

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



**CUANTIFICACIÓN POTENCIOMÉTRICA DE
CARBONO INORGÁNICO TOTAL EN
CULTIVOS ESTÁTICOS DE *Rhodomonas* sp. E
Isochrysis aff. *galbana* (CLONE T-ISO).**



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

Tania Karina Camiro Vargas

Ensenada, Baja California, Abril del 2001.

**CUANTIFICACIÓN POTENCIOMÉTRICA DE
CARBONO INORGÁNICO TOTAL EN
CULTIVOS ESTÁTICOS DE *Rhodomonas* sp. E
Isochrysis aff. *galbana* (CLONE T-ISO).**

**QUE PRESENTA:
TANIA KARINA CAMIRO VARGAS**


APROBADA POR:



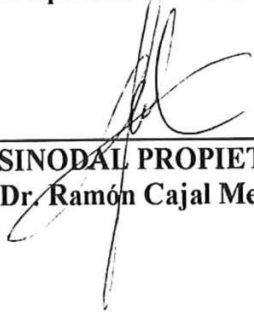
**PRESIDENTE DEL JURADO
Dr. José Martín Hernández Ayón**



**SINODAL PROPIETARIO
MC. Enrique Valenzuela Espinoza.**



**SINODAL PROPIETARIO
Dr. Francisco Delgadillo Hinojosa.**



**SINODAL PROPIETARIO
Dr. Ramón Cajal Medrano.**

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Martín Hernández Ayón..... gracias, por permitirme de ser tu primer hija académica, gracias por el apoyo incondicional, por la paciencia, por la dedicación y el entusiasmo.

A la Facultad de Ciencias Marinas, por ser la base de toda mi carrera profesional. A todos mis maestros porque clase tras clase, laboratorio tras laboratorio, semestre tras semestre, me enseñaron lo que implica ser oceanóloga.

Al MC. Enrique Valenzuela Espinoza, por haberme facilitado todo el materia biológico necesario para mi tesis, gracias por las palabras de aliento. Gracias al Oc. Filiberto Nuñez realmente tu colaboración es valiosa.

Al Dr. Ramón Cajal Medrano y Dr. Francisco Delgadillo Hinojosa, gracias por la paciencia, gracias a sus excelentes observaciones y contribuciones, mejoraron este trabajo.

A Fabiola Lafarga, gracias por todas las explicaciones, realmente me sirvieron mucho.

A mis amigos del IIO, Lore..... por los coscorrónes y las lecciones de química, Yoal, Rene, Nancy, Sra. Betty, Atilano, Esteban, Placido (bueno tu eres colado), gracias por la compañía y por ser gente buena.

A los surgenciomanos: Graciela Guerra..... gracias por enseñarnos siempre el verdadero significado de las cosas, realmente cada que platicamos veo el mundo de diferente manera. Edgar (la estrellita marinera) y Marianita y a Caneck, gracias por ser como son, por su colaboración, pertenecemos realmente a un equipo de trabajo..... personitas como ustedes realmente escasean.

A Cecy Chapa, por ser siempre tan autentica pero sobre todo gracias por saber ser mi amiga, en las buenas y en las malas, realmente te admiro.

A Jessy (por ser buena gente cuando esta dormida) y a Corpus, por las interminables desveladas y pachangas que disfrutamos juntos (esos fueron buenos tiempos).....sean felices donde quiera que se encuentren, a la Sra. Victoria Aguirre gracias por permitirnos estar en su casa, gracias por la harmonia de vivir con usted. A mis queridissimos padrinos Rafael y Angelita Cota, los quiero horrores, ustedes saben que siempre los tengo en mi corazón.

A Pedro Cervantes Ojeda.....gracias por ser, lo que siempre había anhelado, contigo realmente soy feliz, te amo y es para siempre.

DEDICATORIA

A mis padres

Magdalena Vargas Orozco y Estanislao Camiro Navarro
Porque todo lo que soy, se lo debo a ustedes

A mis hermanos

Claudia “Payita”, Juan Manuel “Chanito”, David “Nene” y Grecia
Por todos los momentos felices juntos

A mis abuelitas:

Petra Navarro Herrera y Elenita Orozco Sánchez

ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes.....	4
2.OBJETIVOS.....	8
3.MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
3.1. Mediciones potenciométricas.....	9
3.1.1. Celda de acrílico.....	9
3.1.2. Jeringa electrónica y potenciómetro.....	11
3.1.3. Precisión y exactitud.....	12
3.2. Sistemas de cultivo.....	13
4.RESULTADOS.....	17
4.1. Crecimiento microalgal.....	17
4.2. Cambio de pH, Alcalinidad total (A_t) y Carbono inorgánico total (C_t).....	21
4.2.1. pH.....	22
4.2.2. Alcalinidad total (A_t).....	26
4.2.3. Carbono inorgánico total (C_t).....	28
4.2.4. Correlación pH vs Carbono inorgánico total (C_t).....	30
4.3. Nutrientes.....	30
4.3.1. Consumo de PO_4^{3-} y NO_3^-	33
4.3.2. Producción de NO_2^- y NH_4^+	33
4.4. Bases Extras.....	34
5.DISCUSIÓN.....	36
6.CONCLUSIÓN.....	54
7.LITERATURA CITADA.....	58

