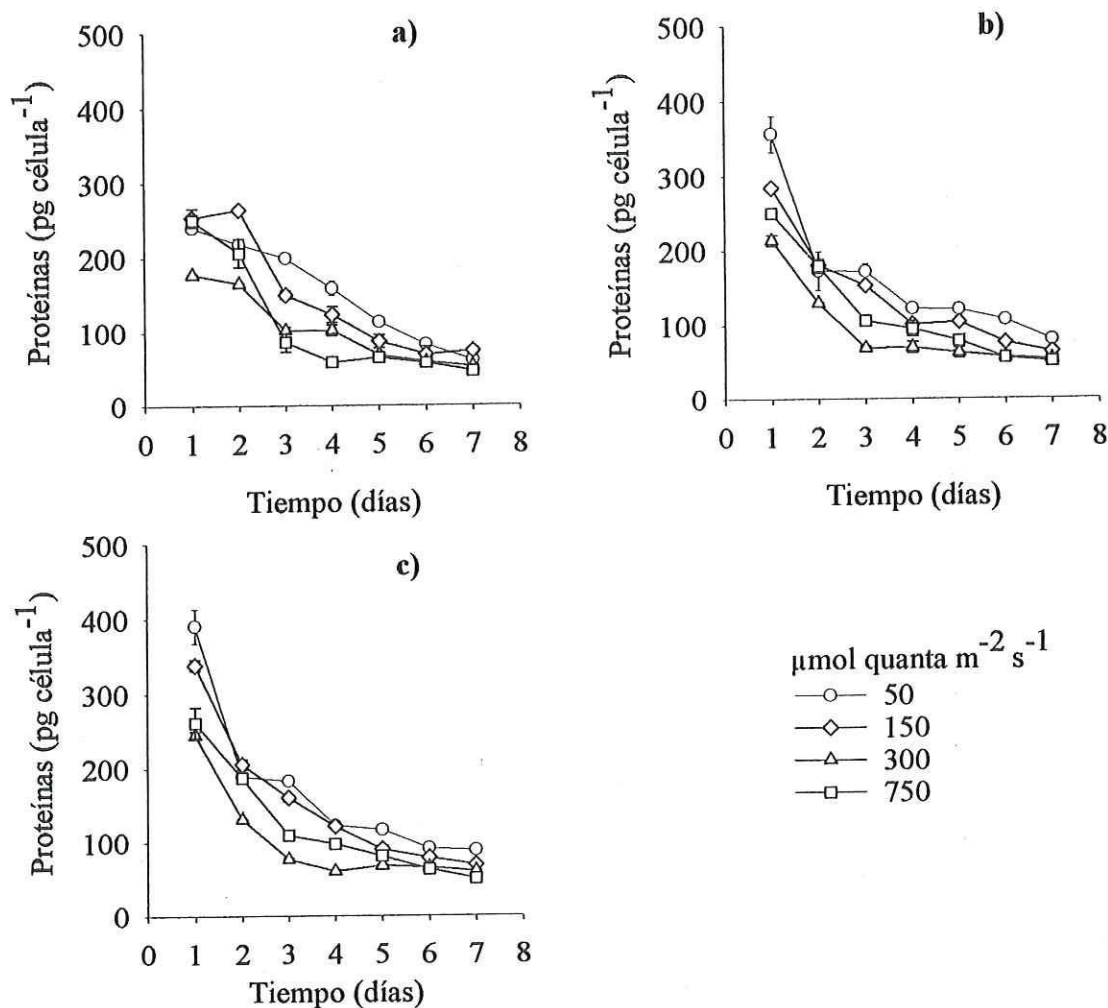


Figura 4. Contenido promedio de proteínas en *Amphidinium carteri* cultivada en 2.9 L bajo diferentes irradiancias y tres combinaciones de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$: a) bajo nutriente 441.5/8.1; b) medio nutriente 883/36.3, y c) alto nutriente 1766/72.6 μM . La barra vertical indica el error estándar (n=2).

5.1.3.2. Carbohidratos

El efecto de la interacción de nutrientes y la luz en el contenido de carbohidratos de *A. carteri*, depende del día de cultivo en los diferentes tratamientos. En la condición de bajo nutriente (Fig. 5a), los carbohidratos aumentaron respecto al tiempo de cultivo. Los valores promedio iniciales en esta condición de nutriente fueron similares (5.6 ± 0.37 , 7.6 ± 1.20 y 7.3 ± 0.33 pg cél⁻¹ respectivamente) en irradiancias de 50, 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, excepto la condición de 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ cuyo valor promedio inicial (10.9 ± 0.35 pg cél⁻¹) es mayor que las condiciones antes mencionadas. Las concentraciones finales de este constituyente celular fueron similares y no significativos ($P > 0.05$) para las irradiancias de 150, 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (25.61 ± 4.01 , 25.09 ± 1.21 , 26.67 ± 3.05 pg cél⁻¹ respectivamente) y valores menores (18.92 ± 2.1 pg cél⁻¹), fueron observados en 50 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

También, en la condición media de nutrientes, estas macromoléculas presentaron valores promedio iniciales similares (12.01 ± 1.82 , 13.47 ± 0.20 , 11.56 ± 0.66 pg cél⁻¹) y no significativa ($P > 0.05$) en irradiancias de 50, 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Asimismo, en los siguientes cinco días del cultivo, se observó poca variación entre estos tratamientos. En cambio, la condición de 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ presentó un valor promedio inicial (25.20 ± 3.70 pg cél⁻¹) mayor y significativo ($P < 0.05$) respecto a las condiciones arriba descritas y mayor variación durante el tiempo de cultivo (Fig. 5b). Al final del periodo de cultivo (día 6 y 7) los valores promedio de carbohidratos, en todas las condiciones de luz se incrementaron (Fig. 5b), y no mostraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre las distintas irradiancias.

A diferencia de los resultados antes descritos, los valores iniciales promedio en la condición de alto nutriente difieren significativamente unos de otros. Así, el promedio de carbohidratos (27.66 ± 2.19 pg cél⁻¹) que corresponde a $150 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, difiere significativamente ($P > 0.05$) de las condiciones 50, 300 y $750 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, cuyos valores promedio son: 21.40 ± 1.50 , 16.47 ± 1.78 y 11.34 ± 0 pg cél⁻¹ respectivamente (Fig. 5c). Estos valores iniciales disminuyen conforme transcurre el tiempo de cultivo, aunque se observó que la cantidad de carbohidratos en las condiciones de baja irradiancia siempre fueron mayores que aquellos de alta irradiancia. Sin embargo, al final del cultivo los valores promedio entre las distintas condiciones de luz fueron similares (entre 10.38 ± 0.62 y 11.88 ± 0.18 pg cél⁻¹) y no significativos ($P > 0.05$) entre las distintas irradiancias (Fig. 5c).

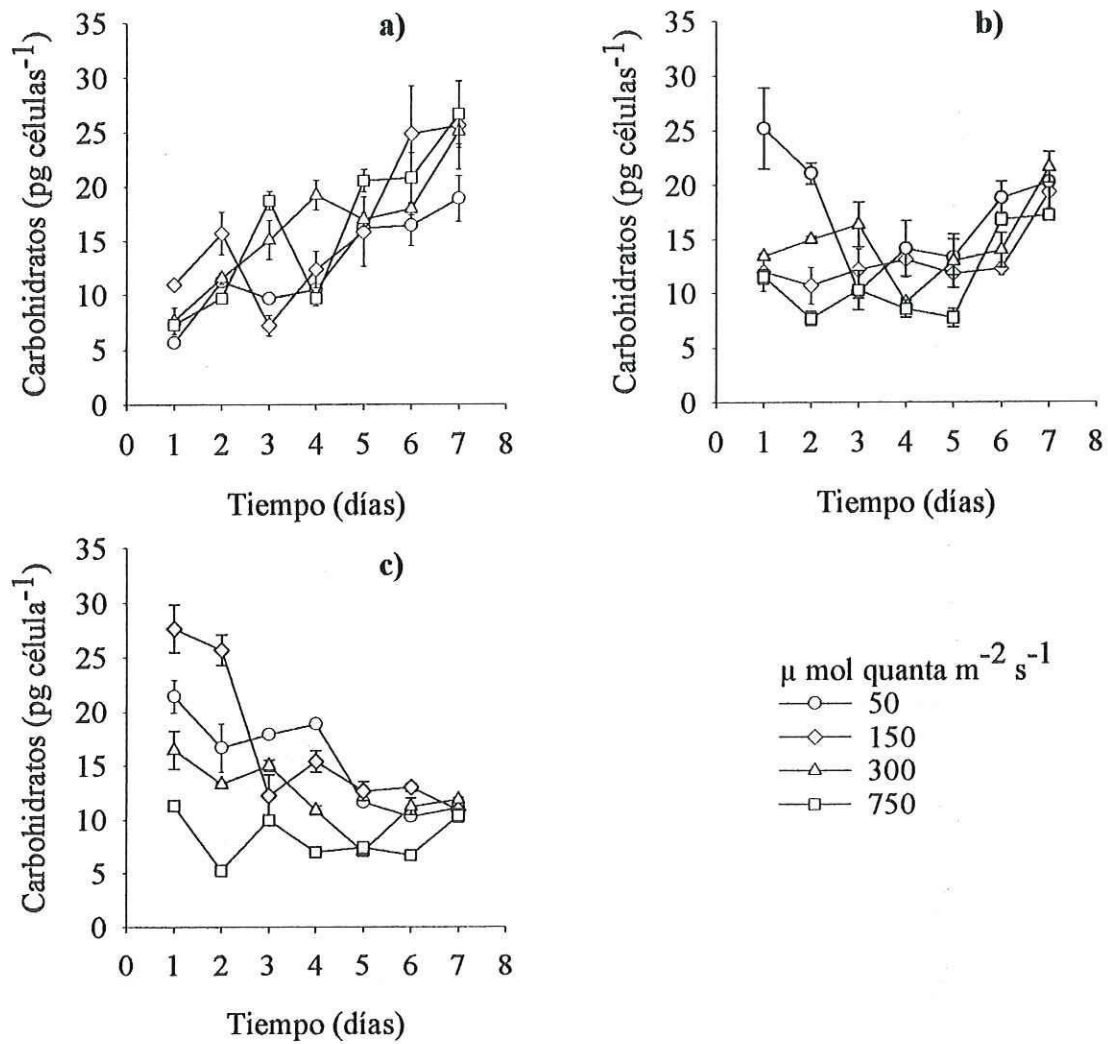


Figura 5. Contenido promedio de carbohidratos en *Amphidinium carteri* cultivada en 2.9 L bajo diferentes irradiancias y tres combinaciones de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$: a) bajo nutriente 441.5/8.1; b) medio nutriente 883/36.3, y c) alto nutriente 1766/72.6 μM . La barra vertical indica el error estándar ($n=2$).

5.1.3.3. Lípidos

En términos generales, el contenido de lípidos de *A. carteri* disminuyen con respecto al tiempo del cultivo (Fig. 6). Sin embargo, en los primeros tres días del cultivo el contenido de este constituyente celular es mayor y significativo ($P < 0.05$) en irradiancias de 150 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para las condiciones bajo y media de nutriente (Fig. 6a, b). En el primer día de cultivo para las condiciones de bajo ($59.42 \pm 1.50 \text{ pg cél}^{-1}$) y medio nutriente ($63.07 \pm 0.27 \text{ pg cél}^{-1}$), no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) en los valores promedio de lípidos dentro del nivel de 50 y 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 6a, b). En cambio, al comparar la condición de alto nutriente ($102.87 \pm 4.91 \text{ pg cél}^{-1}$) contra bajo ($59.42 \pm 1.50 \text{ pg cél}^{-1}$) y medio nutriente ($63.07 \pm 0.27 \text{ pg cél}^{-1}$) en 50 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$). Así mismo, diferencias significativas ($P < 0.05$) fueron encontradas al comparar la condición media de nutriente ($113.30 \pm 1.59 \text{ pg cél}^{-1}$) contra bajo (86.18 ± 0.31) y alto nutriente ($77.94 \pm 1.95 \text{ pg cél}^{-1}$) dentro de 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para el mismo primer día de cultivo. En los diferentes niveles de nutrientes evaluados dentro del nivel 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no hubo diferencias significativas ($P = 0.05$).

Al cuarto día de cultivo, la comparación por factor nutriente no mostró diferencias significativas ($P > 0.05$) en el contenido de lípidos entre los tratamientos bajo y medio de nutrientes, determinándose solo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre experimentos bajo vs. alto y medio vs. alto nutriente. La comparación por factor luz indica que los valores promedio de lípidos en la condición de 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ difieren significativamente ($P < 0.05$) de las condiciones de 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En los tres días restantes del cultivo, cambios no significativos en el nivel de lípidos fueron

encontrados en las distintas condiciones de luz y nutrientes, obteniéndose concentraciones finales mínimas de 19.15 ± 0.038 pg cél⁻¹ para la condición alta de nutriente y $750 \mu\text{mol}$ quanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 6c) y máximas de 32.56 ± 1.24 pg cél⁻¹ para la condición baja de nutriente y $300 \mu\text{mol}$ quanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 6a).

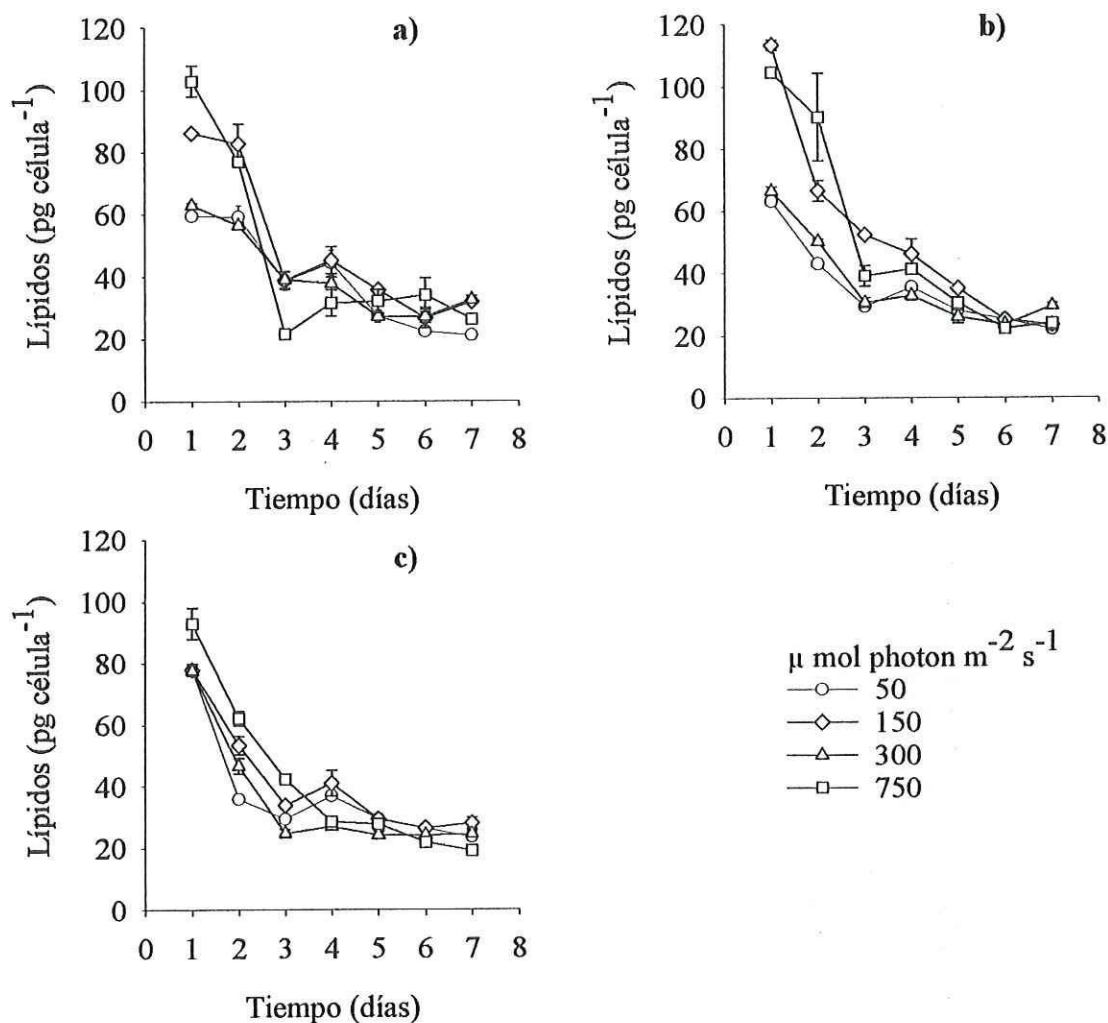


Figura 6. Contenido promedio de lípidos en *Amphidinium carteri* cultivada en 2.9 L bajo diferentes irradiancias y tres combinaciones de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$: a) bajo nutriente 441.5/8.1; b) medio nutriente 883/36.3, y c) alto nutriente 1766/72.6 μM . La barra vertical indica el error estándar (n=2).

5.1.4. Pigmentos

Los pigmentos medidos en *A. carteri* fueron clorofila α , el carotenoide fotosintético peridina, y carotenoides fotoprotectores tales como diadinoxantina, dinoxantina y diatoxantina. La razón peridina/clorofila α no fue significativamente afectada por las diferentes condiciones de nutrientes ($P > 0.05$), pero sí fue afectada por las distintas condiciones de luz ($P < 0.05$), y hubo una interacción significativa ($P < 0.05$) entre nutrientes e irradiancias. Cuando *A. carteri* estuvo creciendo en las cuatro irradiancias y baja condición de nutrientes, su razón promedio de peridina/clorofila α fue mayor en irradiancias de 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mientras que en irradiancias de 300 y 750 la razón disminuyó (Fig. 7a; Tabla I). Asimismo, poca variación se encontró en la razón peridina/ clorofila α en las cuatro irradiancias con respecto al tiempo de cultivo, pero diferencias significativas ($P > 0.05$) fueron encontradas entre las razones en las diferentes irradiancias excepto entre las condiciones de 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Por otro lado, la razón de diadinoxantina, dinoxantina, y diatoxantina respecto a la clorofila α siempre fueron mayores en altas irradiancias que en bajas irradiancias (Fig. 7b, c, y d), y el incremento más notable en diadinoxantina respecto a la clorofila α se encontró para irradiancias de 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ siendo su valor 1.5 veces mayor con respecto a las bajas irradiancias.

Cuando *A. carteri* se cultivo en la condición media de nutrientes, la razón promedio de peridina/ clorofila α en 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fue similar que aquellas obtenidas en la baja condición de nutrientes (Tabla I). Para irradiancias de 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ esta razón fue 0.26 durante los primeros tres días de cultivo y entonces se incrementó a 0.30 (Fig. 8a). En irradiancias de 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ la razón promedio de

peridinina/clorofila α fue 0.36 y mostró baja variación con respecto al tiempo de cultivo (Fig. 8a). La razón promedio de pigmentos fotoprotectores respecto a la clorofila α se incrementó con un incremento en la irradiancia (Fig. 8b, c, y d). En irradiancias de 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ la razón diadinoxantina/clorofila α fue mayor, comparada con irradiancias de 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tabla I). En el caso de las razones de dinoxantina y diatoxantina respecto a la clorofila α sus valores promedios fueron menores que la razón diadinoxantina/clorofila α pero difieren entre irradiancias (Fig. 8c, d; Tabla I).

En cultivos con alta concentración de nitrato y fosfato e irradiancias de 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ las razones promedios de peridinina/clorofila α fueron iguales (Fig. 9a; Tabla I) y las irradiancias no tuvieron un efecto significativo ($P > 0.05$). Sin embargo, en 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ los valores promedios de las razones de peridinina respecto a la clorofila α fueron diferentes (Tabla I) y significativamente ($P < 0.05$) afectados por las irradiancias. Además, se observó que las razones en bajas irradiancias tuvieron poca variación con respecto al tiempo de cultivo (Fig. 9a). Sin embargo, la razón peridinina/clorofila α , en 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ cambio con el tiempo de 0.23 a 0.33 al final del cultivo (Fig. 9a). La variación de la razón diadinoxantina/clorofila α en 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante el tiempo de cultivo fue de 0.33 a 0.40 y de 0.34 a 0.50 respectivamente (Fig. 9b), con valores promedios de 0.35 y 0.39 para ambos casos (Tabla I). La razón de los otros pigmentos como dinoxantina y diatoxantina respecto a la clorofila α no mostraron incremento con el tiempo de cultivo, pero mostraron diferencias entre irradiancias (Fig. 9c, d). Por consiguiente, estos resultados indican que la razón de pigmentos accesorios/clorofila α de *A. carteri* cambiaron por efecto de irradiancia y no por la condición de nutrientes.

Tabla I. Razón promedio de pigmentos accesorios/clorofila *a* de *Amphidinium carteri* cultivado en diferentes condiciones de luz y nutrientes.

| Nutriente NaNO ₃ /NaH ₂ PO ₄ (μ M) | Pigmentos específicos | Condiciones de luz (μ mol quanta m ⁻² s ⁻¹) | | | |
|--|-----------------------|--|------|------|------|
| | | 50 | 150 | 300 | 750 |
| Bajo 441.5/18.1 | Peridinina | 0.39 | 0.39 | 0.37 | 0.29 |
| | Diadinoxantina | 0.18 | 0.22 | 0.33 | 0.31 |
| | Dinoxantina | 0.02 | 0.03 | 0.05 | 0.09 |
| | Diatoxantina | 0.01 | 0.01 | 0.04 | 0.14 |
| Medio 883/36.3 | Peridinina | 0.40 | 0.39 | 0.36 | 0.26 |
| | Diadinoxantina | 0.19 | 0.23 | 0.32 | 0.35 |
| | Dinoxantina | 0.27 | 0.32 | 0.46 | 0.81 |
| | Diatoxantina | 0.01 | 0.01 | 0.03 | 0.16 |
| Alto 1766/72.6 | Peridinina | 0.39 | 0.39 | 0.37 | 0.27 |
| | Diadinoxantina | 0.18 | 0.22 | 0.35 | 0.39 |
| | Dinoxantina | 0.03 | 0.03 | 0.05 | 0.11 |
| | Diatoxantina | 0.01 | 0.01 | 0.04 | 0.12 |

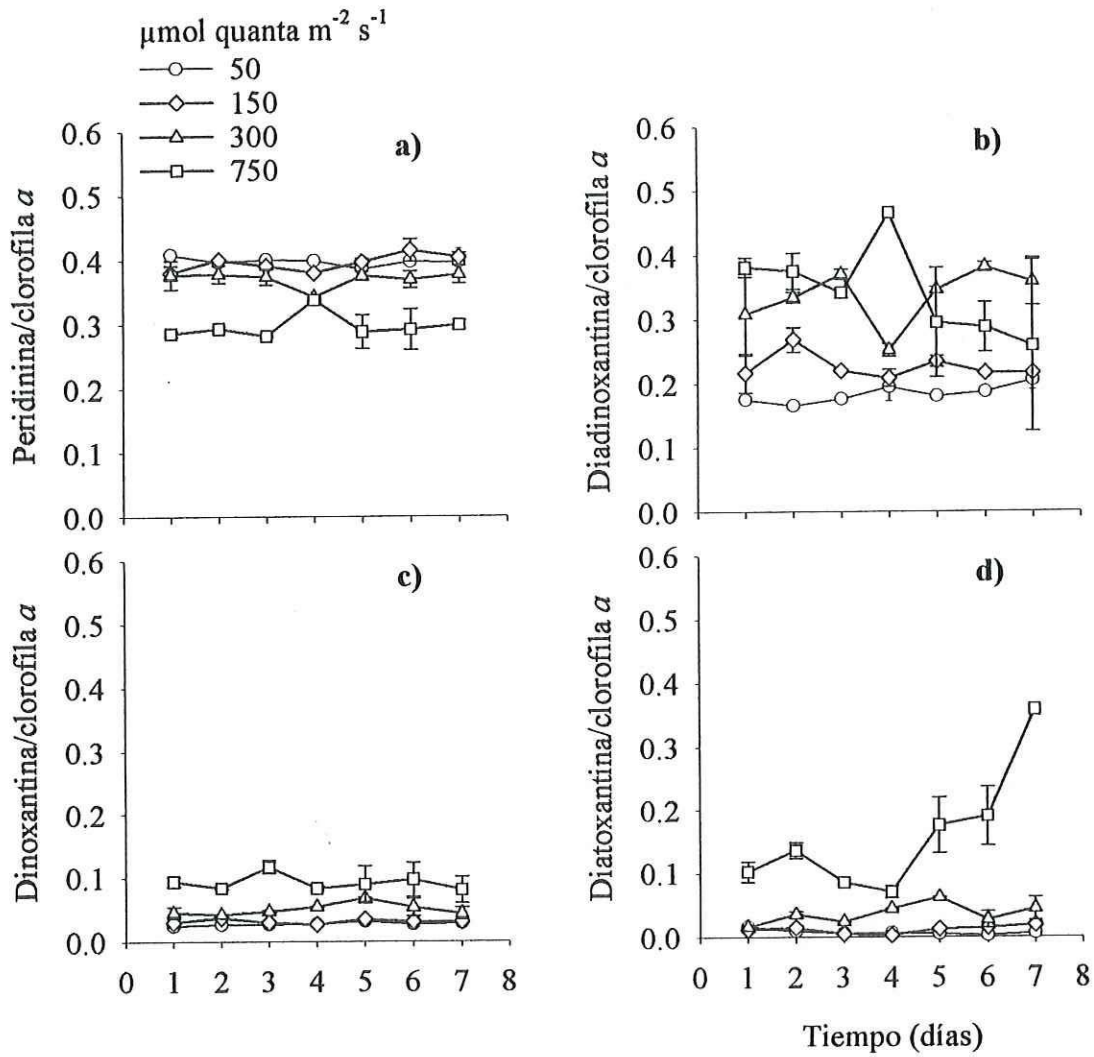


Figura 7. Razón promedio de pigmentos accesorios/clorofila *a* de *Amphidinium carterii*, en cultivos estáticos en diferentes irradiancias y 441.5/18.1 μM de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$. La barra vertical indica el error estándar (n=2).

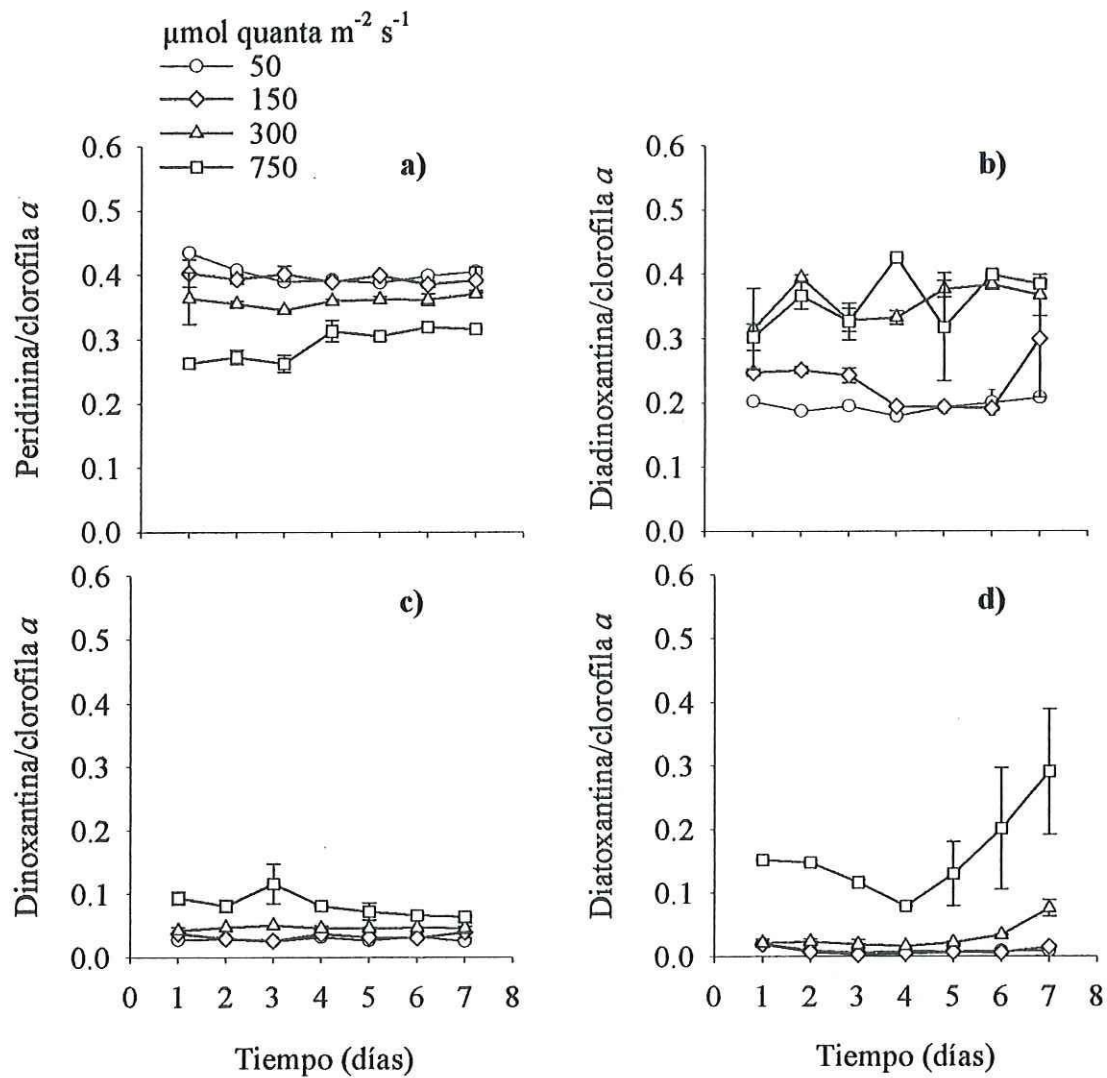


Figura 8. Razón promedio de pigmentos accesorios/clorofila a de *Amphidinium carteri*, en cultivos estáticos en diferentes irradiancias y $883/36.3 \mu\text{M}$ de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$. La barra vertical indica el error estándar (n=2).

