

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



**“EFECTO DE LA LUZ GUIADA POR FIBRA ÓPTICA EN EL CRECIMIENTO
Y CONTENIDO DE CLOROFILAS EN CULTIVOS ESTÁTICOS DE
Isochrysis aff. galbana (CLONE T-Iso)”**



T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
O C E A N O L O G O
PRESENTA

Claudia Moreno Miranda

Ensenada, Baja California, Agosto del 2003

**“EFECTO DE LA LUZ GUIADA POR FIBRA ÓPTICA EN EL CRECIMIENTO
Y CONTENIDO DE CLOROFILAS EN CULTIVOS ESTÁTICOS DE
Isochrysis aff. galbana (CLONE T-Iso)”**

**T E S I S
QUE PRESENTA**

CLAUDIA MORENO MIRANDA

APROBADA POR


PRESIDENTE DEL JURADO

M. C. Enrique Valenzuela Espinoza


SINODAL PROPIETARIO

Dr. Rafael Hernández Walls


SINODAL PROPIETARIO

Dr. Roberto Millán Núñez

RESUMEN

Se realizó un diseño aleatorio simple con tres tratamientos y dos unidades de evaluación para cultivos estáticos (2.5 litros) de *Isochrysis aff galbana* (clone T-Iso): Luz fluorescente (control) (T1), luz fluorescente más luz guiada por fibra óptica (T2) y luz guiada por fibra óptica (T3). Los cultivos se mantuvieron a $19\pm 1^\circ\text{C}$ e irradiancia de $150 \mu\text{M quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante siete días. El pH se mantuvo en el intervalo de 7.7-8.5 con la adición de CO_2 . La densidad celular, concentración de clorofilas y consumo de NO_3^- y PO_4^{3-} se determinó diariamente. Muestras para espectros de absorción fueron tomadas los días 1, 3, 5 y 7 del cultivo. La mayor densidad celular se obtuvo en el tratamiento T2 con 8.04×10^6 células ml^{-1} , ($\mu=0.33 \text{ día}^{-1}$, y 0.48 divisiones por día), siendo significativo a partir del tercer día con respecto al tratamiento control T1. En cambio al utilizar solo fibra óptica, la concentración de clorofilas por célula fue mayor. El mayor consumo de fosfato y nitrato se presentó en el tratamiento T2, caso contrario ocurrió en el tratamiento T3. Los espectros de absorción para cada unidad experimental muestran que los coeficientes se incrementan conforme transcurre el tiempo de cultivo. Los mayores coeficientes se observaron en el T1 y T2. Máximos de absorción por carotenos y clorofila a se identificaron entre 430-440 nm y 650-670nm respectivamente en los tres tratamientos. En conclusión, los resultados indican que la producción de biomasa se incrementó con el uso de luz fluorescente más luz guiada por fibra óptica y el contenido de clorofilas por unidad celular presentó poca variación respecto al tratamiento control durante el cultivo estático de *Isochrysis aff. galbana* (clone T-Iso).

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Baja California y a la Facultad de Ciencias Marinas por haberme permitido culminar esta etapa de mi vida como estudiante.

Al proyecto 274 de la 6ta convocatoria del programa de proyectos de investigación de la UABC.

Al Instituto de Investigaciones Oceanológicas y al Proyecto 4020 Producción de Microalgas por haberme dado la oportunidad de desarrollar este trabajo.

Al M.C. Enrique Valenzuela Espinoza por permitirme integrarme a un gran equipo, compartirme enseñanzas y criterios de trabajo, por el apoyo durante el desarrollo de este, y por la siempre acertada intervención para el detallamiento y culminación de este trabajo.

Al Dr. Roberto Millán Núñez y al Dr. Rafael Hernández Walls, por su gran optimismo y confianza, el apoyo en toda duda, y en todo momento durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Zaúl García Esquivel por el apoyo desde el inicio, las charlas siempre agradables, y su siempre disposición, que a veces eso es lo que más vale y más se le agradece, gracias.

A la Dra. Adriana González Silveira y al Dr. Eduardo Santamaría Del Angel, por su apoyo, y explicaciones que en verdad fueron de gran ayuda.

Al Oc. José Luis Sánchez Osorio, a los biólogos Juan Manuel López Divas y Alberto Gálvez, sus asesorías y prestamos me salvaron de varias!!!!!! GRACIAS.

A mis super compañeros de laboratorio, Fili, Sibebó y los Rudos, gracias por la compañía en esas largas jornadas, aguantarme y escuchar todas mis dudas, quejas y demás.

A las chicas del club de la TORTUGA!, Loud-Loud, Moni, Fanny, Denisse, Adriana y Eli, gracias por haber compartido conmigo clases, fiestas y demás, y simplemente por haber estado ahí.

A los siempre presentes por que gracias a su amistad, ejemplo, y enseñanzas motivaron en mí el deseo de emprender esta aventura de ser oceanólogo, M.C. Sergio Rendón Rodríguez; Dr. Emilio Macías Regalado, Dr. José Antonio Calderón Pérez, y M.C. Rafael Solís Ibarra. MUCHAS GRACIAS.

A las familias Marchena Miranda y Miyagui Cetina por apoyarme al recibirme y permitirme ser uno de ustedes. A mis tías, Chela, Toya y Licha por el apoyo a distancia. A mi tía Martha, y a ti Haydeé, por hacerme fuerte tantas veces.

DEDICATORIA

A mi mejor amiga, Rosa Elena.

Por que en la vida es necesario contar con el apoyo de una mano firme y confiable que nos guíe para llegar con bien a nuestro destino.....gracias papi.

A Carlitos, Mario y Humberto, que con todo el corazón deseo ser su mejor ejemplo.

ÍNDICE

	Página
1-. INTRODUCCIÓN.....	1
2-. ANTECEDENTES.....	3
3-. OBJETIVO.....	6
3.1-. OBJETIVOS PARTICULARES.....	6
4-. MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
4.1-.CULTIVO DE MICROALGAS.....	7
4.2-.ANÁLISIS QUÍMICOS.....	11
4.3-.TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS DATOS.....	12
5-. RESULTADOS.....	13
5.1-.CRECIMIENTO MICROALGAL.....	14
5.2-.CONSUMO DE NUTRIENTES.....	19
5.3-.CONTENIDO DE PIGMENTOS.....	23
5.3.1-.CLOROFILA a.....	23
5.3.2-.ESPECTROS DE ABSORCIÓN.....	26
6-.DISCUSIÓN.....	36
6.1-. CRECIMIENTO MICROALGAL.....	37
6.2-. CONSUMO DE NUTRIENTES.....	39
6.3-. CLOROFILA a	41
6.4-.ESPECTROS DE ABSORCIÓN.....	43
7-.CONCLUSIONES.....	44
8-.LITERATURA CITADA.....	46

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla I Parámetros poblacionales promedio de <i>Isochrysis aff. galbana</i> (clone T-Iso) en nivel Fernbach (2.5 litros).....	17
Tabla II Análisis estadístico con χ^2 , (bondad de ajuste) de los datos de la concentración celular de <i>Isochrysis aff. galbana</i> (clone T-Iso) en nivel Fernbach 2.5 litros, con $\alpha=0.05$, g.l.=7 y con un valor crítico de $\chi^2=14.1$	18
Tabla III Consumo promedio diario de PO_4^{3-} por <i>Isochrysis aff. galbana</i> (clone T-Iso) en nivel Fernbach 2.5 litros	21
Tabla IV Consumo promedio diario de NO_3^- por <i>Isochrysis aff. galbana</i> (clone T-Iso) en nivel Fernbach 2.5 litros	21
Tabla V Concentración promedio de clorofila a y feofitina a por unidad celular de <i>Isochrysis aff. galbana</i> (clone T-Iso) en nivel Fernbach 2.5 litros.....	25
Tabla VI Valores promedio de pH celular de <i>Isochrysis aff. galbana</i> (clone T-Iso) en nivel Fernbach 2.5 litros	25

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Estructura de la fibra óptica mostrando la trayectoria de la luz...	2
Figura 2 Tratamiento 1: Luz Fluorescente.....	8
Figura 3 Tratamiento 2: Luz Fluorescente más luz guiada por fibra óptica	9
Figura 4 Tratamiento 3: Luz guiada por fibra óptica.....	10
Figura 5 Crecimiento promedio de <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (clone T-Iso) en cultivo de 2.5 litros con fibra óptica (Δ), luz fluorescente (\circ) y ambas (\bullet). La barra vertical indica el error estándar. (n=2).....	16
Figura 6 Consumo promedio de fosfato por <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (clone T-Iso) en cultivo de 2.5 litros con fibra óptica y luz fluorescente. La barra vertical indica el error estándar (n=2).....	22
Figura 7 Consumo promedio de nitrato por <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (clone T-Iso) en cultivo de 2.5 litros con fibra óptica y luz fluorescente. La barra vertical indica el error estándar (n=2).....	22
Figura 8 Concentración promedio de clorofila a por unidad de célula de <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (clone T-Iso) en cultivo de 2.5 litros con fibra óptica y luz fluorescente. La barra vertical indica el error estándar (n=2).....	24
Figura 9 Espectros de absorción por tratamiento, normalizados por la concentración de clorofila a de <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (clone T-Iso), en cultivos de 2.5 litros con fibra óptica y luz fluorescente. a_{ϕ}^* (λ): coeficiente específico de absorción del fitoplancton de la clorofila a.....	28
Figura 10 Espectros de absorción por día con cada tratamiento normalizados por la concentración de clorofila a de <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (clone T-Iso), en cultivos de 2.5 litros con fibra óptica y luz fluorescente. a_{ϕ}^* (λ): coeficiente específico de absorción del fitoplancton de la clorofila a.....	29

	Espectros de absorción por tratamiento, de <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (clone T-Iso), en cultivos de 2.5 litros con fibra óptica y luz fluorescente. $a_{\phi}(\lambda)$: coeficiente de absorción del fitoplancton.....	30
Figura 11	Espectros de absorción de <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (clone T-Iso), por día con cada tratamiento en cultivos de 2.5 litros con fibra óptica y luz fluorescente. $a_{\phi}(\lambda)$: coeficiente de absorción del fitoplancton.....	31
Figura 12	Espectros de absorción por tratamiento, de <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (clone T-Iso), en cultivos de 2.5 litros con fibra óptica y luz fluorescente. $a_p(\lambda)$: coeficiente de absorción del material particulado.....	32
Figura 13	Espectros de absorción de <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (clone T-Iso), por día con cada tratamiento en cultivos de 2.5 litros con fibra óptica y luz fluorescente. $a_p(\lambda)$: coeficiente de absorción del material particulado.....	33
Figura 14	Espectros de absorción por tratamiento, de <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (clone T-Iso), en cultivos de 2.5 litros con fibra óptica y luz fluorescente. $a_d(\lambda)$: coeficiente de absorción del material detrítico.....	34
Figura 15	Espectros de absorción de <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (clone T-Iso), por día con cada tratamiento en cultivos de 2.5 litros con fibra óptica y luz fluorescente. $a_d(\lambda)$: coeficiente de absorción del material detrítico.....	35
Figura 16		

1.-INTRODUCCIÓN

La elección apropiada del alimento para la alimentación de organismos utilizados en acuicultura en ocasiones es crítica, ya que una mala elección puede repercutir no solo en el buen desarrollo de los organismos que se cultivan, sino también puede influir en los resultados, costos y calidad del producto.

En el área de acuicultura, el cultivo intensivo de microalgas sigue siendo parte fundamental en la alimentación de larvas, juveniles y/o adultos de moluscos, crustáceos y peces (De Pauw, 1981; Reitan *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 1997 y 1998; Lafarga-De la Cruz, 2000).

Las investigaciones sobre el valor alimenticio de las microalgas y las condiciones de cultivo que limitan y modifican su crecimiento, continuamente se siguen llevando a cabo (Flaak y Epifanio, 1978; Wickfors, 1986; Fabregas *et al.*, 1989; Correa-Reyes, 1993; Lafarga-De la Cruz, 2000).

Para llevar a cabo un cultivo de microalgas, es necesario conocer los aspectos básicos que regulan su crecimiento, tales como la disponibilidad de nutrientes, composición del medio de cultivo, temperatura, salinidad, pH, disponibilidad de CO₂ y luz. Aunque al inicio del cultivo, todos los factores mencionados se encuentran en intervalos óptimos, con el tiempo estos son modificados, lo cual hará que alguno de ellos se convierta en factor limitante, y esto a su vez se verá reflejado en el tiempo de vida del cultivo y en la biomasa celular final.

Uno de los factores que resultan difíciles de mantener es la luz, ya que su disponibilidad puede llegar a limitar la producción primaria tanto en ecosistemas acuáticos (Álvarez-Borrego, 1986) así como, en cultivos de laboratorio, donde la tasa de crecimiento y producción en biomasa son por lo general limitadas por la cantidad de luz (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 1996).

En el agua tanto la irradiancia como la calidad espectral de la luz varían marcadamente con la profundidad, con excepción de los ambientes someros (Álvarez-Borrego, 1986), en donde la luz varía por las altas concentraciones de detritus (Kirk, 1994). En el caso de cultivos en laboratorio, aún cuando se cuenta con un sistema de aireación que permite una exposición de las células a la fuente de luz; esta no llega a ser suficiente por largos periodos de tiempo, debido a que el incremento en la biomasa celular reduce el tiempo de exposición a la luz. Por lo cual, se han implementado sistemas como los fotoreactores o fotobioreactores cuyo principal objetivo ha sido el aumentar la razón área volumen de exposición a la luz por un mayor tiempo.