LISTA DE TABLAS

Tabla I	Calibración del peso de la celda de titulación. Durante la calibración se utilizó agua destilada a 25°C.....	9
Tabla II	Resultados de la titulación de 5 réplicas de agua de mar certificada con ácido estandarizado. El batch empleado corresponde a $A_t = 2211.11 \pm 0.95 \mu\text{molkg}^{-1}$ y $C_t = 2006.21 \pm \mu\text{molkg}^{-1}$	13
Tabla III	Valores poblacionales de <i>Rhodomonas</i> sp. cultivadas en diferentes niveles de cultivo, A) Erlenmeyer, B) Fernbach y C) Garrafón.....	18
Tabla IV	Valores poblacionales de <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (Clone T-ISO) en diferentes niveles de cultivo, A) Erlenmeyer, B) Fernbach y C) Garrafón.....	19
Tabla V	Valores de pH, alcalinidad total (A_t) y carbón inorgánico total (C_t) en diferentes cultivos de <i>Rhodomonas</i> sp. A) Erlenmeyer, B) Fernbach y C) Garrafón.....	23
Tabla VI	Valores de pH, alcalinidad total (A_t) y carbón inorgánico total (C_t) en diferentes cultivos de <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (Clone T-ISO) A) Erlenmeyer B) Fernbach y C) Garrafón.....	24
Tabla VII	Valores de A_t medida y calculada, en el nivel Garrafón, para <i>Rhodomonas</i> sp. e <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (Clone T-ISO).....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Celda de acrílico para la titulación potenciométrica. A. Electrodo, B. Conducto para HCl, C. Pistón, D. Conducto para muestra, E. Agitador magnético, F. Llave, G. Plancha de agitación.....	10
Figura 2	Técnica de la Derivada. Forma de calcular pH, alcalinidad total (A_t) y carbono inorgánico total (C_t).....	12
Figura 3	Crecimiento logarítmico promedio de <i>Rhodomonas</i> sp. ● e <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (Clone T-ISO) ▲ cultivada en tres diferentes niveles de cultivo, Erlenmeyer (a), Fernbach (b) y Garrafón (c). La flecha azul [↙] indica el término de la fase de retardo y la flecha verde [↗] indica el término de la fase exponencial. La barra vertical indica el error estándar...	19
Figura 4	Valores de pH en cultivos de <i>Rhodomonas</i> sp. ● e <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (Clone T-ISO) ▲ cultivada en tres diferentes niveles de cultivo, Erlenmeyer(a-b), Fernbach (c-d) y Garrafón (e-f). La barra vertical indica el error estándar. La línea horizontal indica el valor en equilibrio.....	25
Figura 5	Valores de alcalinidad total (A_t) en cultivos de <i>Rhodomonas</i> sp. ● e <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (Clone T-ISO) ▲ cultivada en tres diferentes niveles de cultivo, Erlenmeyer (a-b), Fernbach (c-d) y Garrafón (e-f). La barra vertical indica el error estándar.....	27
Figura 6	Valores de carbono inorgánico total (C_t) en cultivos de <i>Rhodomonas</i> sp. ● e <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (Clone T-ISO) ▲ cultivada en diferentes niveles de cultivo, Fernbach (a-b), y Garrafón (c-d). La barra vertical indica el error estándar. La línea horizontal indica el valor en equilibrio.....	29
Figura 7	Correlación pH vs C_t en <i>Rhodomonas</i> sp. ● e <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (Clone T-ISO) ▲ cultivada en nivel Fernbach (a-b) y Garrafón (c-d). La barra vertical indica el error estándar.....	31
Figura 8	Cambio en la concentración promedio de fosfato (PO_4^{3-}) (a-b), nitrato (NO_3^-) (c-d), nitrito (NO_2^-) (e-f) y amonio (NH_4^+) (g-h) en <i>Rhodomonas</i> sp. ● e <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (Clone T-ISO) ▲ cultivada en nivel Garrafón. La barra vertical indica el error estándar.....	32
Figura 9	Valores de alcalinidad total (A_t) calculada y medida en nivel Garrafón para <i>Rhodomonas</i> sp. ● (a) e <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (Clone T-ISO) ▲ (b).....	35
Figura 10.	Cuantificación de bases extras, obtenidas a través de las diferencias encontradas entre $A_{t(\text{med})} - A_{t(\text{cal})}$, para el nivel Garrafón, en <i>Rhodomonas</i> sp. ● (a) e <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (Clone T-ISO) ▲ (b).....	35
Figura 11	Gráficas obtenidas mediante la derivación de los datos de milivoltaje con respecto a los microlitos de HCl adicionados en <i>Rhodomonas</i> sp. en Fernbach (a) y Garrafón (b). Los días se especifican en cada gráfica.....	37

- Figura 12** Relación entre el crecimiento logarítmico promedio de *Rhodomonas* sp. ● (a) e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) ▲ (b), y la concentración medida ($\mu\text{moles kg}^{-1}$) en símbolos llenos del $\text{CO}_{2(\text{ac})}$ (a-b) (◆) y HCO_3^- (c-d)(■) en el nivel Garrafón. Los símbolos vacíos corresponden al cambio de las especies de carbono por el cambio termodinámico. La línea (—) corresponde a la diferencia entre las especies de carbono medidas y el cambio termodinámico, en cada caso..... 42
- Figura 13** Tasa de consumo de carbono ($\mu\text{ moles } C_t \mu\text{m}^{-3} \text{ día}^{-1}$) vs concentración de $\text{CO}_{2(\text{ac})}$ y HCO_3^- , en *Rhodomonas* sp. ● (a-b) e *I.* aff. *galbana* (Clone T-ISO) ▲ (c-d), para el nivel Garrafón. Para la correlación se empleó una $n=7$ 43
- Figura 14** Correlaciones NO_3^- vs PO_4^{-3} (a-b), C_t vs NO_3^- (c-d) y C_t vs PO_4^{-3} (e-f), en *Rhodomonas* sp. ● e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) ▲, en Garrafón. En todos los cálculos se utilizó una $n= 10$. La barra vertical indica el error estándar..... 48
- Figura 15** Valores de carbono inorgánico total C_t y C_t (pH- A_t) (símbolos vacíos) en *Rhodomonas* sp. ● (a) e *Isochrysis* aff. *galbana* ▲ (Clone T-ISO)(b), en el nivel Garrafón. Para los cálculos de C_t (pH- A_t) se mantuvo la A_t inicial..... 53

1.- INTRODUCCIÓN

En el cultivo intensivo de microalgas, uno de los factores que influye tanto en la cantidad como en la calidad celular de las microalgas es el dióxido de carbono. Este compuesto junto con otros factores como la calidad de luz, temperatura, salinidad y nutrientes, modifican las funciones metabólicas de las células fitoplanctónicas en cultivos, lo cual a su vez repercute en producción de biomasa y composición bioquímica microalgal (Sanchez-Saavedra, 1994). También el origen y concentración de los nutrientes en el medio de cultivo, influyen en la tasa de crecimiento, en la composición celular, en el contenido de clorofila, así como también en su rendimiento final (Valenzuela-Espinoza, 1997).