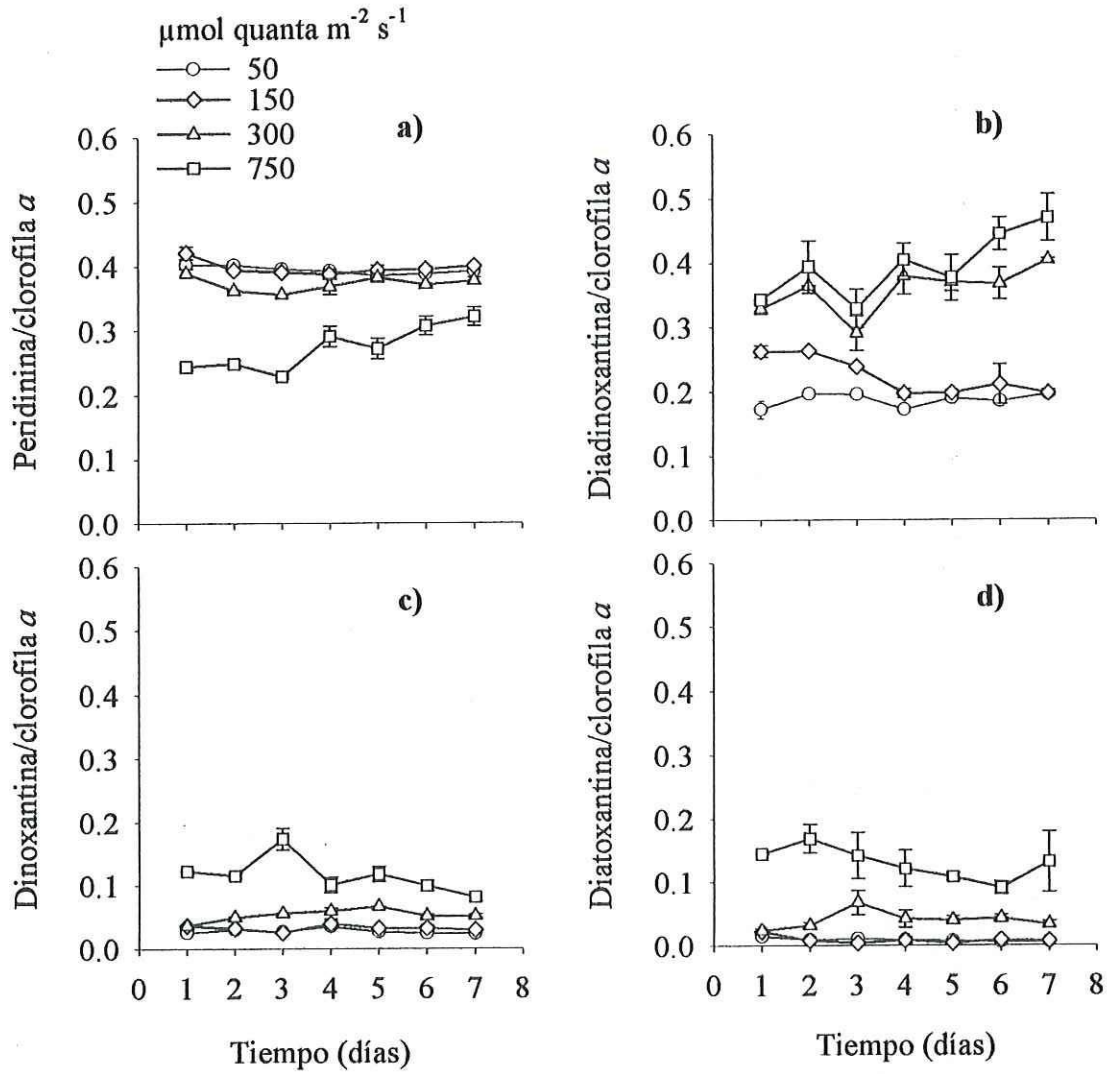


Figura 9. Razón promedio de pigmentos accesorios/clorofila *a* de *Amphidinium carteri*, en cultivos estáticos en diferentes irradiancias y 1766/72.6 μM de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$. La barra vertical indica el error estándar ($n=2$).

5.1.5. Discusión

5.1.5.1. Cultivo de *A. carteri*

La densidad celular de *A. carteri* puede variar en respuesta a interacciones entre irradiancias y concentración de nutrientes. Los resultados de este estudio indican que la producción celular fue afectada principalmente por la irradiancia (Fig.1), y cuando la irradiancia se incrementó el crecimiento de *A. carteri* fue diferente independientemente de la condición de nutrientes, y una mejor respuesta en el crecimiento fue observado en irradiancia de $300 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 1). Sin embargo, las células que estuvieron creciendo bajo la mayor irradiancia ($750 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) siempre mostraron baja densidad celular al principio del cultivo en todas las condiciones evaluadas, lo cual indica que células de *A. carteri* durante los primeros dos días del cultivo experimentaron fotoaclimatación al exceso de irradiancia por célula, incrementando después su densidad celular. Asimismo, la tasa de crecimiento específica en la fase exponencial fue mayor en altas irradiancias (0.6 hasta 1.3) que en bajas irradiancias (0.5 y 0.6). Estos resultados están de acuerdo con valores determinados por Sosik y Chisholm (1989) en cultivos de esta especie. García y Purdie (1992) midieron una tasa de crecimiento máxima de 0.37 divisiones por día para *Gyrodinium cf. aureolum* en cultivos creciendo en niveles de luz de $235\text{-}380 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mientras que Kim *et al.* (2004) encontraron que el óptimo de irradiancia para el crecimiento de *Cochlodinium polykrikoides* fue mayor que $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y no ocurrió fotoinhibición en $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los datos del presente trabajo indican que *A. carteri* tiene un alto grado de tolerancia a alta irradiancia en comparación con otros dinoflagelados como *Gyrodinium cf. aureolum* el cual en $\sim 500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ presentó una severa inhibición de la fotosíntesis (García y Purdie, 1992).

5.1.5.2. Consumo de nutrientes (NO_3^- , PO_4^{3-})

El consumo de nitrato y fosfato por *A. carteri* fue modificado por la irradiancia en las diferentes condiciones de nutrientes. Durante los primeros cuatro días, la densidad celular en la condición de bajo nutriente esta inversamente relacionada a la concentración de nutrientes en el medio y fue afectada por la disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo, parcialmente por nitrato, indicando limitación y deficiencia de este nutriente es especialmente observado al final del periodo de cultivo (Fig. 2a; 3a), lo cual también conduce a una disminución en la síntesis de proteína (Bucciarelli y Sunda, 2003). El consumo de fosfato en altas irradiancias fue mayor que en bajas irradiancias (Fig. 3a), lo cual sugiere que requerimientos en ATP y NADPH fueron altos para la fijación de dióxido de carbono (Juneau y Harrison, 2005) aunque esto no fue probado en el presente estudio puede ser considerado como una explicación debido a que la asimilación de nitrato también requiere ATP (Clark y Flynn, 2002). Un mayor consumo de nitrato y fosfato fue encontrado en la condición alta de nutrientes comparado con aquella condición de bajo nutriente. Asimismo, tanto en la condición baja como en la condición media de nutrientes se observó limitación de nitrato y fosfato para el quinto y sexto día de cultivo (Fig. 2b, c; 3b, c). En estos dos casos, en irradiancias de 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ el consumo de nutrientes mostró una marcada similitud entre estas dos condiciones de luz. Una tendencia de más bajo consumo de nitrato y fosfato fue observada en 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en todos los tratamientos con la excepción de la condición de bajo nutrientes. Nalewajko y Lee (1983) sugieren que el consumo de fosfato es controlado por la luz cuando el fitoplancton esta limitado por esta variable ambiental o por deficiencia de fósforo. Sin embargo, cuando la luz no es limitante las concentraciones de fósforo son altas y el efecto

de la luz es menor. Los resultados de este trabajo también son consistentes con las observaciones hechas por Clark (2001) y Clark y Flynn (2002) quienes cuantificaron la utilización de nitrógeno inorgánico disuelto y asimilación de nitrato y encontraron que entre el quinto y sexto día el nitrato es agotado en el cultivo. Needoba y Harrison (2004) también observaron que el consumo de nitrato fue modificado por la luz y altos reservorios de nitrato fueron detectados en el periodo de oscuridad. Por otro lado, el incremento en el consumo de nutrientes en la condición de $300 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiancia puede ser una consecuencia de los cambios en el número de células debido a que la mayor tasa de crecimiento resultó en una rápida asimilación, lo cual indica que la razón fotosintética no fue reducida y valores de irradiancia para saturación de la fotosíntesis están entre 300 y $500 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Kirk, 1994).

5.1.5.3. Composición proximal celular

La concentración celular de proteínas, lípidos y carbohidratos en *A. carteri* no solo fue afectada por cambios en la concentración de nutrientes y diferentes niveles de irradiancia, sino también, el tiempo de cultivo produjo cambios importantes en su composición celular. Aunque se observaron diferencias en los valores promedio de estos constituyentes bioquímicos entre los distintos niveles de nutrientes y luz, las proteínas siempre fueron el constituyente orgánico mayor, seguido por lípidos y luego por carbohidratos. También se observó que el contenido de proteínas y lípidos registraron una disminución importante en los primeros tres días de cultivo en todas condiciones de nutrientes y luz evaluadas (Fig. 4 y 6). En cambio los carbohidratos (Fig. 5) mostraron mayor variación y menor contenido por célula que proteínas y lípidos. La correlación existente entre proteínas y lípidos se

debe probablemente a que las membranas celulares en el fitoplancton están constituidas de una doble capa de lípidos, lugar donde se encuentran embebidas diferentes proteínas. En cambio los carbohidratos, están restringidos a la superficie exterior de la célula (Campbell, 1996). Por esta razón, diferentes ambientes en luz y nutrientes interactúan modificando los componentes bioquímicos de *A. carteri* en cultivo.

Varios autores han demostrado que la concentración de proteínas en fase exponencial aumenta, mientras que, la concentración de lípidos y carbohidratos disminuye (Harrison, 1990; Brown *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1996; Lourenco *et al.*, 2002). Los resultados de este estudio indican lo contrario en cuanto a proteínas y lípidos se refiere, pero los carbohidratos aumentan en la condición de bajo y medio nutriente. En estos dos tratamientos experimentales, el nitrato (Fig. 2a, b) es limitante al quinto y sexto día de cultivo, lo cual explica el aumento de carbohidratos. Sin embargo, es importante señalar que diferencias significativas ($P < 0.05$) fueron encontradas en las distintas condiciones de luz evaluadas, lo cual también confirma que no solo el factor nutriente está modificando la composición bioquímica celular, sino también la interacción luz, nutrientes y tiempo de cultivo modifican la calidad celular. En consecuencia, distintas concentraciones de constituyentes bioquímicos de *A. carteri*, no pueden ser directamente comparables con aquellos trabajos donde se estudia el efecto individual de algún factor en particular, como nutrientes (Harrison, 1990), fotoaclimatación (Quigg *et al.*, 2003), temperatura, edad del cultivo o tiempo de cosecha y recuperación (Brown, 1996), debido a que la interacción entre varios factores modifica la fisiología celular de manera diferente. Por tanto, si se correlaciona el efecto de un solo factor sobre la tasa de crecimiento y composición celular, probablemente existen otros que la estén modificando sin que hayan sido tomados en

cuenta. Los hallazgos aquí presentados, concuerdan con estudios realizados por Thompson (1999) quién evaluó la interacción de la duración del día, irradiancia, y temperatura en la razón clorofila *a*:cuota celular de carbono. Encontró que la respuesta bioquímica de *Thalassiosira pseudonana* es más compleja que cuando se estudian variables ambientales individuales. Asimismo, Ralph *et al.* (2005) también señala que la interacción de condiciones ambientales como gradientes en temperatura, salinidad, luz y nutrientes modifican la composición química y taxonómica de las comunidades microalgales del Ártico. En conclusión, los resultados de este estudio, indican una modificación diferente en los constituyentes bioquímicos de *A. carteri* a lo comúnmente reportado.

5.1.5.4. Pigmentos

Para los distintos tratamientos evaluados en el cultivo de *A. carteri*, la irradiancia tuvo efectos significativos en las razones de pigmentos accesorios/clorofila *a*, pero no fueron significativamente afectadas por la condición de nutrientes (Fig. 7, 8, y 9). La razón peridina/clorofila *a* fue mayor en irradiancias de 50 y 150 que en 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Lo contrario ocurrió con las razones de diadinoxantina, dinoxantina y diatoxantina respecto a la clorofila *a*, las cuales fueron mayores en 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ donde diadinoxantina estuvo presente en mayor cantidad que dinoxantina y diatoxantina, encontrándose esta última en concentraciones traza. Considerando la función fotoprotectiva de estos pigmentos, sus concentraciones podrían esperarse que co-variaran con la clorofila *a* y las irradiancias como se muestra en este trabajo.

El hecho de que exista una considerable concentración de pigmentos fotosintéticos en células de *A. carteri* sugiere que pigmentos de esta clase co-varían con la clorofila *a* bajo condiciones de limitación de luz, cuyo rol es coleccionar luz en la región de 458-473 nm (Jefrey y Vesk, 1997) y transferir la energía absorbida a los centros de reacción para llevar a cabo el proceso de fotosíntesis (Kirk, 1994). Estas observaciones están de acuerdo con estudios hechos por Schlüter *et al.* (2000) quienes cultivaron dos especies de dinoflagelados y encontraron mayor concentración en baja condición de luz. Asimismo, la razón peridininina/clorofila *a* disminuyó con un incremento en la irradiancia debido a la reducción en el contenido celular de pigmentos accesorios y clorofila *a*. Estudios de campo también han confirmado que mayores concentraciones de pigmentos accesorios fotosintéticos son el resultado de la adaptación de células de fitoplancton a baja irradiancia y cuando el fitoplancton es expuesto a altas irradiancias por periodos largos de tiempo esto puede contribuir a producir pigmentos con la finalidad de proteger los centros de reacción contra daño y foto-oxidación (Trees *et al.*, 2000). Goericke y Montoya (1998) señalan que cambios en la concentración de pigmentos son producto de la irradiancia y tasa de crecimiento del fitoplancton. Los resultados de este trabajo indicaron que solo la irradiancia modificó la razón de pigmentos de *A. carteri* y no se encontraron efectos debido a la tasa de crecimiento. Sin embargo, los cambios en la tasa de crecimiento en altas irradiancias específicamente en $300 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mejoraron la densidad celular de los cultivos y redujo las razones tanto los pigmentos accesorios fotosintéticos como fotoprotectores respecto a la clorofila *a*. Esto podría explicar los cambios encontrados con el incremento en la intensidad de luz, lo cual no fue reflejado por la concentración de nutrientes, indicando que no existe efecto interactivo en las condiciones evaluadas y los

cambios en la reducción de pigmentos accesorios fotosintéticos causa el incremento de la productividad algal (Nakajima y Itayama, 2003). Del mismo modo, Kirk (1994) señala que dentro del fitoplancton los dinoflagelados tienen altas tasas de respiración, y por consiguiente altos puntos de compensación de luz, que las diatomeas y esto puede ser debido a la energía requerida para sostener la movilidad en la formación de grupos lo cual apoya lo arriba mencionado.

Por otro lado, la razón de pigmentos accesorios/clorofila *a* mostraron una notable similitud entre baja (Fig. 7), media (Fig.8), y alta (Fig. 9) concentración de nutrientes usadas para el cultivo de *A. carteri*. Estos resultados implican que el efecto de nutrientes sobre la razón de pigmentos no fue significativo debido a que limitación del crecimiento por la disponibilidad de nutrientes solo fue observada al final del periodo del cultivo, en particular para las condiciones baja y media de nutrientes. Además, la magnitud de cambio en las razones de pigmentos con respecto al tiempo de cultivo no fue importante., mientras que en diferentes condiciones de luz, las razones de pigmentos accesorios respecto a la clorofila *a* de *A. carteri* fueron diferentes entre bajas y altas irradiancias. De acuerdo a lo antes expuesto, se concluye que *A. carteri* tuvo una mejor respuesta en el crecimiento y consumo de nutrientes en $300 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Variaciones en la intensidad de luz produjeron cambios en las razones de pigmentos accesorios respecto a la clorofila *a* y diferentes condiciones de nutrientes no tuvieron un efecto en las razones. Asimismo, la razón peridininina/clorofila *a* fue mayor en baja irradiancias que en alta irradiancia. Sin embargo, estas razones no mostraron diferencias con respecto al tiempo del cultivo. En general, diadinoxantina siempre se encontró en mayor concentración que dinoxantina y diatoxantina, siendo esta última en cantidades traza. La razón diadinoxantina/clorofila *a*

fue casi dos veces mayor en altas irradiancias que en bajas irradiancias. Estos cambios en las razones pueden ser debido a que *A. carteri* ajusta su composición de pigmentos de acuerdo a las diferentes condiciones de luz. Además, los resultados del presente estudio proporcionan información acerca de la contribución de la razón de pigmentos accesorios a la clorofila *a* en *A. carteri* y como la composición de pigmentos se modifica por cambios en los factores del abióticos del cultivo de esta especie.

6. RESULTADOS

6.1. Experimento 2: Crecimiento, consumo de nutrientes, composición proximal y razón de pigmentos accesorios/clorofila *a* en *Thalassiosira pseudonana* Hasle y Heimdal (Bacillariophyceae) cultivada bajo diferentes condiciones de luz y nutrientes.

6.1.1. Cultivo de *Thalassiosira pseudonana*

La densidad celular de *Thalassiosira pseudonana* se incrementó durante los primeros dos días de cultivo en todas las condiciones de nutrientes y luz evaluadas (Fig. 10). Durante este tiempo de cultivo, se presentó el crecimiento exponencial. En la condición de bajo nutriente y distintas intensidades de luz, la tasa de crecimiento varió entre 1.0-1.2 día⁻¹. En cambio, para la condición de medio nutriente, esta se mantuvo en 0.7 día⁻¹. También los tratamientos de alto nutriente con irradiancias de 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ registraron tasa similares (0.7 día⁻¹) que aquellos de medio nutriente. Mientras que, en alto nutriente e irradiancias de 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, la tasa de división celular se incrementó en 1.0 y 1.1 día⁻¹. Al tercer día de cultivo, la tasa específica de crecimiento disminuyó a un valor promedio de 0.11 día⁻¹ en todas las condiciones de luz, dando lugar a la fase de lento crecimiento (Fig. 10: Tabla II), lo cual indica que los cultivos estuvieron iniciando la fase estacionaria. Aunque se registraron diferencias en la densidad celular, no hubo cambios significativos ($P>0.05$) durante el tiempo de cultivo entre las diferentes irradiancias. Pero la comparación por factor nutriente indicó diferencias en los valores promedio entre las distintas concentraciones de nutrientes ($P<0.05$).

En la condición de bajo nutriente y distintas condiciones de luz, la densidad celular promedio final fue $0.892 \pm 0.019 \times 10^6$ células mL^{-1} (Fig. 10a), la cual es menor que la

obtenida en la condición media de nutrientes ($1.59 \pm 0.079 \times 10^6$ células mL^{-1} ; Fig. 10b). Sin embargo, los valores promedio obtenidos en la alta condición de nutrientes ($2.71 \pm 0.231 \times 10^6$ células mL^{-1} ; Fig. 10c) son mayores que los tratamientos antes mencionados. Al comparar por factor nutriente, dentro de la condición de $50 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, solo hubo diferencias significativas entre alto vs. bajo nutriente ($P < 0.05$), en cambio alto vs. medio nutriente, no resultaron significativos ($P > 0.05$) dentro de $150 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Para las condiciones de 300 y $750 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, no hubo diferencias significativas en los tratamientos medio vs. bajo nutriente. Es importante destacar que la interacción entre estas últimas condiciones de luz y la condición de alto nutriente produjeron mayor densidad celular ($3.11 \pm 0.032 \times 10^6$ células mL^{-1} ; Fig. 10c) que el resto de los tratamientos.

Tabla II. Valores promedio de la tasa de crecimiento específica de *Thalassiosira pseudonana* cultivada en diferentes irradiancias y concentración de nutrientes.

| Tiempo(días) | Nutriente $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (μM) | Irradiancias ($\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) | | | |
|--------------|--|--|------|------|------|
| | | 50 | 150 | 300 | 750 |
| 1 | 441.5/18.1 | 0.82 | 1.02 | 1.08 | 1.25 |
| | 883/36.3 | 1.58 | 1.46 | 1.60 | 1.64 |
| | 1766/72.6 | 1.68 | 1.68 | 1.52 | 1.52 |
| 2 | 441.5/18.1 | 1.00 | 1.09 | 1.10 | 1.24 |
| | 883/36.3 | 0.72 | 0.87 | 0.78 | 0.73 |
| | 1766/72.6 | 0.72 | 0.72 | 1.05 | 1.14 |
| 3 | 441.5/18.1 | 0.05 | 0.12 | 0.18 | 0.01 |
| | 883/36.3 | 0.05 | 0.08 | 0.18 | 0.19 |
| | 1766/72.6 | 0.15 | 0.15 | 0.13 | 0.10 |
| 4 | 441.5/18.1 | 0.35 | 0.05 | – | 0.02 |
| | 883/36.3 | 0.14 | 0.19 | 0.18 | 0.06 |
| | 1766/72.6 | – | – | 0.07 | 0.17 |
| 5 | 441.5/18.1 | 0.02 | 0.19 | 0.15 | 0.01 |
| | 883/36.3 | 0.20 | – | – | – |
| | 1766/72.6 | 0.07 | 0.07 | 0.18 | 0.05 |

(–) menor que 0.01

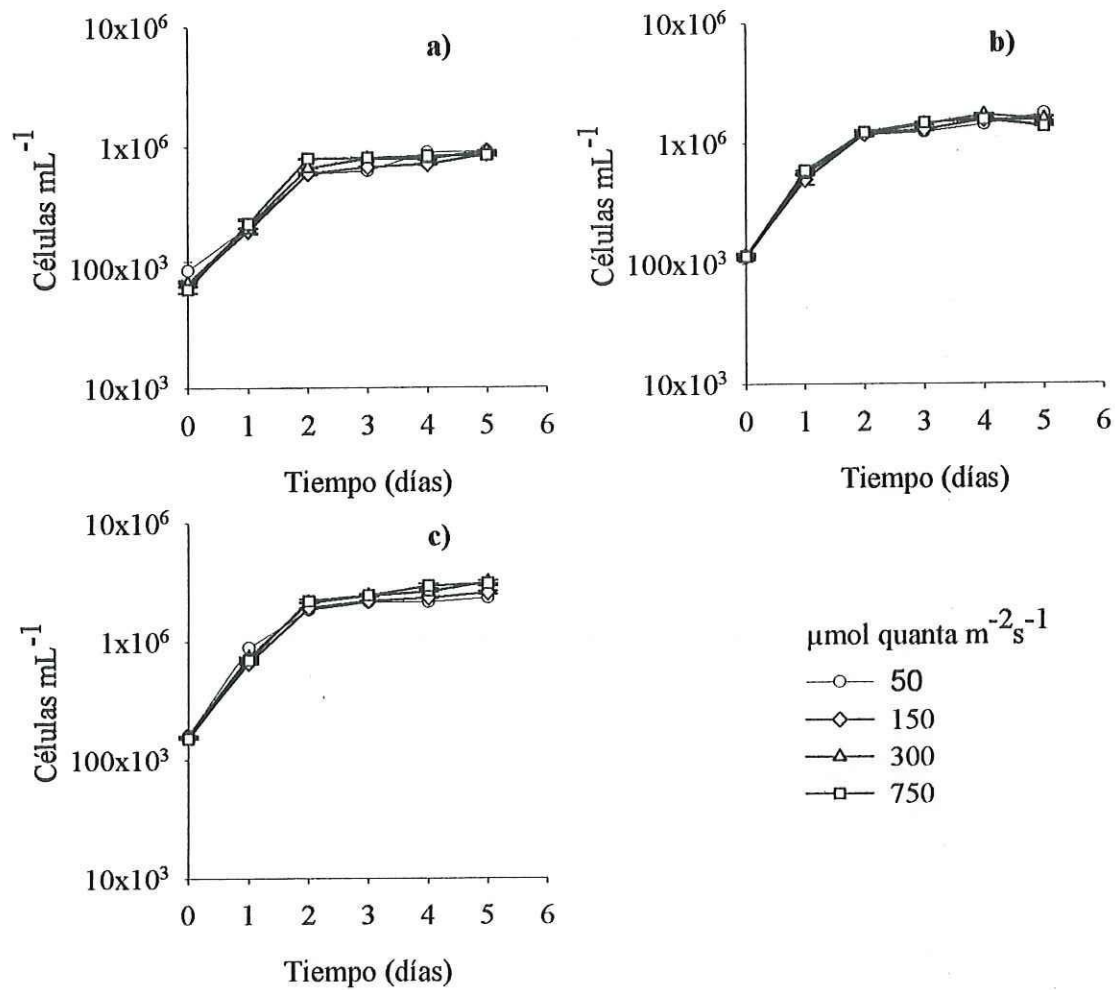


Figura 10. Cambios en densidad celular de *Thalassiosira pseudonana* en cultivos estáticos con diferentes irradiancias y tres concentraciones de nutrientes: a) 441.5/18.1; b) 883/36.3; c) 1766/72.6 μM de NaNO₃/NaH₂PO₄. La barra vertical indica el error estándar (n=2).

6.1.2. Consumo de nutrientes (NO_3^- , PO_4^{3-} , Si(OH)_4)

En cultivos de laboratorio, la concentración de nitrato, fosfato y silicato son factores ambientales importantes que regulan el crecimiento de la diatomea *Thalassiosira pseudonana*. En este estudio, el consumo de estos constituyentes inorgánicos estuvo determinado por la densidad celular de esta especie en cada condición de cultivo experimental. Durante la fase de crecimiento exponencial, el consumo de nitrato y silicato (Fig. 11a y 13a) en la baja condición de nutriente, no fue afectado por las distintas condiciones de luz, en cambio el fosfato presentó mayores variaciones entre irradiancias (Fig. 12a). Al final de la fase exponencial (día 3), el consumo de nitrato y fosfato en bajo nutriente e irradiancias de 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fue de 166-232 μM (37.7-52%) y de 10.3-4.87 μM (60.3-26.9%) de nitrato y fosfato removido del medio respectivamente. En irradiancia de 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, el consumo de nitrato y fosfato fue 257.5-6.5 μM (58.3-36%), los cuales son menores que el consumo en 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (274-7.4 μM ; 62-41.2%, respectivamente). En cambio la concentración de silicatos durante la fase exponencial para todas las condiciones luz disminuyó marcadamente (Fig. 13a), observándose una remoción máxima de 101.1 μM (94.9%) y una mínima de 97.3 μM (90.9%) en 150 y 50 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ respectivamente, mientras que, en 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ el consumo de silicato fue idéntico (98.9 μM ; 92.4%).

Con el inicio de la fase de crecimiento lento, el consumo de nutrientes continuó disminuyendo. La concentración residual final (día 5) de nitrato, fosfato y silicato fue: 162-7.7-9.6 μM ; 152-13.2-4.4 μM ; 137-9.9-5.4 μM y 155-0.5-6.4 μM , en el cultivo de *T. pseudonana* creciendo en 50, 150, 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ respectivamente.

A diferencia de la condición anterior, en la condición media de nutrientes la remoción de nitrato y fosfato fue mayor (Fig. 11b y 12b), mientras que, el consumo de silicatos (Fig. 13b) fue similar que aquella condición de bajo nutriente. El incremento en el consumo de nitrato y fosfato, se correlaciona también con un incremento en la densidad celular de *T. pseudonana* para la fase exponencial de crecimiento (Fig. 10b). Así, en 50 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, el consumo de nitrato y fosfato fue 258 μM (29.2%) y 12 μM (33%) respectivamente. Este consumo fue menor que lo observado en 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (338 μM ; 38% y 15.3; 42%). Cuando *T. pseudonana* se expuso a irradiancias de 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la cantidad de nitrato consumido fue similar (367-358 μM ; 41-40%), mientras que, el consumo de fosfato resultó mayor con la irradiancia (20.8-33 μM ; 57-91%: Fig. 12b).

Al final del periodo de cultivo, la concentración residual de nitrato en cada una de las irradiancias fue similar ($364.5 \pm 5.2 \mu\text{M}$: Fig. 11b), mientras que la cantidad de fosfato residual disminuyó a 2.10 μM con un incremento en la irradiancia (Fig. 12b). En el caso del silicato, se observó menor variación entre irradiancias durante este periodo de cultivo, restando al final $7.69 \pm 0.66 \mu\text{M}$ de silicato residual (Fig. 13b).

Al comparar el consumo de nitrato y fosfato en la condición de alto nutriente (Fig. 11c y 12c) contra los tratamientos arriba expuestos, se encontró que el orden de consumo fue: alto nutriente > medio nutriente > bajo nutriente. En tanto que, el silicato, mostró una marcada disminución (Fig. 13c) en el segundo día de cultivo. Los resultados del consumo para la fase exponencial, en irradiancias de 50, 150 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fue similar ($380 \pm 1.52 \mu\text{M}$; 21.3%). En 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiancia, la cantidad de nitrato removido del medio fue mayor (415 μM ; 23.4%). En el caso de fosfato, se observó que el

consumo se incrementó con la irradiancia, registrando un valor mínimo de 23.6 μM (30.9%) en irradiancia de 50 y máximo de 49 μM (64%) en 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 12c).

Para el quinto día de cultivo, el consumo total de nitrato en irradiancias de 150 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fue similar ($763.5 \pm 1.5 \mu\text{M}$; 43.2%). Valores mínimos de consumo total (670 μM ; 37.9%) y máximos (834 μM ; 47.2%) fueron encontrados en irradiancias de 50 y 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ respectivamente (Fig. 11c). En cambio, en irradiancias de 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ el consumo total de fosfato varió entre 34.7 μM (45.3%) y 44.6 μM (58.2%), mientras que, en 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, el consumo total aumentó a valores de 51.2 μM (66.9%) y 63.3 μM (82.7%). Concentraciones finales de silicatos en el medio de cultivo (Fig. 13c), revelaron una consistencia similar a lo observado en tratamientos de baja y media concentración de nutrientes.