El diseño de algunos de estos fotoreactores se ha basado en el uso de fibra óptica como difusora de la luz, gracias a que la fibra tiene la capacidad de transmitir la luz de un extremo a otro sin pérdida alguna debido a su estructura (Fig. 1).

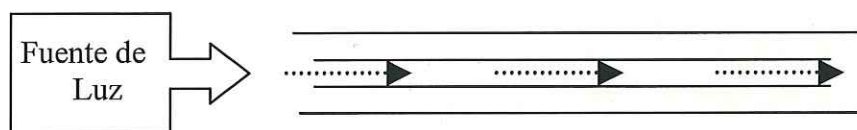


Figura 1.- Estructura de la fibra óptica, mostrando la trayectoria de la luz dentro de esta.

2.-ANTECEDENTES

Takano *et al.* (1992) utilizaron fibra óptica como difusora de la luz en un fotobioreactor con dos medios diferentes para el cultivo de *Synechococcus* sp. Encontraron que el consumo gradual de CO₂ se incrementó aproximadamente cuatro veces, cuando la intensidad de la luz en la superficie de las fibras aumento de 2.5 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 20 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y la biomasa producida aumentó 4.2 veces.

Otro trabajo que presenta el uso de fibras es el realizado por Matsunaga *et al.* (1991) quienes cultivaron *Synechococcus* sp en un reactor biosolar con fibra óptica como difusora de la luz, para la producción de glutamato a partir de CO₂, y encontraron un incremento en la eficiencia de producción de glutamato de 6.72 veces, a partir del uso de fibras comparado con un medio de cultivo tradicional.

Yamada *et al.* (1996) hacen uso de fibra óptica para incrementar la producción de hidrógeno con *Rhodobacter marinus*. La producción de hidrógeno con este tipo de reactor se llevo a cabo con una suspensión de células libres y con células inmovilizadas con gel de alginato directamente en las fibras. Obtuvieron una tasa óptima de producción de hidrogeno de 16.9 $\mu\text{mol/mg (gel)/h}$ a partir de una concentración de células en el gel de 4.5 mg seco (peso/ml) con una irradiancia de 135 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la superficie de la fibra.

Por otro lado la microalga marina *Isochrysis galbana* ha recibido un creciente interés gracias a su alto contenido de ácidos grasos polinsaturados; como el docohexadecanoico (DHA), y los de cadena larga los cuales proveen de energía durante el desarrollo larvario de peces marinos y moluscos bivalvos. Aunque se conoce la importancia de *Isochrysis galbana* como productora de ácidos grasos estos pueden variar significativamente durante las diferentes fases de crecimiento (Emdadi y Berland, 1989; Liu y Lin; 2001) y pueden cambiar con la variación en las condiciones del cultivo, como la concentración de nutrientes, temperatura, salinidad, pH, fotoperíodo, intensidad y calidad de la luz (Yongmanitachai y Ward, 1989; Roessler, 1990; Liu y Lin, 2001).

Zhu, *et al.* (1997) examinaron la composición bioquímica y el contenido de lípidos de *Isochrysis galbana* en la fase exponencial y estacionaria en dos condiciones de temperatura: 15 y 30°C. Afirman que el contenido de carbohidratos y proteínas varía en las dos temperaturas de cultivo y en las fases de crecimiento. El mayor contenido de proteínas y carbohidratos se encontró a los 15°C en las fases exponencial y estacionaria respectivamente. En la fase estacionaria se presentó una acumulación de lípidos, siendo la mayor concentración a los 30°C.

Por otra parte, Saoudi-Helis, *et al.* (1994) con *I. aff galbana* (clone T-Iso) cultivada en un quimiostato, con limitación de nitrógeno, bajo una irradiancia de $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ a 26°C, determinaron los cambios en la composición de

pigmentos, la clase de lípidos y el tipo de ácidos grasos insaturados. Las células analizadas mostraron un bajo contenido de clorofila *a* y carotenoides, y un alto contenido de lípidos neutrales. En contraste con los cultivos con una rápida tasa de crecimiento que produjeron una menor concentración celular, pero un mayor contenido de clorofila *a*, carotenoides y contenido de lípido por célula, siendo lo anterior producto de las deficiencias en nitrógeno más que de luz.

El uso de fibras o de fotobioreactores ha permitido evaluar la composición celular, con resultados positivos. Sin embargo, las condiciones de irradiancia en las cuales se han desarrollado los trabajos experimentales con cianobacterias, muestran que su requerimiento de luz no es comparable de aquellos que necesita el fitoplancton en cultivo.

Por lo tanto, en este trabajo se propone adicionar el uso de fibra óptica modificada para introducir luz al interior de los cultivos con el propósito de disminuir el efecto de auto-sombreado dentro de los mismos. Considerando que habrá cambios significativos en el incremento de la densidad celular en cultivos estáticos de *Isochrysis aff. galbana* (clone T-Iso).

3.-OBJETIVO GENERAL

- Comparar el efecto de la luz fluorescente y la luz guiada por fibra óptica, en cultivos estáticos de *Isochrysis aff galbana* (clone T-Iso).

3.1.-OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el crecimiento y concentración de clorofilas mediante el uso de lámparas fluorescentes y fibra óptica en el interior de cultivos estáticos de *Isochrysis aff galbana* (clone T-Iso).
- Conocer el consumo de nitrato y fosfato en cultivos estáticos de *Isochrysis aff galbana* (clone T-Iso) en condiciones de luz fluorescentes y guiada con fibra óptica.
- Estimar los coeficientes de absorción de *Isochrysis aff galbana* (clone T-Iso) en cultivos estáticos en condiciones de luz fluorescentes y guiada con fibra óptica.

4.-MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.-CULTIVO DE MICROALGAS

Para el desarrollo de este experimento se utilizó la microalga *Isochrysis aff galbana* (clone T-Iso), que se encuentra en el cepario del Instituto de Investigaciones Oceanológicas, a $19 \pm 1^\circ\text{C}$ con medio f/2 de Guillard (1975) el cual fue utilizado como medio control para el desarrollo experimental.

El cultivo inició en matraces Erlenmeyer, para lo cual se prepararon matraces que contenían 150 ml de medio f/2 de Guillard (1975), y se esterilizaron en autoclave durante 15 minutos a 121°C , y 1.05 kg/cm^2 de presión. Posteriormente cada unidad de cultivo se inoculó asépticamente con 2 ml de *Isochrysis aff galbana* (clone T-Iso) mediante el uso de micropipeta eppendorf. El cultivo en este nivel se mantuvo por un tiempo de 7 días, a partir del cual, se continuó en matraces Fernbach; los cuales fueron preparados con 1.850 L de medio f/2 de Guillard (1975), se esterilizaron en autoclave a 121°C , y 1.05 kg/cm^2 de presión por 15 minutos, y asépticamente se inocularon con 150 ml de *Isochrysis aff galbana* (clone T-Iso) obtenido del nivel anterior. En este nivel se diversificaron los cultivos en los tratamientos **T1** (luz fluorescente), **T2** (luz fluorescente más luz guiada con fibra óptica) y **T3** (luz guiada con fibra óptica). (Figuras 2, 3 y 4).

Se utilizó un diseño experimental aleatorio simple, donde todos los tratamientos fueron asignados a tres unidades experimentales. A cada unidad experimental se le aplicó de manera independiente un tratamiento por duplicado.

Las unidades experimentales se mantuvieron en condiciones iniciales similares en cuanto a la composición del medio. El pH en los cultivos fue controlado mediante la adición de CO_2 y la única condición variable fue la luz. En los tres tratamientos se midió la irradiancia, con un irradiómetro Biospherical Instrument Inc., modelo QSL sensor 4π .

La secuencia de cada unidad experimental se describe a continuación:

Diseño Experimental



Figura 2.- Tratamiento 1 : Luz fluorescente. (T1) n=2

Además de la luz fluorescente, se suministró luz al interior de los cultivos, proporcionada con una fuente externa **(A)**.

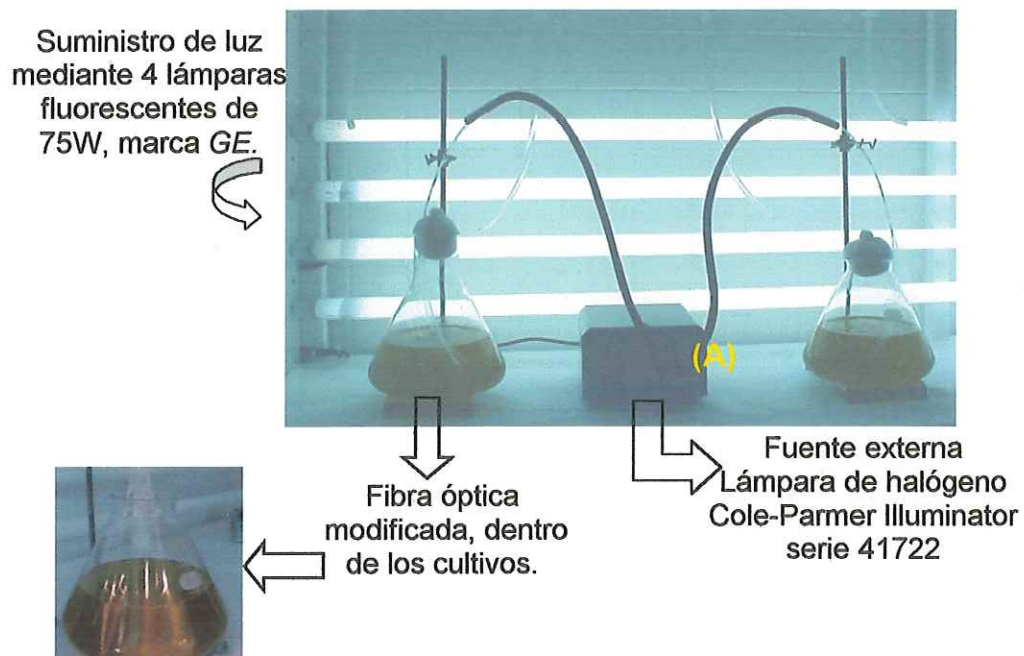


Figura 3.-**Tratamiento 2:** Luz fluorescente + luz guiada con fibra óptica. **(T2)** n=2

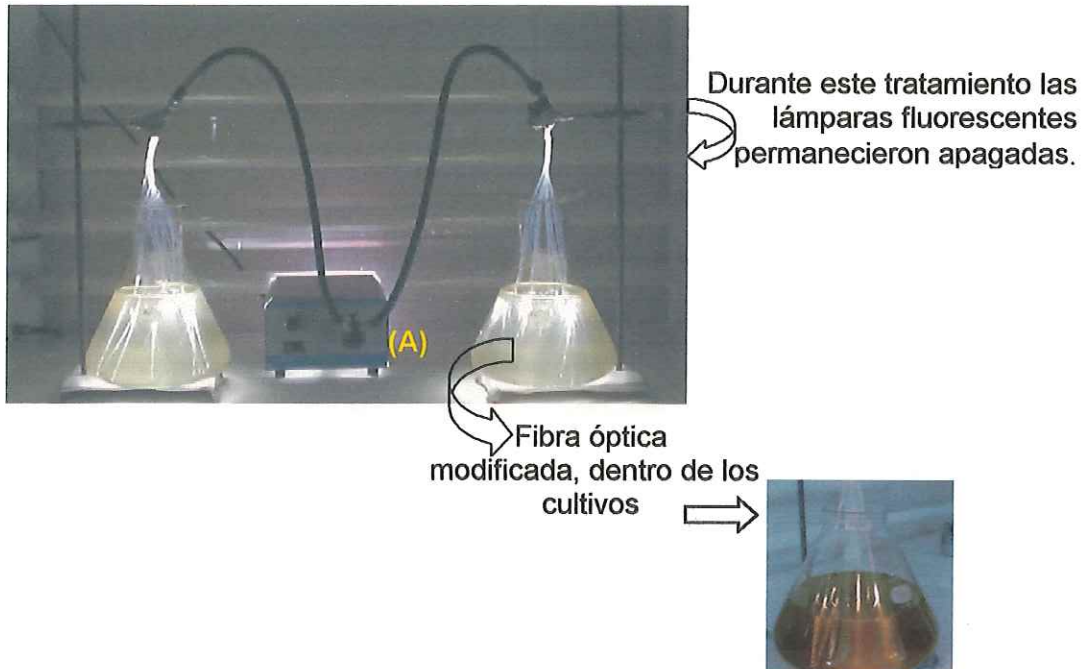


Figura 4.-**Tratamiento 3** : Luz guiada con fibra óptica (**T3**) n=2

En este tratamiento (Fig. 4) los cultivos solo recibieron luz guiada por fibra óptica a partir de una lámpara de halógeno (A) por lo que se realizó aislado de cualquier otro tipo de luz.

De cada tratamiento se realizaron muestreos diarios e independientes de 1 ml, y se cuantificó la densidad celular ($\text{cél ml}^{-1} \times 10^6$), diaria mediante el contador de partículas Beckman Multisizer 3.