Otro de los problemas en los cultivos intensivos de microalgas es mantener el pH a valores alrededor de 8 donde la concentración de carbono inorgánico sea óptima para el crecimiento de las microalgas. Las microalgas realizan la fijación de carbono en mayor proporción en los cultivos, debido a que la luz es continua durante su cultivo. En la fase luminosa de la fotosíntesis, la concentración de carbono inorgánico disminuye, mientras que la concentración de oxígeno y materia orgánica aumenta. Sin embargo, es incierta la cantidad de carbono requerido por el número de microalgas a determinado día de cultivo.

En el agua de mar, el carbono se encuentra en tres formas intercambiables ($\text{CO}_{2(\text{ac})}$, HCO_3^- y CO_3^{2-}) las cuales están en función del pH, la temperatura y la salinidad. El carbono inorgánico total (C_t) es la suma de estas tres especies de carbono (Skirrow y

Riley, 1965). En condiciones iniciales de cultivo, el pH del agua de mar fluctúa en un intervalo de 7.8 y 8.2, en este intervalo la especie de carbono predominante es HCO_3^- comprendiendo más del 90% del total del C_t presente (Kremer, 1981; Geider y Osborne, 1992; Millero, 1994). Teóricamente las microalgas solamente pueden asimilar $\text{CO}_{2(\text{ac})}$ y HCO_3^- del medio, sin embargo existen preferencias de especies de carbono, dependiendo de la especie de microalga cultivada (Elzenga *et al.*, 2000). En cultivos de *Rhodomonas* sp. e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) el pH se incrementa conforme transcurre el tiempo de cultivo (Lafarga-De la Cruz, 1997; Lafarga-De la Cruz, 2000; Valenzuela-Espinoza, 1997) por lo que se esperaría que las concentraciones de $\text{CO}_{2(\text{ac})}$ y HCO_3^- disminuyeran.

Para este trabajo las especies de microalgas seleccionadas fueron: *Rhodomonas* sp. e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO), las cuales son utilizadas como alimento vivo, en cultivos de moluscos (Parés-Sierra y Leyva, 1982; Ferreira *et al.*, 1990; Clausen y Riisgard, 1996; Ward *et al.*, 1996; Rhee y Davis, 1997; Aldana-Aranda y Patiño-Suarez, 1998), estadios larvarios de equinodermos (Zuñiga-Cortés, 1994; Martínez-López, 1994). También se emplean como alimento de especies como *Artemia salina* (Zhukova *et al.*, 1998), copépodos (Shipp *et al.*, 1999; Starr *et al.*, 1999; Payne, 2000; Sibly *et al.*, 2000;) y esponjas (Osinga *et al.*, 1999). Así mismo, ambas especies fueron escogidas, por la diferencia de tamaño que presentan, *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) mide entre 5-7 micras, mientras que *Rhodomonas* sp. alcanza tamaños de 8 y hasta 12 micras. El tamaño determina la razón superficie/volumen, lo cual a su vez está asociada a la proporción de nutrientes absorbidos. Se ha observado en diferentes especies de

diatomeas, que el consumo de ^{14}C es proporcional al área superficial (Blasco *et al.*, 1982).

Este trabajo pretende investigar la dinámica del consumo de C_t en cultivos estáticos de *Rhodomonas* sp. e *I. aff. galbana* (Clone T-ISO), así como los cambios en alcalinidad total (A_t) y pH producidos tanto por la asimilación de CO_2 como por el consumo de nutrientes inorgánicos. Adicionalmente, la técnica utilizada en este trabajo permite determinar el consumo de especies de carbono como el HCO_3^- y $\text{CO}_{2(\text{ac})}$ lo cual resulta una gran ventaja, puesto que empleando otras técnicas mas sofisticadas o complicadas como enzimología ó ^{14}C , resultaría incierto, caro y con mas variaciones analíticas. Para esto se consideran las siguientes hipótesis.

I) El suministro de C_t mediante agitación o aireación, permite el crecimiento de *Rhodomonas* sp. e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) en cultivos estáticos (Erlenmeyer, Fernbach y Garrafón).

II) Es factible realizar cuantificaciones de C_t en cultivos de *Rhodomonas* sp. e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) mediante un sistema de titulación potenciométrico.

III) El consumo de C_t , esta afectado por la diferencia de superficie/volumen que existe entre *Rhodomonas* sp. e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO), esto significa que *Rhodomonas* sp. al tener una superficie/volumen menor consume en mayor proporción C_t .

Para la medición de los cambios de carbono se utilizó la potenciometría la cual ha demostrado ser una técnica sencilla, rápida y no costosa para realizar mediciones de cambios de C_t . Recientemente Hernández-Ayón *et al.*, (1999) desarrollo un sistema de titulación potenciométrico con el cual obtuvo una precisión de $\pm 7.8 \mu\text{molkg}^{-1}$ y una exactitud de $6.82 \mu\text{molkg}^{-1}$ al usar estándares certificados. Este sistema se ha empleado con éxito en zonas costeras (Hernández-Ayón, 2000) y en cultivos de bacterias (Cajal-Medrano, 1999). Los cambios de pH en cultivos de microalgas marinas fluctúan de 8 hasta 10, lo que facilita aún mas la aplicación de dicho sistema.

1.1. Antecedentes

Aún cuando la mayoría de los trabajos están enfocados a mejorar los cultivos intensivos de microalgas, los referidos a mediciones directas de C_t pueden ser considerados escasos. La mayoría de los trabajos están enfocados hacia el mecanismo enzimático de consumo de carbono (Yokota y Calvin, 1986) y su influencia en la fisiología fotosintética (García-Sánchez *et al.*, 1996, Jiménez-Del Río *et al.*, 1996; Ramazanov *et al.*, 1996; Falkowski y Raven, 1997).