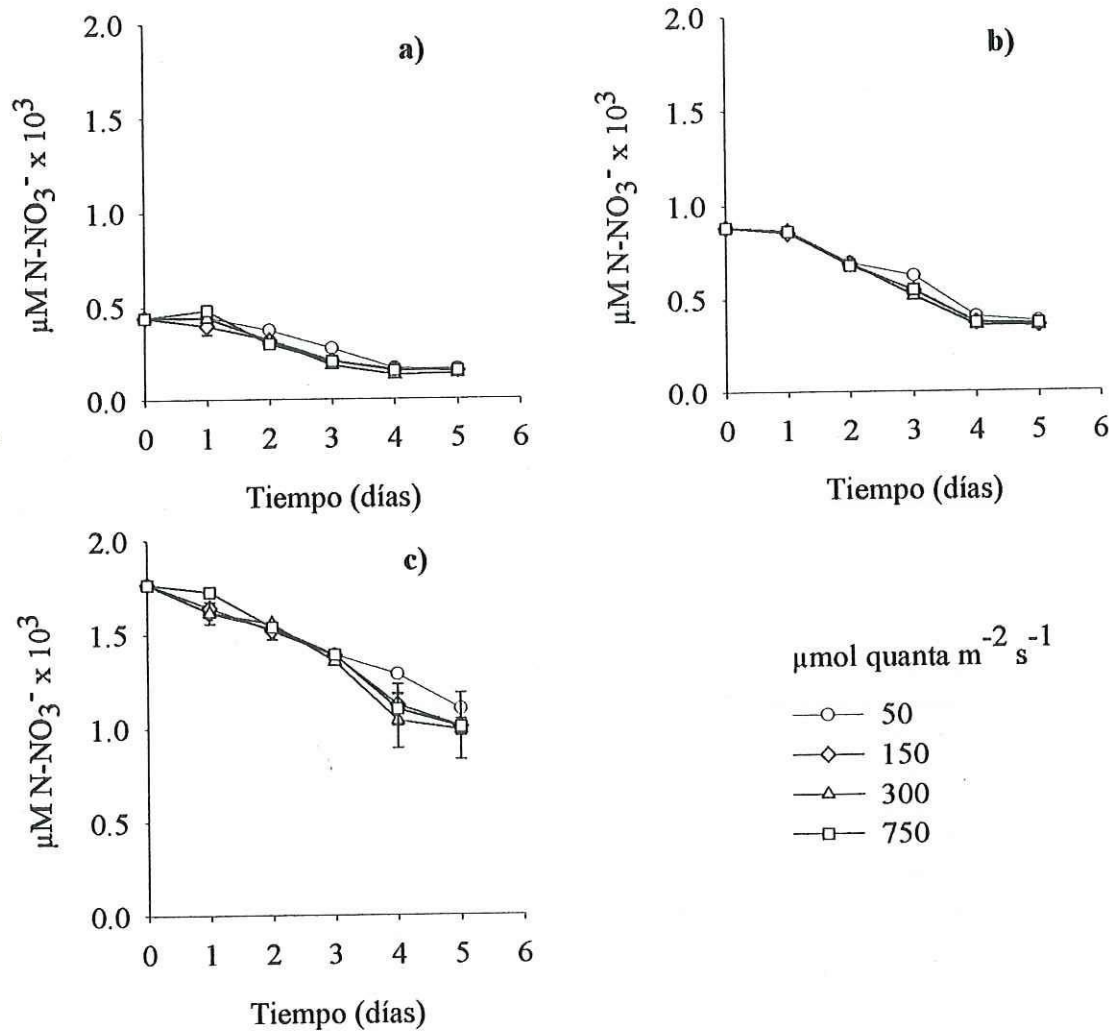


Figura 11. Cambios en concentración de nitrato en cultivos estáticos de *Thalassiosira pseudonana* en diferentes irradiancias y tres concentraciones de nutrientes: a) 441.5/18.1; b) 883/36.3; c) 1766/72.6 μM de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$. La barra vertical indica el error estándar ($n=2$).

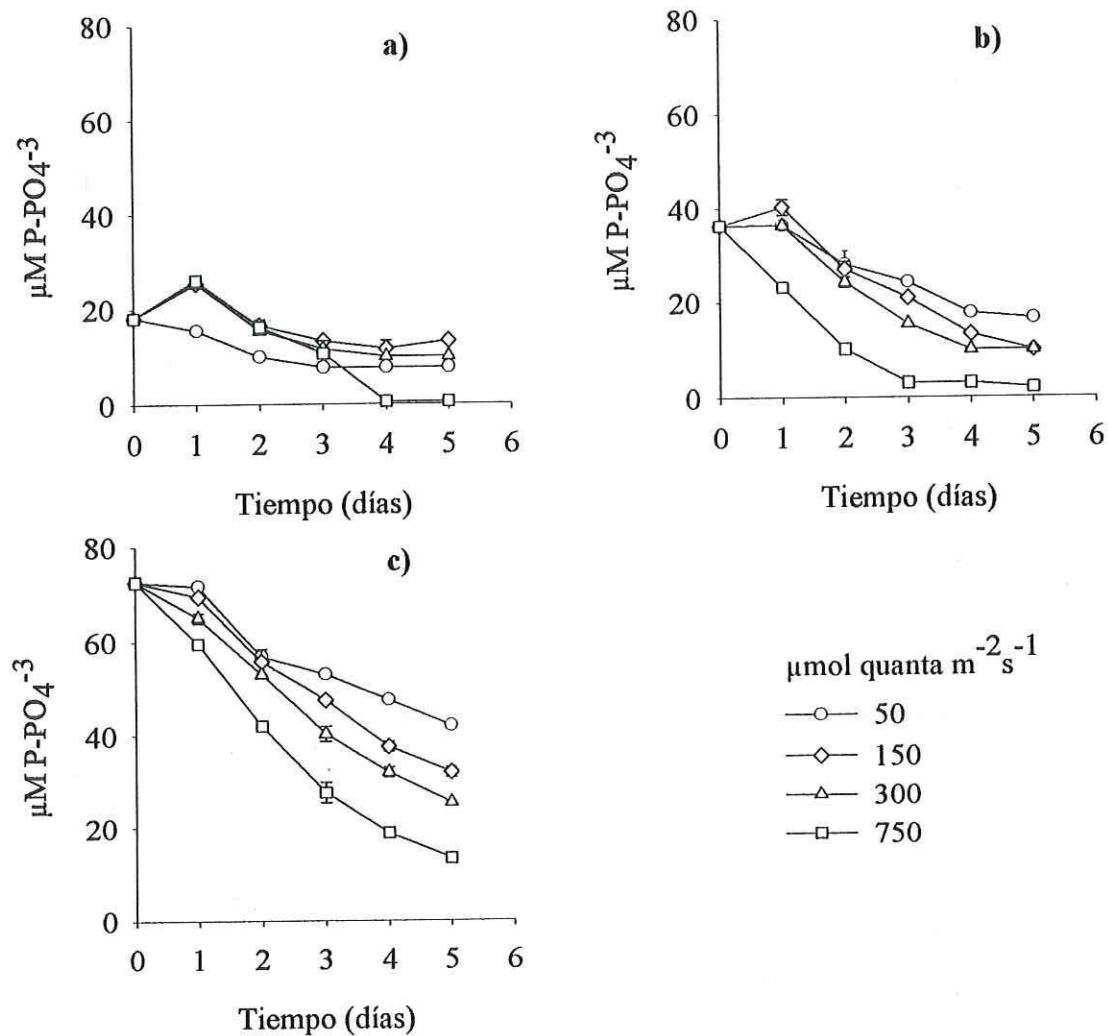


Figura 12. Cambios en concentración de fosfato en cultivos estáticos de *Thalassiosira pseudonana* en diferentes irradiancias y tres concentraciones de nutrientes: a) 441.5/18.1; b) 883/36.3; c) 1766/72.6 μM de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$. La barra vertical indica el error estándar ($n=2$).

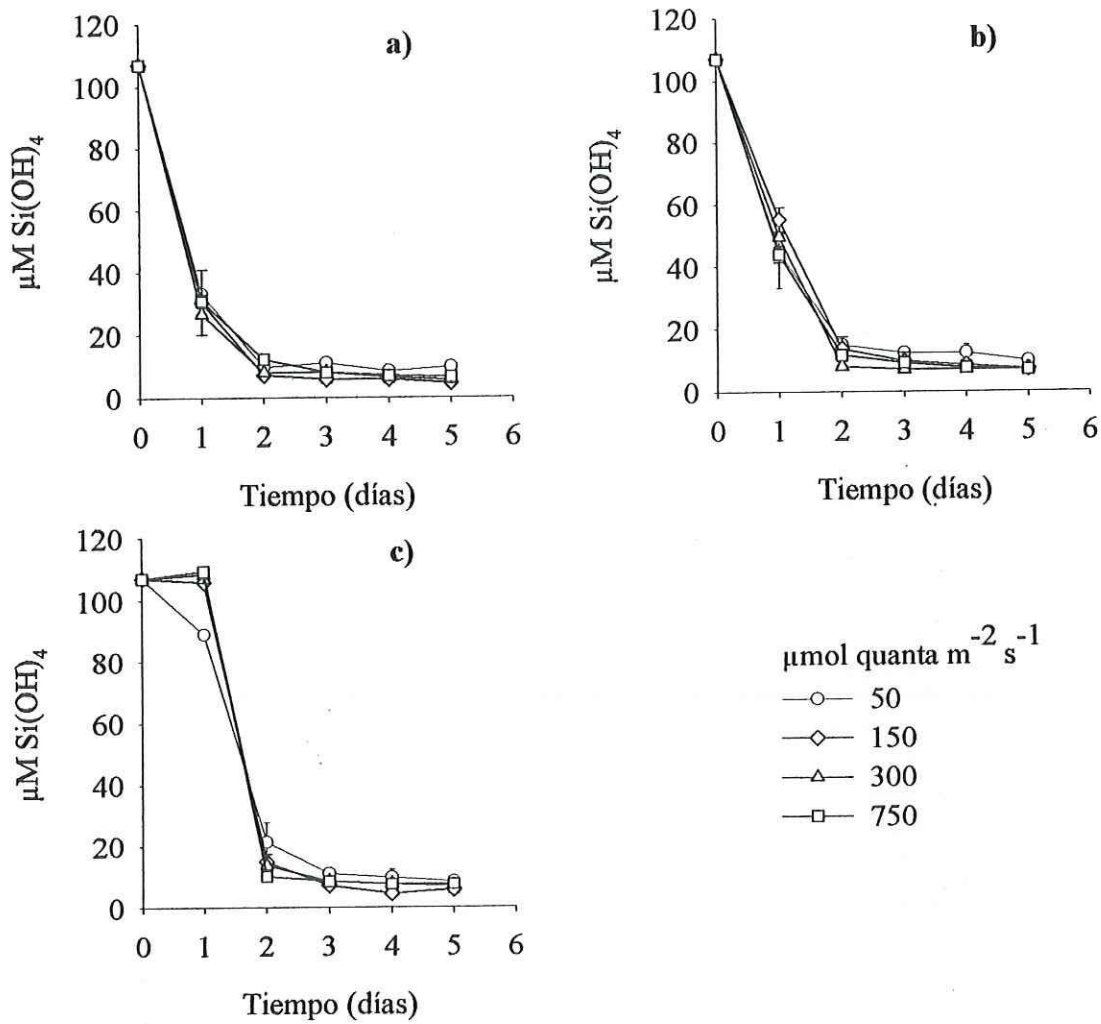


Figura 13. Cambios en concentración de silicato en cultivos estáticos de *Thalassiosira pseudonana* cultivada en diferentes irradiancias y tres concentraciones de nutrientes: a) 441.5/18.1; b) 883/36.3; c) 1766/72.6 μM de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$. La barra vertical indica el error estándar (n=2).

6.1.3.- Composición proximal celular

6.1.3.1- Proteínas

Para todos los tratamientos, el contenido de proteínas de *Thalassiosira pseudonana* disminuyó en los primeros dos días del cultivo (Fig. 14). Asimismo, este constituyente celular difiere entre tratamientos y fue afectado de manera significativa ($P < 0.001$) tanto por la concentración de nutrientes como por la irradiancia ($P < 0.001$), con una interacción significativa entre los factores ($P < 0.001$). Al inicio del cultivo, en la condición de bajo nutriente e irradiancias de 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 14a), se observaron valores máximos de proteínas (272.20 ± 1.27 y 301.28 ± 15.39 $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$) que difieren entre si ($P < 0.001$), los cuales son mayores que los obtenidos en 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (210.62 ± 11.49 y 202.71 ± 22.87 $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$), pero no hubo diferencias significativas ($P = 0.647$) entre estas condiciones de luz. Sin embargo, al comparar el contenido promedio de proteínas obtenidas en altas irradiancias contra 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ existen diferencias ($P < 0.001$). Durante los siguientes tres días del cultivo, el contenido de proteínas en *T. pseudonana* continuó disminuyendo y se puede observar (Fig. 14a) que células creciendo en bajas irradiancias tuvieron mayor contenido que aquellas cultivadas en altas irradiancias, denotándose además, una variación similar con el tiempo de cultivo, aunque los resultados mostraron diferencias entre baja y alta irradiancia. Al final, los valores promedio de proteínas para células cultivadas en 50, 150, 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fueron: 78 ± 2.90 , 82.63 ± 1.49 , 63.18 ± 1.10 y 69.12 ± 0.001 $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$ respectivamente, con diferencias ($P = 0.008$) entre 150 y 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Cuando *T. pseudonana* se cultivó en la condición de medio nutriente (Fig. 14b), la cantidad de proteínas por célula fue menor y difiere ($P < 0.001$) de aquella obtenida en la

condición de bajo nutriente. Se observó también, al inicio del cultivo una mayor cantidad de proteínas (112.71 ± 11.06 y 131.92 ± 14.21 pg cél⁻¹) en irradiancias de 50 y 150 que en 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (94.72 ± 0.19 y 99.92 ± 5.22 pg cél⁻¹). Al comparar los resultados del contenido promedio de proteínas en cada una de las condiciones de luz, se encontró que solo: 50 vs. 750 y 750 vs. 300 no difieren entre sí ($P=0.240$ y $P=0.847$ respectivamente). Después de 24 horas y durante los siguientes cuatro días de cultivo, no hubo una variación significativa en la concentración de proteínas por célula (Fig. 14b), registrándose al quinto día valores de 57.10 ± 1.97 y 49.28 ± 0.030 pg cél⁻¹ en irradiancias de 50 y 150 respectivamente. Mientras que en 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ las concentraciones fueron 42.09 ± 0.48 y 47.21 ± 0.22 pg cél⁻¹.

Los resultados de la condición de alto nutriente (Fig. 14c) fueron significativamente menores ($P < 0.001$) que aquellos obtenidos en la condición de medio y bajo nutriente. Al igual que en las condiciones arriba mencionadas, las proteínas celulares de *T. pseudonana* disminuyen en el primer día y al comparar su concentración por factor luz, mostró que en 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ la concentración promedio de proteínas (104.92 ± 1.38 pg cél⁻¹) fue mayor y diferente ($P < 0.001$) a las condiciones de 50, 150 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, cuyos valores promedio fueron: 76.99 ± 2.42 ; 73.85 ± 1.72 y 79.10 ± 2.82 pg cél⁻¹. A partir del segundo día la concentración de proteínas mostró poca variación con respecto al tiempo de cultivo y sin diferencias significativas ($P > 0.05$) entre las condiciones de luz (Fig. 14c). Para el quinto día de cultivo, el contenido de proteína en irradiancias de 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fue similar (38.29 ± 0.51 y 34.99 ± 1.04 pg cél⁻¹), mientras que en 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ los valores promedios fueron casi el mismo: 24.07 ± 1.09 y 24.48 ± 0.84 pg cél⁻¹ respectivamente.

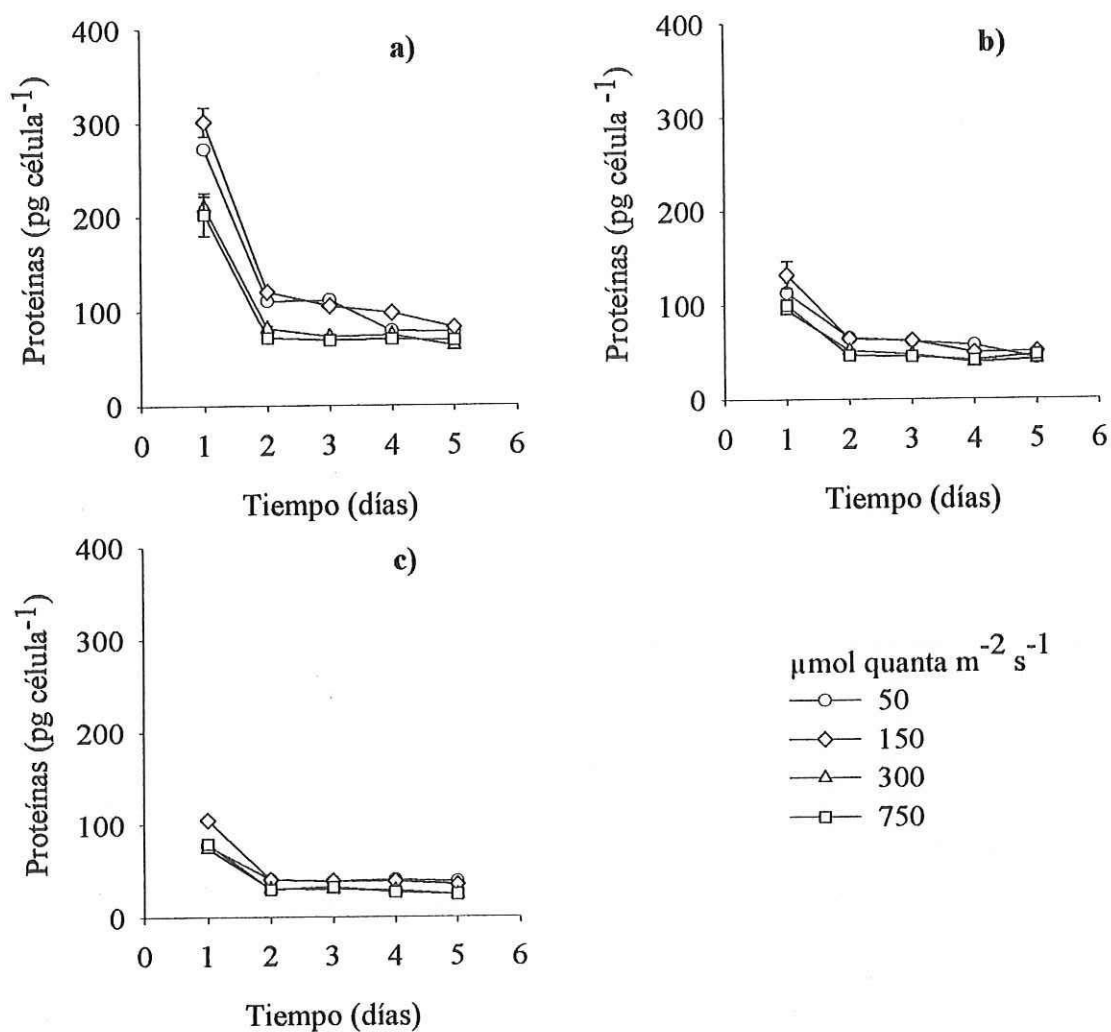


Figura 14. Contenido promedio de proteínas en *Thalassiosira pseudonana* cultivada en 2.9 L bajo diferentes irradiancias y tres combinaciones de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$: a) bajo nutriente 441.5/8.1; b) medio nutriente 883/36.3, y c) alto nutriente 1766/72.6 μM . La barra vertical indica el error estándar (n=2).

6.1.3.2.- Carbohidratos

En todas las condiciones de cultivo, el contenido de carbohidratos por célula, disminuyó con el tiempo del cultivo (Fig.15). Este constituyente celular, también fue significativamente afectado por los diferentes niveles de nutrientes y de luz ($P < 0.001$). Opuesto a proteínas, los resultados de carbohidratos en la condición de bajo nutriente (Fig. 15a) son mayores en altas irradiancias, observándose al inicio del cultivo valores promedio similares (11.16 ± 0.23 y 11.84 ± 1.11 pg cél⁻¹), en irradiancias de 50 y 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Resultados diferentes (9.89 ± 0.67 y 15.26 ± 1.41 pg cél⁻¹) fueron obtenidos en irradiancias de 150 y 750 respectivamente. En los días 2 y 3 del cultivo, la condición de 50 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ registró la menor concentración (4.74 ± 0.67 y 2.66 ± 0.06 pg cél⁻¹) de carbohidratos, mostrando diferencias significativas ($P \leq 0.001$) respecto a los demás niveles de luz. Al final (Fig. 15a), los valores promedio de carbohidratos por célula, en los diferentes niveles de luz no fue significativa ($P = 0.4$).

En el nivel medio de nutrientes (Fig. 15b), la cantidad de carbohidratos por célula fue menor y significativo ($P < 0.001$) respecto al nivel bajo de nutrientes durante la fase de crecimiento exponencial (días 1 y 2). También, al inicio del cultivo, las células creciendo en irradiancias de 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ presentaron mayor concentración de carbohidratos (9.01 ± 0.10 y 10.26 ± 0.07 pg cél⁻¹) que aquellas cultivadas en irradiancias de 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (4.24 ± 0.49 y 3.99 ± 0.40 pg cél⁻¹), determinándose diferencias significativas ($P < 0.001$) entre alta y baja irradiancia. Durante los siguientes días de cultivo, la concentración promedio de carbohidratos en los distintos niveles de luz permaneció entre 2.17 ± 0.74 y 4.16 ± 0.16 pg cél⁻¹ (Fig. 15b). Al final del cultivo, los valores promedio entre los distintos niveles de luz no mostraron diferencias significativas ($P = 0.359$).

Cuando *T. pseudonana* se cultivo en la condición de alto nutriente (Fig. 15c), la concentración celular de carbohidratos, presentó una tendencia muy similar a la observada en el nivel medio de nutrientes. Sin embargo, al compararlos estadísticamente se encontraron diferencias ($P=0.003$) por el factor nutriente. Al igual que en el tratamiento de medio nutriente, la concentración promedio de carbohidratos en el primer día de cultivo, en intensidades de luz de 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fueron mayores (7.27 ± 0.42 y 8.8 ± 1.02 pg cél^{-1}), que las registradas en intensidades de luz de 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (3.23 ± 0.28 y 4.27 ± 0.08 pg cél^{-1}). Después, estas concentraciones disminuyeron a un valor promedio de 2.36 ± 0.07 pg cél^{-1} en el tercer día de cultivo. A partir de este tiempo, el contenido de carbohidratos se mantuvo casi constante, teniendo valores finales similares (1.28 ± 0.11 ; 1.43 ± 0.17 ; 1.17 ± 0.15 y 0.91 ± 0.03 pg cél^{-1}) y no significativos ($P=0.359$) entre 50, 150, 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ respectivamente.

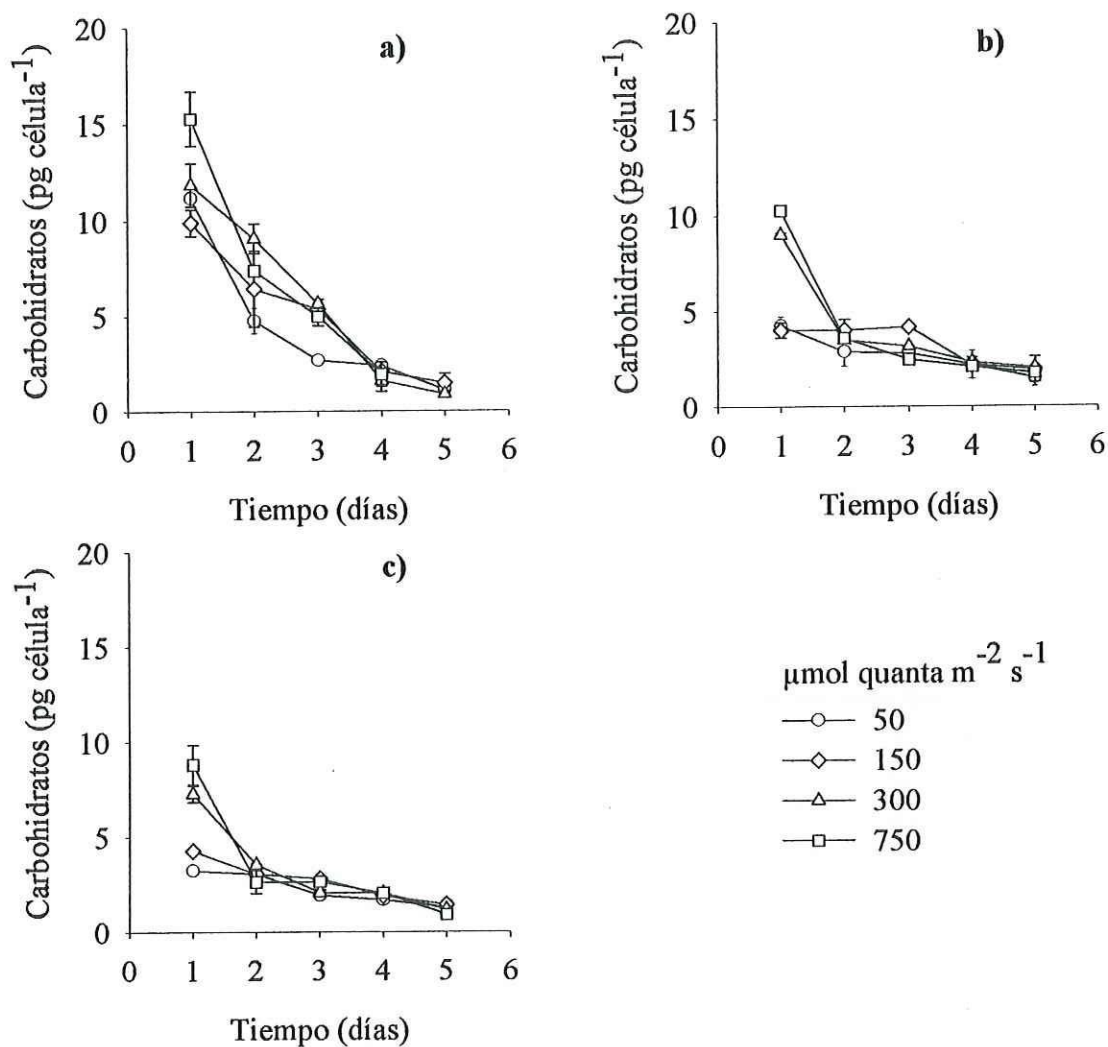


Figura 15. Contenido promedio de carbohidratos en *Thalassiosira pseudonana* cultivada en 2.9 L bajo diferentes irradiancias y tres combinaciones de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$: a) bajo nutriente 441.5/8.1; b) medio nutriente 883/36.3, y c) alto nutriente 1766/72.6 μM . La barra vertical indica el error estándar (n=2).

6.1.3.3.- Lípidos

Similar a proteínas, la concentración de lípidos en la mayoría de las condiciones experimentales disminuyó marcadamente en el segundo día del cultivo (Fig. 16) y se encontraron diferencias significativas ($P < 0.001$) en los valores promedios de este constituyente celular entre los diferentes niveles de nutrientes. Cuando *T. pseudonana* se cultivó en bajo nutriente, la máxima concentración de lípidos se registró en el primer día, con valores promedio de 49.69 ± 0.29 y 62.31 ± 3.30 pg cél⁻¹ para irradiancias de 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mientras que en irradiancias de 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fueron 59.31 ± 12.20 y 43.22 ± 8.94 pg cél⁻¹. Después del segundo día y durante los siguientes tres días restantes no hubo una variación significativa en la concentración, registrándose valores mínimos de 14.7 ± 1.25 y 13.98 ± 0.45 pg cél⁻¹ para bajas irradiancias (50 y 150) y mayores (21.56 ± 1.02 y 18.34 ± 2.14 pg cél⁻¹) en altas irradiancias (300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Al comparar los resultados obtenidos en la condición de medio nutriente (Fig. 16b), con aquellos de bajo nutriente (Fig. 16a), en el primer día de cultivo, resultó que la concentración de lípidos en medio nutriente es 2.2 y 2.7 veces menor en irradiancias de 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (23.23 ± 4.44 y 22.75 ± 5.24 pg cél⁻¹), en tanto que, en irradiancias de 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (21.86 ± 0.62 y 22.14 ± 0.47 pg cél⁻¹) esta proporción es 2.7 y 1.95 veces menor. En el segundo día de cultivo, el contenido de lípidos disminuyó a un valor promedio de 13.6 ± 0.94 pg cél⁻¹ en todas las condiciones de luz. A partir de este tiempo, se observaron variaciones en lípidos en los días 3 y 4 del cultivo, encontrándose siempre valores mayores en bajas irradiancias que en altas irradiancias (Fig. 16b). Al final, el contenido de lípidos en *T. pseudonana* fue similar

(8.67 ± 0.88 ; 10.76 ± 1.43 ; 8.96 ± 0.24 y 10.24 ± 0.07 pg cél⁻¹) y no significativo ($P=0.24$) entre irradiancias de 50, 150 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ respectivamente.

Los resultados de la condición de alto nutriente (Fig. 16c) siempre fueron menores y significativos ($P < 0.001$) que aquellos de medio y bajo nutriente. En el primer día de cultivo, el contenido de lípidos fue similar (15.39 ± 1.21 ; 14.55 ± 0.78 y 14.59 ± 2.58 pg cél⁻¹), en las condiciones de 50, 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mientras que, en 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ el valor promedio de lípidos fue 21.49 ± 1.05 pg cél⁻¹. Estos valores iniciales de lípidos, disminuyeron en el segundo día (Fig. 16c) y entonces permanecieron casi constantes hasta registrar valores finales ligeramente mayores (11.16 ± 0.40 ; 10.86 ± 0.64 pg cél⁻¹) en bajas irradiancias (50 y 150) que aquellos de altas irradiancias (6.05 ± 0.63 y 8.40 ± 1.39). El análisis estadístico no mostró diferencias ($P=0.24$) en el contenido de lípidos entre tratamientos de luz en el último día de cultivo.