4.2.-ANÁLISIS QUÍMICOS

De los cultivos en nivel Fernbach se realizaron muestreos diarios para el análisis de consumo de PO_4^{3-} y NO_3^- , contenido de clorofila y para los espectros de absorción se realizaron muestreos los días 1, 3, 5 y 7 para los tres tratamientos.

De cada unidad experimental se filtró un volumen diario de 8 ml a través de filtros GF/F de 25 mm de diámetro para pigmentos y espectros de absorción.

Todos los filtros fueron almacenados en un contenedor con nitrógeno líquido al igual que los filtros para análisis de pigmentos.

El agua de filtrado se recolectó para análisis de nutrientes en recipientes de vidrio de 10 ml aproximadamente, después del filtrado y recolección de la muestra, los recipientes fueron almacenados en un ultracongelador a -40°C .

Para el análisis de clorofilas se obtuvieron los extractos pigmentarios de *Isochrysis aff galbana* (clone T-Iso) en acetona, centrifugando a $1190 \times g$ por 10 minutos de acuerdo a la metodología descrita por Parsons *et al.* (1985) y se realizaron lecturas de absorbancia contra longitud de onda en un espectrofotómetro Beckman Coulter DU 530. Los espectros de absorción se obtuvieron realizando un barrido de los 400 a 750 nanómetros, con incrementos de 1 nm, en un espectrofotómetro Perking Elmer Lambda 10, equipado con una esfera integradora, obteniendo los datos de los coeficientes de absorción del material particulado $a_p(\lambda)$, el coeficiente de absorción del detritus $a_d(\lambda)$, el coeficiente de absorción del fitoplancton ($a_\phi(\lambda)$), y el coeficiente específico de

absorción del fitoplancton ($a_{\phi}^*(\lambda)$) este último, con la concentración de clorofila a , utilizando el método QFT descrito por Mitchell (1990).

Para los análisis de fosfato y nitrato se utilizaron los procedimientos descritos por Parsons *et al.* (1985). Previo a los análisis se realizaron curvas de calibración para ambos compuestos de acuerdo a las metodologías citadas.

4.3.-TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Con los datos de concentración celular obtenidos de los tres tratamientos se realizó una Prueba de bondad de ajuste χ^2 , al 95 % de confianza, utilizando los datos expresados exponencialmente (1×10^5).

5.-RESULTADOS

Entre las variables que modifican el crecimiento de *Isochrysis. aff galbana* (clone T-Iso) se encuentra el pH, el cual fue controlado mediante la adición de dióxido de carbono a razón de 2.5 L min.^{-1} , flujo determinado con un ensayo previo, con el fin de evitar variaciones fuera del intervalo óptimo (7.7-8.5), obteniendo que durante el desarrollo experimental, los valores de pH permanecieron en promedio dentro del intervalo óptimo antes mencionado para el crecimiento de *I. aff. galbana* (clone T-Iso) (Tabla VI). Para el tratamiento control el pH se mantuvo en 8.14 ± 0.23 , 7.62 ± 0.12 con fibra óptica y en el tratamiento con luz fluorescente y guiada por fibra óptica en 7.97 ± 0.15 .

La irradiancia de trabajo fue de $150 \mu\text{M quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, para los tres tratamientos durante el tiempo de cultivo. Sin embargo en el interior de los cultivos dicha irradiancia disminuyó por el aumento en la concentración celular, teniendo irradiancias finales en el interior de los cultivos de 45.16, 36.76, y $15.72 \mu\text{M quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ T1, T2 y T3 respectivamente (figura 2,3 y 4).

5.1.-CRECIMIENTO MICROALGAL.

Los resultados del crecimiento y parámetros poblacionales de *Isochrysis aff galbana* (clone T-Iso) bajo condiciones de iluminación con luz fluorescente (control), fibra óptica, y el uso de ambas se muestran en la figura 5, Tabla I, los parámetros poblacionales se determinaron de acuerdo las ecuaciones descritas por Guillard (1973):

Tasa de crecimiento específica “μ”

$$\mu = \frac{\text{Ln}C_2 - \text{Ln}C_1}{t_2 - t_1}$$

C_2 = Concentración celular promedio en t_2
 C_1 = Concentración celular promedio en t_1
 t_1 y t_2 = Tiempo inicial y final (días).

Divisiones por día “D”

$$D = \frac{\mu}{\text{Ln}2}$$

Tiempo de duplicación “TD”

$$TD = \frac{1}{D}$$

Producción diaria “PD”

La producción diaria se obtuvo de la diferencia en concentración celular inicial y final respecto al tiempo t_1 y t_2 .

Al inicio del cultivo los tres tratamientos presentan una concentración similar, cuyo promedio es 7.69×10^5 cél ml⁻¹, permaneciendo sin cambios significativos en el crecimiento durante las primeras 24 horas. Después de este tiempo se observan variaciones en la concentración celular en los tres tratamientos. Estas variaciones también se indican en la Tabla IA y IC, donde los tratamientos fibra óptica con luz fluorescente y luz fluorescente (control), presentaron la mayor tasa de crecimiento específico promedio de 0.33 y 0.31 días, respectivamente.

Mientras que en el tratamiento solo con fibra óptica T3, el valor fue de 0.14 días. De igual forma este tratamiento presentó el mayor tiempo de duplicación promedio (TD), 6.26 días, en comparación con los tratamientos con fibra y luz, y luz fluorescente, cuyos valores de TD son menores (2.72 y 2.64 días) y las divisiones por día mayores; 0.48 y 0.45 div x día⁻¹ respectivamente (Tabla I).

Asimismo el mayor valor porcentual de producción diaria se observó a las 48 horas en el tratamiento con fibra óptica y luz fluorescente: 82% y en el tratamiento con luz fluorescente (control): 75%. A diferencia del tratamiento con fibra óptica, el cual presentó valores porcentuales menores; 40%.

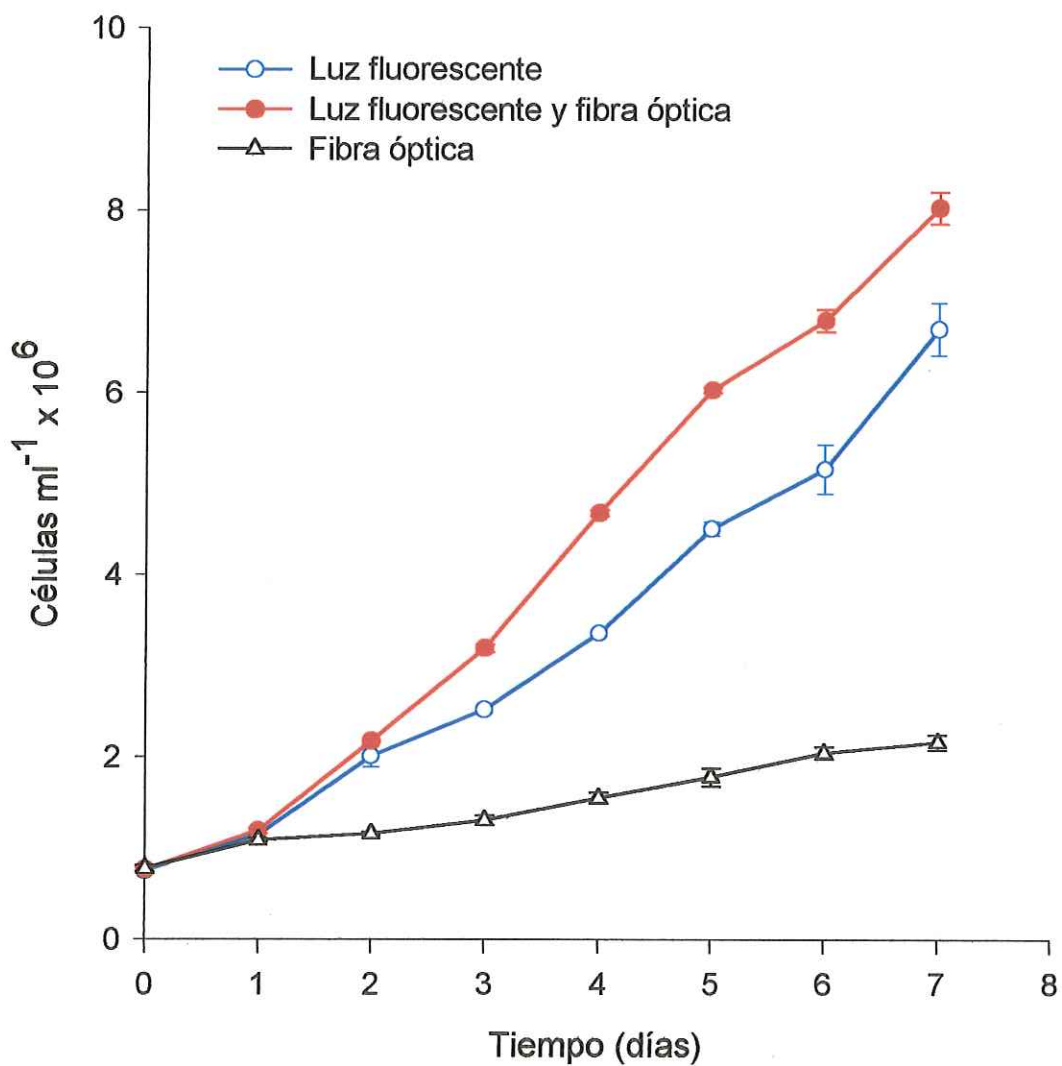


Figura 5.- Crecimiento promedio de *Isochrysis aff. galbana* (clone T-Iso) en cultivo de 2.5 litros con fibra óptica (Δ), luz fluorescente (\circ) y ambas (\bullet). La barra vertical indica el error estándar. (n=2)

Tabla I. Parámetros poblacionales promedio de *Isochrysis aff. galbana* (clone T-Iso) en nivel Fernbach (2.5 litros).

Tratamiento con luz fluorescente (A)						
Tiempo (días)	Concentración (cél ml ⁻¹)	μ (días)	TD (días)	D (div día ⁻¹)	PD (cél ml ⁻¹)	VP (%)
0	756050	---	---	---	---	---
1	1152600	0.42	1.64	0.61	396550	52.45
2	2015450	0.56	1.24	0.81	862850	74.86
3	2525650	0.23	3.07	0.33	510200	25.31
4	3362750	0.29	2.42	0.41	837100	33.14
5	4511350	0.29	2.36	0.42	1148600	34.16
6	5167350	0.14	5.11	0.20	556000	12.32
7	6708350	0.26	2.66	0.38	1541000	29.82
Promedio		0.3129	2.643	0.45	---	---

Tratamiento con fibra óptica (B)						
Tiempo (días)	Concentración (cél ml ⁻¹)	μ (días)	TD (días)	D (div día ⁻¹)	PD (cél ml ⁻¹)	VP (%)
0	778550	---	---	---	---	---
1	1088800	0.33	0.897	1.11	310250	39.85
2	1161150	0.064	10.77	0.09	72350	6.645
3	1308500	0.119	5.80	0.17	147350	12.70
4	1552900	0.171	4.04	0.24	24400	18.68
5	1783350	0.138	5.01	0.19	230450	14.84
6	2050600	0.14	4.96	0.20	267250	14.98
7	2168950	0.056	12.35	0.08	118350	5.77
Promedio		0.1464	6.2640	0.30	---	---

Tratamiento con luz fluorescente y fibra óptica(C)						
Tiempo (días)	Concentración (cél ml ⁻¹)	μ (días)	TD (días)	D (div día ⁻¹)	PD (cél ml ⁻¹)	VP (%)
0	772550	---	---	---	---	---
1	1197100	0.44	1.58	0.63	424550	54.95
2	2179900	0.60	1.16	0.86	982800	82.10
3	3201500	0.38	1.80	0.55	1021600	46.86
4	4687100	0.38	1.80	0.55	1485600	46.40
5	6036400	0.25	2.74	0.36	1349300	28.79
6	6801700	0.12	5.81	0.17	765300	12.68
7	8041700	0.17	4.14	0.24	1240000	18.23
Promedio		0.3343	2.7186	0.48	---	---

Tabla II.- Análisis estadístico con X^2 , (bondad de ajuste) de los datos de la concentración celular de *Isochrysis aff. galbana* (clone T-Iso) en nivel Fernbach 2.5 litros, con $\alpha=0.05$, g.l.=7 y con un valor crítico de $X^2 = 14.1$.

Tratamientos	X^2 calculada	Decisión
Luz fluorescente vs. Luz fluorescente y guiada por fibra óptica	20.153	Son diferentes
Luz fluorescente vs Fibra óptica	222.86	Son diferentes
Luz fluorescente y guiada por fibra óptica vs. Fibra óptica	470.21	Son diferentes

Criterio de decisión: $X^2_{calculada} > X^2_{crítica}$, los tratamientos son diferentes.

5.2.-CONSUMO DE NUTRIENTES

El fosfato residual en el medio de cultivo y su consumo por *Isochrysis aff. galbana* (clone T-Iso) durante los siete días de cultivo, para cada unidad experimental se presentan en la figura 6, Tabla III respectivamente. Los resultados obtenidos indican que el mayor consumo de fosfato se presenta en el tercer y cuarto día para los tres tratamientos, lo cual se relaciona directamente con la fase de crecimiento exponencial en el tratamiento control y con el de ambas fuentes de luz. En respuesta al incremento en la densidad celular, el cultivo en luz fluorescente y fibra óptica inició su consumo al tercer día, que correspondió a $21.3 \mu\text{M}$ y tasa de crecimiento de 0.38 día^{-1} .