De las especies de carbono, el HCO_3^- es el que se encuentra en mayor proporción en el agua de mar (90-99%), y por lo tanto, en condiciones iniciales en los cultivos de microalgas (Riley y Skirrow, 1965; Kremer, 1981; Millero, 1994). Sin embargo, es indudable que la especie de carbono que con más facilidad atraviesa la membrana es $\text{CO}_{2(\text{ac})}$ (Ralph, 1976; Riebesell *et al.*, 1993, Falkowsky y Raven, 1997). Existen organismos que exclusivamente consumen $\text{CO}_{2(\text{ac})}$, sin embargo hay otros que presentan

una ventaja adaptativa la cual consiste en consumir el HCO_3^- , cuando los niveles de $\text{CO}_{2(\text{ac})}$ son limitantes para la fotosíntesis (Nabil, 1997; Tortell, 1997). Sin embargo, Riebesell *et al.*, (1993), mostraron que en condiciones óptimas de luz y nutrientes, el crecimiento de tres especies de diatomeas estuvo afectado por el suministro de CO_2 . Otra ventaja adaptativa consiste en desarrollar mecanismos de concentración de carbono (pirenoide o carboxilosomas), en los cuales se almacena Rubisco, la enzima que inician la carboxilación (Falkowski y Raven, 1997, Nabil, 1997). De las propiedades de esta enzima depende en parte la asimilación del $\text{CO}_{2(\text{ac})}$ (Moroney y Somanchi, 1999). El consumo de HCO_3^- se realiza a través del plasmalema, mediante transporte activo porque los lípidos de esta membrana la hacen impermeable a HCO_3^- y CO_3^{-2} (Falkowski y Raven, 1997), este transporte lo realiza la anhidrasa carbónica (AC) intra y extracelularmente (Jiménez-Del Rio, 1996, Nabil *et al.*, 1996).

Otras líneas de investigación referidas a las características fisicoquímicas provocados por la actividad biológica en cultivos, han sido desarrollados por Gavis y Ferguson (1975) quienes mostraron que la difusión del CO_2 disminuye a bajas concentraciones de carbono, lo cual esta relacionado con altos valores de pH, durante la asimilación de carbono por el fitoplancton.

En relación a estudios sobre efectos en otras variables del sistema del CO_2 como la A_t , Brewer y Goldman (1976) determinaron incrementos o disminuciones de dicho parámetro, debidos al tipo de fuente de nitrógeno en tres diferentes microalgas cultivadas, si las microalgas consumen nitratos la A_t aumenta y si consumen amonía disminuye. Uusitalo (1996), realizó estudios referidos al consumo de carbono los cuales

mostraron diferentes patrones de cambios de pH y A_t , en tres macroalgas, causados por el tipo de protón exudado o consumido durante el consumo de carbono. El autor reporta que en *Ulva lactuca* (alga verde) el pH aumentó, sin embargo la A_t fue constante, en *Polysiphonia nigrescens* (alga roja), el pH fue constante y la A_t aumentó, en *Ascophyllum nodosum* (alga parda) el pH fue constante sin embargo la A_t disminuyó.

Estudios de los diferentes parámetros del sistema del dióxido de carbono en las especies utilizadas en este trabajo se conoce muy poco. Recientemente Lafarga-De la Cruz, 2000, realizó mediciones de consumo de carbono empleando ^{14}C en *Rhodomonas* sp. utilizando diferentes irradiancias y concentraciones de nutrientes, los valores de consumo fueron menores a $45 \text{ pg C célula}^{-1} \text{ hr}^{-1}$. Cabe señalar que en la mayoría de los estudios realizados para medir consumo de carbono en el agua de mar, se ha empleado el método de asimilación de carbono catorce (^{14}C), porque es considerado el más preciso. No obstante, es difícil obtener de la literatura datos confiables respecto a su precisión, debido a errores sistemáticos que resultan de las exudaciones fitoplanctónicas y del efecto del tipo de la fuente de nitrógeno. (Williams *et al.*, 1979). Además de este tipo de inconvenientes, otras desventajas de este método son la necesidad de laboratorios certificados, permisos en usos de material radioactivo, la contaminación radioactiva, personal especializado y el alto costo en equipo y material.

Por esta razón y por lo explicado anteriormente, el uso de un sistema potenciométrico en cultivos de microalgas, tiene especial importancia debido a la sencillez y precisión con que se determinan las concentraciones de las diferentes especies que componen, el sistema del dióxido de carbono. Adicionalmente, lo anterior muestra

que las investigaciones que existen sobre el sistema del CO₂ en sistemas de cultivos de microalgas son pocos, y que la información que concierne al consumo C₁ en *Rhodomonas* sp. e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) puede considerarse escaso.

2. OBJETIVOS

Evaluar la variación de pH y carbono inorgánico total (C_t) en cultivos estáticos de *Rhodomonas* sp. e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) .

Aplicar un método potenciométrico, para medir los cambios de alcalinidad total (A_t) en cultivos estáticos de *Rhodomonas* sp. e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) con altas concentraciones de bases extras.

Determinar las tasas de consumo de C_t en cultivos estáticos de *Rhodomonas* sp. e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) (Erlenmeyer, Fernbach y Garrafón).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó el sistema de titulación potenciométrico, para analizar muestras de cultivos estáticos de microalgas. A continuación se describen los componentes del sistema de titulación y posteriormente, las condiciones (luz, temperatura, salinidad y nutrientes) del cultivo y la toma de muestras en los tres niveles de cultivo, el mismo procedimiento se efectúa para cada muestra en ambas especies.

3.1. Mediciones potenciométricas

El sistema de titulación consta de tres partes principales; una celda de acrílico con un diseño especial para mantener las titulaciones en sistema cerrado, un potenciómetro con salida a puerto serie y una jeringa electrónica programable. Los tres módulos son controlados por una computadora.

3.1.1. Celda de acrílico:

La celda tiene una llave de teflón de un lado y del otro cuenta con una tapa de cuello de rosca. A través de la tapa hay un electrodo de combinación Orion, un pistón de acrílico el cual compensa el volumen de ácido adicionado y dos conductos de plástico; uno pequeño donde se realizan las adiciones de ácido, y otro grande por donde se introduce la muestra, todo lo anterior está unido a la tapa y sellado con silicón. Dentro de la celda se coloca un agitador magnético que homogeniza la muestra (Figura 1).