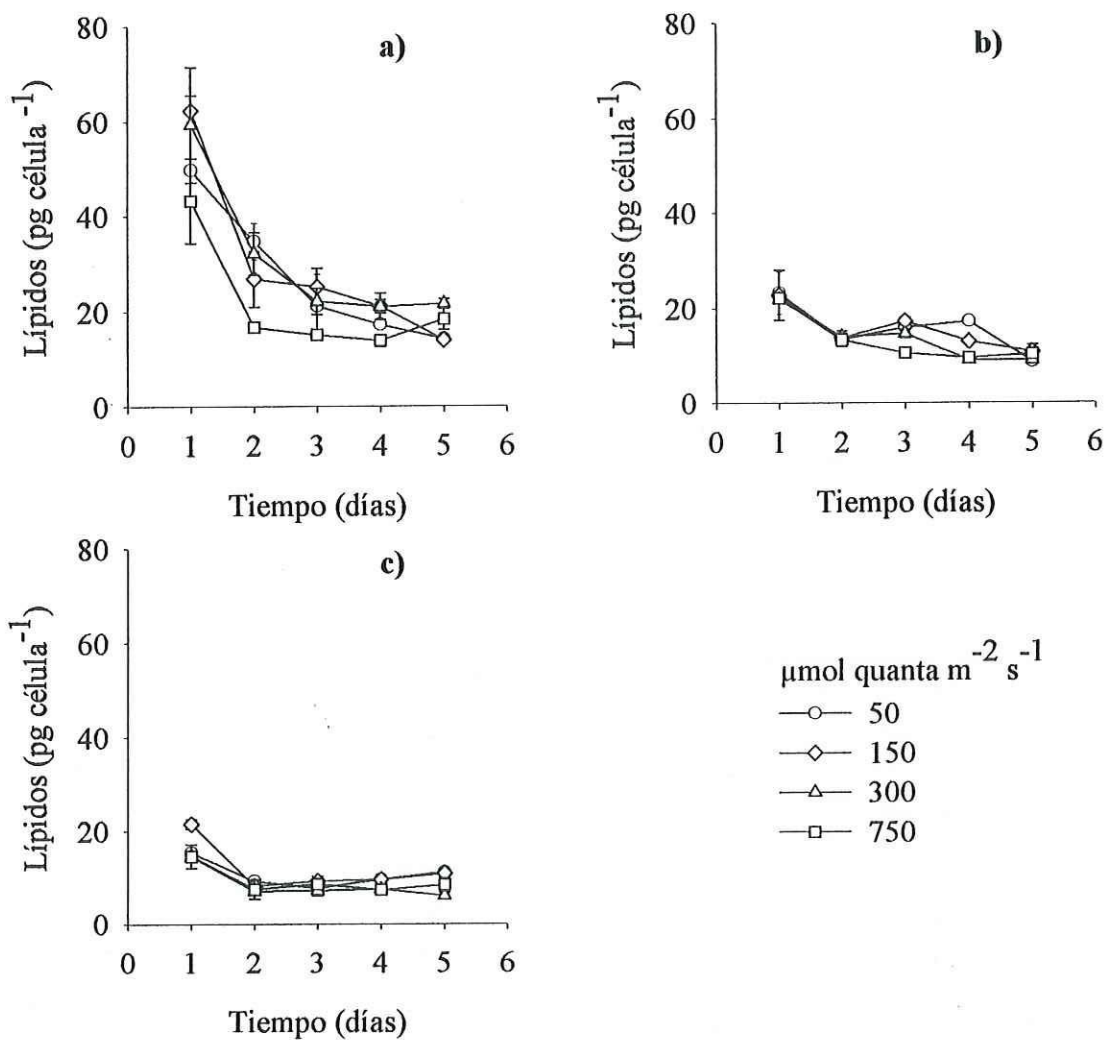


Figura 16. Contenido promedio de lípidos en *Thalassiosira pseudonana* cultivada en 2.9 L bajo diferentes irradiancias y tres combinaciones de NaNO₃/NaH₂PO₄: a) bajo nutriente 441.5/8.1; b) medio nutriente 883/36.3, y c) alto nutriente 1766/72.6 μM. La barra vertical indica el error estándar (n=2).

6.1.4.- Pigmentos

Los pigmentos medidos en *Thalassiosira pseudonana* pueden ser diferenciados en fotosintéticos y fotoprotectores con respecto a su función en la fotosíntesis (Jeffrey y Veski, 1977). Entre los fotosintéticos se encuentra la clorofila α la cual es universal, el carotenoide fotosintético fucoxantina y los carotenoides fotoprotectores diadinoxantina y diatoxantina. La variación en la razón de fucoxantina-diadinoxantina/clorofila α , fue significativamente afectada tanto por las condiciones de nutrientes ($P < 0.001$) como por los diferentes niveles de luz ($P < 0.001$), pero el efecto interactivo entre nutrientes y luz solo fue significativo ($P < 0.001$) para la razón diadinoxantina/clorofila α y no para fucoxantina/clorofila α ($P = 0.377$). Mientras que, la razón diatoxantina/clorofila α no fue significativamente afectada ($P = 0.066$) por la concentración de nutrientes ($P = 0.066$), pero si por los diferentes niveles de luz ($P < 0.001$), sin una interacción significativa entre los factores ($P = 0.875$) para diatoxantina/clorofila α .

En la condición baja de nutrientes e irradiancias de 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la razón de pigmentos fucoxantina/clorofila α en *T. pseudonana* fue mayor al inicio del cultivo, con valores promedio de 0.41 ± 0.01 y 0.45 ± 0.007 , mientras que, en altas irradiancias (300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) los valores de estas fueron 0.37 y 0.34 respectivamente (Fig. 17a). En el segundo día, la razón fucoxantina/clorofila α disminuyó marcadamente a valores de 0.27 ± 0.001 en irradiancias de 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, en tanto que, la razón en 300 y 750 varió de 0.25 ± 0.0004 a 0.22 ± 0.001 . A partir de este tiempo, la razón fucoxantina/clorofila α , se mantuvo con poca variación, excepto en 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ donde se observó un incremento (Fig. 17a).

Entre los pigmentos fotoprotectores, la razón diadinoxantina/clorofila α estuvo presente en cantidades mayores que la razón de diatoxantina/clorofila α (Fig 17 b, c). La razón diadinoxantina/clorofila α mostró un incremento a partir del segundo y tercer día de cultivo en irradiancias de 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 17b), con diferencias significativas ($P < 0.001$) entre estas condiciones de luz. En bajas irradiancias (50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) los valores observados en la razón diadinoxantina/clorofila α siempre fueron menores que aquellos de altas irradiancias, excepto en el segundo día donde las razones para cada una de las condiciones de luz fueron similares (Fig. 17b). Por otra parte, diatoxantina mostró un incremento significativo entre las diferentes irradiancias, con valores mayores en altas irradiancias (Fig. 17c).

Cuando *T. pseudonana* estuvo creciendo en la condición media de nutrientes, se observó que la razón celular de fucoxantina/clorofila α disminuyó a valores entre 0.22 ± 0.004 y 0.26 ± 0.01 en el segundo día (Fig. 18a), y se encontró poca variación en sus razones entre las diferentes irradiancias y con respecto al tiempo de cultivo, sin diferencias significativas ($P > 0.05$) entre las razones en las distintos niveles de luz. Las razones promedio en irradiancias de 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fueron 0.26 ± 0.007 y 0.28 ± 0.009 , mientras que en 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sus razones promedio fueron idénticas (0.27 ± 0.009). Por otra parte, la razón de diadinoxantina-diatoxantina/ clorofila α se incrementó con un incremento en la irradiancia (Fig. 18b, c) y en altas irradiancias los valores de las razones diatoxantina/clorofila α fueron mayores que aquellos de bajas irradiancias, con diferencias significativas ($P < 0.001$) entre 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y las demás niveles de luz.

En el caso de cultivos en alto nutriente, la razón celular de fucoxantina/clorofila a en *T. pseudonana* mostró una respuesta consistente sin cambios significativos ($P > 0.05$) en los valores de sus razones en los diferentes niveles de luz y tiempo de cultivo (Fig. 19a). El valor promedio integrado de todas las razones en las distintas irradiancias y tiempo de cultivo fue 0.258 ± 0.003 . Además, los valores de las razones diadinoxantina/clorofila a son similares a los observados en la condición media de nutrientes, pero diferentes a los resultados obtenidos en bajo nutriente. En cuanto a las razones de diatoxantina/clorofila a siempre se encontraron valores mayores en altas irradiancias (Fig. 19c), siendo esta razón significativa ($P < 0.001$) el nivel de $750 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ respecto a los otros niveles de luz.

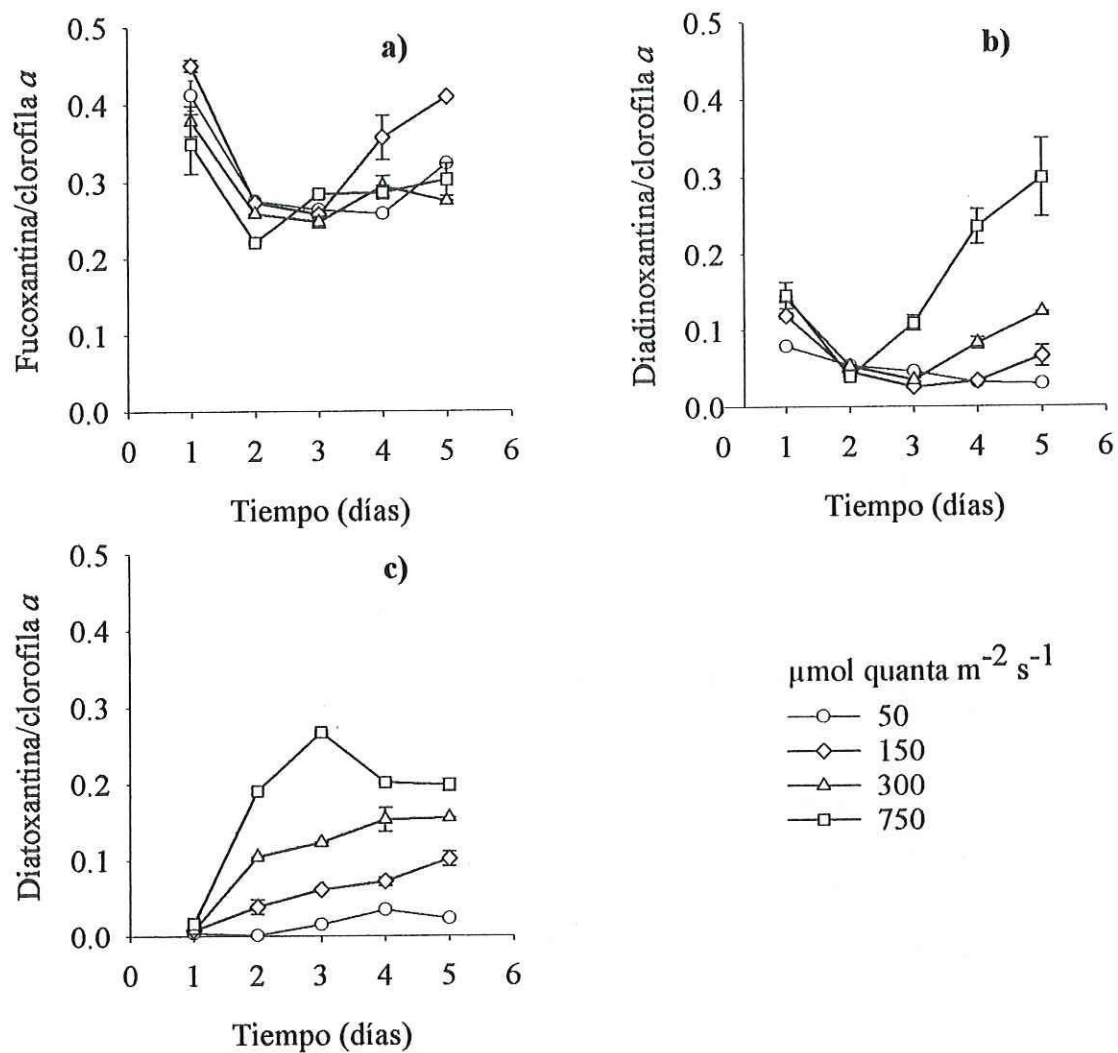


Figura 17. Razón promedio de pigmentos accesorios/clorofila α de *Thalassiosira pseudonana*, en cultivos estáticos en diferentes irradiancias y 441.5/18.1 μM de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$. La barra vertical indica el error estándar ($n=2$).

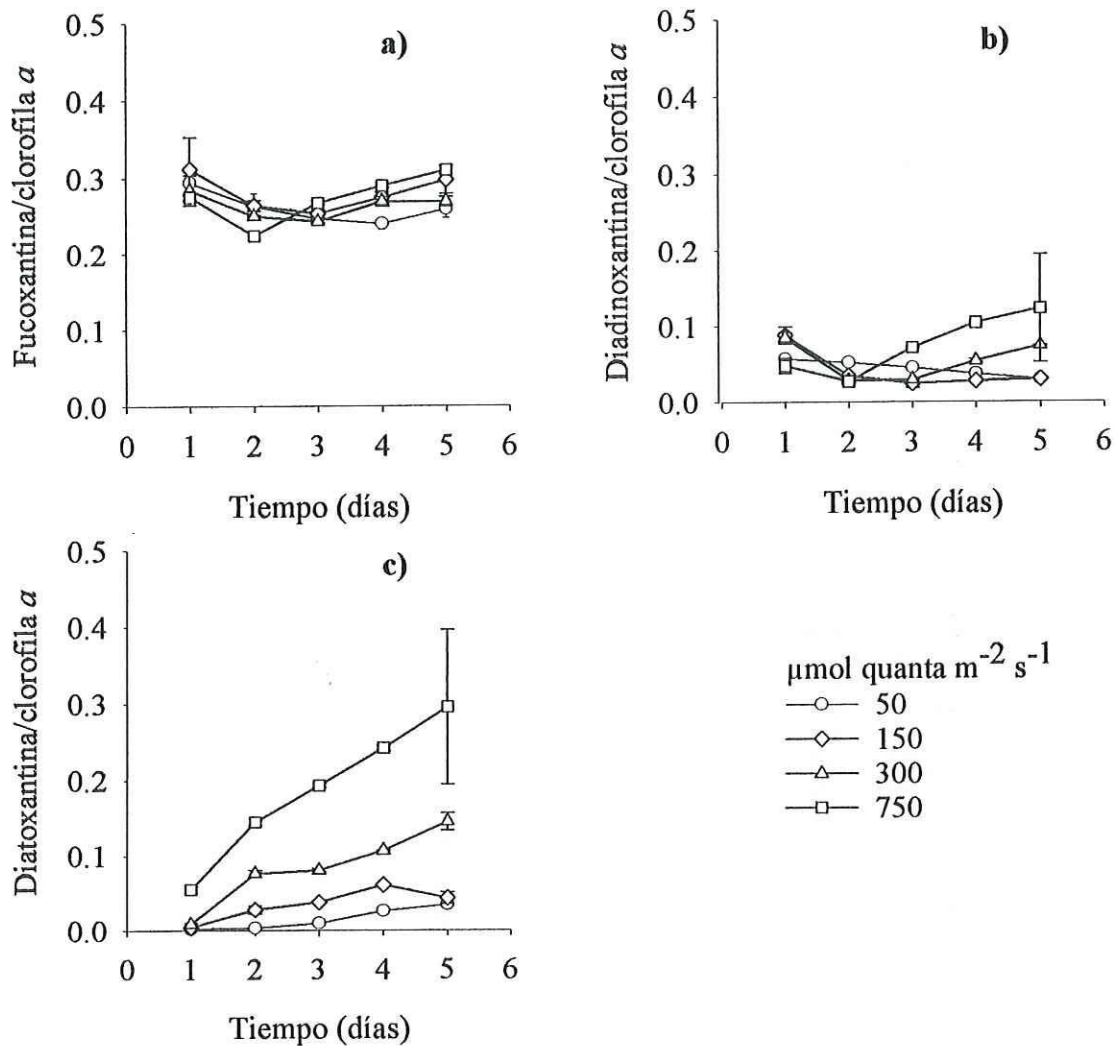


Figura 18. Razón promedio de pigmentos accesorios/clorofila *a* de *Thalassiosira pseudonana*, en cultivos estáticos en diferentes irradiancias y 883/36.3 μM de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$. La barra vertical indica el error estándar (n=2).

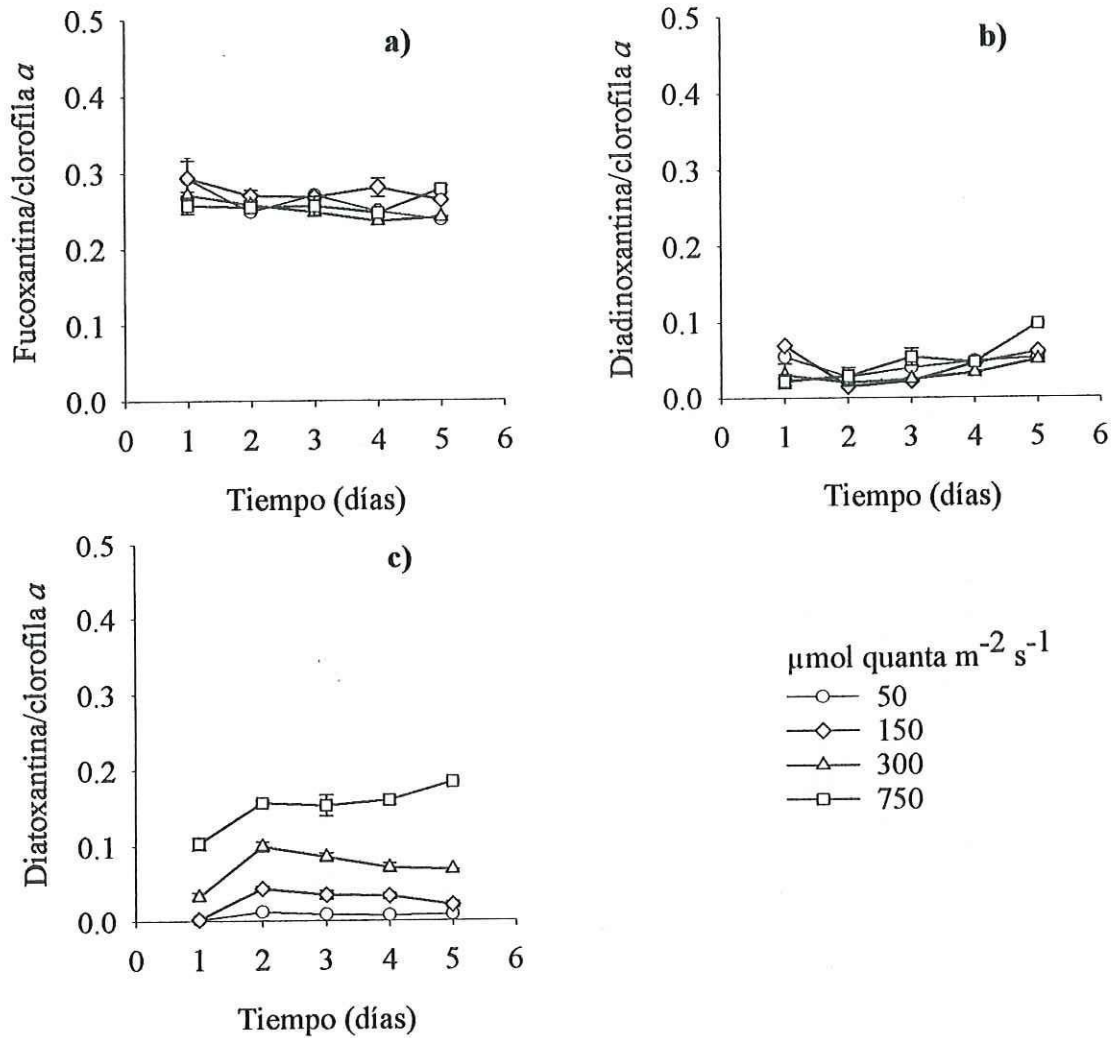


Figura 19. Razón promedio de pigmentos accesorios/clorofila *a* de *Thalassiosira pseudonana*, en cultivos estáticos en diferentes irradiancias y 1766/72.6 μM de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$. La barra vertical indica el error estándar (n=2).

6.1.5.- Discusión

6.1.5.1.- Cultivo de *Thalassiosira pseudonana*

Los resultados muestran claramente la fase de crecimiento exponencial de *T. pseudonana*, donde se observó un incremento en la tasa específica de crecimiento durante los primeros dos días del cultivo (Fig. 10). Sin embargo, la densidad celular obtenida de *T. pseudonana* difiere ($P < 0.001$) en respuesta a las diferentes concentraciones de nutrientes evaluadas y no en relación a los diferentes niveles de luz, los cuales no tuvieron efectos significativos ($P = 0.291$) en el crecimiento en los primeros dos días del cultivo.

El efecto de la luz fue disminuido debido al rápido incremento en la densidad celular y el consecuente incremento en la turbidez de los cultivos durante la fase exponencial. Observaciones similares también han sido realizadas por Brown *et al.* (1996), quien explica que la irradiancia en cultivos de *T. pseudonana* es reducida del 20 al 25% al final de la fase exponencial. Asimismo, las mayores tasas de crecimiento ocurrieron en estos primeros días y variaron entre 0.7 y 1.6 divisiones por día en las distintas condiciones de luz y nutrientes (Tabla II).

Los resultados de este estudio son consistentes con los encontrados por Stramski *et al.* (2002), quien observó que la tasa de crecimiento de *T. pseudonana* en baja irradiancia es reducida a 0.60 divisiones por día, comparado con aquellas obtenidas en altas irradiancias (2.0 divisiones por día). Con el inicio de la fase estacionaria, la tasa de crecimiento específica se redujo notablemente (Fig. 10). La disparidad entre la fase exponencial y estacionaria puede representar diferencias en el tiempo de la división celular (sincronía celular), también como el estatus fisiológico de las células en cada fase de cultivo. Estas observaciones implican que el rápido agotamiento de silicatos (Fig. 13) ocurrido en los

primeros dos días, afectó tanto la tasa de crecimiento como el ciclo celular de *T. pseudonana*, debido a que el silicio es un elemento esencial, requerido para la formación de la pared celular de diatomeas y su consumo esta fuertemente acoplado al ciclo celular (Claquin *et al.*, 2002; Hildebrand, 2002). Los resultados también indican que *T. pseudonana* es una excelente microalga para el cultivo masivo en acuicultura, debido a su capacidad de tolerar un importante intervalo de irradiancias para su crecimiento y producir alta densidad celular en un corto tiempo.

6.1.5.2.- Consumo de nutrientes (NO_3^- , PO_4^{3-} , $Si(OH)_4$)

El crecimiento del fitoplancton en laboratorio puede ser limitado por la concentración de nutrientes y cambios en la irradiancia durante su cultivo. En este estudio, la concentración celular de *T. pseudonana* en fase de crecimiento exponencial, se relaciona de manera inversa con la concentración de nutrientes en el medio, lo cual origina que la disponibilidad de los elementos nutricionales para el crecimiento disminuya con respecto al tiempo del cultivo.

Al examinar el consumo de nitrato y silicato en todas las condiciones experimentales, se observó que las diferentes condiciones de luz no modificaron de forma importante el consumo de estos nutrientes (Fig. 11, 13). Sin embargo, el consumo de fosfato (Fig. 12) resultó afectado por cambios en la irradiancia de crecimiento. Esta variación en los niveles de luz podría haber conducido a cambios igualmente rápidos en la energía celular, debido a la producción de ATP y NADPH a través de las reacciones de luz en la fotosíntesis, siendo estas reacciones, mucho más rápidas, que la utilización de los nutrientes en las reacciones de biosíntesis (Falkowski y Raven, 1997). Aunque la concentración de

nutrientes disminuyó rápidamente con el inicio del crecimiento exponencial, la diatomea usada en este estudio, consumió diferentes cantidades de nitrato y silicato durante el mismo intervalo de crecimiento para los cultivos. Con respecto a lo antes expuesto, varios estudios sugieren que el metabolismo del nitrógeno esta coordinado con la fotosíntesis o con algún producto de la fotosíntesis (Turpin, 1991; Vergara *et al.*, 1998), mientras que el metabolismo del sílice esta relacionado al ciclo celular de las diatomeas y no directamente a la fotosíntesis (Brzezinski y Conley, 1994; Martin-Jézéquel *et al.*, 2000).

Los resultados de este estudio, muestran que durante el crecimiento exponencial, los requerimientos de nitrato y fosfato (Fig. 11, 12) por *T. pseudonana* son menores que aquellos observados en el consumo de silicatos (Fig. 13). Este mayor consumo de silicato puede ser explicado por el incremento en la tasa de crecimiento (Tabla II) durante la fase exponencial, donde las células sintetizan una mayor cantidad de sílice para la formación de nuevas valvas. Estos hallazgos concuerdan con lo observado por Claquin *et al.* (2002) quien indica que los requerimientos de sílice son usualmente altos durante periodos de síntesis de pared celular y mitosis. También señala que en diferentes condiciones de luz, *T. pseudonana* tiene mayor requerimiento de fósforo durante la replicación de DNA y periodos de rápido crecimiento, lo cual concuerda con lo observado de este trabajo, ya que se encontró que células expuestas en altas irradiancias consumen mayor cantidad de fosfato que aquellas creciendo en bajas irradiancias (Fig. 12).

Aunque el consumo de fosfato fue dependiente de la intensidad de luz, la cantidad consumida de este nutriente fue mayor en altas irradiancias que en bajas irradiancias (Fig. 12) y el requerimiento de fosfato por *T. pseudonana* fue usualmente mayor a medida que se incrementó su concentración en el cultivo. En el caso del nitrato, también se observó la

misma tendencia (Fig. 11) excepto que no hubo efecto por distintos niveles de luz. El incremento en la demanda de estos nutrientes es relativo al tiempo de cultivo y la densidad celular de *T. pseudonana*, la cual tuvo un incremento significativo (Fig. 10) a medida que se incremento la concentración de nutrientes en el cultivo. Estos resultados son consistentes con los hallazgos hechos por Lomas y Glibert (2000) y Kudo (2003), quienes indican que las diatomeas generalmente tienen mayores consumos de nitratos que las flageladas y que *Thalassiosira* sp. consume diferentes cantidades de nitrato cuando las concentraciones son diferentes. Una importante explicación de esta sugerencia es que el cultivo de diatomeas en condiciones abundantes de nitrógeno, pueden tener la capacidad para tomar y reducir nitrato independientemente de su requerimiento nutricional y en respuesta a estas condiciones ambientales, un exceso de energía celular es requerido relativo a la demanda.

6.1.5.3.- Composición proximal celular

La diatomea *Thalassiosira pseudonana* creciendo bajo diferentes condiciones de luz y nutrientes mostró siempre mayor variación en proteínas, carbohidratos y lípidos en la condición baja de nutrientes que en las condiciones media y alta de nutrientes (Fig. 14, 15 y 16). Consecuentemente, los constituyentes bioquímicos de *T. pseudonana* variaron en concentración dependiendo de la disponibilidad de nutrientes, encontrándose que la cantidad de proteínas por célula es mayor que lípidos y estos a su vez mayor que carbohidratos. También es interesante resaltar que las proteínas y lípidos por célula mantienen una relación más estrecha que los carbohidratos por célula. Este bajo contenido de carbohidratos por célula probablemente se deba a la limitación por silicatos, el cual

puede ser visto en la figura 13. Esta limitación por silicatos, más que la limitación por otros macronutrientes, causa un incremento en la producción de lípidos en diatomeas (Taguchi *et al.*, 1987; Roessler, 1988). También se puede observar que la concentración de proteínas, lípidos y carbohidratos disminuyeron con el tiempo de cultivo (segundo día), probablemente a la mayor frecuencia en la división celular de *T. pseudonana*. Después, estas macromoléculas presentaron poca variación en su concentración en las distintas condiciones de luz y nutrientes, excepto en el tratamiento de bajo nutriente, donde se evidenció el efecto de la luz y la concentración de nutrientes. Resultados similares también han sido observados en cultivos estáticos de *Rhodomonas* sp (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2002), donde el mayor consumo de nitrato y fosfato se presentan en el segundo y tercer día de cultivo, con la subsecuente disminución de los constituyentes bioquímicos en el segundo día y entonces permanecen con poca variación hasta el final del cultivo.

Al analizar los constituyentes bioquímicos en la fase de lento crecimiento (después del segundo día), el contenido de macromoléculas por célula mostraron poca variación (Fig. 14, 15 y 16) excepto, los carbohidratos de la condición baja de nutrientes, los cuales continuaron disminuyendo hasta el final del cultivo (Fig. 15a). Estos resultados no tienen la misma tendencia de lo observado por Brown *et al.* (1996) quien encuentra que *T. pseudonana* creciendo en irradiancias de 50 y 100 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y fotoperíodo continuo, incrementa el contenido carbohidratos y en menor grado los lípidos. Esta tendencia es típica en células creciendo en limitación de nutrientes (nitrógeno), donde el metabolismo celular esta siendo modificado de formación de proteínas, para el almacenamiento de energía (carbón). En el presente este estudio, si se observan los resultados de consumo de nitrato y fosfato (Fig. 11a y 12a), no hubo limitación por

ninguno de estos nutrientes. Pero los resultados del consumo de sílice muestran lo contrario (Fig. 13). Por lo tanto, el consumo de nitrato no cambió de manera significativa con la tasa de crecimiento bajo diferentes condiciones de luz. En contraste el fosfato si cambio, mientras que la disponibilidad de silicatos fue un factor clave en la regulación del crecimiento de la diatomea. Estudios hechos por Claquin *et al.* (2002) indican que existe un acoplamiento entre el metabolismo del nitrógeno, fósforo y la irradiancia, mientras que el consumo de sílice no esta acoplado con el consumo de nitrógeno. Estas diferencias permiten explicar la relativa estabilidad que presentaron las proteínas, lípidos y carbohidratos después del segundo día de cultivo, con excepción de lo observado en carbohidratos en la condición baja de nutrientes (Fig. 15a). Además, efectos de la irradiancia sobre el reservorio celular de sílice también afecta la tasa de crecimiento, lo cual a su vez, modifica los requerimientos de sílice durante la síntesis de la pared celular y los constituyentes bioquímicos (Martin-Jézéquel *et al.*, 2000). Aunque en este trabajo, no se evaluó el efecto de la irradiancia sobre el reservorio celular, datos del presente estudio pueden ser considerados como evidencia del efecto de la irradiancia en el consumo de silicatos y la modificación en los constituyentes celulares de *T. pseudonana*.