Los tratamientos, luz fluorescente (control) y fibra óptica iniciaron el consumo de fosfato al cuarto día: $25.5 \mu\text{M}$ y $\mu=0.29 \text{ días}^{-1}$; $22.5 \mu\text{M}$ y $\mu=0.17 \text{ días}^{-1}$ respectivamente.

El consumo y concentración del nitrógeno; en forma de nitrato se encuentra en la Tabla IV, figura 7. El nitrógeno fue consumido durante los siete días. Siendo diferente el consumo entre tratamientos a partir del día 2, coincidiendo con el aumento en la producción de biomasa en una relación inversa entre la concentración residual y el crecimiento del cultivo.

El mayor consumo de nitrógeno se observó en el tratamiento con fibra óptica: $180.8 \mu\text{M}$ el cual tuvo su mayor producción diaria $\text{PD}=1.18 \times 10^5 \text{ cél ml}^{-1}$ en el séptimo día, el menor consumo: $7.3 \mu\text{M}$ se presentó al cuarto día.

Este comportamiento fue similar en el tratamiento con luz fluorescente el cual presentó un mayor consumo de nitrógeno $176 \mu\text{M}$ y $\text{PD}=1.54 \times 10^5 \text{ cél ml}^{-1}$ en el séptimo día y el menor consumo: $50 \mu\text{M}$, se presentó al tercer día (Tabla IA, IC).

Para el tratamiento con fibra óptica y luz fluorescente el mayor consumo se registró en el quinto día $172.3 \mu\text{M}$; al final de la fase exponencial y un menor consumo: $74 \mu\text{M}$ al séptimo día, que corresponde a la fase de crecimiento estacionario en este cultivo.

Tabla III. Consumo promedio diario de PO_4^{3-} por *Isochrysis aff. galbana* (clone T-Iso) en nivel Fernbach 2.5 litros.

Tratamiento	Luz fluorescente		Luz guiada por fibra óptica		Luz fluorescente y luz guiada por fibra óptica	
	Fosfato Residual (μM)	Consumo Fosfato (μM)	Fosfato Residual (μM)	Consumo Fosfato (μM)	Fosfato Residual (μM)	Consumo Fosfato (μM)
1	50.3797	---	50.0630	---	50.0630	---
2	50.0630	0.3167	50.0630	---	50.0630	---
3	50.0630	---	50.0630	---	28.1354	21.9271
4	24.5207	25.5423	27.5661	22.4969	23.3025	4.8334
5	24.5207	---	24.5207	3.0454	22.0844	1.2181
6	18.7465	5.7742	23.3025	1.2182	16.9193	5.1651
7	17.5283	1.2182	19.9647	3.3378	16.9193	---

Tabla IV. Consumo promedio diario de NO_3^- por *Isochrysis aff. galbana* (clone T-Iso) en nivel Fernbach 2.5 litros.

Tratamiento	Luz fluorescente		Luz guiada por fibra óptica		Luz fluorescente y luz guiada por fibra óptica	
	Nitrato residual (μM)	Consumo Nitrato (μM)	Nitrato residual (μM)	Consumo Nitrato (μM)	Nitrato residual (μM)	Consumo Nitrato (μM)
1	1164.2431	---	1215.2185	---	1149.6787	---
2	1061.0786	103.1645	1142.3965	72.8220	1069.5745	80.1042
3	1011.3169	49.7617	1132.6869	9.7096	909.3661	160.2084
4	865.6729	145.6440	1125.4047	7.2822	804.9879	104.3782
5	749.1577	116.5152	1047.7279	77.6768	632.6425	172.3454
6	687.2590	61.8987	997.9662	49.7617	524.6232	108.0193
7	511.2725	175.9865	817.1249	180.8413	450.5875	74.0357

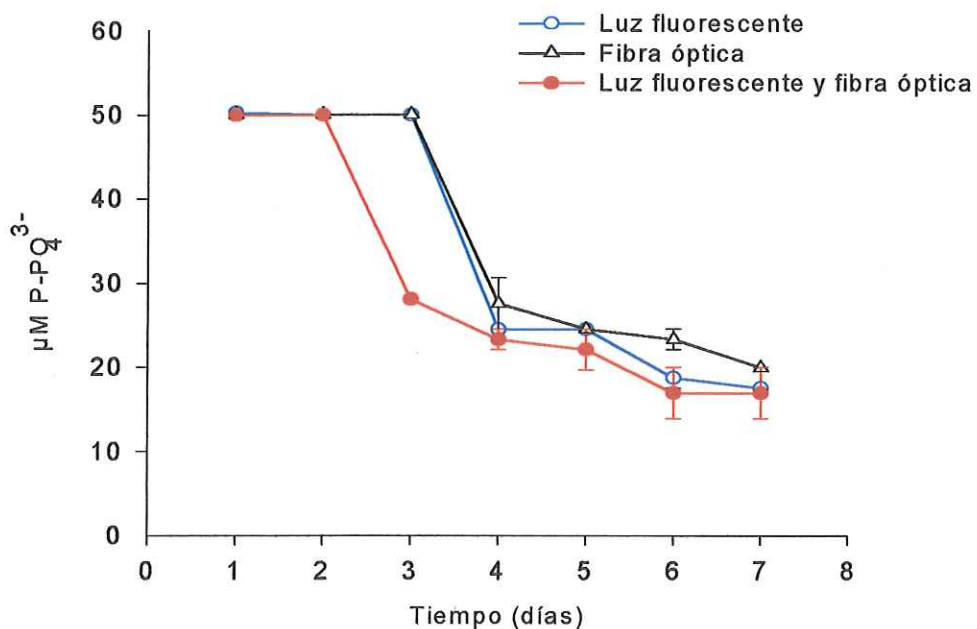


Figura 6.- Consumo promedio de fosfato por *Isochrysis aff. galbana* (clone T-Iso) en cultivo de 2.5 litros con fibra óptica y luz fluorescente. La barra vertical indica el error estándar (n=2)

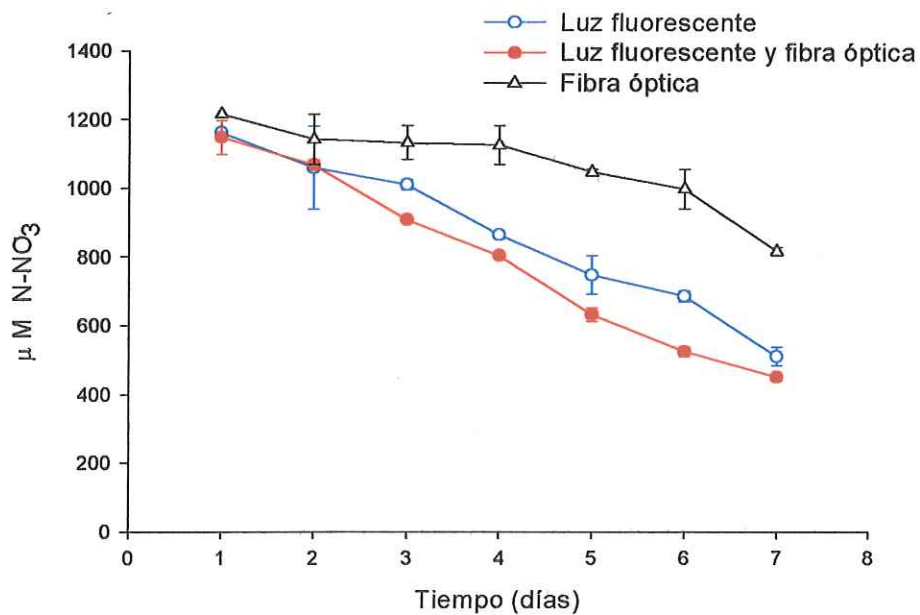


Figura 7.- Consumo promedio de nitrato por *Isochrysis aff. galbana* (clone T-Iso) en cultivo de 2.5 litros con fibra óptica y luz fluorescente. La barra vertical indica el error estándar (n=2)

5.3.-CONTENIDO DE PIGMENTOS

5.3.1.-CLOROFILA *a*

La concentración de clorofila *a* por unidad celular de *Isochrysis* aff. *galbana* (clone T-Iso) para cada tratamiento se encuentra en la Tabla V y figura 8.

Isochrysis aff. *galbana* (clone T-Iso), respondió a la disminución en irradiancia, incrementando el contenido de clorofila por célula (Tabla V). El contenido de clorofila en células que crecieron en luz guiada por fibra óptica fue mayor que aquellas células que crecieron en luz fluorescente y luz fluorescente más la fibra óptica.

El mayor contenido de clorofila *a* entre tratamientos se observó al séptimo día de cultivo, en el tratamiento de luz guiada por fibra óptica; 0.52 pg cél^{-1} y para ese mismo tratamiento, pero en el primer día de muestro se encontró el menor valor; 0.18 pg cél^{-1} . En el tratamiento con luz fluorescente, el mayor contenido de clorofila *a* por célula se alcanzó al cuarto día, 0.34 pg cél^{-1} , mientras que una menor concentración se registró en el primer día 0.22 pg cél^{-1} .

En el caso del tratamiento con luz más fibra óptica los valores encontrados son 0.19 y 0.36 pg cél^{-1} para el primer y segundo día respectivamente.

Se registró una baja concentración de feofitina *a* (Tabla V) por unidad celular al cuarto día en el tratamiento con luz fluorescente: $5.23 \times 10^{-4} \text{ pg cél}^{-1}$ que coincide con su máximo de contenido de clorofila *a*; sin embargo en este tratamiento en el primer día se encontró una concentración de feofitina *a* de $0.018 \text{ pg cél}^{-1}$ y en el tratamiento de luz guiada por fibra óptica una concentración de $0.1074 \text{ pg cél}^{-1}$ al quinto día.

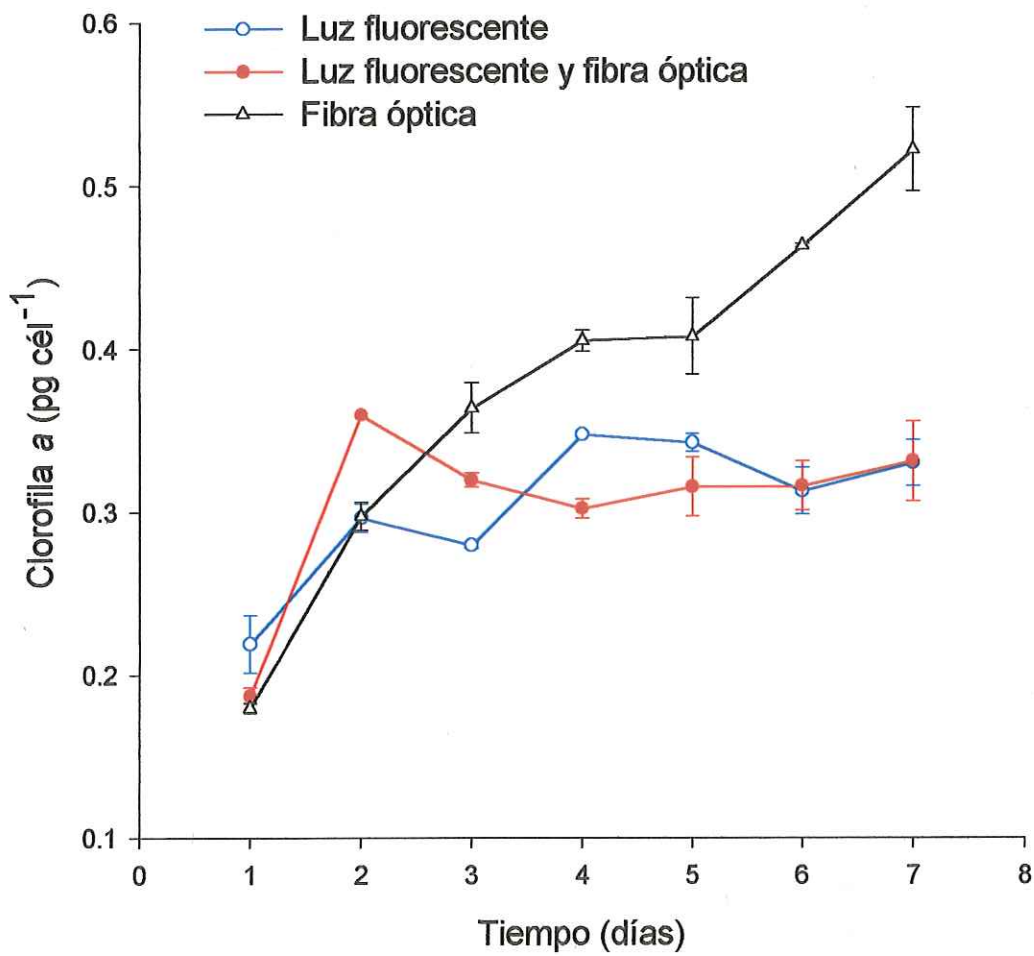


Figura 8.- Concentración promedio de clorofila a por unidad de célula de *Isochrysis aff. galbana* (clone T-Iso) en cultivo de 2.5 litros con fibra óptica y luz fluorescente. La barra vertical indica el error estándar (n=2)

Tabla V. Concentración promedio de clorofila *a* por unidad celular de *Isochrysis aff. galbana* (clone T-Iso) en nivel Fernbach 2.5 litros.