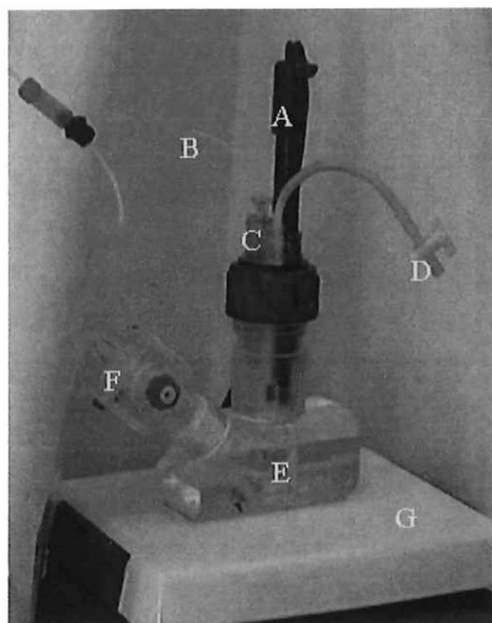


Figura 1. Celda de acrílico para la titulación potenciométrica. A. Electrodo, B. Conducto para HCl, C. Pistón, D. Conducto para muestra, E. Agitador magnético, F. Llave, G. Plancha de agitación.

El volúmen estándar dentro de la celda, se determinó mediante la resta del peso de la celda seca y llena posteriormente con agua destilada (Tabla I).

Tabla I. Calibración del peso de la celda de titulación. Durante la calibración se utilizó agua destilada a 25°C.

Determinaciones	1	2	3	4	5	6
Celda húmeda	403.29	403.30	403.29	403.29	403.29	403.29
Celda seca	368.18	368.17	368.18	368.18	368.18	368.18
Diferencia	35.11	35.13	35.11	35.11	35.11	35.11
Volúmen (mL) (peso * 0.996044)	34.971	34.991	34.971	34.971	34.971	34.971
Corr. del tubo (conductor de muestra)	0.262					
Volúmen de la celda (mL)	34.850					
Precisión	0.0232%					

Para prevenir el contacto con la atmósfera, la muestra se introduce a la celda mediante una jeringa de 50 mL vía el conducto de plástico y las llaves de acceso abiertas. Posteriormente, el llenado se realiza de manera lenta, de tal forma que la muestra de agua desplace el aire dentro de la celda para evitar la presencia y/o la formación de burbujas. Cuando la celda está completamente llena, se cierran ambas llaves de acceso, y se da paso a la titulación con ácido clorhídrico.

La titulación termina cuando se llega al final del segundo punto de inflexión (aproximadamente a un pH de 4.3). Después de cada titulación, el contenido de la celda se drena. El sistema y sus componentes se enjuagan con agua destilada y con agua de mar de las muestras para evitar residuos del ácido.

La calibración del electrodo de pH se realiza por separado con amortiguadores de agua de mar a 25°C: aminopiridina y trishidroximetilaminometano en la escala de protones totales (DOE,1994).

3.1.2. Jeringa electrónica y potenciómetro

Se usa un titulador programable Klotz con una jeringa y un potenciómetro ambos conectados en puerto serial a una computadora. Para el control de ambos instrumentos se usa un programa en Qbasic, el cual graba el volumen de ácido adicionados y el cambio de milivoltaje en archivos en ASCII. El titulador adiciona cada 10 segundos 10 microlitros de ácido. Después de cada titulación, los datos son procesados en un

programa de Matlab que calcula la derivada de los milivolts con respecto al volumen, este programa realiza una interpolación lineal, filtra los datos y obtiene la posición exacta de los puntos de inflexión y calcula los valores de pH, Alcalinidad total (A_t) y carbono inorgánico total (C_t). El pH es la primera lectura del electrodo antes de que inicie la titulación, la A_t es la distancia del inicio de la titulación hasta el segundo punto de inflexión y el C_t es la diferencia entre los dos puntos de inflexión o picos (Figura 2).

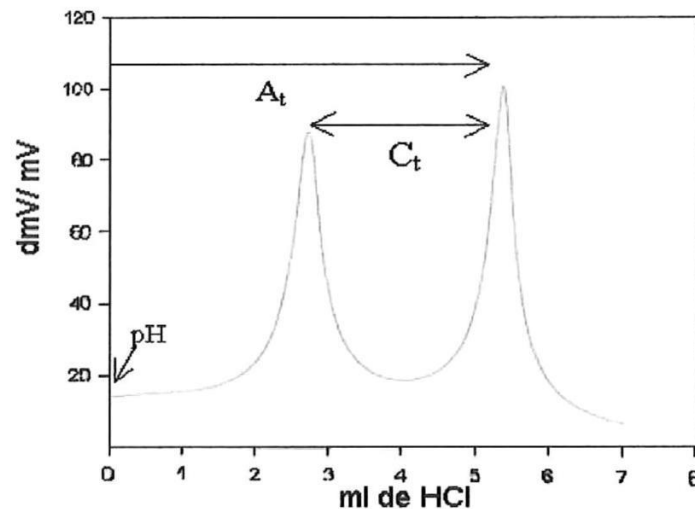


Figura 2. Técnica de la Derivada. Forma de calcular pH, Alcalinidad total (A_t) y carbono inorgánico total (C_t).

3.1.3. Precisión y exactitud

Para la prueba de exactitud, se analizó material de referencia (CRM) del Dr. Andrew Dickson de Scripps Institution of Oceanography, en donde los valores del Batch 50 para A_t fueron de $2211.11 \pm 0.95 \mu\text{molkg}^{-1}$ y de $C_t = 2006.21 \pm 0.66 \mu\text{molkg}^{-1}$. En la tabla II se muestra el error medido en las titulaciones. Con respecto al promedio obtenido

se encontró un error de $3.5 \mu\text{molkg}^{-1}$ para la A_t de $6 \mu\text{molkg}^{-1}$ para C_t , en esta misma se muestra la precisión obtenida, para el pH, con una desviación estándar de 0.008 y para A_t y C_t un porcentaje de error de 0.39 % y 0.56 % respectivamente.