6.1.5.4.- Pigmentos

Las proporciones promedio de pigmentos accesorios respecto a la clorofila α mostraron una marcada similitud entre las condiciones baja (Fig.17), media (Fig. 18) y alta (Fig. 19) de nutrientes usadas para el cultivo de *T. pseudonana*. El principal factor que afectó la concentración celular de pigmentos fue la irradiancia. Cuando esta se incrementó modificó tanto la razón de pigmentos accesorios fotosintéticos y fotoprotectores con respecto a la clorofila α y variaciones importantes en la cantidad de diatoxantina fueron observadas en altas irradiancias en todas las condiciones de luz y nutrientes evaluadas. En cambio, la proporción celular de pigmentos fotosintéticamente activos como fucoxantina solo mostró mayor variación en la baja concentración de nutrientes, donde se observó una reducción en la razón fucoxantina/clorofila α en el segundo día de cultivo. Esto indica que, el contenido celular de clorofila α fue mayor respecto al carotenoide fotosintéticamente activo fucoxantina en los primeros tres días que duró la fase exponencial y después ambos pigmentos disminuyen durante la fase estacionaria, pero diferentes irradiancias en los cultivos, provocan que este pigmento accesorio co-varíe con la clorofila α , modificándose tanto el contenido celular de clorofila α y fucoxantina (datos no mostrados), lo cual puede explicar las variaciones observadas en las razones de fucoxantina/clorofila α (Fig. 17a).

Cuando cultivos de *T. pseudonana* fueron expuestos a distintas irradiancias, las razones de diadinoxantina/clorofila α también disminuyeron en el segundo día (Fig. 17b, 18b y 19b), aunque después de este tiempo, se observaron incrementos en las razones en las distintas irradiancias. Esta respuesta coincidió con el máximo de

densidad celular obtenido en el segundo día (Fig. 10), y como consecuencia de esto, la penetración de luz en los cultivos disminuyó, pero la densidad celular continuo incrementándose con el tiempo, entonces es probable que este efecto de auto-sombreado por densidad celular, haya permitido que las proporciones diadinoxantina/clorofila a también se incrementaran con el tiempo en las distintas irradiancias. Experimentos hechos por Kashino y Kudoh (2003) en cultivos de *Chaetoceros gracilis* indican que células expuestas a 200 y 400 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ disminuyeron la proporción de diadinoxantina/clorofila a y aumentaron diatoxantina/clorofila a . Pero cuando las células se mantienen en oscuridad, las proporciones de estos pigmentos muestran lo contrario. Mientras que, las razones de fucoxantina/clorofila a se mantienen en valores razonablemente constantes durante el periodo de tiempo de este experimento.

Los resultados de este estudio concerniente a *T. pseudonana*, concuerdan con lo observado por Arsalane *et al.* (1994), en cultivos de otras diatomeas como *Phaeodactylum*. Un alto flujo de fotones y un incremento del tiempo de iluminación modifica la fotosíntesis neta con un incremento de la razón diatoxantina/(diatoxantina + diadinoxantina). Asimismo, las razones diadino-diatoxantina/clorofila a son fuertemente influenciadas por la intensidad de luz y generalmente se incrementan con la intensidad de luz (Schlüter *et al.* 2000, 2006; Descey *et al.* 2000). Entonces estos cambios de concentración de diadinoxantina a diatoxantina observados en altas irradiancias en este estudio, protegen a la célula cuando un exceso de luz es registrado en el sistema fotosintético y el exceso de quantas absorbidos es proporcionalmente disipados como energía termal (Rmiki *et al.*, 1996;). El principal componente de esta

respuesta esta asociado con el desarrollo de gradientes de pH a través de las membranas tilacoidales (Kashino y Kudoh (2003) y con la inactivación del fotosistema II (Weis y Berry, 1987). En conclusión, este estudio proporciona información sobre las propiedades nutricionales de *T. pseudonana*, la cual tolera un amplio intervalo de irradiancias para su crecimiento, mismas que pueden ser usadas para el cultivo de esta especie en acuicultura. Asimismo, los datos de razones de pigmentos aquí desarrollados son de importancia primaria para estudios ecológicos, porque permiten conocer los mecanismos de respuesta de *T. pseudonana* bajo distintas condiciones ambientales y la contribución que esta especie a la clorofila *a* en el ambiente marino, para la medición de la biomasa del fitoplancton la cual varía en función de variables ambientales y parámetros fisiológicos.

7. RESULTADOS

7.1. Experimento 3: Crecimiento, consumo de nutrientes, composición próximal y razón de pigmentos accesorios/clorofila *a* en *Tetraselmis suecica* (Kilin) Butcher (Prasinophyceae) cultivada bajo diferentes condiciones de luz y nutrientes.

7.1.1. Cultivo de *Tetraselmis suecica*

Tanto la irradiancia como la concentración de nutrientes tuvieron un efecto significativo ($P < 0.001$) en la densidad celular de *T. suecica* al final de los siete días de experimento (Fig. 20). Todos los tratamientos, iniciaron con una densidad celular similar, la cual en promedio fue $1.07 \pm 0.046 \times 10^5$ células mL^{-1} . En las distintas condiciones se observó la fase de retardo en las primeras 24 h, seguida por un crecimiento exponencial (Fig. 20) hasta el cuarto día de cultivo. En la condición de bajo nutriente e intensidades de luz de 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la tasa específica de crecimiento (μ) fue similar (0.6) durante fase exponencial, con densidades celulares finales de $8.78 \pm 0.059 \times 10^5$ y $1.04 \pm 0.015 \times 10^6$ células mL^{-1} (Fig. 20a). En la condición media de nutrientes y mismas irradiancias especificadas arriba, μ varió entre 0.44 y 0.35, pero la densidad celular final obtenida fue mayor (1.06 ± 0.036 y $1.69 \pm 0.039 \times 10^6$ células mL^{-1} ; Fig. 20b) que aquellas de bajo nutriente. Mientras que, en alto nutriente los valores de μ fueron 0.34 y 0.41 respectivamente. En esta última condición se registraron densidades celulares finales de 1.03 ± 0.0075 y $1.89 \pm 0.019 \times 10^6$ células mL^{-1} (Fig. 20c), las cuales son similares a la condición media de nutrientes, pero mayores que las obtenidas en bajo nutriente.

A diferencia de los resultados antes mencionados, en irradiancias de 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ las tasas de crecimiento siempre fueron mayores, con valores de 1.15 y 0.98 para bajo nutriente, de 0.63 y 0.85 en medio nutriente y de 0.39 y 0.63 en alto nutriente

respectivamente. Asimismo, la densidad celular de *T. suecica* no solo se incrementó con un aumento en la irradiancia sino también, con el incremento en la concentración de nutrientes. Así, en bajo nutriente e irradiancias de 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, las densidades celulares finales fueron 1.17 ± 0.0018 y $1.11 \pm 0.036 \times 10^6$ células mL^{-1} (Fig. 20a), las cuales son menores que las obtenidas en la condición media de nutrientes en las mismas irradiancias (1.96 ± 0.096 y $2.07 \pm 0.036 \times 10^6$ células mL^{-1} ; Fig. 20b). Cuando *T. suecica* se cultivó en alto nutriente y en las irradiancias antes especificadas, la densidad celular final registrada en este tratamiento fue mayor (2.56 ± 0.026 y $2.59 \pm 0.032 \times 10^6$ células mL^{-1} ; Fig. 20c) que aquellas de bajo y medio nutriente. Un incremento en la división celular de *T. suecica* fue observado cuando la intensidad de luz se incrementó. En 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se tuvo la mayor división celular en las distintas condiciones de nutrientes (Fig. 20).

Al final de la fase exponencial, inició la fase de lento crecimiento, en la cual la tasa de división celular de *T. suecica* disminuyó de forma significativa en todos los tratamientos, denotándose en los cultivos de bajo nutriente e irradiancia de 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, una fase en la cual el número de células permanece más o menos estacionario, para después entrar a la fase de muerte (Fig. 20a), donde el número de células por unidad de volumen disminuyó al séptimo día del cultivo.

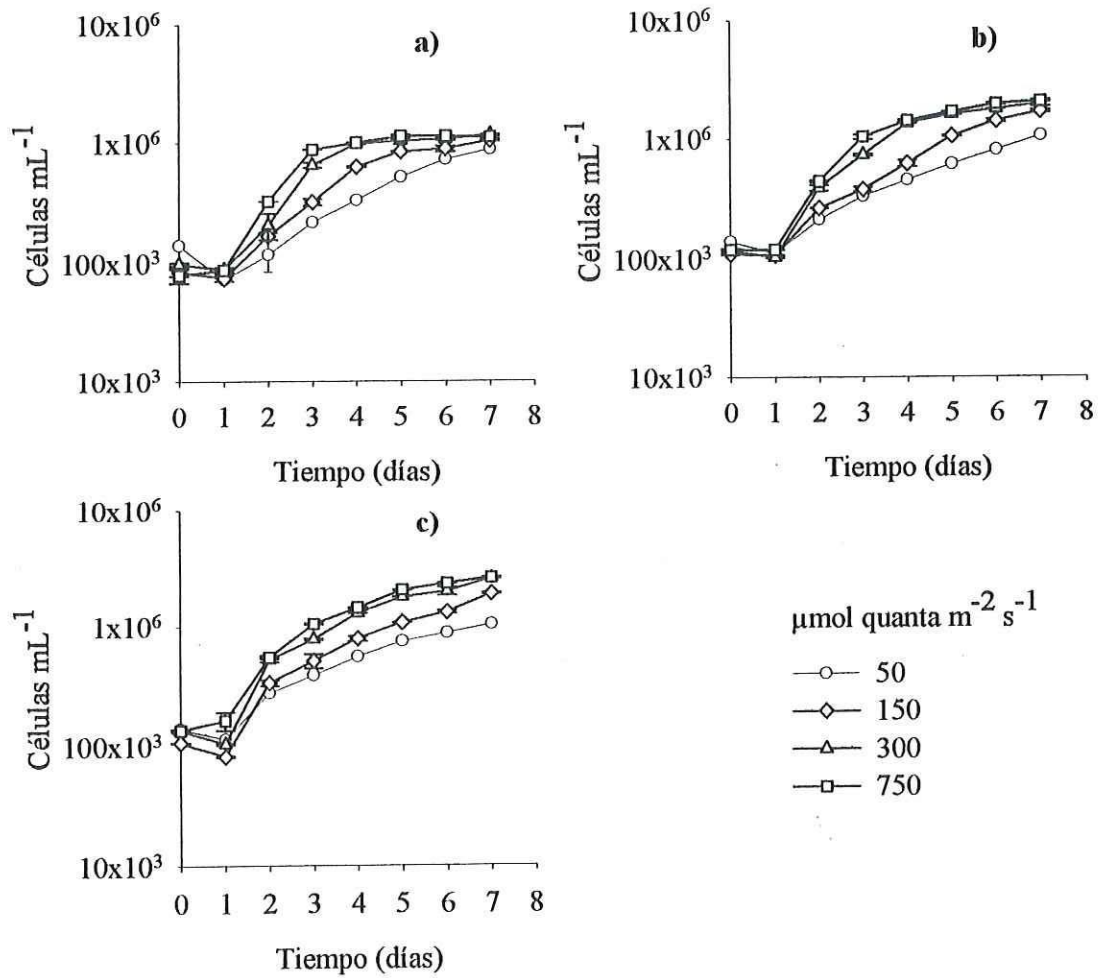


Figura 20. Cambios en densidad celular de *Tetraselmis suecica* en cultivos estáticos con diferentes irradiancias y tres concentraciones de nutrientes: a) 441.5/18.1; b) 883/36.3; c) 1766/72.6 μM de NaNO₃/NaH₂PO₄. La barra vertical indica el error estándar (n=2).

7.1.2.- Consumo de nutrientes (NO_3^- , PO_4^{3-})

El consumo de nitrato y fosfato por *Tetraselmis suecica* mostró una respuesta consistente con el incremento en la concentración de nutrientes y la intensidad de luz. Un aumento en la concentración de nutrientes en el cultivo de *T. suecica*, variando la intensidad de luz, produjo un considerable consumo de nitrato y fosfato (Fig. 21 y 22).

Cuando *T. suecica* se cultivó en la condición baja de nutrientes, el consumo acumulado de nitrato (Fig. 21a) durante el crecimiento exponencial (tercer día), en irradiancias de 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fue distinto (108.4-338.4 μM ; 53.8-76.6% respectivamente), mientras que, el consumo acumulado de fosfato (Fig. 22a) fue idéntico (13.6 μM ; 72.7%) en ambas condiciones de luz. Sin embargo, en la misma condición de cultivo, cuando la irradiancia se incrementó en 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, *T. suecica* mostró mayor consumo: 409-422 μM de nitrato (92.6 y 95.7 %), y 17-15.9 μM de fosfato (93.9 y 87.8%). Durante el resto del cultivo (fase de lento crecimiento), el consumo de estos nutrientes mostraron poca variación entre irradiancias (Fig. 21a y 22a), y al séptimo día de cultivo, la concentración residual final promedio de nitrato y fosfato en las distintas condiciones de luz fue 13.2 y 1.09 μM respectivamente.

La remoción de nutrientes por *T. suecica* en la condición media de nutrientes fue dos veces mayor que aquella observada en la condición baja de nutrientes. En irradiancias de 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la remoción de nitrato en fase exponencial fue: 223.3-430 μM (25.2-48.6%) mientras que, la remoción de fosfato para las mismas condiciones de luz fueron de 28.5-31.8 μM (78.7-87.8%). Estos resultados son menores que los observados en altas irradiancias (Fig.21b y 22b) donde, la cantidad de nitrato removida al tercer día del cultivo, fue muy similar en irradiancias de 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (834-848

μM ; 94-96%), en cambio la remoción de fosfato, no mostró diferencias tan marcadas entre las distintas irradiancias (Fig. 22b), aunque, durante los primeros tres días de cultivo, *T. suecica* removió la mayor cantidad de fosfato del medio (33.6 μM ; 92.6% y 32.9 μM ; 90.6% respectivamente).

Para la fase de lento crecimiento y en condiciones de bajas irradiancias, la remoción de nitrato continuó hasta el quinto y sexto día de cultivo (Fig. 21b). En cambio, la concentración residual final de fosfato permaneció casi constante a partir del tercer día, con valores de 4.4 y 3.3 μM en bajas irradiancias y de 1.1 a 2.2 μM para altas irradiancias (Fig. 22b). La concentración residual final (día 7) de nitrato en medios de cultivo expuestos a irradiancias de 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ fue de 14.6 y 21.3 μM . En estos cultivos el consumo total de nitrato fue 868 μM (98.3%) y 861.7 μM (97.5%). En el caso de cultivos creciendo en 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, el agotamiento de nitrato se observó al tercer día (Fig. 21b), después de este tiempo, la concentración residual final de nitrato en el medio permaneció casi constante, con valores de 8.89 μM y 9.13 μM . El consumo total de nitrato en estas condiciones de luz fueron 874.1 μM (98.99%) y 873.8 μM (98.96%) respectivamente.

T. suecica tuvo el mayor consumo de nutrientes cuando se cultivo en la condición alta de nutrientes y al igual que en las condiciones antes mencionadas, la remoción de nutrientes siempre fue mayor en altas irradiancias que en bajas irradiancias (Fig. 21 y 22). En comparación con las otras condiciones de nutrientes, *T. suecica* siempre registró mayor consumo que la condición media y baja de nutrientes. Los resultados de la condición de alto nutriente indican diferencias en remoción de nitratos y fosfatos en la fase exponencial para las distintas condiciones de luz. Así, en irradiancias de 50 y 150 μmol

quanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la cantidad de nitrato (278-487 μM ; 15.7-27.5%) y fosfato (31.8-38.4 μM ; 43.8-52.9%) removido del medio fue menor que la registrada en 300 y 750 μmol quanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En estas últimas condiciones de luz la remoción de nitrato fue de 891.5-1016.4 μM (50.4-57.5%), mientras que la utilización fosfato fue idéntica en ambas condiciones de luz (67 μM ; 92.4%).

A diferencia de los resultados arriba mencionados, el consumo de nitrato y fosfato no cambio notablemente entre la fase estacionaria y la fase de lento crecimiento. Cultivos de *T. suecica* en altas irradiancias comienzan a ser limitados por nitrato en el quinto día, mientras que la limitación por fosfato empieza al cuarto día (Fig. 21c y 22c). En el caso de cultivos en bajas irradiancias no mostraron limitación por nutrientes. Al final del periodo de cultivo (día 7), en irradiancias de 50 y 150 μmol quanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, el consumo total de nitrato (980-1655 μM ; 55.4-93.7%) y fosfato (62.6-68.1 μM ; 86.3-93.9) fue distinto, mientras que, en irradiancias de 300 y 750 μmol quanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, el consumo total de nitrato fue 1721.9 μM (97.9%) para ambas condiciones de luz, en tanto que, el consumo total de fosfato fue 71.5-69 μM (98.4-95.4%).

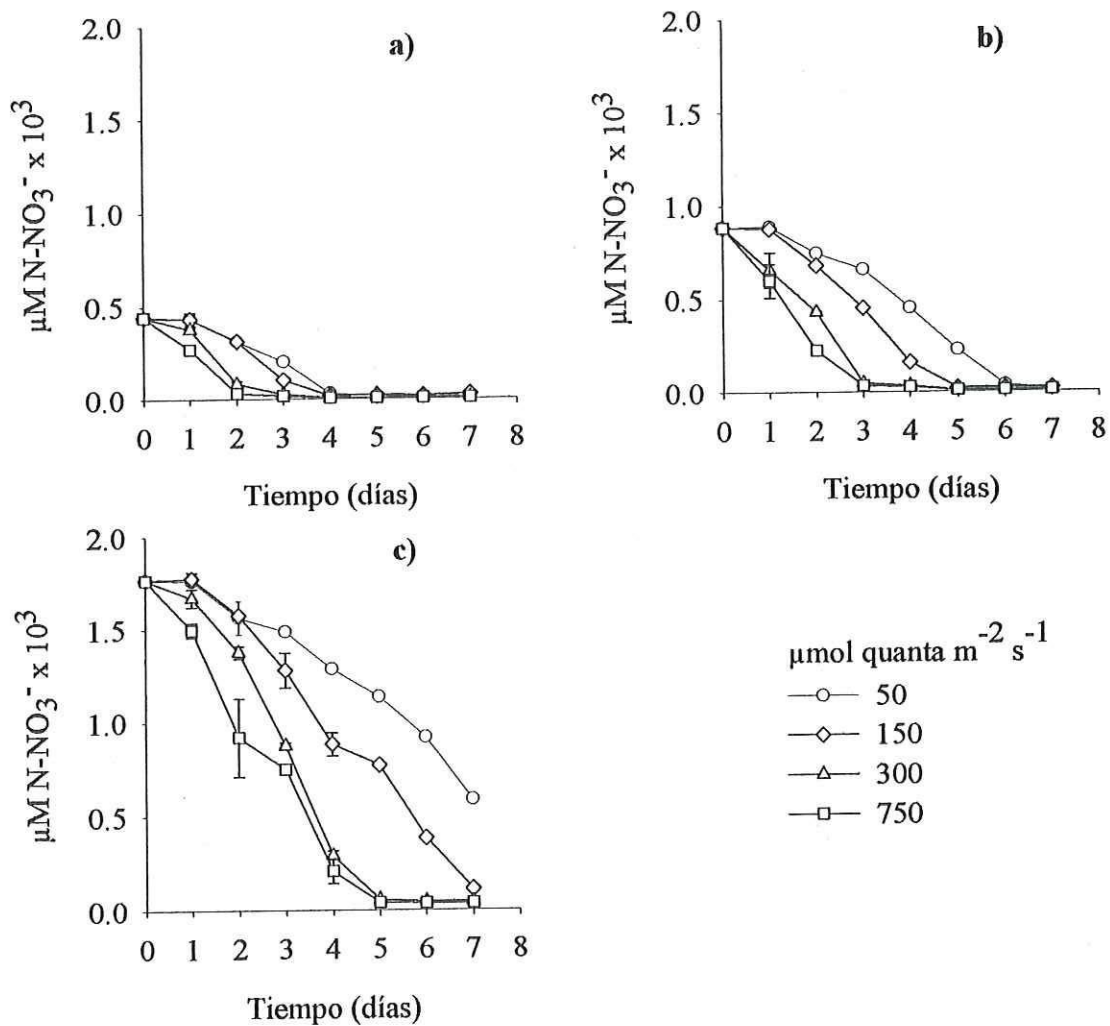


Figura 21. Cambios en concentración de nitrato en cultivos estáticos de *Tetranelmis suecica* en diferentes irradiancias y tres concentraciones de nutrientes: a) 441.5/18.1; b) 883/36.3; c) 1766/72.6 μM de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$. La barra vertical indica el error estándar ($n=2$).

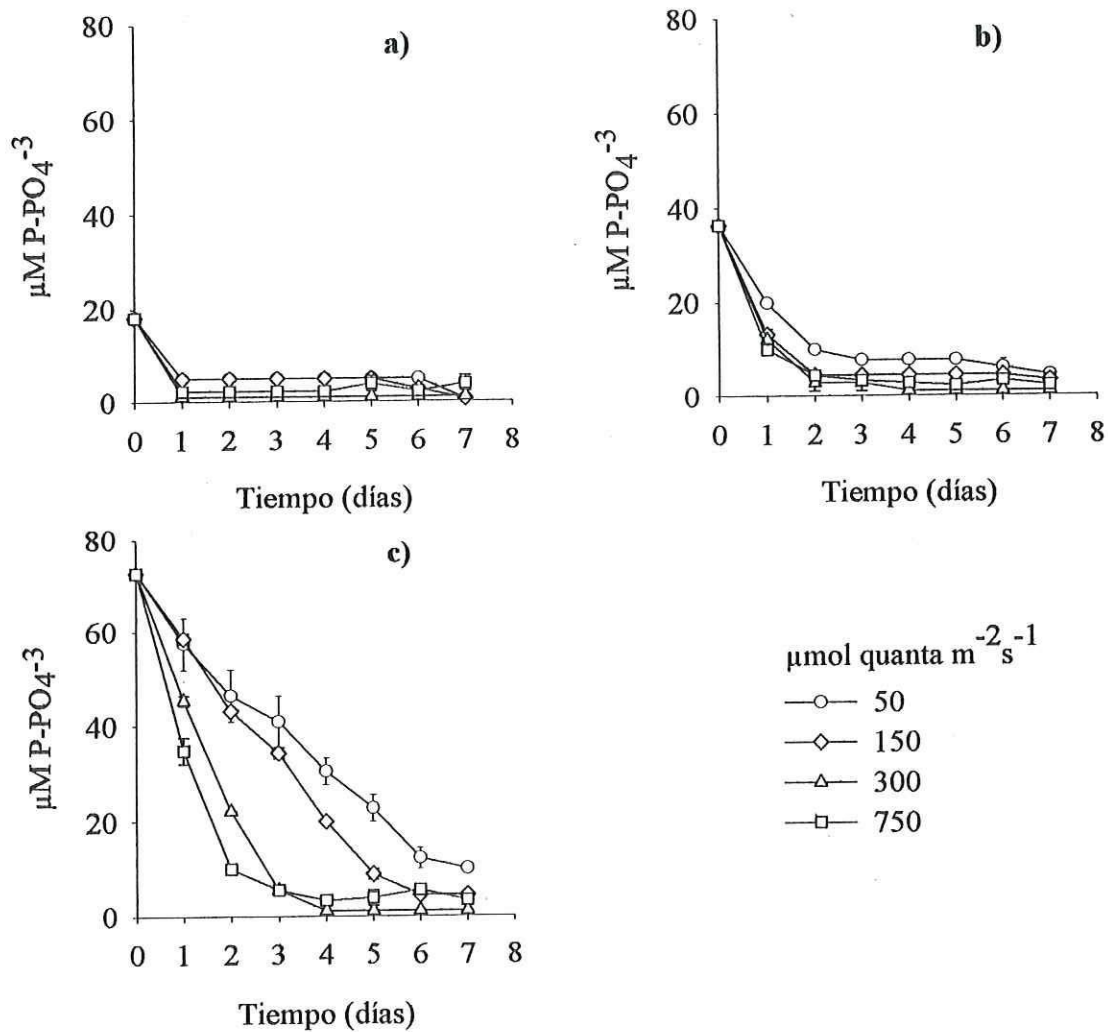


Figura 22. Cambios en concentración de fosfato en cultivos estáticos de *Tetraselmis suecica* en diferentes irradiancias y tres concentraciones de nutrientes: a) 441.5/18.1; b) 883/36.3; c) 1766/72.6 $\mu\text{M NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$. La barra vertical indica el error estándar (n=2).

7.1.3.- Composición proximal celular

7.1.3.1.- Proteínas

Tanto la concentración de nutrientes como la intensidad de luz tuvieron un efecto significativo ($P < 0.001$) en el contenido promedio de proteínas de *T. suecica*, con una interacción significativa entre los factores ($P < 0.001$).

Células creciendo en la condición baja de nutrientes tuvieron mayor concentración de proteínas al inicio del cultivo que aquellas cultivadas en la condición media y alta de nutrientes (Fig. 23). La comparación por factor luz, dentro del nivel bajo de nutriente (Fig.23a) y día 1 de cultivo mostró que no existen diferencias significativas ($P = 0.51$) entre los valores promedio de proteína por célula. Durante los días subsecuentes del cultivo (fase exponencial), se encontró que el contenido de proteína en $50 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ es mayor y significativo ($P < 0.001$) respecto a las demás condiciones de luz evaluadas (Fig. 23a). Asimismo, la proteína celular disminuyó marcadamente con la edad del cultivo, de 609.4 ± 29.2 y $580.3 \pm 25.72 \text{ pg célula}^{-1}$ a valores de $269.13 \pm$ y $199.5 \pm 16.9 \text{ pg célula}^{-1}$ en irradiancias de 50 y $150 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mientras que, en irradiancias de 300 y $750 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ la proteína disminuyó de 599.6 ± 4.34 y $623.5 \pm 33.88 \text{ pg célula}^{-1}$ a valores de 122.8 ± 5.43 y $121.3 \pm 33.85 \text{ pg célula}^{-1}$ respectivamente. Para la fase de lento crecimiento (del cuarto día al séptimo día) los cultivos en irradiancias de 300 y $750 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ incrementaron ligeramente la proteína por célula, mientras que en cultivos creciendo en 50 y $150 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se observó lo contrario (Fig. 23a).

Al comparar la condición baja contra la condición de medio nutriente se encontró que no difieren entre si ($P < 0.001$), pero la comparación por factor luz dentro del nivel medio de nutriente (Fig.23b) y día 1 de cultivo, mostró que el valor promedio de proteína por

célula en *T. suecica* en el tratamiento de 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($558.4 \pm 24.76 \text{ pg célula}^{-1}$) es mayor y significativo ($P \leq 0.001$) respecto a los valores (443.1 ± 1.50 y $438.9 \pm 29.15 \text{ pg célula}^{-1}$) registrados en 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En el segundo día se observó la mayor disminución de proteína por célula en *T. suecica*, con valores promedio similares de 187.4 ± 17.41 y $188.7 \pm 1.20 \text{ pg célula}^{-1}$ en irradiancias de 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Estos valores fueron menores y significativos ($P < 0.001$) respecto a los registrados en 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (279.4 ± 10.39 y $239 \pm 5.61 \text{ pg célula}^{-1}$ respectivamente). Del tercer al séptimo día de cultivo, la proteína por célula continuó disminuyendo gradualmente en todos los tratamientos de luz (Fig. 23b), y diferencias no significativas ($P > 0.05$) fueron encontradas para esta etapa del cultivo. Los valores promedios de proteína por célula al final del experimento fueron 80.69 ± 4.68 y $72.3 \pm 0.82 \text{ pg célula}^{-1}$ en irradiancias de 50 y 150, mientras que, en 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ la concentración promedio fue de 96.7 ± 7.69 y $89.2 \pm 0.94 \text{ pg célula}^{-1}$ respectivamente.

Por otro lado, los resultados del contenido de proteína por célula entre la condición media y alta de nutrientes no difieren entre si ($P = 0.090$). Pero al comparar esta última contra la condición baja de nutrientes si hubo diferencias ($P < 0.001$).

La comparación por factor luz, dentro de la condición de alto nutriente en el día 1 de cultivo, no mostró diferencias ($P = 0.982$) en el contenido de proteína por célula (554.2 ± 42.35 y $543.4 \pm 12.69 \text{ pg célula}^{-1}$) entre 150 y 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Asimismo, entre 50 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (421.1 ± 16.92 y $368.6 \pm 26.79 \text{ pg célula}^{-1}$) tampoco hubo diferencias ($P = 0.280$). Pero, la concentración promedio de proteína obtenida en 150 y 300 difieren ($P < 0.001$) de los resultados obtenidos en 50 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 23c). Como en el tratamiento anterior, una tendencia similar en la disminución de

proteínas fue observada en el segundo día, que corresponde al crecimiento exponencial de *T. suecica*. Después de este tiempo, variaciones menores en el contenido promedio de proteínas fueron observadas con la edad del cultivo, con valores finales de 88 ± 2.31 y 73.3 ± 0.04 pg célula⁻¹ para irradiancias de 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y concentraciones promedio de 86.6 ± 1.10 y 83.7 ± 0.28 pg célula⁻¹ en 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sin diferencias significativas ($P=0.269$) entre los diferentes niveles de luz evaluados (Fig. 23c).