Tratamiento	Luz fluorescente		Luz fluorescente y luz guiada por fibra óptica		Luz guiada por fibra óptica	
	Clorofila <i>a</i> pg cél ⁻¹	Feofitina <i>a</i> pg cél ⁻¹	Clorofila <i>a</i> pg cél ⁻¹	Feofitina <i>a</i> pg cél ⁻¹	Clorofila <i>a</i> pg cél ⁻¹	Feofitina <i>a</i> pg cél ⁻¹
Tiempo (días)						
1	0.2195	0.0184	0.1878	---	0.1798	---
2	0.2967	0.0037	0.3634	0.0012	0.2976	0.0122
3	0.2799	---	0.3197	0.0197	0.3638	---
4	0.3478	0.000523	0.3022	0.0032	0.4051	---
5	0.3425	---	0.3154	---	0.4077	0.1074
6	0.3129	0.0068	0.3161	---	0.4633	---
7	0.3301	---	0.3311	---	0.5221	---

Tabla VI. Valores promedio de pH de *Isochrysis aff. galbana* (clone T-Iso) en nivel Fernbach 2.5 litros.

Tratamiento	Luz fluorescente		Luz fluorescente y fibra óptica	
	Luz fluorescente	Luz guiada por fibra óptica	Luz fluorescente y fibra óptica	Luz guiada por fibra óptica
Tiempo (días)	pH	pH	pH	pH
1	---	---	---	7.75
2	---	---	---	7.63
3	8.25	8.10	8.10	7.75
4	8.03	7.90	7.90	7.40
5	8.25	8.05	8.05	7.55
6	8.40	8.10	8.10	7.65
7	7.75	7.30	7.30	7.63
Promedio	8.14 ± 0.23	7.97 ± 0.15	7.97 ± 0.15	7.62 ± 0.12

5.3.2.-ESPECTROS DE ABSORCIÓN

La forma básica de los espectros de absorción de cualquier tipo de alga es el reflejo de su composición de pigmentos, la cual varía en condiciones de irradiancia diferentes. Las figuras 9 a la 16 reflejan el contenido de pigmentos de *I. aff. galbana* (clone T-Iso) en los diferentes tratamientos. Los resultados encontrados de los coeficientes de absorción de: a_{ϕ}^* (λ) (fitoplancton específico de la clorofila), a_{ϕ} (λ) (fitoplancton), a_p (λ) (material particulado), y a_d (λ) (material detrítico) de *Isochrysis aff. galbana* (clone T-Iso), y espectros de absorción se muestran por tratamiento y por día.

En los espectros se observó un incremento en los coeficientes de absorción durante el tiempo de cultivo en los tres tratamientos, con dos máximos de absorción; uno entre los 430-440 nm y otro entre los 650-670 nm. En los espectros del material detrítico solo se observó un máximo entre los 410-420 nm. Los mayores coeficientes se observaron en el tratamiento de luz fluorescente más fibra óptica (T2) y en el control (T1), luz fluorescente. Entre los 650-670 nm se observan valores de absorción similares en estos dos tratamientos. Este comportamiento se observó con el coeficiente específico de absorción para los tres tratamientos.

Dado que a_{ϕ} (λ) es obtenido a partir de la diferencia entre a_p (λ) - a_d (λ), las diferencias observadas entre los espectros del material particulado a_p (λ), y del fitoplancton a_{ϕ} (λ) son mínimas, por el bajo coeficiente obtenido a partir del material detrítico a_d (λ).

La mayor variación de los espectros entre tratamientos se observan en la región azul del espectro, aproximadamente entre los 430-450 nm, en donde se muestran los máximos de absorción de los pigmentos accesorios, que en el caso de *Isochrysis* aff. *galbana* (clone T-Iso) son carotenos, los cuales se hacen más evidentes debido a que la escala es menor en el tratamiento con fibra óptica (T3) (figura 9 y 10) sin embargo presenta un máximo de absorción por clorofila *a* al igual que en T1 y T2 a 676 nm. En el caso de T1 y T2 a los 400-445 nm aproximadamente presentan un máximo de absorción por clorofila *a*.

La determinación de la feofitina; además de indicar el estatus fisiológico de la célula, también indica el contenido detrital de la población (Ríos-Leal, *et al.* 1994). Lo cual explica los bajos coeficientes de absorción del material detrítico (figura 15-16), pues las concentraciones de feofitinas encontradas en los tres tratamientos, son mínimas.

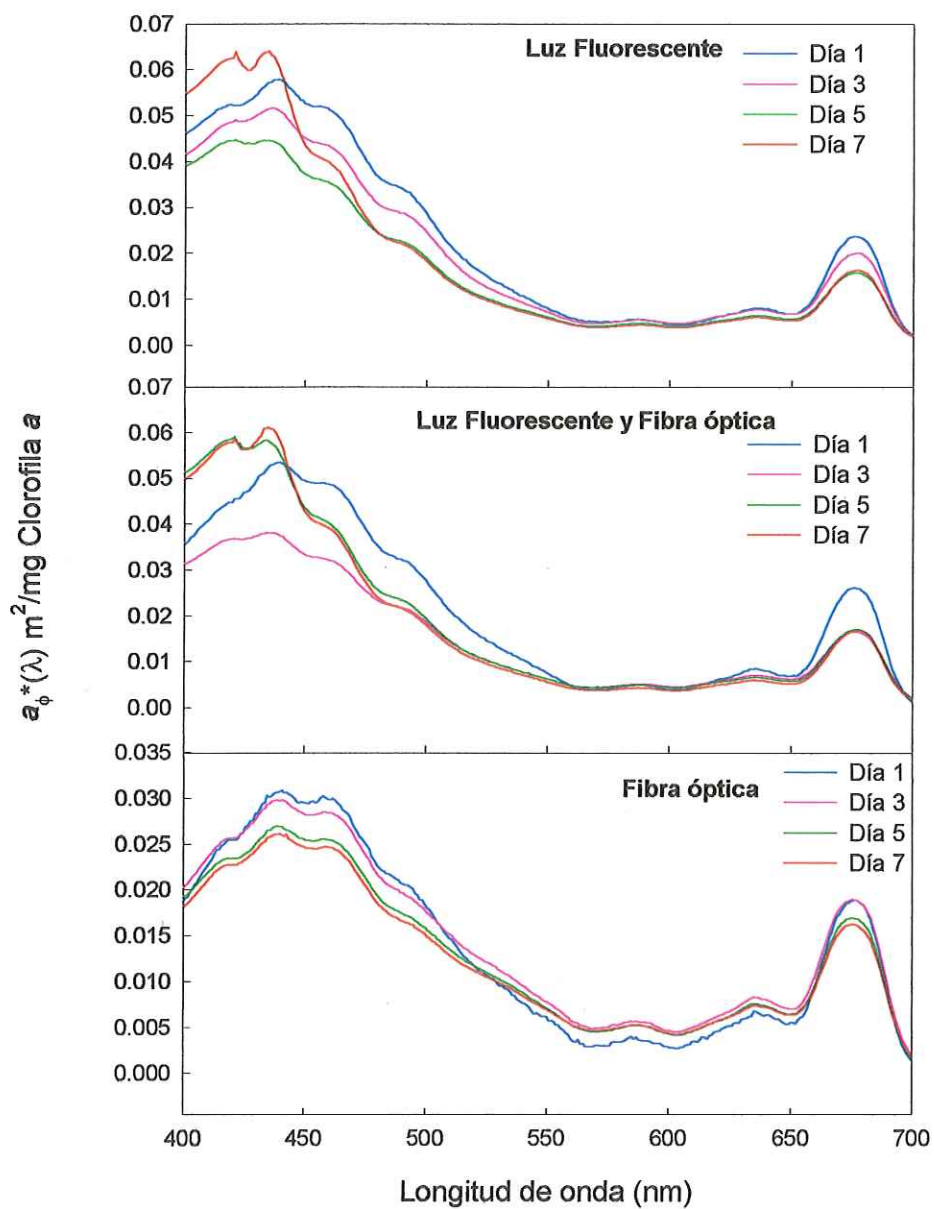


Figura 9.- Espectros de absorción por tratamiento, normalizados por la concentración de clorofila *a* de *Isochrysis aff. galbana* (clone T-Iso), en cultivos de 2.5 litros con fibra óptica y luz fluorescente.

$a_p^*(\lambda)$: coeficiente específico de absorción del fitoplancton de la clorofila *a*.

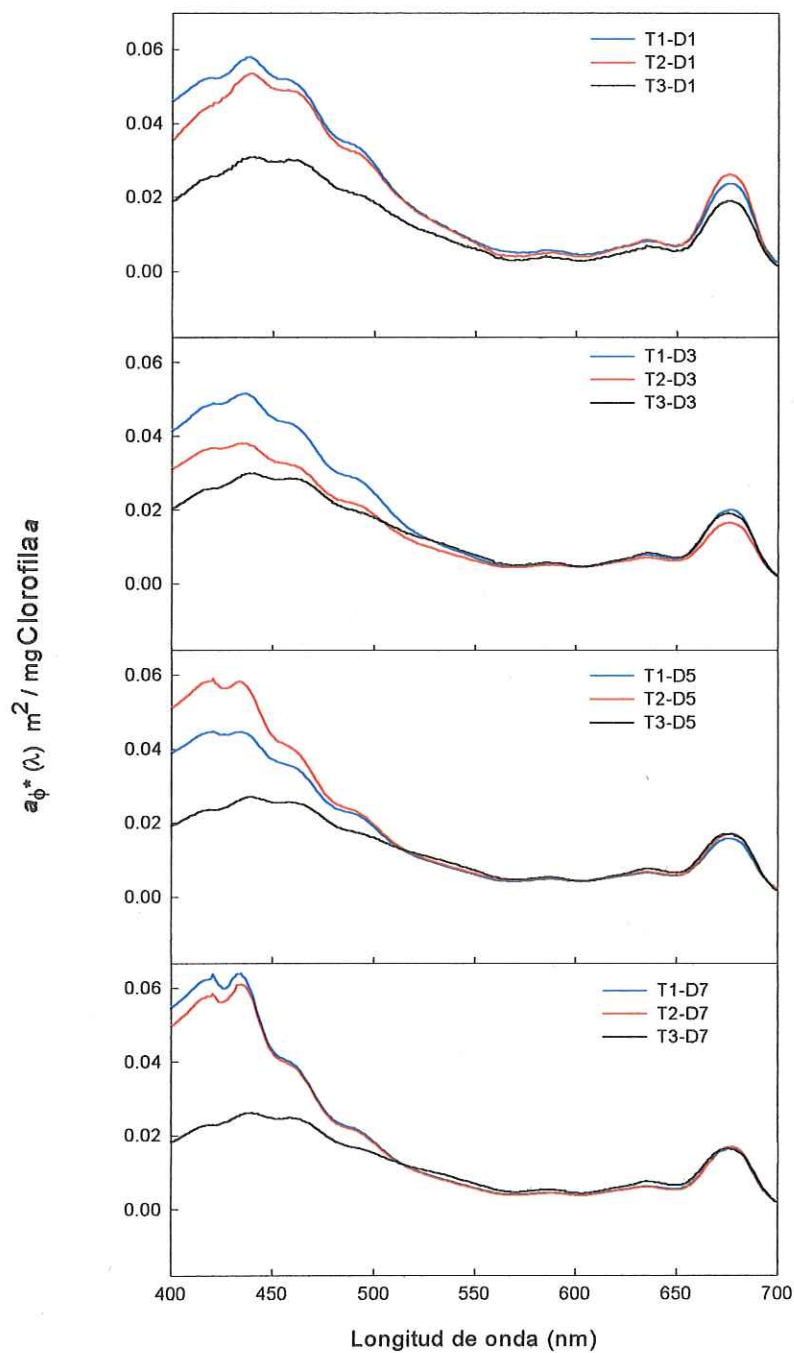


Figura 10.- Espectros de absorción por día con cada tratamiento normalizados por la concentración de clorofila *a* de *Isochrysis aff. galbana* (clone T-Iso), en cultivos de 2.5 litros con fibra óptica y luz fluorescente.

$a_p^*(\lambda)$: coeficiente específico de absorción del fitoplancton de la clorofila *a*.