La calibración del ácido clorhídrico, se realizó contra agua de mar certificada como material de referencia (CRM) usando un estándar distinto. La normalidad del ácido clorhídrico utilizado en las titulaciones fue de 0.0934 M.

Tabla II. Resultados de la titulación de 5 réplicas de agua de mar certificada con ácido estandarizado. El batch empleado corresponde a $A_t = 2211.11 \pm 0.95 \mu\text{mol kg}^{-1}$ y $C_t = 2006.21 \pm 0.66 \mu\text{mol kg}^{-1}$.

No. de muestra	A_t μmolkg^{-1}	C_t μmolkg^{-1}	pH
1	2205.0	2012.7	7.5537
2	2218.7	2007.2	7.5350
3	2215.9	2026.5	7.5350
4	2218.7	1996.3	7.5401
5	2199.5	2018.2	
Promedio	2211.56	2012.1	7.540
Desviación	8.79	11.38	0.008
Precisión	0.39%	0.56%	

3.2. Sistemas de cultivo.

La cepa de *Rhodomonas* sp. e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) empleada para este estudio fue adquirida de la colección de cultivos unialgales que se encuentra en

el laboratorio de producción de microalgas del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California.

Se analizaron de manera consecutiva y por duplicado, tres niveles de cultivo: Erlenmeyer (200 mL), Fernbach (2 L) y Garrafón (18 L).

El agua de mar que se utiliza para la preparación de los medios se trata mediante dos tipos de filtros de cartucho (cuno) de 1 y 0.65 μm y luz ultravioleta. Para Erlenmeyer y Fernbach después de este tratamiento el agua de mar se esteriliza durante 15 minutos a 121 °C y 1.05 kg cm^{-2} . Para el nivel Garrafón, el agua se desinfecta mediante un tratamiento químico (Pruder y Bolton 1978). Después de esterilizar y desinfectar los diferentes niveles de cultivo, se prosigue a la elaboración del medio de cultivo que es adicionado a los diferentes niveles. La elaboración de los medios de cultivo esta basado en la formulación del medio f/2 propuesto por Guillard (1975) al 150%. Para las vitaminas se hace una mezcla con soluciones preparadas de 0.1 mgL^{-1} de Tiamina hidrociorhídrica, 0.5 μgL^{-1} de Biotina y 0.5 μgL^{-1} de vitamina B₁₂. Esta mezcla fue esterilizada en autoclave durante 5 minutos a 121 °C y 1.05 kg cm^{-2} .

A cada nivel, se le adicionaron los nutrientes (1 mL^{-1}) que corresponden al medio de cultivo f/2 al 150% (Guillard, 1975) más la mezcla de vitaminas y posteriormente, en una atmósfera aséptica generada por dos mecheros de alta temperatura, cada nivel recibió el inóculo del nivel de microalgas correspondiente. El nivel Erlenmeyer se uso como inóculo para el Fernbach y el Fernbach para Garrafón.

Los cultivos experimentales se llevaron a cabo en un cuarto con temperatura controlada de 20 ± 1 °C. La iluminación fue continua y estuvo proporcionada por lámparas Day-light General Electrics de 8 pies y 75 watts. La luz incidente en los cultivos se midió mediante un irradiómetro PAR, (modelo QSL - 100, 4π sensor, Biophysical Instruments). Las irradiancias para cada el nivel de cultivo estudiado fueron: 113, 162.8 y 174.4 $\mu\text{M m}^{-2}\text{seg}^{-1}$, para Erlenmeyer, Fernbach y Garrafón respectivamente.

Los cultivos Erlenmeyer y Fernbach se agitaron diariamente para impedir el asentamiento de células y favorecer el intercambio gaseoso entre el medio y la atmósfera circundante. Para el nivel Garrafón se suministró un flujo de aire de 4.5 Lmin^{-1} (flujómetro Gildmont) mediante un soplador.

En todos los niveles de cultivo se realizó la cuantificación diaria de células previamente preservadas con lugol, mediante conteos directos al microscopio compuesto con una cámara de Neubauer de 0.1 mm de profundidad. De los resultados, obtenidos de los conteos, se determinó la tasa de crecimiento específica (μ), las divisiones por día (D), el tiempo de duplicación (TD) y la producción diaria (PD) de acuerdo a las metodologías propuestas por Guillard (1975).

Los análisis de pH, A_t y C_t , se realizaron por duplicado, excepto el nivel Erlenmeyer para *Rhodomonas* sp. debido a que uno de los cultivos se contaminó. En todos los niveles se tomaron muestras antes y después de cada inoculación. Posterior a la inoculación se tomaron muestras cada 24 horas, para Erlenmeyer y Fernbach, usando

volúmenes de 10 y 40 mL respectivamente. Para el nivel Garrafón se tomaron dos muestras diarias de aproximadamente 40 mL.

En el nivel Erlenmeyer, las titulaciones se realizaron de manera abierta (contacto con la atmósfera) debido al volumen limitado del cultivo (200 mL), por lo que los mililitros titulados (aproximadamente 10 mL) fueron pesados antes de la titulación.

En el nivel Garrafón además de las muestras para pH, A_t y C_t , se recolectaron muestras para nutrientes. Debido a que su presencia o consumo en sistemas de cultivo de microalgas modifican la A_t y el pH. Las muestras se analizaron con un Autoanalizador en la Universidad de Santa Barbara California. Los nutrientes analizados fueron: fosfatos (PO_4^{-3}), nitratos (NO_3^-), nitritos (NO_2^-) y amonio (NH_4^+).

Las bases extras fueron cuantificadas, a partir de mediciones de A_t medida y calculada, para esta última, se empleó el programa CO2SYSTEM, el cual utiliza valores de salinidad, temperatura, PO_4^{-3} , pH y C_t medidos. Estos cálculos solo se determinaron para el nivel Garrafón.

4. RESULTADOS

4.1. Crecimiento microalgal

Para cada nivel de cultivo de *Rhodomonas* sp. e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) se obtuvo una curva de densidad celular (Log 10) de cultivo (Figura 3). Las tablas de crecimiento poblacional para cada especie y nivel se muestran en las Tablas III y IV.