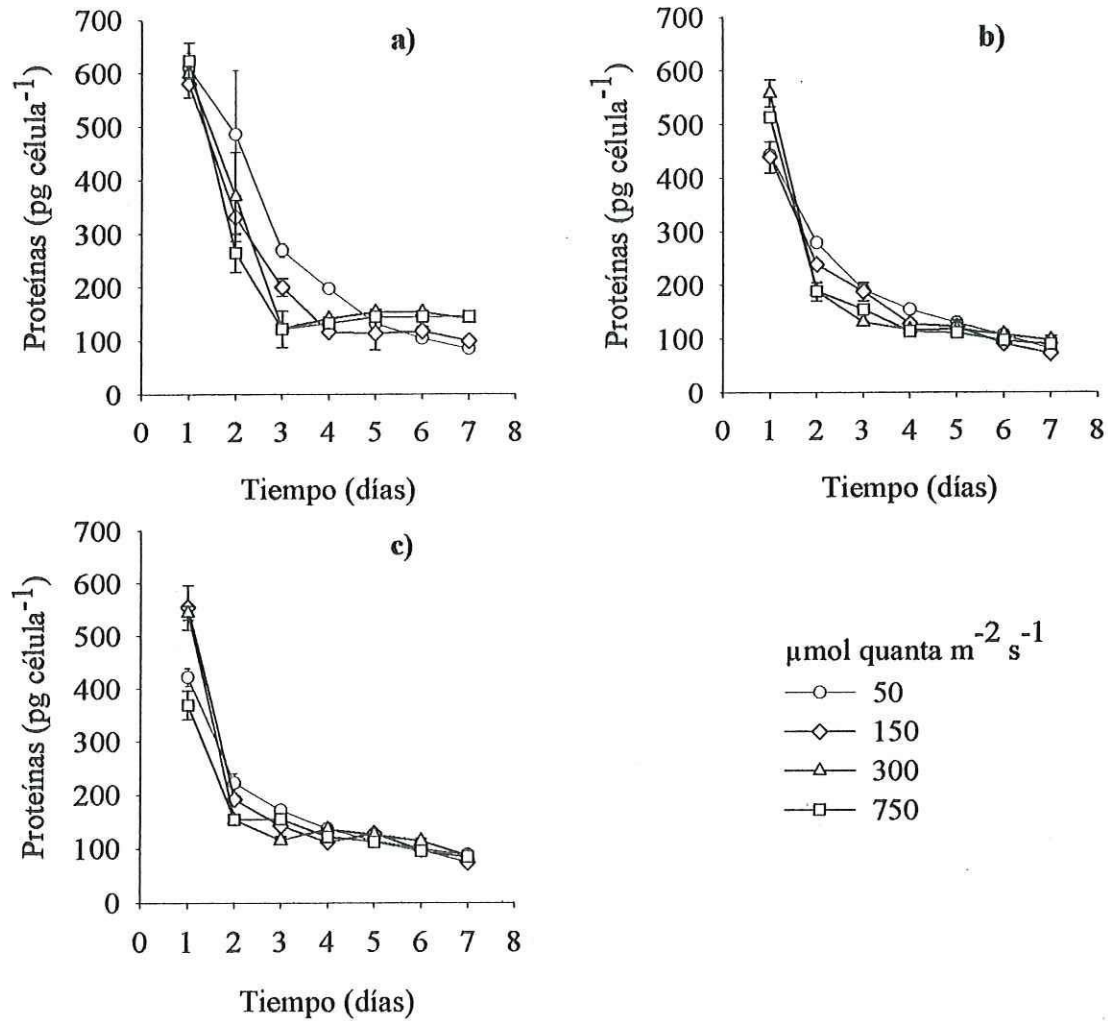


Figura 23. Contenido promedio de proteínas en *Tetraselmis suecica* cultivada en 2.9 L bajo diferentes irradiancias y tres combinaciones de NaNO₃/NaH₂PO₄: a) bajo nutriente 441.5/8.1; b) medio nutriente 883/36.3, y c) alto nutriente 1766/72.6 μM. La barra vertical indica el error estándar (n=2).

7.1.3.2.- Carbohidratos

El contenido de carbohidratos en *T. suecica* mostró principalmente tendencias opuestas a aquellas observadas en las proteínas. Esto se presentó en todas las condiciones de nutrientes y luz evaluadas, excepto en la condición alta de nutriente y bajas irradiancias (Fig. 24c).

La concentración de carbohidratos fue afectado significativamente tanto por la concentración de nutrientes ($P \leq 0.001$) como por la intensidad de luz ($P \leq 0.001$) y hubo una interacción significativa ($P < 0.001$) entre los dos factores. El contenido de carbohidratos en la condición baja de nutrientes e irradiancias de 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se incrementó de 6.4 ± 2.8 y 7.1 ± 0.38 a 20 ± 2.0 y 55.7 ± 0.80 pg célula^{-1} durante el crecimiento exponencial respectivamente, mientras que en irradiancias de 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ el incremento fue mayor y significativo ($P < 0.001$) respecto a las bajas irradiancias, con valores promedio iniciales de 6 ± 3 y 9 ± 2.6 pg célula^{-1} , los cuales se incrementaron rápidamente durante los primeros cuatro días del cultivo, a valores de 84.8 ± 10.7 y 91.9 ± 0.53 pg célula^{-1} (Fig. 24a). Posterior a la fase exponencial, el contenido de carbohidratos en las condiciones de 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ disminuyó (día 5-7) a valores similares (67.9 ± 6.3 y 67.5 ± 6.6 pg célula^{-1} , respectivamente). Por el contrario, en las células creciendo en 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, el contenido de este constituyente celular continuó aumentando durante la fase de lento crecimiento, hasta valores finales de 93.5 ± 0.01 y 101.3 ± 0.65 pg célula^{-1} (Fig. 24a).

La comparación por factor nutriente, mostró que el contenido promedio de carbohidratos en *T. suecica* entre la condición de bajo y medio nutriente fue significativa ($P < 0.001$). Al comparar el contenido de carbohidratos en los diferentes niveles de luz, *T.*

suecica tuvo la menor cantidad de este constituyente en irradiancias de 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con valores iniciales de 14.5 ± 5.0 y 14.4 ± 0.40 pg célula^{-1} , los cuales tuvieron poca variación en los primeros días, presentando resultados similares (21.9 ± 3.5 y 21 ± 1.7 pg célula^{-1}) al final del crecimiento exponencial (4 día; Fig. 24b), mientras que, los cultivos en irradiancias de 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fueron mayores y significativos ($P < 0.001$), con valores iniciales de 26.6 ± 1.20 y 23.7 ± 0.09 pg célula^{-1} , incrementándose con el tiempo del cultivo a concentraciones promedio de 65.8 ± 1.1 y 62.4 ± 3.2 pg célula^{-1} durante la fase exponencial (Fig. 24b). En la fase de crecimiento lento, el contenido de carbohidratos por célula en 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se incrementó a 42.7 ± 1.2 y 74.4 ± 0.6 pg célula^{-1} con diferencias significativas ($P < 0.001$) entre estos niveles de luz. En las condiciones de alta irradiancia (300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$), *T. suecica* tuvo valores similares (94.1 ± 4.6 y 95.4 ± 1.2 pg célula^{-1}) al final del periodo de cultivo, siendo estos significativos ($P < 0.001$) respecto aquellos de baja irradiancia en la fase de lento crecimiento (Fig. 24b).

Al comparar el contenido de carbohidratos de *T. suecica* entre la condición alta versus media y alta versus bajo nutriente se encontró una notable diferencia ($P < 0.001$). Asimismo, a diferencia de los resultados arriba mencionados, en la condición de alto nutriente el contenido de carbohidratos de *T. suecica* en 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no mostró diferencias significativas ($P > 0.05$) y presentó poca variación con el tiempo de cultivo. En cambio, en 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ la concentración de carbohidratos por célula se incrementó después del cuarto día, lo cual coincide con la fase de lento crecimiento (Fig. 24c).

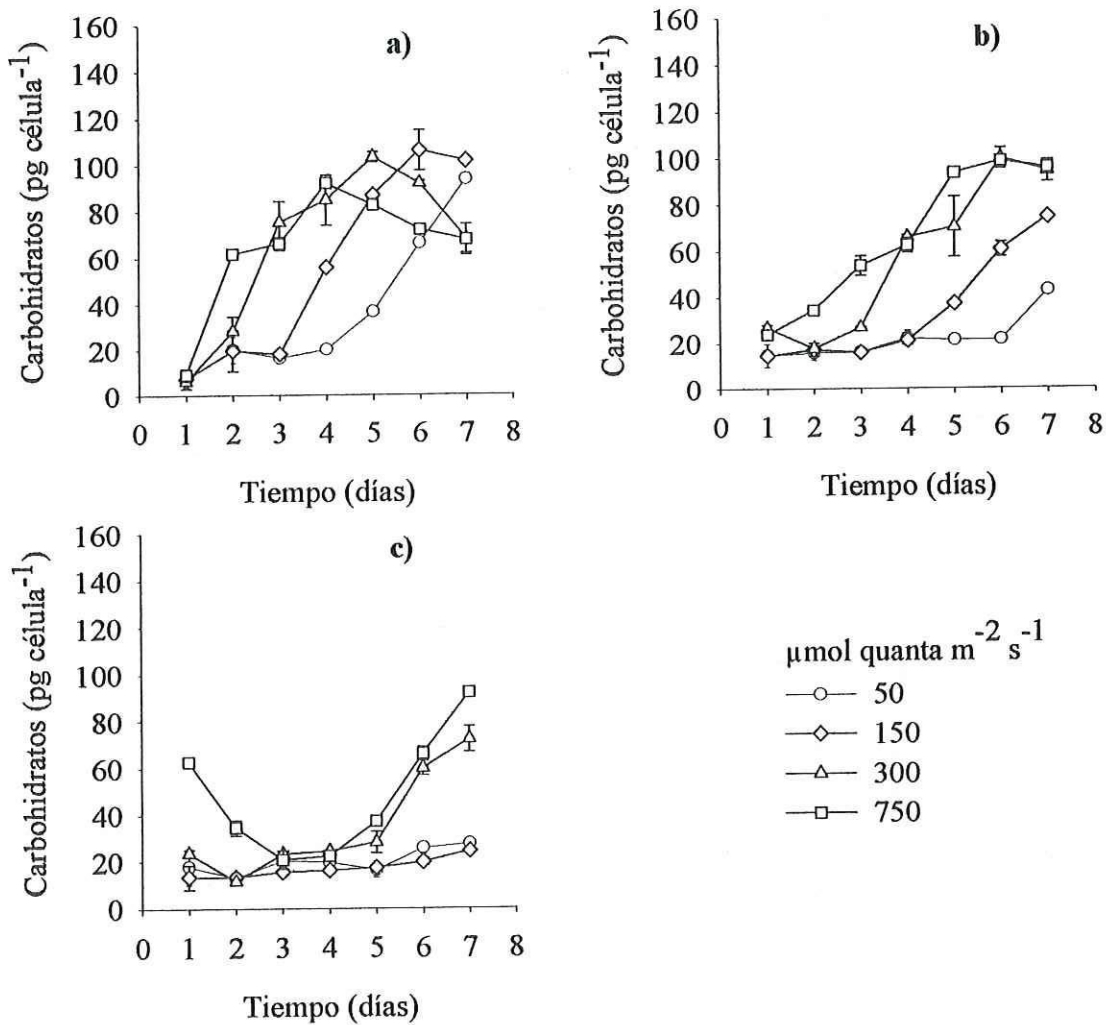


Figura 24. Contenido promedio de carbohidratos en *Tetraselmis suecica* cultivada en 2.9 L bajo diferentes irradiancias y tres combinaciones de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$: a) bajo nutriente 441.5/8.1; b) medio nutriente 883/36.3, y c) alto nutriente 1766/72.6 μM . La barra vertical indica el error estándar (n=2).

7.1.3.3.- Lípidos

El contenido de lípidos en *T. suecica* mostró una tendencia a disminuir marcadamente en los primeros tres días del cultivo y particularmente en la condición de luz de 50 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se registró la mayor cantidad de esta biomolécula por célula (Fig. 25), con diferencias significativas ($P < 0.001$) respecto a los valores promedios observados en los diferentes niveles de luz evaluados dentro de cada condición de nutrientes.

Al comparar el nivel de lípidos en el primer día de cultivo (Fig. 25a) de *T. suecica* en la condición de bajo nutriente, se encontraron diferencias significativas ($P < 0.001$) entre las distintas irradiancias, excepto entre 150 y 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($P = 1.0$). En intensidades de luz de 50 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ la concentración promedio de lípidos por célula fue 216.5 ± 42.5 y 144.1 ± 21.1 pg cél^{-1} , las cuales son mayores que las observadas en 150 y 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, teniendo estas últimas valores similares (88.1 ± 15.6 y 88.7 ± 27.5 pg cél^{-1}). Después del primer día, el nivel de lípidos en 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ disminuyó a 63.3 ± 7.2 y 30.5 ± 2.0 pg cél^{-1} para el cuarto día, mientras que en 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se obtuvieron valores medios de 26.8 ± 3.0 y 36.9 ± 1.3 pg cél^{-1} . Estos resultados reflejan que las células estuvieron creciendo exponencialmente, aunque su nivel de lípidos estuvo siendo modificado tanto por la intensidad de luz como por la edad del cultivo. Al final, el contenido de lípidos en células cultivadas en 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se incrementó a 64 ± 20.8 pg cél^{-1} , mientras que los valores promedio entre las irradiancias de 50, 150 y 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 25a) fueron similares y no significativos ($P = 0.48$).

En la condición media de nutrientes (Fig. 24b) el contenido inicial de lípidos de *T. suecica* fue menor que los registrados en la condición baja de nutrientes. La comparación

por factor luz dentro de esta condición de nutrientes y primer día de cultivo mostró solo diferencias significativas ($P < 0.001$) entre las irradiancias 50 versus 150 y 50 versus 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con valores promedios iniciales de 172.9 ± 43.2 y 90.2 ± 4.4 $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$ en irradiancias de 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los cultivos expuestos a irradiancias de 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no mostraron diferencias significativas ($P = 0.539$), registrando concentraciones medias de 130.7 ± 2.7 y 108.1 ± 7.5 $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$. Durante el crecimiento exponencial el contenido de lípidos en *T. suecica* disminuyó a 46.8 ± 3.9 y 36.8 ± 0.19 $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$ en irradiancias de 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, en tanto que en irradiancias de 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ las concentraciones de estas macromoléculas se mantuvieron en 27.2 ± 0.76 y 32.5 ± 1.0 $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$ para el cuarto día del cultivo. A partir de este tiempo, el contenido de lípidos en las células cultivadas en las distintas intensidades de luz, presentó poca variación, registrando valores finales entre 22.8 ± 2.7 y 32 ± 3.7 $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$, sin diferencias significativas ($P = 0.482$) entre los diferentes niveles de luz (Fig. 25b).

En comparación con los resultados antes mencionados, *T. suecica* registró la menor concentración inicial de lípidos en la condición alta de nutrientes (Fig. 25c), denotándose diferencias significativas ($P < 0.05$) en el primer día entre 50 versus 300 y 50 versus 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los valores medios obtenidos en 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (134 ± 14.9 y 108.4 ± 19.6 $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$) fueron mayores a los registrados en irradiancias de 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (72.8 ± 5.6 y 80.6 ± 16.4 $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$ respectivamente). En los días posteriores los niveles de lípidos mostraron una tendencia disminuir a mediada que el cultivo se desarrollaba. En el cuarto día que corresponde a la fase final del crecimiento exponencial, la concentración de lípidos por célula disminuyó el 29 y 21 por ciento con respecto al primer día en irradiancias de 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (39.1 ± 1.3 y

23.6 ± 3.2 pg cél⁻¹), mientras que para las condiciones de 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la reducción en el nivel de lípidos por célula fue 49.5 y 41.6 por ciento (36.1 ± 2.8 y 33.6 ± 3.1 pg cél⁻¹). Del cuarto al séptimo día de cultivo la variación en el contenido de lípidos de *T. suecica* en los distintos niveles de luz se mantuvo con poca fluctuación (entre 21.3 ± 5.3 y 37.7 ± 1.3 pg cél⁻¹), observándose al final un incremento de 52 ± 7.2 pg cél⁻¹ en 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mientras que en el resto de las condiciones de luz evaluadas, la concentración de lípidos por célula fue similar (27.8 ± 0.67 , 32.4 ± 1.8 y 28.7 ± 1.7 pg cél⁻¹; Fig. 25c).

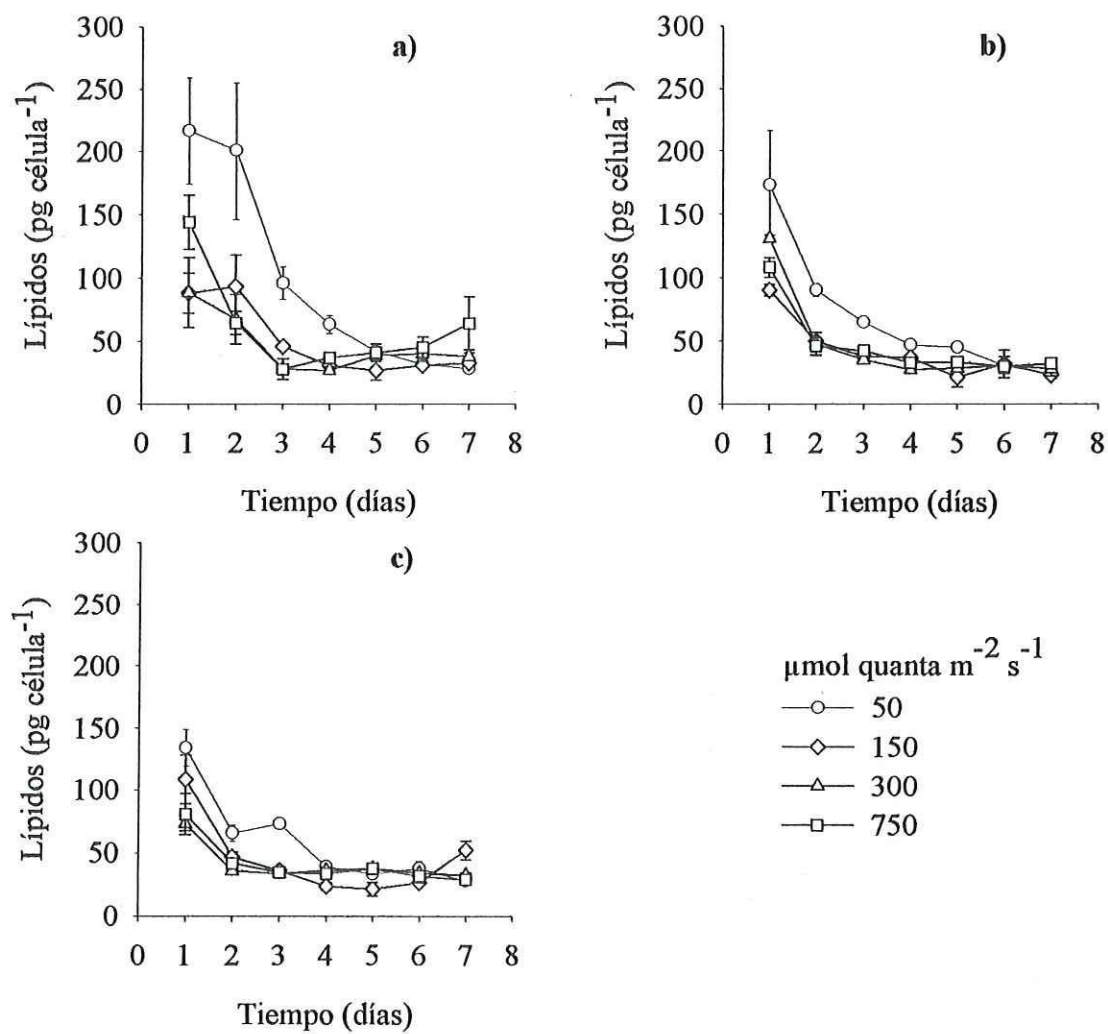


Figura 25. Contenido promedio de lípidos en *Tetraselmis suecica* cultivada en 2.9 L bajo diferentes irradiancias y tres combinaciones de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$: a) bajo nutriente 441.5/8.1; b) medio nutriente 883/36.3, y c) alto nutriente 1766/72.6 μM . La barra vertical indica el error estándar ($n=2$).

7.1.4.- Pigmentos

Los pigmentos identificados y medidos en *Tetraselmis suecica* fueron clorofila *a*, clorofila *b* la cual es un pigmento accesorio fotosintético y otro grupo de pigmentos no fotosintéticos cuya función principal es proteger el centro de reacción fotosintético contra la influencia destructiva de radiación dañina. En este último grupo se incluyen neoxantina, violaxantina, luteína y α + β -caroteno.

Al analizar los resultados de las diferentes razones de pigmentos accesorios respecto a la clorofila *a* se encontró que tanto la concentración de nutrientes como la intensidad de luz tuvieron un efecto significativo ($P \leq 0.001$) en la proporción de pigmentos de *T. suecica*. Sin embargo, al evaluar el efecto interactivo entre nutriente y luz en las distintas razones de pigmentos, se encontraron solo diferencias significativas para las siguientes razones: violaxantina/clorofila *a* ($P=0.002$), α + β -caroteno/clorofila *a* ($P=0.013$) y clorofila *b*/clorofila *a* ($P \leq 0.001$).

Cuando *T. suecica* se cultivo en bajo nutriente, la concentración promedio de los pigmentos accesorios respecto a la clorofila *a* mostraron cambios cuantitativos en su composición de pigmentos, relacionados principalmente a la intensidad de luz. Estos cambios en la razón promedio de pigmentos accesorios/clorofila *a* son presentados en la figura 26. En esta condición de nutrientes, la razón promedio de clorofila *b*/clorofila *a* fue casi siempre mayor en intensidades de luz de 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con valores mínimos de 0.51 y máximos de 0.59. En intensidades de 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ la razón promedio de clorofila *b*/clorofila *a* siempre fue menor, con valores mínimos de 0.43 y máximos de 0.50 (Fig. 26a). También se observó que esta razón promedio de pigmentos, presentó poca variación con respecto al tiempo de cultivo en las distintas irradiancias, sin

embargo diferencias significativas ($P < 0.001$) resultaron de la comparación entre irradiancias de 150 contra 300 y 750 en los primeros 4 días de cultivo, en tanto que en los últimos tres días, la razón promedio de clorofila *b*/clorofila *a* en irradiancia de 50 resultó significativa respecto a 150, 300 y 750 (Fig. 26a).

En el caso de las razones promedio de luteína y $\alpha + \beta$ caroteno/clorofila *a* mostraron diferencias significativas ($P < 0.001$) entre las cuatro irradiancias, excepto que la razón promedio de $\alpha + \beta$ caroteno/clorofila *a* entre 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no fue significativa ($P = 0.794$) en los primeros cinco días. Asimismo, se observó un incremento en las razones luteína y $\alpha + \beta$ caroteno/clorofila *a* de bajas a altas irradiancias (Fig. 26b, e). El contenido celular de luteína y $\alpha + \beta$ caroteno en *T. suecica* fue relativamente bajo, así que, las razones de luteína/clorofila *a* en bajas irradiancias (50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) variaron entre 0.0693 ± 0.001 y 0.1529 ± 0.005 , en tanto que las razones $\alpha + \beta$ caroteno/clorofila *a* variaron entre 0.0581 ± 0.001 y 0.0934 ± 0.0006 . En cambio en altas irradiancias (300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$), la proporción de luteína/clorofila *a* varió entre 0.1117 ± 0.0001 y 0.2048 ± 0.0018 , mientras que, la razón $\alpha + \beta$ caroteno/clorofila *a* varió entre 0.0691 ± 0.0015 y 0.2260 ± 0.00086 . Cabe señalar que la mayor proporción de estos pigmentos se encontró en irradiancias de 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 26b, e).

La razón promedio del pigmento neoxantina/clorofila *a* no presentó diferencias en altas irradiancias (razones entre 0.05 y 0.06), mientras que en bajas irradiancias las razones se incrementa hasta 0.10 con la edad del cultivo. Sin embargo, la proporción de neoxantina/clorofila *a* en *T. suecica* fue mayor en bajas irradiancia (Fig. 26c). La razón de violaxantina/clorofila *a* disminuyen con el tiempo de cultivo en altas irradiancias, mientras que en bajas irradiancias permanecen con poca variación (razones entre 0.0568 ± 0.0001 y

0.07550±0.0003) sin diferencias significativas ($P=0.917$) entre estas irradiancias durante el cultivo.

La feofitina a es un producto de degradación de la clorofila a que resulta del envejecimiento de las células en el cultivo. Las razones promedio de feofitina a /clorofila a variaron en función de la irradiancia, encontrándose que para todas las irradiancias evaluadas, la proporción de este pigmento respecto a la clorofila a varió entre el 0.27% y 0.69%. Los resultados también mostraron que el porcentaje de la razón feofitina a /clorofila a se incrementa con una disminución en la irradiancia (Fig. 26f).

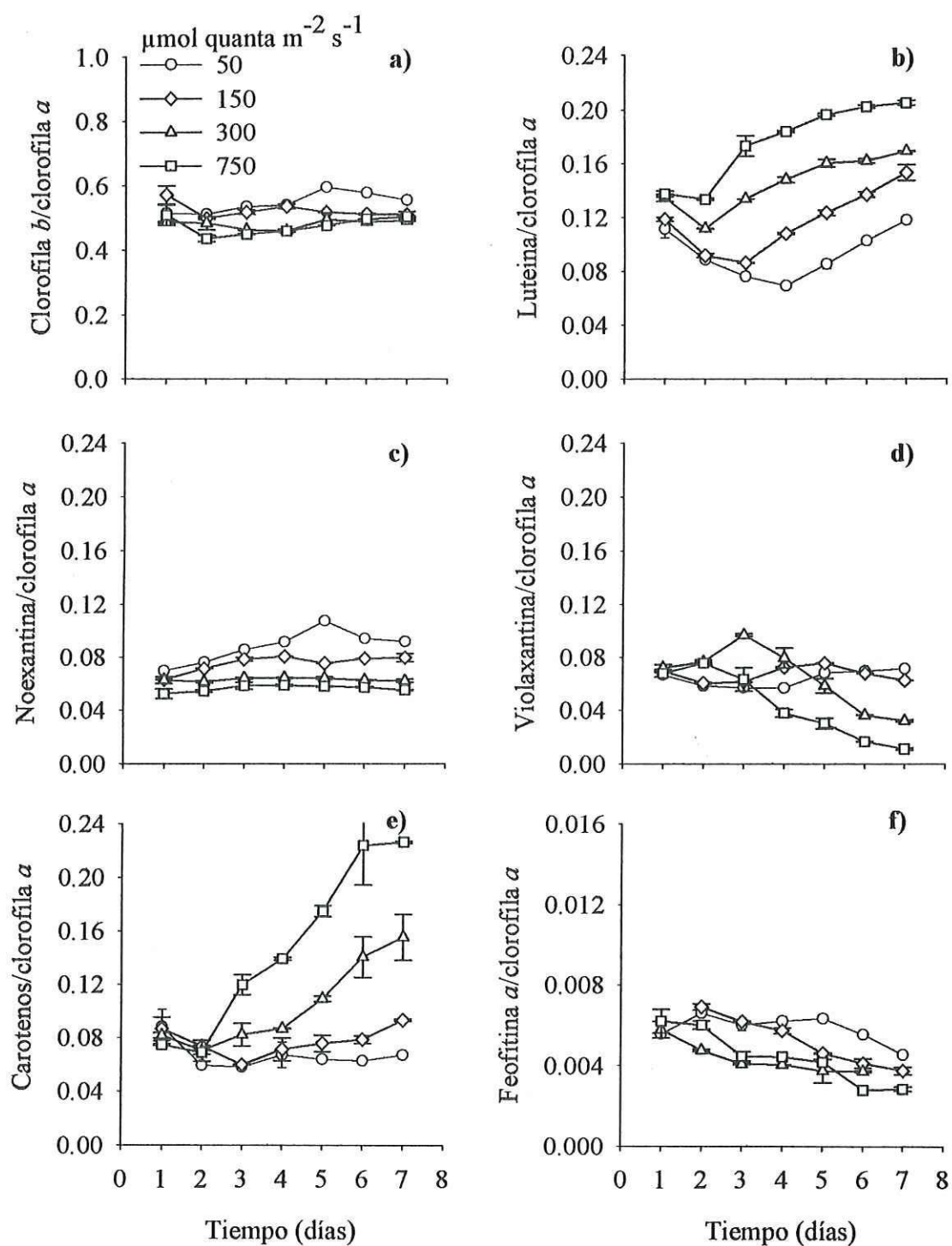


Figura 26. Razón promedio de pigmentos accesorios/clorofila *a* de *Tetraselmis suecica*, en cultivos estáticos en diferentes irradiancias y 441.5/18.1 μM de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$. La barra vertical indica el error estándar (n=2).

Cuando *T. suecica* se cultivo en la condición de medio de nutriente, la razón promedio de clorofila *b*/clorofila *a* (Fig. 27a) fue muy similar a aquella obtenida en bajo nutriente. Aquí la razón clorofila *b*/clorofila *a* también fue mayor en irradiancias de 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, con valores mínimos de 0.5096 ± 0.006 y máximos de 0.6173 ± 0.028 . En cambio la razón promedio de clorofila *b*/clorofila *a* en microalgas creciendo en altas irradiancias registraron valores mínimos de 0.4644 ± 0.0006 y máximos de 0.5306 ± 0.0121 , con diferencias significativas ($P < 0.001$) entre bajas y altas irradiancias.