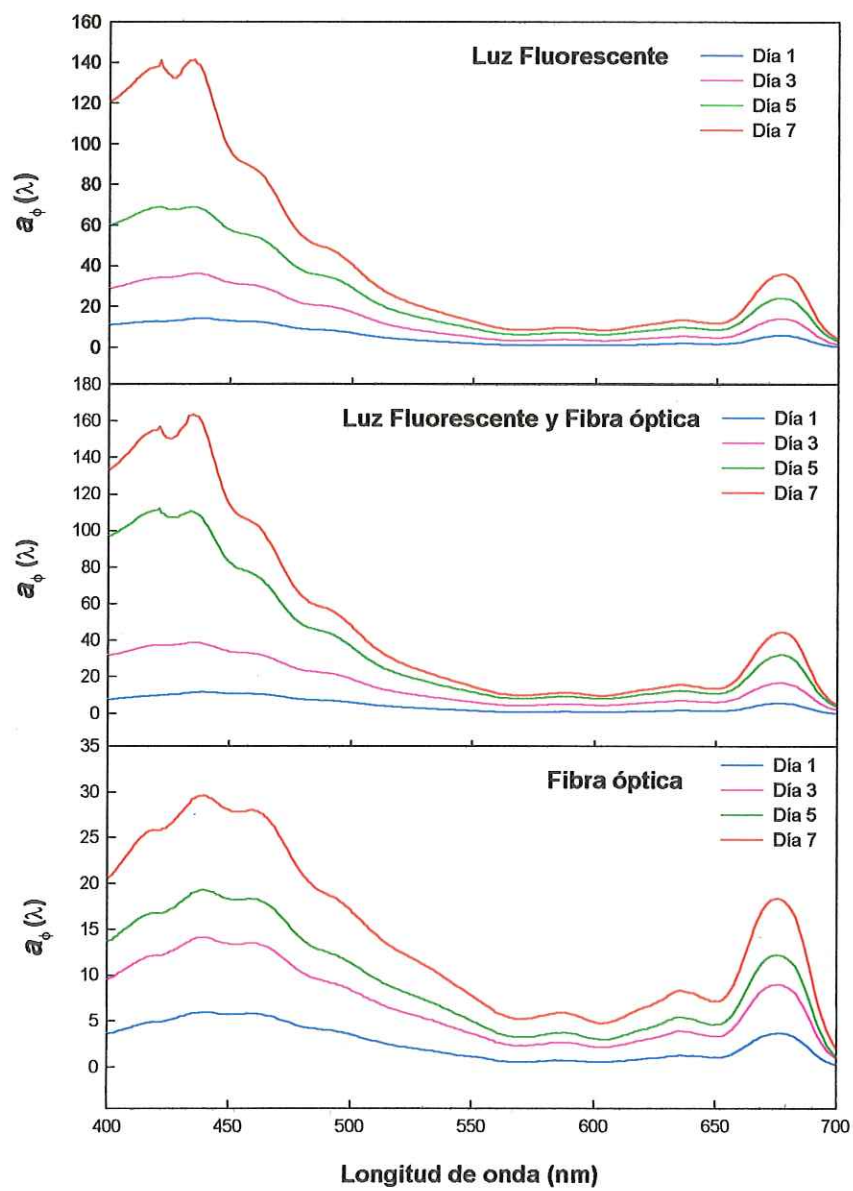


Figura 11.- Espectros de absorción por tratamiento, de *Isochrysis aff. galbana* (clone T-Iso), en cultivos de 2.5 litros con fibra óptica y luz fluorescente.

$a_p(\lambda)$: coeficiente de absorción del fitoplancton.

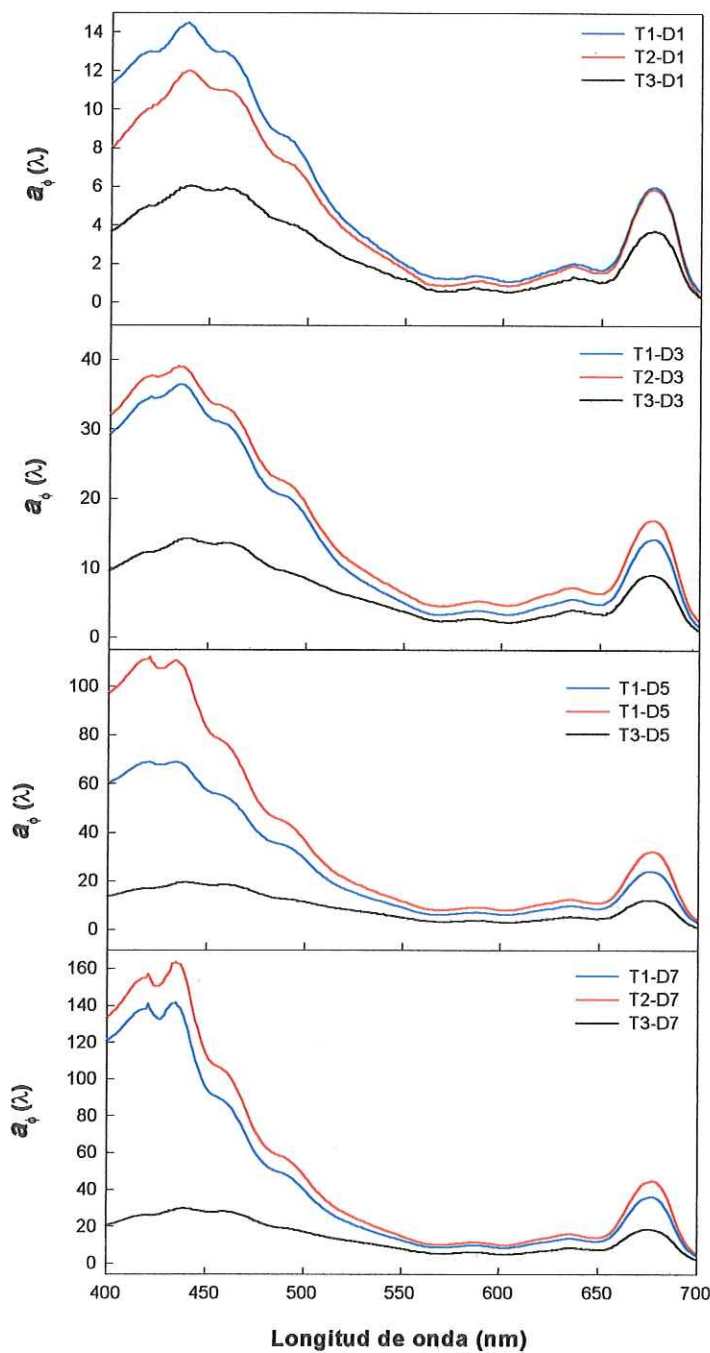


Figura 12.- Espectros de absorción de *Isochrysis aff. galbana* (clone T-Iso), por día con cada tratamiento en cultivos de 2.5 litros con fibra óptica y luz fluorescente. $a_p(\lambda)$: coeficiente de absorción del fitoplancton

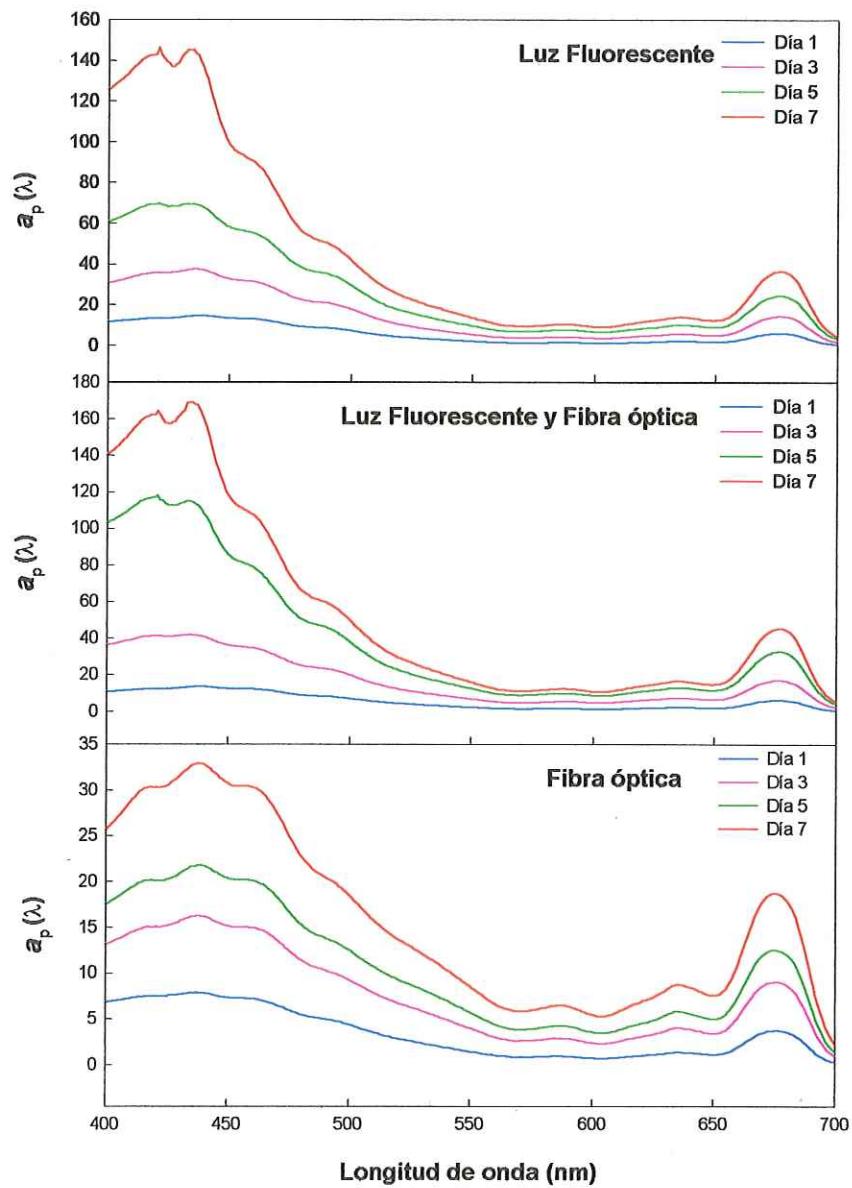


Figura 13.- Espectros de absorción por tratamiento, de *Isochrysis aff. galbana* (clone T-Iso), en cultivos de 2.5 litros con fibra óptica y luz fluorescente.

$a_p(\lambda)$: coeficiente de absorción del material particulado.

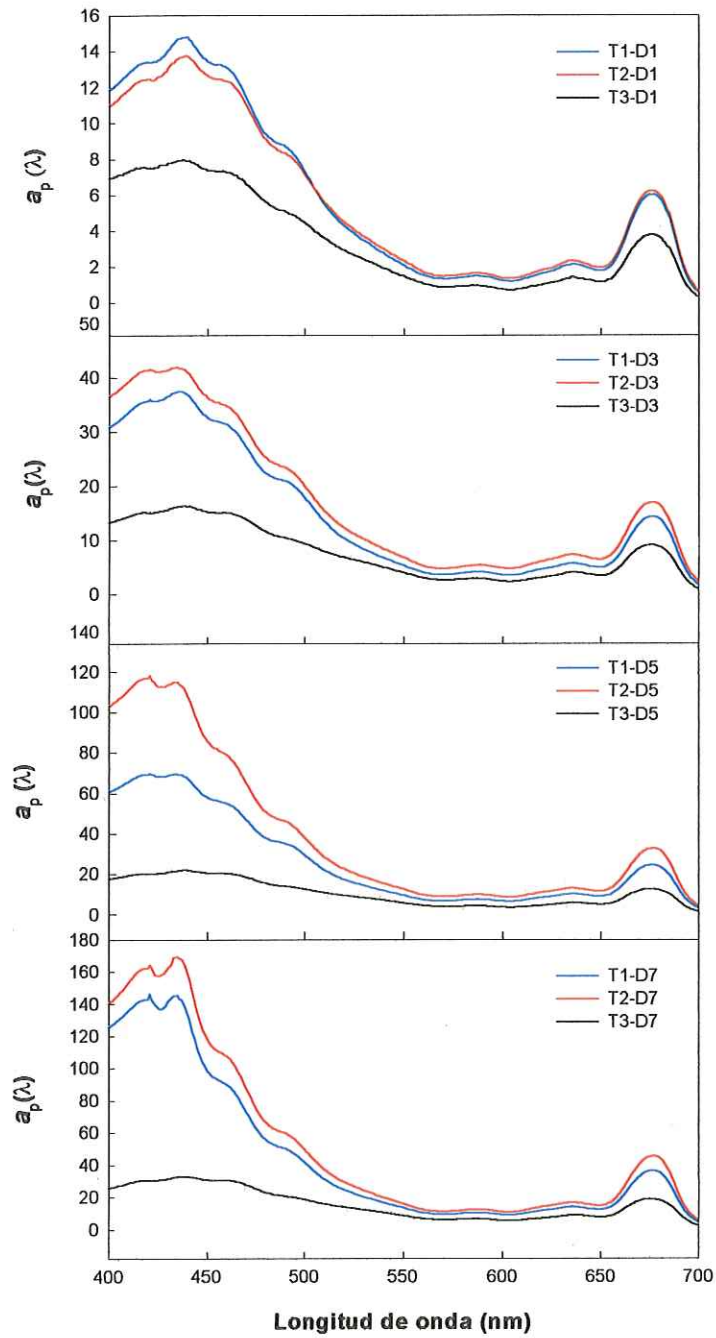


Figura 14.- Espectros de absorción de *Isochrysis aff. galbana* (clone T-Iso), por día con cada tratamiento en cultivos de 2.5 litros con fibra óptica y luz fluorescente. $a_p(\lambda)$: coeficiente de absorción del material particulado.