En el nivel Erlenmeyer (Figura 3 a), la fase de retardo solamente se presentó en *Rhodomonas* sp., y tuvo una duración de 24 horas. La fase exponencial tuvo una duración de 48 horas. En *I. aff. galbana* (Clon T-ISO), la fase exponencial tuvo una duración de 72 horas. La fase estacionaria comenzó a partir del tercer día para *Rhodomonas* sp. y a partir del cuarto día en *I. aff. galbana* (Clon T-ISO). La tasa de crecimiento exponencial promedio fue de 0.933 y 0.792 con 1.346 y 1.143 divisiones celulares por día para *Rhodomonas* sp. e *I. aff. galbana* (Clon T-ISO) respectivamente. La máxima producción diaria (PD) se obtuvo al tercer día para *Rhodomonas* sp. y al cuarto día para *I. aff. galbana* (Clon T-ISO).

En el nivel Fernbach (Figura 3 b). La fase exponencial para *Rhodomonas* sp., tuvo una duración de 48 horas, la fase de estacionaria comenzó a partir del segundo día. Para *I. aff. galbana* (Clon T-ISO) la fase exponencial tuvo una duración de 72 horas, la fase estacionaria comenzó al tercer día de cultivo. La tasa de crecimiento promedio exponencial fue 0.630 y 0.685 con 0.910 y 0.988 divisiones celulares por día para

Tabla III. Valores poblacionales de *Rhodomonas* sp. cultivadas en diferentes niveles de cultivo:

A) Erlenmeyer, B) Fernbach y C) Garrafón.

A

Tiempo (día)	Concentración (células mL ⁻¹ x10 ⁵)	μ (día ⁻¹)	D (divisiones día ⁻¹)	TD (días)	PD (células mL ⁻¹ x10 ⁵)
inoculación	0.48	---	---	---	---
1	0.67	0.335	0.483	2.069	0.18
2	1.77	0.975	1.406	0.711	1.10
3	4.31	0.892	1.287	0.777	2.54
4	6.08	0.345	0.497	2.011	1.77
5	11.10	0.600	0.865	1.156	5.00

B

Tiempo (día)	Concentración (células mL ⁻¹ x10 ⁵)	μ (día ⁻¹)	D (divisiones día ⁻¹)	TD (días)	PD (células mL ⁻¹ x10 ⁵)
inoculación	0.66	---	---	---	---
1	1.08	0.630	0.910	1.099	0.43
2	2.80	0.950	1.370	0.730	1.72
3	3.68	0.272	0.392	2.548	0.88
4	4.43	0.188	0.271	3.694	0.76

C

Tiempo (día)	Concentración (células mL ⁻¹ x10 ⁵)	μ (día ⁻¹)	D (divisiones día ⁻¹)	TD (días)	PD (células mL ⁻¹ x10 ⁵)
inoculación	0.56	---	---	---	---
1	0.71	0.274	0.395	2.534	0.15
2	3.99	1.729	2.495	0.401	3.23
3	5.93	0.396	0.572	1.748	1.94
4	6.51	0.092	0.133	7.513	0.57
5	9.82	0.411	0.593	1.685	3.31
6	9.96	0.014	0.021	48.365	0.14
7	11.60	0.155	0.223	4.478	1.67

μ = tasa de crecimiento

D = divisiones por día

TD = tiempo de duplicación

PD = producción diaria

Fase exponencial

Tabla IV. Valores poblacionales de *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) cultivada en diferentes niveles de cultivo: A) Erlenmeyer, B) Fernbach y C) Garrafón

A

Tiempo (día)	Concentración (células mL ⁻¹ x 10 ⁵)	μ (día ⁻¹)	D (divisiones día ⁻¹)	TD (días)	PD (células mL ⁻¹ x 10 ⁵)
inoculación	2.65	---	---	---	---
1	5.27	0.715	1.032	0.969	2.62
2	13.49	0.941	1.357	0.737	8.23
3	27.75	0.721	1.041	0.961	14.25
4	46.67	0.520	0.750	1.333	18.92
5	58.10	0.219	0.316	3.163	11.43

B

Tiempo (día)	Concentración (células mL ⁻¹ x 10 ⁵)	μ (día ⁻¹)	D (divisiones día ⁻¹)	TD (días)	PD (células mL ⁻¹ x 10 ⁵)
inoculación	4.12	---	---	---	---
1	8.08	0.854	1.233	0.811	3.97
2	15.86	0.674	0.973	1.028	7.78
3	26.85	0.526	0.759	1.317	12.23
4	32.17	0.181	0.261	3.830	17.48

C

Tiempo (día)	Concentración (células mL ⁻¹ x 10 ⁵)	μ (día ⁻¹)	D (divisiones día ⁻¹)	TD (días)	PD (células mL ⁻¹ x 10 ⁵)
inoculación	3.58	---	---	---	---
1	5.98	0.590	0.852	1.174	2.40
2	18.10	1.108	1.599	0.625	12.10
3	37.15	0.719	1.038	0.964	19.10
4	43.76	0.164	0.237	4.228	6.62
5	52.60	0.184	0.265	3.770	8.83
6	59.83	0.129	0.186	5.378	7.23
7	66.53	0.106	0.153	6.529	6.70