El efecto más pronunciado de la irradiancia puede ser visto en las razones promedio de luteína y $\alpha + \beta$ caroteno/clorofila *a* en *T. suecica*. Dichas razones aumentaron con un incremento en la intensidad de luz (Fig. 27b, e). En irradiancias de 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ las razones de estos constituyentes celulares son mayores que aquellos encontrados en irradiancias de 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. El procedimiento de comparación múltiple mostró que las razones promedio de luteína/clorofila *a* entre irradiancias difieren ($P < 0.001$). En cambio al comparar las razones de $\alpha + \beta$ caroteno/clorofila *a* entre 750 contra 50, 150 y 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ resultaron significativas. En el caso de las proporciones de neoxantina/clorofila *a* sus valores promedio fueron mayores en bajas irradiancias (50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; Fig. 27c) y difieren ($P < 0.001$) de las razones promedio obtenidas en irradiancias de 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Las razones promedio de violaxantina y feofitina/clorofila *a* fueron más consistentes con el tiempo de cultivo y el efecto de la irradiancia es poco evidente. La razón violaxantina /clorofila *a* solo mostró diferencias significativas ($P < 0.001$) entre irradiancias de 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Fig. 27d). En cuanto a los fopigmentos, las razones promedio de

feofitina/clorofila a en todas las condiciones de luz varió entre el 0.38% (0.0038 ± 0.0001) y 0.95% (0.0095 ± 0.003) (Fig. 27 f).

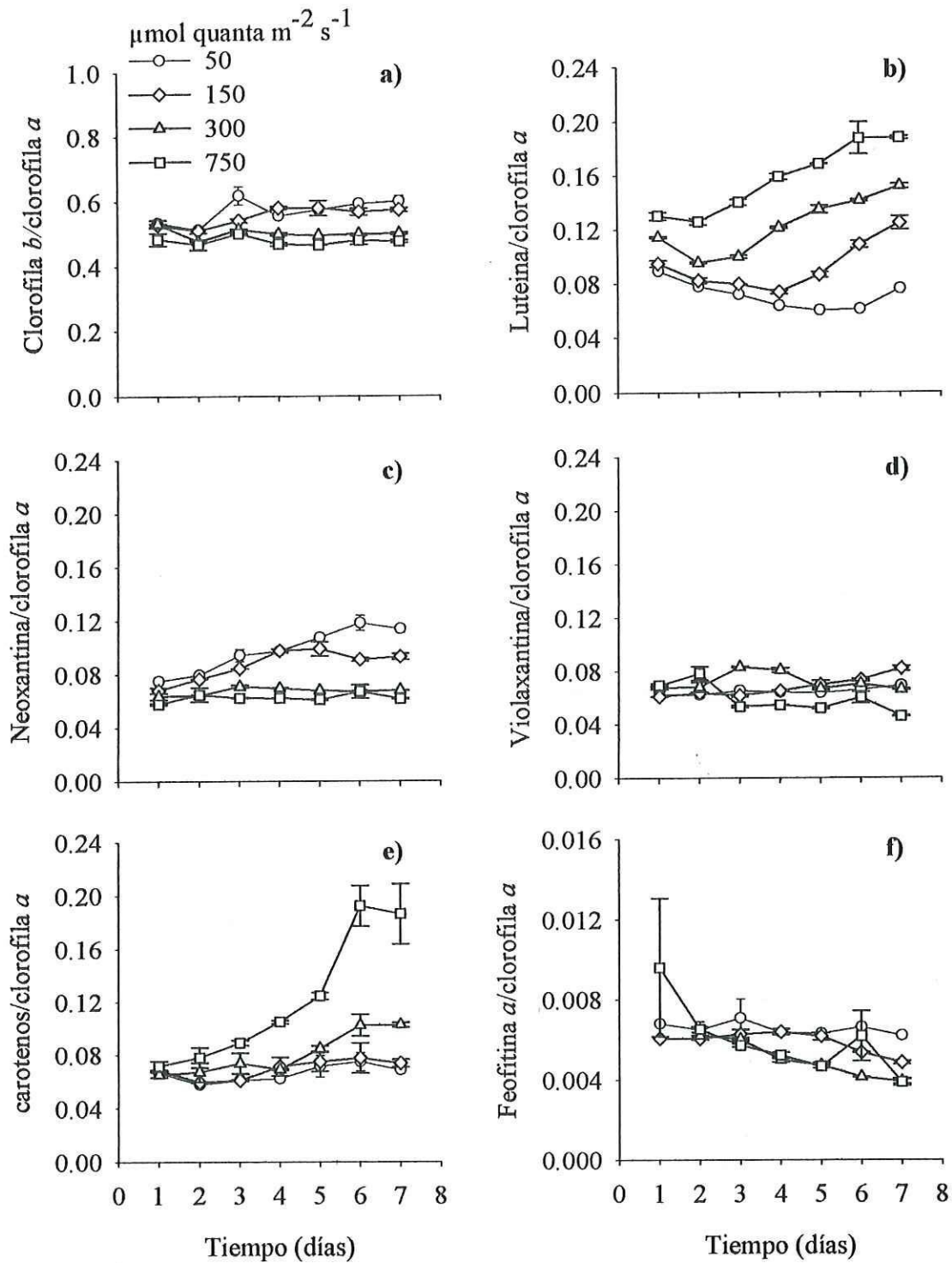


Figura 27. Razón promedio de pigmentos accesorios/clorofila *a* de *Tetraselmis suecica*, en cultivos estáticos en diferentes irradiancias y 883/36.3 μM de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$. La barra vertical indica el error estándar (n=2).

En la condición de alto nutriente, la proporción promedio de clorofila *b*/clorofila *a* de *T. suecica* permaneció relativamente constante en las cuatro diferentes tratamientos de luz (Fig. 28a). Sin embargo, esta proporción promedio casi siempre fue mayor en bajas intensidades de luz (50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) que en altas intensidades de luz (300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Los valores de la razón promedio de clorofila *b*/clorofila *a* para las condiciones de 50 y 150 variaron entre 0.5234 ± 0.008 y 0.7526 ± 0.057 , mientras que, para las condiciones de 300 y 750 fueron menores, resultando razones mínimas de 0.4572 ± 0.006 y máximas de 0.5577 ± 0.026 . No hubo diferencias significativas ($P=1.000$) al comparar los valores promedios de las razones entre 50 y 150, así como también entre 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Las razones luteína/clorofila *a* fueron generalmente afectadas por la intensidad de luz (Fig. 28b), aunque disminuyen con el tiempo de cultivo, sus valores promedio en 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fueron bastante similares y variaron entre 0.0571 ± 0.00006 y 0.0928 ± 0.002 sin diferencias significativas ($P=0.311$). En cambio las razones promedio de luteína/clorofila *a* en 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ varían entre 0.0860 ± 0.0007 y 0.1376 ± 0.0016 con diferencias significativas ($P < 0.001$) entre estas condiciones de luz. Además, estas razones son mayores y significativas ($P < 0.001$) respecto aquellas encontradas en bajas irradiancias.

Las razones promedio de neoxantina/clorofila *a* en 50 y 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ tienden a incrementarse con el tiempo de cultivo y los valores varían notablemente de 0.0696 ± 0.005 a 0.1382 ± 0.008 (Fig. 28c), sin diferencias significativas ($P=0.671$) entre estas condiciones de luz. Mientras que, en irradiancias de 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ los valores de las razones de estos constituyentes celulares permanecen con poca variación

(0.0613 ± 0.0004 y 0.0808 ± 0.001) con respecto al tiempo de cultivo, sin diferencias ($P=0.078$). Las razones promedio violaxantina/clorofila α no fueron significativamente afectadas ($P>0.05$) por la intensidad de luz y permanecen con poca variación con respecto al tiempo de cultivo (Fig. 28d). Asimismo, los valores promedio en las razones $\alpha+\beta$ caroteno/clorofila α son similares (entre 0.0631 ± 0.0005 y 0.0867 ± 0.008 ; Fig. 28e) y no significativos ($P>0.05$) entre irradiancias de 50, 150 y 300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mientras que en 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ los valores de estas razones de pigmentos se incrementan de 0.0755 ± 0.006 a 0.1214 ± 0.013 . La razón de feofitina/clorofila α en las diferentes condiciones de luz varió de 0.53% (0.0053 ± 0.0001) a 0.81% (0.0081 ± 0.0004) (Fig. 28f).

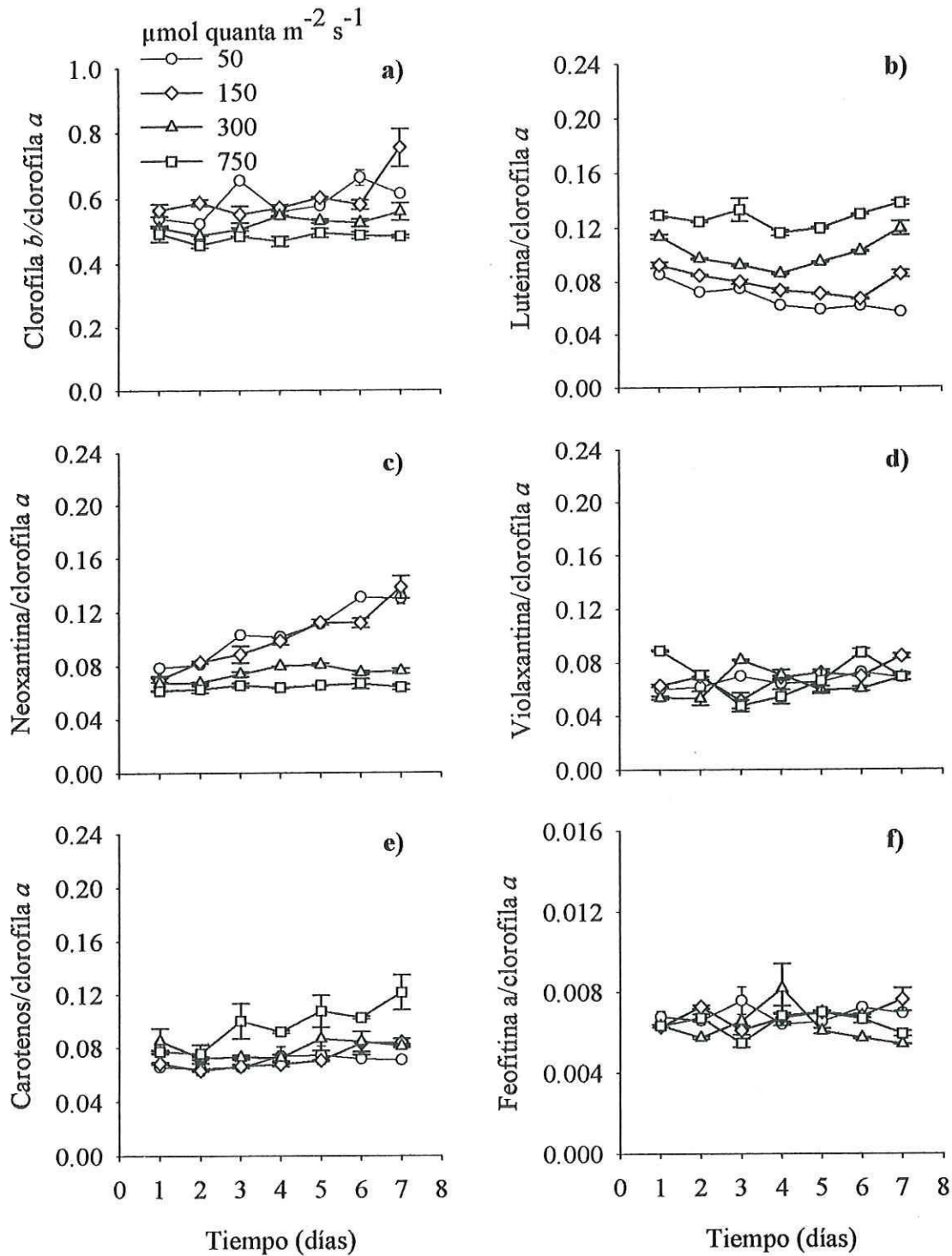


Figura 28. Razón promedio de pigmentos accesorios/clorofila *a* de *Tetraselmis suecica*, en cultivos estáticos en diferentes irradiancias y 1766/72.6 μM de $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$. La barra vertical indica el error estándar (n=2).

7.1.5.- Discusión

7.1.5.1.- Cultivo de *Tetraselmis suecica*

El efecto de la intensidad de luz y concentración de nutrientes en la densidad celular de *T. suecica* se muestra en la Fig.20. Se observa que conforme se incrementa la concentración de nutrientes y la intensidad de luz, la densidad celular también incrementa, por tanto la interrelación entre la luz y nutrientes es claramente demostrada para esta especie en las condiciones de cultivo especificadas en este estudio. Cultivos en baja concentración de nutrientes resultaron en menor producción de biomasa, porque estuvieron limitados en nutrientes para su crecimiento en menor tiempo (Fig. 20a), que aquellos cultivos que fueron expuestos a mayor concentración de nutrientes (Fig. 20b, c). Sin embargo, al examinar la tasa específica de crecimiento en las distintas condiciones de luz, se encontraron mayores tasas de crecimiento asociadas con baja concentración de nutrientes. Esta respuesta fisiológica es común en células que tienen una alta afinidad por nutrientes, lo cual sugiere que *T. suecica* tuvo altas tasas de crecimiento cuando el factor limitante primario en estas condiciones de cultivo es el nutriente. Es importante señalar que esta especie se aclimató a las distintas concentraciones de nutrientes antes de su uso, lo cual permitió conocer de mejor manera su respuesta en distintas condiciones de luz y nutrientes. En consecuencia, de la misma manera que *T. suecica* se aclimató a limitación de nutrientes, el aparato fotosintético también se aclimata a cambios en la irradiancia. Asimismo, es importante cuantificar la tasa de crecimiento de especies individuales en diferentes condiciones de luz y nutrientes, porque estos factores modifican la tasa de crecimiento y permiten entender los cambios cuantitativos en comunidades del fitoplancton marino (Clark, 2001). Otros estudios (Voltolina *et al.*, 1998) también señalan

la importancia de tomar en cuenta el historial nutricional de cada alga para su evaluación en medios alternativos lo que permite incrementar su producción de biomasa.

Por otra parte, la similitud en el número total de células en cultivos creciendo en $50 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y distintas concentraciones de nitrógeno y fósforo, indican limitación por luz para el crecimiento celular de *T. suecica*. Indirectamente, esta limitación por luz representa un inadecuado suministro de carbón inorgánico para la fotosíntesis, lo cual produjo baja biomasa comparado con aquellos cultivos que fueron expuestos a altas irradiancias. Estos hallazgos sugieren que alta intensidad de luz es importante porque determina mayor producción celular en cultivos masivos en acuicultura. Es difícil comparar los resultados de este estudio con aquellos de la literatura, con respecto al efecto interactivo entre diferentes intensidades de luz y nutrientes, porque la densidad celular de *T. suecica* varió en diferentes condiciones de cultivo. Por ejemplo el crecimiento puede ser controlado ya sea por cantidad de luz suministrada durante el día, la condición de nutrientes o el fotoperíodo. Estudios hechos por Lourenco *et al.* (1998) cuantifican densidades celulares durante 9 días para *Tetraselmis gracilis* de aproximadamente $7.19 \times 10^5 \text{ cél mL}^{-1}$ en $300 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fotoperíodo 12:12 h luz-oscuridad en medio Conway. Qin *et al.* (1999) reportan densidades de $1.75 \times 10^6 \text{ cél mL}^{-1}$ para *T. suecica* en medio f/2 e irradiancias de $315\text{-}375 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, mientras que, estudios hechos por Renaud *et al.* (1999) reporta valores entre $1.78\text{-}1.85 \times 10^6 \text{ cél mL}^{-1}$ para *Tetraselmis* sp en medio f/2 y $80 \pm 2 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Otros estudios, evalúan el crecimiento autotrófico de *T. suecica* en medio f/2, $140 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y fotoperíodo 12:12 h luz-oscuridad, obteniendo $31.12 \times 10^5 \text{ cél mL}^{-1}$ en una semana (Qtae Jo, *et al.*, 2004). Meseck *et al.* (2005) también observaron que tanto la intensidad de luz como el

fotoperíodo tienen un efecto significativo en la densidad celular de *Tetraselmis chui*. Sus resultados indican que en intensidad de luz $220 \mu\text{Einst. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y fotoperíodo continuo (24:0 h luz-oscuridad) se obtienen máximas densidades celulares de $2.833 \pm 0.141 \times 10^6$ cél mL^{-1} . Algunos resultados del presente estudio concuerdan con aquellos de la literatura antes mencionados, sobre todo los cultivos que se llevaron a cabo en irradiancias entre 150 y $300 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y medio $f/2$, el cual es el equivalente a la condición media de nutrientes usada en este trabajo. Por otra parte, si se toman en cuenta otros factores como el fotoperíodo, su duración y altas intensidades de luz, se obtienen mayores densidades celulares (Meseck *et al.*, 2005). Si bien, estos antecedentes sugieren que otras variables modifican la densidad celular de *T. suecica*. Los resultados de este estudio indican que, incrementos en la intensidad de luz y concentración de nutrientes, también producen mayor densidad celular de *T. suecica*.

7.1.5.2.- Consumo de nutrientes (NO_3^- , PO_4^{3-})

El consumo de nitrato y fosfato por el fitoplancton en cultivo es derivado del proceso fotosintético y la actividad fotosintética puede ser modificada por diferentes intensidades de luz. En las condiciones de cultivo evaluadas, la eficiencia en la utilización de la energía que proviene de la luz, fue uno de los factores que modificó la densidad celular en los cultivos (Fig. 20) y por tanto el consumo de nutrientes (Fig. 21, 22). El consumo de nitrato y fosfato por *T. suecica* estuvo estrechamente relacionado con la intensidad de luz, de tal forma que conforme se incrementó la intensidad de luz, la densidad celular también incrementó, originando mayor consumo de nitrato y fosfato. Así en bajas intensidades de luz (50 y $150 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) el consumo de nutrientes siempre fue menor que en

intensidades de luz de 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Estas diferencias en irradiancias pudieron haber conducido a fluctuaciones igualmente rápidas en energía celular, debido a que cultivos en bajas intensidades de luz mostraron siempre menor crecimiento celular que aquellos de altas intensidades de luz. En referencia a estos resultados, se ha documentado que especies pertenecientes a la clase cloroficea, como es caso de *T. suecica* tienden a tener mayor punto de compensación de luz que especies pertenecientes a otras clases. Además, las especies de la clase prasinophyceae pueden tolerar mayores irradiancias para el crecimiento en cultivo y desarrollarse en ambientes donde las condiciones de luz incidente son muy altas (Kirk, 1994). Estas observaciones concuerdan con los resultados aquí presentados, lo cual podría explicar el mayor consumo de nitrato por el alga en altas intensidad de luz.

Por otra parte, de los experimentos en bajo y medio nutriente en las condiciones de 300 y 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, se observó que durante los primeros tres días de cultivo, que corresponden a la fase exponencial de crecimiento de *T. suecica*, la concentración residual de nitrato y fosfato disminuyó a condiciones limitantes (Fig. 21a, b; 22a, b). Esto se debe a que cultivos en esta fase, demandan mayor consumo de nutrientes, debido al incremento en la duplicación celular. Cuando *T. suecica* se cultivo en condiciones altas de nutrientes, el consumo de nitrato y fosfato fue 4 y 2 veces mayor que en bajo y medio nutriente respectivamente. El consumo de nutrientes también estuvo fuertemente influenciado por altas intensidades de luz (Fig. 21c; 22c). Estos resultados son consistentes con las variaciones en la densidad celular, siendo esta mayor que aquellas observadas en bajo y medio nutriente. Observaciones similares han sido realizadas por Meseck *et al.* (2005) quien indica que cultivos de *Tetraselmis chui* en fotoperíodo

continuo y altas irradiancias ($220\mu\text{Einst. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) producen mayor biomasa celular, un mayor consumo de nitrato y fosfato en menor tiempo, comparados con cultivos en menor fotoperíodo y menor intensidad de luz. Needoba y Harrison (2004) también observaron que el consumo de nitrato fue relativamente constante en cultivos de varias especies de fitoplancton en luz continua. Una implicación ecológica importante de los resultados de este estudio, es que las altas tasas de crecimiento observadas en altas irradiancias resultan en una rápida asimilación de nutrientes, lo cual proporciona una ventaja para esta especie comparada con otras especies de fitoplancton del ambiente marino, que también estarán creciendo en altas condiciones de nutrientes típicas de principios de primavera, donde los florecimiento de otros grupos de fitoplancton (diatomeas) son comunes. En el caso de células creciendo en bajas irradiancias la relación entre la tasa de crecimiento y consumo de nutrientes estuvo determinada por la intensidad de luz, debido a que modificaciones en la condición de luz cambio el consumo tanto de nitrato como de fosfato. El elevado consumo de nitrato y fosfato en tratamientos con alta irradiancia sugieren que, en cortos periodos de tiempo *T. suecica* obtiene suficiente energía para la fotosíntesis e incrementa sus reservas de nitrógeno y fósforo. Las reservas resultantes pueden entonces sostener crecimiento en ausencia de cualquier suplemento externo de nutrientes. Por lo tanto, el consumo de nutrientes, y las tasas de crecimiento observadas en los diferentes tratamientos evaluados indican que *T. suecica* esta limitada por luz en irradiancias menores que $150 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, sin considerar la concentración de nutrientes.

7.1.5.3.- Composición proximal celular

El patrón metabólico característico de la fase exponencial es aquel en el cual una alta capacidad fotosintética es dirigida a la producción de proteínas y otros constituyentes celulares involucrados en el crecimiento celular en vez de productos de reserva u otros materiales celulares. Los resultados aquí presentados muestran que células de *T. suecica* en fase exponencial tienen una mayor proporción de proteína por célula que aquellas en fase estacionaria. La composición en proteínas, lípidos y carbohidratos de la especie bajo estudio, mostró diferentes tendencias; el nivel de proteínas y lípidos (Fig. 23, 25) disminuyó notablemente en los primeros tres días de cultivo, mientras que, el nivel de carbohidratos (Fig. 24) se incrementó con el desarrollo del cultivo en todas las condiciones experimentales evaluadas. De estos resultados se puede inferir que el carbón fijado en la fotosíntesis se incorporó a los aminoácidos pero debido a que las células de *T. suecica* están en crecimiento activo durante la fase exponencial, la alta proporción de carbón fijado fotosintéticamente es redistribuido en nuevas células conteniendo las proteínas, y esta es una posible razón que explica la disminución de las proteínas. Caso contrario ocurrió con la producción de carbohidratos, los cuales son productos de reserva o materiales que conforman la pared celular de *T. suecica*. Al respecto, Fernández-Reiriz (1989) analizó siete especies diferentes de microalgas marinas, todas creciendo en condiciones físico-químicas similares y analizadas en tres fases de crecimiento diferentes. Sus resultados indican que el contenido de proteínas se incrementó en la fase final del cultivo para el caso de diatomeas y *Rhodomonas* sp. y disminuyó en *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri* y *Tetraselmis suecica*, esto último concuerda con lo observado en este estudio para el caso de *T. suecica*. Además, es importante señalar que el estudio arriba

mencionado reporta valores de proteínas para *T. suecica* de 65.6 pg célula⁻¹ después de siete días de cultivo. Fabregas *et al.* (1995) encontró un máximo de proteínas en *T. suecica* de 94.3 pg célula⁻¹. Al comparar los resultados antes citados con los observados en el presente estudio (Fig. 23) resultan ser menores que los encontrados en las distintas condiciones ambientales y mismo tiempo de cultivo.

De los resultados de carbohidratos, se observó un incremento en la producción de este constituyente celular durante la fase exponencial solo en los tratamientos de bajo y medio nutriente, denotándose un alto contenido de carbohidratos por célula en cultivos expuestos a altas irradiancias (Fig. 24a, b). En este caso, altas intensidades de luz promueven en mayor medida la síntesis de carbohidratos, probablemente debido a que la proporción de carbón fotoasimilado que está entrando a la fracción de proteínas disminuye. Los valores de lípidos presentan la misma tendencia que las proteínas, la concentración por célula fue modificada por la edad del cultivo, y mostraron una notoria relación positiva con el consumo de nitrato y fosfato (Fig. 21, 22). Aparte de las diferencias en el tiempo de cultivo, la condición de nutrientes y la intensidad de luz también tienen efecto en el contenido de lípidos, al menos esto fue más evidente en la condición de bajo nutriente y baja irradiancia ($50 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$), donde la cantidad de lípidos por célula siempre fue mayor durante los primeros tres días de cultivo, asociado con la fase de crecimiento exponencial (Fig. 25a). Estos hallazgos también están relacionados con el aumento celular de pigmentos en baja irradiancia (Fig. 26-28), ya que al disminuir la disponibilidad de luz en los cultivos densos, causa un incremento simultáneo en el contenido de pigmento (Jeffrey y Vesk, 1977) y en la abundancia de membranas tilacoidales las cuales están constituidas por una doble capa de lípido

(Campbell, 1996), lo cual podría explicar el incremento en contenido de lípido por célula en las diferentes condiciones de nutrientes (Fabregas *et al.* 1995).

El efecto combinado de distintas condiciones de nutrientes y luz modificó de manera importante no solo en el crecimiento, sino también, la composición celular de *T. suecica*. Cuando la intensidad de luz se incrementó de 50 a 750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ la producción de carbohidratos por célula se incrementó. Observaciones similares han sido hechas por Friedman *et al.* (1991) quien reporta un incremento de tres veces la concentración de carbohidratos (polisacáridos), en cultivos de *Porphyridium* sp. y *Porphyridium aeruginosum*, cuando la intensidad de luz se incrementó de 75 a 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. También Tredici *et al.* (1991) demostró que la síntesis de carbohidratos en cultivos externos de *Spirulina platensis* fue significativamente mayor en días soleados que en días nublados. Otros estudios (Burner *et al.* 1989; Choen, 1999); con microalgas de varios grupos sugieren que el contenido celular de lípidos y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), incluyendo eicosapentanoico, están inversamente relacionados con la intensidad de luz para el crecimiento, lo cual concuerda con los resultados expuestos en el presente trabajo, donde células de *T. suecica* estuvieron caracterizadas por un alto contenido de lípidos bajo condiciones limitantes de luz (50 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en los primeros cuatro días (Fig., 25). Sin embargo, esto no se puede generalizar, ya que existen excepciones, debido a que en ciertas especies, se ha observado que alta intensidad de luz también incrementa los niveles de PUFA, los cuales son los constituyentes mayores de las membranas de los tilacoides (Molina-Grima *et al.* 1999). Por tanto diferencias en la composición celular de *T. suecica* son debido a diferentes irradiancias y/o concentración de nutrientes usados para su cultivo.

7.1.5.4.- Pigmentos

La concentración de nutrientes no tuvo un efecto tan marcado como la intensidad de luz en las razones de pigmentos accesorios respecto a la clorofila *a*. Las razones en *T. suecica* creciendo bajo diferentes irradiancias y concentración de nutrientes estuvieron generalmente dentro del intervalo de razones encontradas en prasinofitas (Schlüter *et al.*, 2000; Henriksen *et al.*, 2002), lo cual concuerda con los resultados de este estudio.

Para los diferentes tratamientos en los cultivos experimentales, la intensidad de luz modificó la composición de pigmentos de *T. suecica*. La razón del pigmento fotosintético clorofila *b* respecto a la clorofila *a* aumentó con una disminución en la irradiancia (Fig. 26-28). La respuesta celular a una disminución en la intensidad de luz, provocó un incremento en otros pigmentos colectores de luz tales como la clorofila *b*, la cual absorbe luz en el espectro amarillo-verde y transfiere la energía a la clorofila *a*. Por el contrario, en altas intensidades de luz la razón clorofila *b*/clorofila *a* disminuyó. Estas diferencias se deben principalmente a que en altas irradiancias el número de centros de reacción del fotosistema I y II disminuyen (MacIntyre *et al.*, 2002). Por otro lado, en respuesta a altas intensidades de luz otros pigmentos involucrados en la fotosíntesis de *T. suecica* también fueron modificados. Resultados en la razón clorofila *b*/clorofila *a* también han sido documentados para prasinofitas por Henriksen *et al.* (2002) quien reporta valores entre 0.5 y 0.6 en la razón clorofila *b*/clorofila *a* durante fase exponencial de crecimiento en irradiancias de 100 y 300 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Además, Llewellyn *et al.* (2005) obtiene valores de 0.41 a partir de análisis de Chemtax. Datos del presente estudio variaron entre 0.46 y 0.65 durante fase exponencial, lo cual concuerda con aquellos de la literatura.

Como consecuencia de los cambios en la intensidad de luz para el crecimiento de *T. suecica*, la proporción de luteína/clorofila a aumentó de bajas irradiancias a altas irradiancias en cultivos expuestos a diferentes condiciones de nutrientes. También la misma tendencia fue observada en la razón $\alpha+\beta$ caroteno/clorofila a . Los resultados aquí presentados, son consistentes con la función de fotoprotección del pigmento luteína, la cual se considera que protege al aparato fotosintético contra daño fotooxidativo causado por la exposición de células a altas intensidades de luz (Yoshii, 2006). Observaciones respecto a la disminución en la razón $\alpha+\beta$ caroteno/clorofila a también han sido documentadas por Goericke y Welschmeyer, (1992b) quienes indican que la abundancia de β caroteno disminuye con la intensidad de luz en diatomeas, mientras que, en primnesofitas se incrementa (Moisan *et al.*, 1998). La variación en los pigmentos accesorios respecto a la clorofila a indican el proceso mediante el cual, las células de *T. suecica* disipan el exceso de energía absorbida al incrementar la irradiancia para el crecimiento celular. Esta respuesta puede ser vista en los resultados expresados en las figuras 26-28 de este estudio.