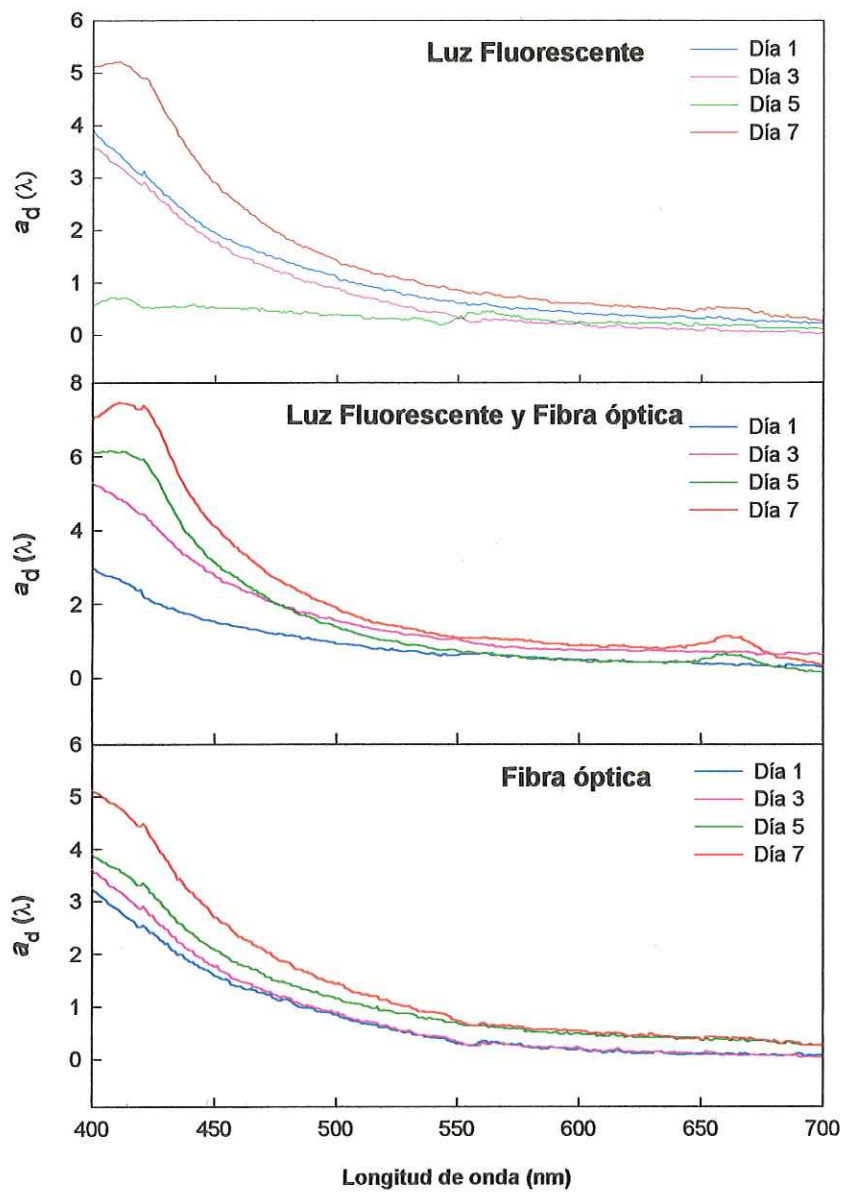


Figura 15.- Espectros de absorción por tratamiento, de *Isochrysis aff. galbana* (clone T-Iso), en cultivos de 2.5 litros con fibra óptica y luz fluorescente.

$a_d(\lambda)$: coeficiente de absorción del material detrítico.

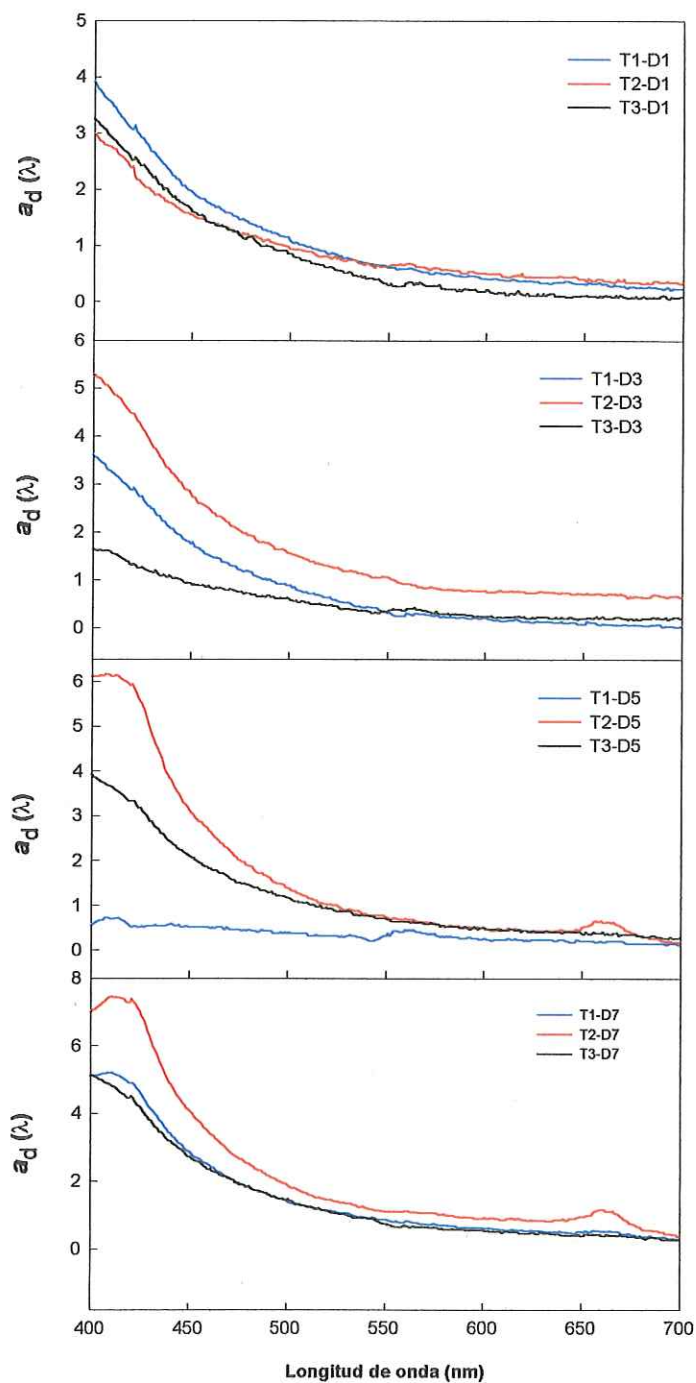


Figura 16.- Espectros de absorción de *Isochrysis aff. galbana* (clone T-Iso), por día con cada tratamiento en cultivos de 2.5 litros con fibra óptica y luz fluorescente. $a_d(\lambda)$: coeficiente de absorción del material detrítico.

6.-DISCUSIÓN

Los factores que modifican el crecimiento de *Isochrysis aff. galbana* (clone T-Iso) son: temperatura, salinidad, composición del medio de cultivo, pH y luz.

En este estudio las tres primeras permanecieron constantes, mientras que el pH y la luz fueron modificadas con el crecimiento de *I. aff. galbana* (clone T-Iso).

El pH en el cultivo cambió debido a la remoción de dióxido de carbono producto del incremento en el número de células en el cultivo, como consecuencia del cambio en la concentración de CO₂ se afectan la tasa de crecimiento, la asimilación de los nutrientes y la producción final de la biomasa microalgal (Hinga, 2002). Otro factor importante es la luz, ya que su disponibilidad al interior del cultivo modifica el contenido de clorofila *a*, y la actividad fotosintética y una reducción substancial en luz también modifica la tasa de crecimiento de *I. aff. galbana* (clone T-Iso) (Strzepek y Price, 2000).

Aunque la variación en más de una produce interrelaciones en la respuesta microalgal, los cambios en el pH y la luz, dependiendo de las características del cultivo son los principales factores que modifican el crecimiento de *I. aff. galbana* (clone T-Iso).

6.1.-CRECIMIENTO MICROALGAL

Las diferencias en la concentración celular en cultivos con condiciones diferentes se detallan a partir del momento en que uno o más factores actúan como limitantes para el desarrollo del cultivo.

De acuerdo a los resultados expresados en la figura 5; en este trabajo la luz fue el factor limitante, específicamente para el tratamiento con fibra óptica, a partir de las 48 horas, tiempo en el que los cambios en concentración celular entre tratamientos se hacen evidentes. Al comparar el crecimiento entre tratamientos, se encontraron diferencias significativas al 95% (Tabla II) entre el control (luz fluorescente) y el tratamiento con fibra óptica y luz fluorescente, lo cual indica que introducir luz guiada por fibra óptica en el cultivo, si modifica el crecimiento de *Isochrysis aff. galbana* (clone T-Iso), y aunque en ambos tratamientos el inicio de las fases de crecimiento coinciden en tiempo (días) (Figura 5) y los valores de tasa de crecimiento específico, tiempo de duplicación y divisiones celulares por día son similares, el tratamiento con luz fluorescente más fibra óptica alcanzó un 20% más de producción celular final.

La biomasa obtenida en los cultivos con luz fluorescente más fibra óptica fue mayor que la producida en el tratamiento control (Tabla I) debido a la mayor disposición de luz al interior de luz en el interior del cultivo, lo cual se puede constatar con los valores de clorofila en este tratamiento.

Utilizar solo luz guiada por fibra óptica también modifica el crecimiento de *Isochrysis aff. galbana* (clone T-Iso), dado que el tratamiento solo con fibra

óptica (T3) resultó con diferencias fuertemente significativas ($\alpha=0.05$) respecto a T1 y T2, control (luz fluorescente) y del tratamiento con fibra óptica y luz fluorescente respectivamente (Tabla II)

Los cultivos entran en la fase estacionaria cuando existen condiciones limitantes, ya sea de CO₂, nutrientes o luz, en consecuencia dos procesos conectados ocurren: a) las células manifiestan características de deficiencia de ese nutriente, y los procesos que requieren de dicho nutriente consumido para llevarse a cabo disminuyen o ya no se realizan, b) las células permanecen metabólicamente activas, sin embargo ya no continúan dividiéndose, continúa la fijación de carbono y la acumulación de carbohidratos y lípidos (Wikfors, 1986).

Un comportamiento similar pudo haber tomado lugar en el tratamiento con fibra óptica, donde la luz resultó ser el factor limitante, denotándose una baja producción celular comparada con los otros tratamientos (Figura 9). Esto indica que aunque las células en cultivo no tuvieron suficiente luz para llevar a cabo su proceso fotosintético y no presentaron una mayor duplicación celular, en el tratamiento con pura fibra óptica la actividad metabólica de las células se ve reflejada en el aumento de clorofila por unidad celular (Tabla V, Figura 8). Este mismo efecto también ha sido documentado por Thompson *et al.* (1990), y Sukenik *et al.* (1993) quienes observaron que bajo condiciones de luz limitante el contenido de pigmentos celulares puede aumentar o disminuir en el caso de exceso de luz.

6.2.-CONSUMO DE NUTRIENTES

Después del carbono, el hidrogeno y oxigeno del agua; el nitrógeno y el fósforo son los elementos más importantes para el crecimiento del fitoplancton (Syrett, 1981). Y a pesar de que la concentración del nitrógeno y del fósforo en el agua de mar, es mucho menor que la utilizada en los cultivos de laboratorio, los efectos en el crecimiento del fitoplancton por la composición y las concentraciones de los nutrientes en el medio han sido ampliamente estudiados. En este estudio se utilizó el medio f/2 como control y se realizó una cuantificación de la concentración y consumo de nitrato y fosfato en el medio para los tres tratamientos, y aunque el medio f/2 señala una concentración de nitrato de 883 μM , y de 36 μM de fosfato los cultivos iniciaron con concentraciones por arriba de las mencionadas (Tabla III y IV), posiblemente debido a la concentración de nitrato y fosfato remanente del nivel anterior (Erlenmeyer, 150 ml). No obstante, las diferencias en el consumo del fosfato, dependen de su concentración en el medio. Darley (1987); explica que, cuando este nutriente se encuentra en exceso, la célula es capaz de realizar un consumo 'innecesario' y almacenarlo en forma de polifosfatos en gránulos citoplasmáticos, en cambio el nitrato es consumido de acuerdo a las necesidades de la célula y a su estado fisiológico, Lafarga-De la Cruz, (2000).

El consumo de fosfato durante los primeros tres días de cultivo fue mínimo para los tratamientos con luz fluorescente y para el tratamiento con pura fibra

óptica. Estos mismos resultados han sido reportados por Valenzuela-Espinoza *et al.* (1999) en cultivos estáticos de *I. aff. galbana* (clone T-Iso).

En el tratamiento con luz fluorescente y fibra, el consumo también fue similar a los otros tratamientos, solo durante los dos primeros días del cultivo debido al inicio de la fase exponencial en este tratamiento.

Durante el transcurso del cultivo en los tres tratamientos experimentales existieron diferencias en cuanto al consumo y concentración de fósforo en el medio, el cultivo con luz fluorescente y fibra óptica incrementa el consumo de fosfato a partir del segundo día, lo cual concuerda con el incremento en densidad celular para el mismo tiempo (Figura 5). En cambio, los cultivos control y solo con fibra óptica presentaron un mayor consumo a partir del tercer día (Figura 6). Sin embargo la concentración final de fósforo en el medio fue muy similar entre el control y tratamiento con fibra y luz fluorescente lo cual a su vez, es menor que la concentración final en el medio para el tratamiento con solo fibra óptica (Figura 6). En esta condición de cultivo la fase estacionaria se presentó a partir del segundo día, y el mayor consumo de fosfato al cuarto día, al igual que la menor producción diaria (cél. ml⁻¹) (Tabla I).