Considerando la función fotoprotectiva de los pigmentos neoxantina y violaxantina, podría esperarse que sus concentraciones covarien con la concentración de pigmentos fotosintéticos (clorofila a) y con la intensidad de luz. Sin embargo, la respuesta en las razones de neoxantina/clorofila a en *T. suecica* en los distintos tratamientos de luz y nutrientes responden de manera diferente a lo esperado. En condiciones de baja intensidad de luz la razón neoxantina/clorofila a siempre fue mayor que en altas intensidades de luz (Fig. 26c-28c). Mientras que, las razones de violaxantina/clorofila a solo mostraron variaciones menores en las diferentes intensidades de luz (Fig. 26d-28d). Investigaciones

recientes señalan que las razones de neoxantina/clorofila *a* disminuyen con un incremento en la irradiancia (Goerike y Montoya, 1998; Henriksen *et al.* 2002; MacIntyre *et al.* 2002). Sin embargo, investigaciones realizadas por Schlüter *et al.* (2000, 2006) indican que la razón neoxantina/clorofila *a* permanece constante en diferentes intensidades de luz, mientras que, las razones violaxantina/clorofila *a* son generalmente menos afectadas por la intensidad de luz y tienden a incrementarse en condiciones de luz reducida. Las diferencias entre los datos de la literatura y los presentados en este estudio, hacen difícil la interpretación, debido a que probablemente las variaciones en las proporciones de pigmentos no fotosintéticos y fotosintéticos, pueden ser resultado ya sea de incrementos o disminuciones de la clorofila por célula (Descy, 2000) o cuando un pigmento o grupo de pigmentos disminuyen en respuesta a un cambio en el campo de luz o condiciones ambientales (Trees *et al.*, 2000), otros pigmentos se incrementan para llenar este espacio vacío. Estas observaciones sugieren cambios fotoadaptativos en respuesta a la condición de luz y nutriente prevaeciente en el ambiente de cultivo. En cuanto a la razón de feofitina/clorofila *a* esta fue significativamente baja (Fig. 26f-28f), de lo cual se descarta que esta razón haya modificado las proporciones de pigmentos accesorios/clorofila *a* en *T. suecica*.

8.- Conclusiones

La densidad celular de las tres especies de fitoplancton estudiadas se incrementaron de bajas irradiancias a altas irradiancias, pero irradiancias de $50 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ limitan el crecimiento de las especies.

El incremento en la densidad celular de *Amphidinium carteri* dependió de la intensidad de luz, y no de la concentración de nutrientes. Para *Thalassiosira pseudonana* la densidad celular se incrementó con la concentración de nutrientes, y solo en la condición alta de nutrientes, diferencias significativas en la densidad celular fueron observadas en relación a la irradiancia. En cambio, *T. suecica* incrementó su densidad celular con el incremento en la intensidad de luz y concentración de nutrientes.

Estos resultados demuestran que cambios simultáneos en la irradiancia y concentración de nutrientes afectan de manera diferente la tasa de crecimiento de diferentes especies de microalgas marinas en cultivos estáticos.

Cultivos de *A. carteri* expuestos a condiciones de bajo y medio nutriente fueron limitados por nutrientes al quinto y sexto día, mientras que, una mayor remoción de nutrientes se observó en $300 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

T. pseudonana no fue limitada por nitrato y fosfato en las distintas condiciones evaluadas, sin embargo, la remoción de silicatos fue del 98% en los primeros dos días del cultivo en altas intensidades de luz siendo este limitante.

La remoción de nutrientes por *T. suecica* se incrementó de bajas a altas irradiancias, observándose que la mayor remoción de nitrato y fosfato tomó lugar en menor tiempo en altas intensidades de luz.

La concentración de proteínas por célula disminuyó en los primeros tres días para las tres especies cultivadas, observándose mayores concentraciones en bajas que en altas irradiancias.

La concentración de lípidos en *A. carteri* fueron mayores en altas irradiancias, mientras que, en *T. suecica* la máxima concentración fue en bajas irradiancias. Para *T. pseudonana* solo se observaron variaciones importantes respecto a la luz en baja concentración de nutrientes.

La concentración de carbohidratos por célula en *T. suecica* se incrementó con el tiempo de cultivo, con valores mayores en altas irradiancias, mientras que, en *T. pseudonana* disminuyen. Para *A. carteri*, se incrementaron en bajo nutriente, y con tendencia a disminuir en cultivos con alta concentración de nutrientes.

Las razones de pigmentos fotosintéticos presentaron diferencias en las distintas intensidades de luz con valores mayores en bajas irradiancias, manteniéndose sin cambios durante el tiempo de cultivo. Por otro lado, la concentración de nutrientes tuvo menor efecto en estas razones.

Las razones de pigmentos fotoprotectores presentaron diferencias en las distintas intensidades de luz, con valores mayores en altas irradiancias, y cambios durante el tiempo de cultivo. El efecto de la concentración de nutrientes fue menor que el de la intensidad de luz en la variación de las razones de pigmentos.

Diferentes intensidades de luz y distintas concentraciones de nutrientes modificaron las razones de pigmentos en las diferentes especies cultivadas.

Los resultados de estos experimentos sugieren que *T. pseudonana* y *T. suecica*, pueden ser usadas en el tercer y cuarto día de su cultivo, ya sea como inóculos para volúmenes mayores de cultivo o en la alimentación de organismos acuáticos en acuicultura.

9.- REFERENCIAS

- Arsalane, W., B. Rousseau and J.C. Duval. 1994. Influence of the pool size of the xantophyll cycle on the effects of light stress in a diatom: competition between photoprotection and photoinhibition. *Photochemical and Photobiology* 60: 237-246.
- Bianchi, T.S., C. Lambert and D.C. Biggs. 1995. Distribution of chlorophyll *a* and pheopigments in the northwestern gulf of México: A comparison between fluorometric and high-performance liquid chromatography measurements. *Bull. Mar. Sci.* 56: 25-32
- Bidigare, R.R., J. Marra, T.D. Dickley, R. Iturriaga, K.S. Baker, R.C. Smith and H. Pak. 1990. Evidence of phytoplankton succession and chromatic adaptation in the Sargasso Sea during spring 1985. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 60: 113-122.
- Bligh, E.G. and W.J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Bricaud, A., M. Babin, A. Morel and H. Claustre. 1995. Variability in the chlorophyll-specific absorption coefficients of natural phytoplankton: Analysis and parameterization. *J. Geophys. Res.* 100: 13321-13332.
- Brown, M.R., C.D. Garland, S.W. Jeffrey, I.D. Jameson and J.M. Leroi. 1993. The gross and amino acid compositions of batch and semi-continuous cultures of *Isochrysis* sp. (clone T.ISO), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. *Journal of Applied Phycology* 5: 285-296.
- Brown, M.R., G.A. Dunstan, S.J. Norwood and K.A. Miller. 1996. Effects of Harvest stage and light on the biochemical composition of the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *J. Phycol.* 32: 64-73.
- Brzezinski, M.A. and Conley D.J. 1994. Silicon deposition during the cell cycle of *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae) determined using dual rhodamine 123 and propidium iodide staining. *J. Phycol.* 30: 45-55.
- Bucciarelli, E. and W.G. Sunda. 2003. Influence of CO₂, nitrate, phosphate, and silicate limitation on intracellular dimethylsulfoniopropionate in batch cultures of the coastal diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Limnol. Oceanogr.*, 48(6): 2256-2265.
- Burner, T., Z. Dubinsky K. Wyman and P.G. Falkowsky. 1989. Photoadaptation and the package effect in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae). *J. Phycol.*, 25: 70-78.
- Campbell, N.A. 1996. *Biology*. Fourth Edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 1206 pp.
- Carr, M.E. 1998. A numerical study of the effect of periodic nutrient supply on pathways of carbon in coastal upwelling regime. *J. Plankton Res.* 20(3): 491-516.
- Chisholm, S.W. 1992. Phytoplankton size In: P.G. Falkowski and A. Woodhead (ed.). *Primary productivity and biogeochemical cycles in the sea*. Plenum Press, New York, P. 213-238.
- Chisholm, S.W., R.J. Olson, E.R. Zettler, R. Goericke, J.B. Waterbury and N.A. Welschmeyer. 1988. A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. *Nature* 334: 340-343.

- Choen, Z. 1999. *Porphyridium cruentum*. In Chemicals from microalgae (ed. Z. Choen), pp. 1-24. Taylor & Francis Ltd, London, U.K.
- Claquin, P., V. Martin-Jézéquel, J.C. Kromkamp, M.J.W. Veldhuis and G.W. Kraay. 2002. Uncoupling of silicon compared with carbon and nitrogen metabolism and role of the cell cycle in continuous cultures of *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae) under light, nitrogen, and phosphorus control. *J. Phycol.* 38: 922-930.
- Clark, D.R. 2001. Growth rate relationships to physiological indices of nutrient status in marine diatoms. *J. Phycol.* 37: 249-256.
- Clark, D.R. and Flynn K.J. 2002. N-assimilation in the noxious flagellate *Heterosigma carterae* (Raphidophyceae): dependence on light, N-source, and physiological state. *J. Phycol.* 38: 503-512.
- Descy, J.P., H.W. Higgins, D.J. Mackey, J.P. Hurley and T. M. Frost. 2000. Pigment ratios and phytoplankton assessment in northern Wisconsin lakes. *Journal Phycology* 36: 274-286.
- Estrada, M. and E. Bardalet. 1997. Phytoplankton in a turbulent world. *Sci. Mar.* 61(supl.1):125-140.
- Everitt, D.A., S.W. Wrigth, J.K. Volkman, D.P. Thomas and E. J. Lindstrom. 1990. Phytoplankton community compositions in the western pacific determined from chlorophyll and carotenoid pigment distribution. *Deep-Sea Res.* 37:975-997.
- Fabregas, J., M. Patiño, B.O. Arredondo-Vega, J.L. Tobar and A. Otero. 1995. Renewal rate and nutrient concentration as tools to modify productivity and biochemical composition of cyclostat cultures of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44: 287-292.
- Falkowski, P.G. and Raven J.A. 1997. Aquatic photosynthesis. Blackwell Science, Falkowski, Malden, MA, 375 pp.
- Fernández-Reirez, M.J., A. Perez-Camacho, M.J. Ferreiro, J. Blanco, M. Planas, M.J. campos and U. Labarta. 1989. Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture*, 83: 17-37.
- Friedman, O., Z. Dubinsky, and S. Arad (Malis). 1991. Effect of light intensity on growth and polysaccharide production in red and blue-green Rhodophyta unicells. *Bioresource Technol.*, 38: 105-110.
- Garcia, V.M.T. and D.A. Purdie. 1992. The influence of irradiance on growth, photosynthesis and respiration of *Gyrodinium cf. aureolum*. *J. Plankton Res.*, 14(9): 1251-1265.
- Geider, R.J., J. LaRoche, R.M. Greene and M. Olaizola. 1993. Response of the photosynthetic apparatus of *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae) to nitrate, phosphate, or iron starvation. *J. Phycol.* 29(6): 755-766.
- Gieskes, W.W.C., G.W. Kraay, A. Nontji, D. Setiapermana and Sutomo. 1988. Monsoonal alteration of a mixed and a layered structure in the phytoplankton of the euphotic zone of the Banda Sea (Indonesia): A mathematical analysis of algal pigment fingerprints. *Neth. J. Sea Res.* 22: 123-137.

- Goericke, R. and J.P. Montoya. 1998. Estimating the contribution of microalgal taxa to chlorophyll *a* in the field—variations of pigments ratios under nutrient- and light-limited growth. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 169: 97-112.
- Goericke, R. y D. J. Repeta. 1992. The pigments of *Prochlorococcus marinum*: The presence of divinyl chlorophyll *a* and *b* in a marine prokariote. *Limnol. Oceanogr.* 37: 425-433.
- Goericke, R. y N.A. Welschmeyer 1992b. Pigment turnover in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* II. The ¹⁴CO₂-labeling kinetics of chlorophyll *a*. *J. Phycol.*, 28: 507-517.
- Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith, W.L. and M.H. Chanley (ed.). *Culture of marine invertebrates animals*. Plenum Publishing Corp. New York., pp.29-60.
- Harris, G.P. 1986. *Phytoplankton Ecology: Structure, Function and Fluctuation*. Univ. Press. Cambridge, 393 pp.
- Harrison, P.J., P.A. Thompson and G.S. Calderwood. 1990. Effects of nutrient and light limitation on the biochemical composition of phytoplankton. *Journal of Applied Phycology* 2: 45-56.
- Henriksen, P., Bo Riemann, H. Kaas, H.M. Sørensen and H.L. Sørensen. 2002. Effect of nutrient-limitation and irradiance on marine phytoplankton pigments. *J. Plankton Res.*, 4(9): 835-858.
- Hildebrand, M. 2002. Lack of coupling between silicon and other elemental metabolism in diatoms. *J. Phycol.* 38: 841-843.
- Hoepffner, N. and S. Sathyendranath. 1991. Effect of pigment composition on absorption properties of phytoplankton, *Mar.Ecol. prog. Ser.*, 73: 11-23.
- Hoepffner, N. and S. Sathyendranath. 1992. Bio-optical characteristics of coastal waters: Absorption spectra of phytoplankton and pigment distribution in the Western North Atlantic. *Limnol. Oceanogr.* 37: 1660-1679.
- Holm-Hansen, O., C.J. Lorenzen, R.W. Holmes and J.D.H. Strickland. 1965. Fluorometric determination of chlorophyll. *J. Cons. Int. Explor. Mer.*, 30: 3-15.
- Jeffrey, S.W. and M. Vesk. 1997. Introduction to marine phytoplankton and their pigment signatures. In: S.W. Jeffrey, R.F.C. Mantoura, and S.W. Wright (Eds.). *Phytoplankton Pigments in Oceanography*, UNESCO, Paris, pp. 37-84.
- Juneau, P. and P.J. Harrison. 2005. Comparison by PAM fluorometry of photosynthetic activity of nine marine phytoplankton grown under identical conditions. *Photochemistry and photobiology*, 81: 649-653.
- Kashino, Y. and S. Kudoh. 2003. Concerted response of xanthophyll-cycle pigments in marine diatom, *Chaetoceros gracilis*, to shifts in light condition. *Phycological Research* 51: 168-172.
- Kjørboe, T. 1993. Turbulence, phytoplankton cell size, and the structure of pelagic food webs. *Adv. Mar. biol.* 29: 1-61.
- Kim, Dae-IL., Y. Matsuyama, S. Nagasoe, M. Yamaguchi, Yang-Ho Yoon, Y. Oshima, N. Imada and T. Honjo. 2004. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the harmful red tide dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* Margalef (Dinophyceae). *J. Plankton Res.*, 26(1): 61-66.

- Goericke, R. and J.P. Montoya. 1998. Estimating the contribution of microalgal taxa to chlorophyll *a* in the field—variations of pigments ratios under nutrient- and light-limited growth. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 169: 97-112.
- Goericke, R. y D. J. Repeta. 1992. The pigments of *Prochlorococcus marinum*: The presence of divinyl chlorophyll *a* and *b* in a marine prokariote. *Limnol. Oceanogr.* 37: 425-433.
- Goericke, R. y N.A. Welschmeyer 1992b. Pigment turnover in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* II. The ¹⁴CO₂-labeling kinetics of chlorophyll *a*. *J. Phycol.*, 28: 507-517.
- Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith, W.L. and M.H. Chanley (ed.). Culture of marine invertebrates animals. Plenum Publishing Corp. New York., pp.29-60.
- Harris, G.P. 1986. Phytoplankton Ecology: Structure, Function and Fluctuation. Univ. Press. Cambridge, 393 pp.
- Harrison, P.J., P.A. Thompson and G.S. Calderwood. 1990. Effects of nutrient and light limitation on the biochemical composition of phytoplankton. *Journal of Applied Phycology* 2: 45-56.
- Henriksen, P., Bo Riemann, H. Kaas, H.M. Sørensen and H.L. Sørensen. 2002. Effect of nutrient-limitation and irradiance on marine phytoplankton pigments. *J. Plankton Res.*, 4(9): 835-858.
- Hildebrand, M. 2002. Lack of coupling between silicon and other elemental metabolism in diatoms. *J. Phycol.* 38: 841-843.
- Hoepffner, N. and S. Sathyendranath. 1991. Effect of pigment composition on absorption properties of phytoplankton, *Mar. Ecol. prog. Ser.*, 73: 11-23.
- Hoepffner, N. and S. Sathyendranath. 1992. Bio-optical characteristics of coastal waters: Absorption spectra of phytoplankton and pigment distribution in the Western North Atlantic. *Limnol. Oceanogr.* 37: 1660-1679.
- Holm-Hansen, O., C.J. Lorenzen, R.W. Holmes and J.D.H. Strickland. 1965. Fluorometric determination of chlorophyll. *J. Cons. Int. Explor. Mer.*, 30: 3-15.
- Jeffrey, S.W. and M. Vesk. 1997. Introduction to marine phytoplankton and their pigment signatures. In: S.W. Jeffrey, R.F.C. Mantoura, and S.W. Wright (Eds.). *Phytoplankton Pigments in Oceanography*, UNESCO, Paris, pp. 37-84.
- Juneau, P. and P.J. Harrison. 2005. Comparison by PAM fluorometry of photosynthetic activity of nine marine phytoplankton grown under identical conditions. *Photochemistry and photobiology*, 81: 649-653.
- Kashino, Y. and S. Kudoh. 2003. Concerted response of xanthophyll-cycle pigments in marine diatom, *Chaetoceros gracilis*, to shifts in light condition. *Phycological Research* 51: 168-172.
- Kjørboe, T. 1993. Turbulence, phytoplankton cell size, and the structure of pelagic food webs. *Adv. Mar. Biol.* 29: 1-61.
- Kim, Dae-IL., Y. Matsuyama, S. Nagasoe, M. Yamaguchi, Yang-Ho Yoon, Y. Oshima, N. Imada and T. Honjo. 2004. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the harmful red tide dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* Margalef (Dinophyceae). *J. Plankton Res.*, 26(1): 61-66.

- Kirk, J.T.O. 1994. Light and photosynthesis in aquatic ecosystems. Second edition. Cambridge University Press. 509 pp.
- Kochert, G. 1978a. Carbohydrate determination by phenol-sulfuric acid method. En: J.A. Hellebust y J.S. Craigie (eds.). Handbook of Physiological and Biochemical methods. Cambridge Univ. Press, London, pp. 95-97.
- Kudo, I. 2003. Change in the uptake and cellular Si:N ratio in diatoms responding to the ambient Si:N ratio and growth phase. *Marine Biology* 143: 39-46.
- Llewellyn, C.A., James R. fishwick and Jerry C. Blackford. 2005. Phytoplankton community assemblages in the English Channel: a comparison using chlorophyll *a* derived from HPLC-CHEMTAX and carbon derived from microscopy cell counts. *Journal of Plankton Research* 27(1): 103-119.
- Lomas. M.W. and P.M. Glibert. 2000. Comparison of nitrate uptake, storage, and reduction in marine diatoms and flagellates. *J. Phycol.* 36: 903-913.
- Lourenco, S.O., E. Barbarini, J. Mancini-Filho, K.P. Schinke and E. Aidar. 2002. Effects of different nitrogen sources on the growth and biochemical profile of 10 marine microalgae in batch culture: an evaluation for aquaculture. *Phycologia* 41(2): 158-168.
- Lourenco, S.O., E. Barbarini, U.M. Lanfer Marquez and E. Aidar. 1998. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: Basis for the calculation of specific nitrogen-to-protein conversion factors. *J. Phycol.* 34: 798-811.
- MacIntyre, H.L., Todd M. Kana, Tracy Anning and Richard J. Geider. 2002. Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria. *J. Phycol.*, 38: 17-38.
- Mackey, D.J., H.W. Higgins, M.D. Mackey and D. Holdsworth. 1998. Algal class abundances in the western equatorial Pacific: estimation from HPLC measurements of chloroplast pigments using CHEMTAX. *Deep Sea Res.*, 45: 1441-1468.
- Mackey, M.D., D.J. Mackey, H.W. Higgins, and S.W. Wright. 1996. CHEMTAX-a program for estimating class abundances from chemical markers: Application to HPLC measurements of phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 144: 265-283.
- Martin-Jézéquel, V., Hildebrand, M. and Brzezinski, M.A. 2000. Silicon metabolism in diatoms: implications for growth. *J. Phycol.* 36: 821-840.
- Masojídek, J., M. Koblížek and G. Torzillo. 2004. Photosynthesis in microalgae. In: Amos Richmond (Ed.). Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology. Blacwell publishing company, 20-39 pp.
- Meseck, S.L., J.H. Alix and G.H. Wikfors. 2005. Photoperiod and light intensity effects on growth and utilization of nutrients by the aquaculture feed microalgae, *Tetraselmis chui* (PLY429). *Aquaculture* 246: 393-404.
- Mille, D.F., H.W. Paerl and J.P. Hurley. 1993. microalgal pigment assessments using high performance liquid chromatography: A synopsis of organismal and ecological applications. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50:2513-2527.
- Moisan, T.A., M. Olaizola and B.G. Mitchell. 1998. Xanthophyll cycling in *Phaeocystis antarctica* karsten under light-limitation. *Limnol. Oceanogr.*, 44: 247-258.
- Molina-Grima, E., F. García-Camacho and F.G. Acien-Fernández. 1999. Production of EPA from *Phaeodactylum tricorutum*. In: Chemicals from microalgae (ed. Z. Choen), pp. 57-92. Taylor & Francis Ltd, London, U.K.

- Morel, A., Y.H. Ahn, F. Partensky, D. Vaultot and H. Claustre. 1993. *Prochlorococcus* and *Synechococcus*: A comparative study of their optical properties in relation to their size and pigmentation. *J. Mar. Res.* 51: 617-649.
- Nakajima, Y. and T. Itayama. 2003. Analysis of photosynthetic productivity of microalgal mass cultures. *J. Appl. Phycol.*, 15: 497-505.
- Nalewajko, C. and Lee, K. 1983. Light simulation of phosphate uptake in marine phytoplankton. *Mar. Biol.*, 74: 9-15.
- Needoba, J.A. and P.J. Harrison. 2004. Influence of low light and a light: dark cycle on NO_3^- uptake, intracellular NO_3^- , and nitrogen isotope fractionation by marine phytoplankton. *J. Phycol.*, 40: 505-516.
- Olson, R.J., S.W. Chisholm, E.R. Zettler and E.V. Armbrust. 1990. Pigments, size, and distribution of *Synechococcus* in the North Atlantic and Pacific Oceans. *Limnol. Oceanogr.* 35: 45-58.
- Pande, S.V., R. Parvin and T. Venkitasubramanian. 1963. microdetermination of lipids and serum total fatty acids. *Analytical Biochemistry*, 6 : 415-425.
- Parslow, J.S., P.J. Harrison and P.A. Thompson. 1984. Saturated uptake kinetics: transient response of the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* to ammonium, nitrate, silicate or phosphate starvation. *Marine Biology*. 83:51-59.
- Parson, T.R., Y. Maita and C.M. Lalli. 1985. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. First edition. Ed. pergamon press. Inc. New York. 173 pp.
- Platt, T., S. Sathyendranath, A. M. Edwards, D.S. Broomhead and O. Ulloa. 2003. Nitrate supply and demand in the mixed layer of the ocean. *Marine Ecology progress series*. Vol. 254:3-9.
- Qin, Jian G., Lyn Pearson and J. F. Carragher. 1999. Response of *Tetraselmis suecica* to nutrient and grazer manipulation. *Journal of Applied Phycology* 11: 481-485.
- Qtae, Jo., Eun Jun Choy, Doo Won Park and Benoît Véron. 2004. Sterol dynamics of heterotrophic *Tetraselmis suecica* and its nutritional implication in the bivalve. *Aquaculture Research* 35: 371-377.
- Quigg, A., J. Beardall and T. Wydrzynski. 2003. Photoacclimation involves modulation of the photosynthetic oxygen-evolving reactions in *Dunaliella tertiolecta* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Functional Plant Biology* 30: 301-308.
- Ralph, P.J., A. McMinn, K.G. Ryan and C. Ashworth. 2005. Short-term effect of temperature on the photokinetics of microalgae from the surface layers of Antarctic pack ice. *J. Phycol.* 41: 763-769.
- Raush, T. 1981. The estimation of micro-algal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomass I. *Hidrobiología*, 78: 237-251.
- Reigman. R., B.R. Kuipers, A.A.M. Noordeloos and H.J. Witte. 1993. Size-differential control of phytoplankton and the structure of plankton communities. *Neth. J. Sea. Res.* 31(3):225-265.
- Renaud, S.M., Loung-Van Thinh and David L. Parry. 1999. The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. *Aquaculture* 170: 147-159.

- Rmiki, Nour-Eddine, C. Brunet, J. Cabioch and Y. Lemoine. 1996. Xanthophyll-cycle and photosynthetic adaptation to environment in macro-and microalgae. *Hydrobiologia* 326/327: 407-413.
- Roessler, P.G. 1988. Effects of silicon deficiency on lipid composition and metabolism in the diatoms *Cyclotella cryptica*. *J. Phycol.* 24: 394-400.
- Schlüter, L., F. Møhlenberg, H. Havskum and S. Larsen. 2000. The use of phytoplankton pigments for identifying and quantifying phytoplankton groups in coastal areas: testing the influence of light and nutrients on pigment/chlorophyll *a* ratios. *Marine Ecology Progress Series* 192: 49-63.
- Schlüter, L., T.L. Lauridsen, G. Krogh and T. Jørgensen. 2006. Identification and quantification of phytoplankton groups in lakes using new pigment ratios- a comparison between pigment analysis by HPLC and microscopy. *Freshwater Biology* 51: 1474-1485.
- Sciandra, A., L. Lazzara, H. Claustre and M. Babin. 2000. Responses of growth rate, pigment composition and optical properties of *Cryptomonas* sp. to light and nitrogen stresses. *Marine Ecology Progress series*. Vol. 201: 107-120.
- Smith, R.C., R.R. Bidigare, B.B. Prezelin, K.S. Baker, and J.M. Brooks. 1987 Optical characterization of primary productivity across a coastal front. *Mar. Biol.* 96: 575-591.
- Sosik, H.M. and B.G. Mitchell. 1991. Absorption, fluorescence, and quantum yield for growth in the nitrogen-limited *Dunaliella tertiolecta*. *Limnol. Oceanogr.* 36(3): 910-921.
- Sosik, H.M. and Chisholm S.W. 1989. Chlorophyll fluorescence from single cells: Interpretation of flow cytometric signals. *Limnol. And Oceanogr.* 34(8): 1749-1761.
- Stramski, D., A. Sciandra and H. Claustre. 2002. effects of temperature, nitrogen, and light limitation on the optical properties of the marine diatoms *Thalassiosira pseudonana*. *Limnol. And Oceanogr.*, 47(2): 392-403.
- Stuart, V.S. S. Sathyendranath, T. Platt, H. Maass and B.D. Irwin. 1998. Pigments species composition of natural phytoplankton populations. Effect on the absorption spectra. *J. Plankton Res.* 20(2): 187-217.
- Taguchi, S., Hirata, J.A. and Laws E.A. 1987. Silicate deficiency and lipids synthesis of marine diatoms. *J. Phycol.* 23: 260-267.
- Tester, P.A., M.E. Geesey, C. Guo, H.W. Paerl and D.F. Millie. 1995. Evaluating phytoplankton dynamics in the Newport River estuary (North Carolina, U.S.A.) by HPLC-derived pigment profiles. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 124: 237-245.
- Thingstad, T.F. and E. Sakshaug. 1990. Control of phytoplankton growth in nutrient recycling system. Theory and terminology. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 63(2-3):261-272..
- Thompson, P. 1999. The response of growth and biochemical composition to variation in daylength, temperature, and irradiance in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 35: 1215-1223.
- Tredici, M.R., P. Carozzi, G. Chini Zittelli and R. Materassi. 1991. A vertical aveolar panel (VAP) for outdoor mass cultivation fo microalgae and cyanobacteria. *Bioresource Technol.*, 38: 153-159.
- Trees, C.C., D.K. Clark, R.R. Bidigare, M.E. Ondrusek and J.L. Mueller. 2000. Accessory pigments versus chlorophyll *a* concentrations within the euphotic zone: A ubiquitous relationship. *Limnology and Oceanography*, 45(5): 1130-1143.

- Trees, C.C., M.C. Kennicutt and J.M. Brooks. 1985. Errors associated with the standard fluorometric determination of chlorophyll and pheopigments. *Mar. Chem.* 17: 1-12.
- Trees, C.C., R.R. Bigdare, D.N. Karl and L. Van Heukelem. 2000. Fluorometric chlorophyll *a*: sampling, laboratory methods, and data analysis protocols. In: G.S. Fargion and J.L. Muller (Eds.) *Ocean Optics Protocols for Satellite Ocean Color Sensor Validation, Revision 2, Chapter 14*, NASA TM 2000-209966, Goddard Space Flight Center, Greenbelt, MD. Pp: 162-169.
- Turpin, D.H. 1991. Effects of inorganic N availability on algal photosynthesis and carbon metabolism. *J. Phycol.* 27: 14-21.
- Valenzuela-Espinoza, E., F. Lafarga-DeLa Cruz, R. Millán-Núñez and F. Núñez-Cebrero. 2002. Growth, nutrient uptake and proximate composition of *Rhodomonas* sp cultured using *f/2* medium and agricultural fertilizers. *Ciencias Marinas*, 31: 79-89.
- Vergara, J.J., Berges, J.A. and Falkowski, P.G. 1998. Diel periodicity on nitrate reductase activity and protein levels in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 34: 952-961.
- Vernet, M. and C.J. Lorenzen. 1987. The presences of chlorophyll *b* at the estimation of pheopigments in marine phytoplankton. *J. Plankton res.* 9: 255-265.
- Voltolina, D., M. Nieves, G. Navarro, Olivia T. and D. Peraza. 1998. The importance of acclimation for the evaluation of alternative media for microalgae growth. *Aquacult. Eng.* 19: 7-15.
- Weis, E. and J. Berry. 1987. Quantum efficiency in relation to energy dependent quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochem. Biophys Acta* 283: 259-267.
- Wright, S.W., Thomas D.P., Marchant H.J., H.W. Higgins, M.D. Mackey and Mackey, D.J. 1996. Analysis of phytoplankton of the Australian sector of the Southern Ocean-comparisons of microscopy and size frequency data with interpretations of pigments HPLC data using CHEMTAX matrix factorization program. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 144: 285-298.
- Yentsch, C.S. and D.A. Phinney. 1989. A bridge between ocean optics and microbial ecology. *Limnol. Oceanogr.* 34(8): 1694-1705.
- Yoshii, Y. 2006. Diversity and evolution of photosynthetic antenna systems in green plants. *Phycological Research* 54: 220-229.