Respecto al consumo de nitrato, los cambios se observaron a partir de la definición de las fases de crecimiento en los cultivos, al segundo día. Se cuantificó un mayor consumo de nitrato en la condición de luz fluorescente y fibra óptica (Figura 7). Lo anterior puede relacionarse a que el consumo de nitrato llega ser estimulado por la luz. Y gracias a que la energía proveniente de

la luz al ser captada por las células en cultivo es convertida en energía química, esta es utilizada de manera eficiente en la reducción de nitrato y CO₂ para la formación de nuevo material celular que se expresa en una mayor concentración celular. (Syrett, 1981; Lafarga-De la Cruz, 2000).

6.3.-CLOROFILA a

La concentración total de pigmentos y los cambios relativos de los diferentes tipos de pigmentos, puede ser afectada por variables ambientales como la concentración de nitrógeno en el medio, la intensidad y longitud de onda de la luz (Kirk, 1994). En este estudio los cultivos expuestos a luz guiada con solo fibra óptica fueron los que tuvieron mayor concentración de clorofila *a* por unidad de célula, coincidiendo con la menor irradiancia (al interior del cultivo) final entre tratamientos (Tabla V, Figura 8) dicho resultado se debe a la adaptación que presentan las microalgas de ajustar la concentración y tamaño de la unidades fotosintéticas (Falkowski y La Roche, 1991) lo que implica un aumento en la concentración de clorofila en la célula en condiciones de bajas irradiancias.

Al relacionar el crecimiento y la división celular, se observó que aunque la duplicación celular por día en general fue mayor en condiciones de iluminación con luz fluorescente más fibra óptica, la concentración de clorofila *a* por unidad celular fue menor, lo cual indica que la cantidad de luz disponible para las

células bajo esta condición no fue limitante. En cambio las células cultivadas solo con fibra óptica, la falta de luz provocó aumento en el contenido de clorofila *a* por célula, y una menor producción en biomasa.

El contenido de feofitina *a*; producto de la degradación de las clorofilas, refleja cambios en el estado fisiológico (envejecimiento) de las células como producto de las condiciones del cultivo. El encontrar feofitina *a* durante el primer día en el tratamiento con luz fluorescente, puede ser el resultado de que las células al ser introducidas en un medio nuevo, entraron en un período de aclimatación, y el contenido de feofitina *a* por unidad celular registrado puede ser el resultado de que la mayor parte de las células analizadas hayan sido de las generadas en el nivel anterior.

Para el tratamiento con pura fibra se observó el menor contenido de clorofila por unidad celular y no se cuantificó feofitina en el primer día, lo cual no indica que se deba a la falta de luz en el cultivo, ya que se trata del primer día del cultivo, en el que idealmente las condiciones iniciales en los tres tratamientos proveen de lo necesario para el crecimiento de *I. aff. galbana* (clone T-Iso). En este caso lo anterior puede ser el resultado de que en el nivel anterior la cantidad de luz por efecto del autosombreado ya era deficiente al interior del cultivo, y al cambiar las células al nivel Ferbach e introducir luz guiada por fibra óptica se redujo el efecto del autosombreado, y en respuesta las células se aclimataron reduciendo el tamaño de su aparato fotosintético.

6.4.-Espectros de Absorción

La cantidad de luz absorbida por el fitoplancton no solo depende de la cantidad total de los pigmentos fotosintéticos presentes en las células, sino también del tamaño y forma de estas (Kirk, 1994). Dichas características suelen ser modificadas por las condiciones de luz en el medio, es decir: en altas irradiancias los cloroplastos reducen su tamaño y su sistema de transferencia de electrones se ve saturado, la energía ya no es transferida y como consecuencia disminuyen el número de tilakoides por cloroplasto, se modifica la concentración de clorofilas y pigmentos accesorios, caso contrario; en bajas irradiancias donde el cloroplasto tiene mayor tamaño y el número de tilakoides por cloroplasto se incrementa y las clorofilas y pigmentos accesorios son más abundantes por lo cual la poca energía disponible es absorbida y transferida a los centros de reacción. Sin embargo esto no significa que pueden utilizar la luz absorbida con una mayor eficiencia (Darley;1987).

Falkowski y La Roche (1991) afirman que las células que crecen en altas irradiancias con un bajo contenido de pigmentos presentan un mayor coeficiente de absorción a_{ϕ}^* (λ). El cual provee información acerca de la cantidad de luz absorbida por las células de fitoplancton (Staeher, *et al.* 2002), lo anterior se observó en el tratamiento T2, donde se absorbió una mayor cantidad de luz, y esta se reflejó en un mayor crecimiento celular de *I. aff. galbana* (clone T-Iso).

7.-CONCLUSIONES

De manera general y en términos de producción de biomasa se recomienda el uso de la luz fluorescente más luz guiada por fibra óptica en cultivos estáticos de *Isochrysis aff galbana* (clone T-Iso).

El crecimiento *Isochrysis aff galbana* (clone T-Iso) en cultivos estáticos fue mayor con luz fluorescente más fibra óptica (T2) y diferencias significativas fueron encontradas entre tratamientos. El crecimiento en T2 fue mayor que T1 a partir del tercer día del cultivo y a partir del segundo día para el T3 (solo fibra óptica). El crecimiento final de T2 alcanzó un 20% más que en T1.

La concentración de clorofila por célula de *Isochrysis aff galbana* (clone T-Iso) fue mayor en T3 que en T1 y T2 a partir del tercer día del cultivo.

El consumo de nitrato para T1 y T2 fue significativamente mayor que en T3 a lo largo del cultivo. Y el consumo de fosfato para los tres tratamientos fue similar a lo largo del cultivo excepto en T2 que fue mayor al tercer día.

Los espectros de absorción presentaron un incremento durante el tiempo de los cultivos, mostrando coeficientes similares en los tratamientos de (T1) luz fluorescente y T2, los cuales fueron el doble de los obtenidos en T3. De manera general se observa la misma forma variando esta solo al tamaño del espectro.

8.-LITERATURA CITADA

- Álvarez- Borrego, S. 1986. Luz y productividad del fitoplancton. En: González-Farías, F. Y J. de la Rosa Vélez (ed.). Temas de Oceanografía biológica en México. Vol. II Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, B. C., México.
- Brown, M. R., S. W. Jeffrey, J. K. Volkman y G. A. Dustan. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151:315-331.
- Correa-Reyes, J. G. 1993. Alimentación de *Artemia franciscana* con microalgas cultivadas bajo diferentes tipos de luz. Tesis de licenciatura, FCM, UABC. Ensenada, Baja California. 56 pp.
- Darley, W. M. 1987 Biología de las algas. Enfoque fisiológico. Editorial Limusa, México, D.F. 236 pp.
- De Pauw, N. 1981. Use and production of microalgae as food for nursery bivalves. In: C. Claus, N. De Pauw y E. Jasper (De.), Nursery Culturing of Bivalve Mollusks. EMS special publ. No.7 European Mariculture Society, Brenede, Belgium, 35-69 pp.
- Embadi, D. y B. Berland., 1989. Variation in lipid class composition during batch growth of *Nannochloropsis salina* and *Pavlova lutheri*. *Mar. Chem.* 26:215-225.
- Fabregas, J. L. Toribio, J. Albalde, B. Cabezas y C. Herrero. 1989. Biochemical composition and growth of the marine microalgae *Dunalliella tertiolecta* (Butcher) with different ammonium nitrogen concentration as chloride, sulfate, nitrate and carbonate. *Aquaculture*, 83:289-304.
- Falkowski, P.G., La Roche, J. 1991. Acclimatation to spectral irradiance in algae. *J. Phycol.* 27; 8-14.
- Flaak, A. R. y C. E. Epifanio. 1978. Dietary protein levels and growth of the oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol.*, 45:157-163.

- Guillard, R.R.L. 1973. Division rates. En: Stein, J.R. (ed) Handbook of Phycological Methods. Culture and Growth Measurements. Cambridge University Press, 289-313.
- Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrate. En: Smith, W. L. y M. H. Chanley (eds.) Culture of Marine Invertebrates Animals. Plenum Publishing Corp. New York. pp 29-60
- Hinga, K. R. 2000. Effects of pH on coastal marine phytoplankton. Marine Ecology Progress Series. 238: 281-300.
- Jeffrey, S. W., M. R. Brown y J. K. Volkman. 1994. Haptophyte as feedstocks in mariculture. In J. C. Green and B.S.C. Leadbeater (eds.). The Haptophyte Algae, Clarendon Press, Oxford. 287-302 pp.
- Kirk, J.T.O. 1994. Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems Second edition. Cambridge, University Press.
- Lafarga-De la Cruz, F. 2000. Interacción entre luz, consumo de nutrientes, composición celular y producción de *Rhodomonas* sp. en cultivos estáticos. Tesis de maestría, FCM, IIO, UABC. Ensenada, Baja California. 132 pp.
- Liu, C.-P. y L.-P., Lin, 2001. Ultrastructural study and lipid formation of *Isochrysis* sp. CCMP1324. Bot. Bull. Acad. Sin. 42: 207-214.
- Matsunaga, T., H. Takeyama, H. Sudo, N. Oyama, S. Ariura, H. Takano, M. Hirano, J. G. Burgess, K. Sode y N. Nakamura. 1991. Glutamate production from CO₂ by marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. using a novel biosolar reactor employing light-diffusing optical fibers. Applied Biochemistry and Biotechnology. 28/29: 157-167.
- Mitchell, B.G. 1990. Algorithms for determining the absorption coefficient of aquatic particulates using the quantitative filter technique (QFT). SPIE. The International Society for Optical Engineering. Ocean optics X. 1302: 137-148.
- Parsons, T.R., Y. Maita y C. M. Lalli. 1985. A Manual of Chemical and Biological methods of seawater analysis. First edition. Pergamon Press. 173 pp.

- Reitan, K. I., J. R. Rainuzzo, G. Oie y Y. Olsen. 1997. A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae. *Aquaculture*, 155: 207-221.
- Ríos-Leal, E. y Cañizares-Villanueva, R. O. 1994. Análisis de microalgas y sus productos mediante cromatografía de gases y líquidos. Serie científica U.A.B.C.S. No. Especial 2(1):121-145.
- Roessler, P.G. 1990. Environmental control of glycerolipid metabolism in microalgae: commercial implications and future research directions. *J. Phycol.* 26: 393-399.
- Sánchez Saavedra, M. P. y D. Voltolina. 1996. The effect of different photon fluence rates of blue-green light on the biomass quality of a costal diatom in pilot scale semicontinuos cultures. *Scientia Marina*. 60:267-272.
- Saoudi-Helis, L., J.-P. Dubacq, Y. Marty, J. -F. Samain & C. Gudin. 1994. Influence of growth rate on pigment and lipid composition of the microalga *Isochrysis aff. galbana* clone T-iso. *Journal of Applied Phycology*. 6: 315:322.
- Staehr, P.A., P. Henrihsen, s. Markager. 2002. Photoacclimatation of four marine phytoplankton species to irradiance and nutrient availability. *Marine Ecology Progress Series* 238:47-59.
- Strzepek, R.F. y Price, N. M., 2000. Influence of irradiance and temperature on the iron content of the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae). *Marine Ecology Progress Series*. 206:107-117.
- Sukenik, A., Zmora, O. Carmeli, Y. 1993. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition.II. *Nannochloropsis* sp. *Aquaculture* 117: 313-326
- Syrett, P.J. 1981. Nitrogen metabolism of microalgae. En: Lafarga-De la Cruz, F. 2000. Interacción entre luz, consumo de nutrientes, composición celular y producción de *Rhodomonas* sp. en cultivos estáticos. Tesis de maestría, FCM, IIO,UABC. Ensenada, Baja California. 132 pp.
- Takano, H., H. Takeyama, N. Nakamura, K. Sode, J. G. Burgess, E. Manabe, M. Hirano y T. Matsunaga. 1992. CO₂ removal by high-density culture of a

- marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. using an improved photobioreactor employing light-diffusing optical fibers. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 34/35: 449-457.
- Thompson, P.A. Harrison, P.J., Whyte, J.N.C. 1990. Influence of irradiance on the fatty acid composition of phytoplankton. *J. Phycol.* 26: 278-288.
- Yamada, A., H. Takano, J. G. Burgess y T. Matsunaga. 1996. Enhanced hydrogen production by marine photosynthetic bacterium, *Rhodobacter marinus*, immobilized onto light-diffusing optical fiber. *J. Mar. Biotechnol.* 4: 23-27.
- Yongmanitachai, W. y O.P. Ward. 1989. Omega-3 fatty acids: alternative sources of production. *Process Biochem.*, 24: 117-125.
- Valenzuela-Espinoza, E., Millán-Núñez, R., Núñez-Cebrero, F. 1999. Biomasa production and nutrient uptake by *Isochrysis* aff. *galbana* (clone T-Iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. *Aquacultural engineering*. 20:135-147.
- Wickfors, G. H. 1986. Altering growth and gross chemical composition of two microalgal molluscan food species by varying nitrate and phosphate. *Aquaculture*, 59:1-14
- Zapata, M. y J. L. Garrido. 1997. Occurrence of phtylated chlorophyll c in *Isochrysis galbana* and *Isochrysis* sp. (clone T-Iso) (Prymnesiophyceae). *J. Phycol.* 33:209-214.
- Zhu C. J., Y. K. Lee & T. M. Chao. 1997. Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1. *Journal of Applied Phycology* 9:451-457.