μ = tasa de crecimiento

D = divisiones por día

TD = tiempo de duplicación

PD = producción diaria

Fase exponencial

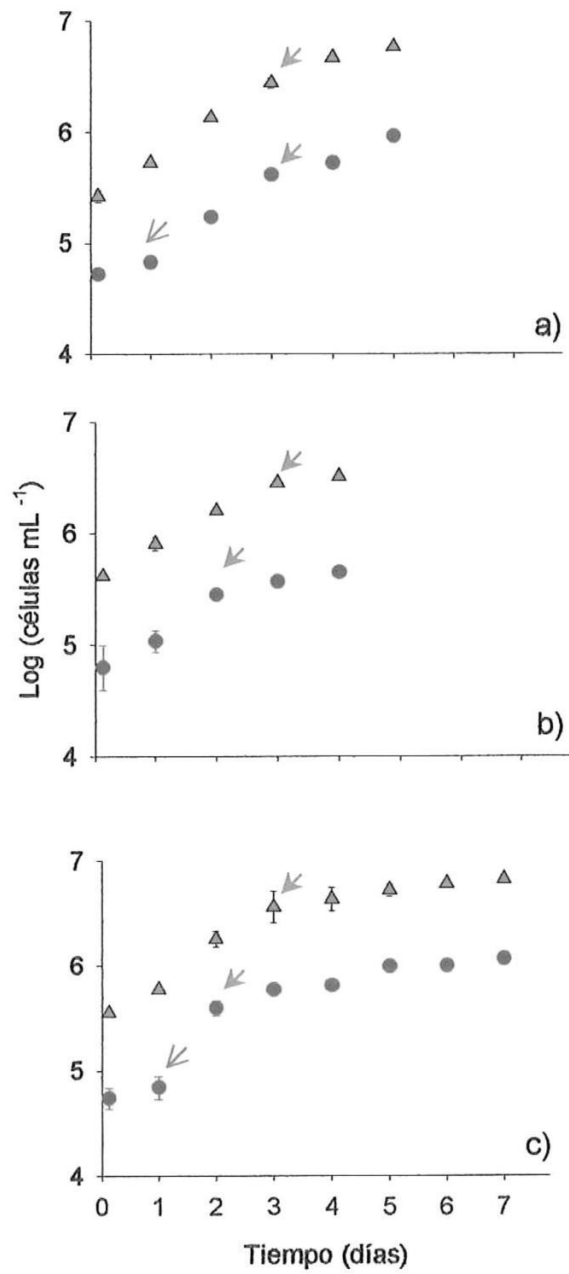


Figura 3. Crecimiento logarítmico promedio de *Rhodomonas* sp. ● e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) ▲ cultivada en tres diferentes niveles de cultivo, Erlenmeyer (a), Fernbach (b) y Garrafón (c). La flecha azul [↙] indica el término de la fase de retardo y la flecha verde [↗] indica el término de la fase exponencial. La barra vertical indica el error estándar.

Rhodomonas sp. e *I. aff. galbana* (Clon T-ISO) respectivamente. La máxima PD se obtuvo al segundo día para *Rhodomonas* sp. y al cuarto día para *I. aff. galbana* (Clon T-ISO).

En el nivel Garrafón (Figura 3 c), se presentó la fase de retardo solo para *Rhodomonas* sp., la cual tuvo una duración de 24 horas. La fase exponencial tuvo una duración de 24 horas. En *I. aff. galbana* (Clon T-ISO), la fase exponencial tuvo una duración de 72 horas. La fase estacionaria comenzó a partir del segundo día para *Rhodomonas* sp. y el cuarto día para *I. aff. galbana* (Clon T-ISO). La tasa de crecimiento exponencial promedio fue de 1.729 y 0.806 con 2.495 y 1.163 divisiones celulares por día para *Rhodomonas* sp. e *I. aff. galbana* (Clon T-ISO) respectivamente. La máxima PD se obtuvo al segundo y quinto día para *Rhodomonas* sp. y al tercer día para *I. aff. galbana* (Clon T-ISO).

4.2. Cambio de pH, Alcalinidad total (A_t) y Carbono Inorgánico Total (C_t).

Los valores promedio de equilibrio de pH y C_t fueron de 8.071 y 1946.5 $\mu\text{moles kg}^{-1}$ respectivamente, los cuales se representan como una línea horizontal dentro de las figuras 4 y 6. Estos valores fueron calculados a partir de los valores iniciales (antes de la inoculación) de A_t y la presión atmosférica parcial del CO_2 ($p\text{CO}_2$) (365 μatm) en el programa CO2SYSTEM. En todos los niveles de cultivo, solamente los valores iniciales, se encuentran por arriba de este valor, lo que indica que el cultivo está liberando $\text{CO}_{2(\text{gas})}$, sin embargo, la mayoría de los valores de pH y C_t , con respecto a los valores de equilibrio, mostraron que los cultivos se encuentran absorbiendo $\text{CO}_{2(\text{gas})}$.

4.2.1. pH.

De manera general, el pH aumenta, sin embargo se presentaron diferentes tasas de aumento. En las mediciones anteriores y posteriores al inóculo, se observó una ligera disminución del pH en todos los niveles de cultivo (Figura 4).

En el nivel Erlenmeyer (Figura 4 a-b), el valor inicial fue 7.726 en ambas especies, sin embargo el valor aumentó hasta 8.987 para *Rhodomonas* sp. y 8.799 para *I. aff. galbana* (Clone T-ISO) al quinto día de cultivo. La tasa de aumento fue 0.262 y 0.242 para *Rhodomonas* sp. e *I. aff. galbana* (Clone T-ISO) respectivamente.

En el nivel Fernbach (Figura 4 c-d), ambos cultivos de microalgas iniciaron con un valor de 8.11 y terminaron el cuarto día de manera muy similar con 8.688 y 8.631 para *Rhodomonas* sp. e *I. aff. galbana* (Clone T-ISO) respectivamente. La tasa de aumento fue 0.171 y 0.170 para *Rhodomonas* sp. e *I. aff. galbana* (Clone T-ISO) respectivamente.

En el nivel Garrafón, el valor al inicial (día cero) antes de la inoculación fue 8.063. El cultivo de *Rhodomonas* sp. aumento los valores hasta el sexto día de cultivo, en donde se midió el máximo valor de 10.165, sin embargo el pH disminuye en las últimas tres mediciones hasta llegar a un valor de 9.498 (Figura 4 e). Para *I. aff. galbana* (Clone T-ISO) los valores de pH aumentaron hasta el tercer día con un valor de 9.134, a partir de este día el pH fluctuó entre 9.001 y 9.354. (Figura 4 f). La tasa de

Tabla V: Valores de pH, alcalinidad total (A_t) y carbono inorgánico total (C_t) en diferentes cultivos de *Rhodomonas* sp. A) Erlenmeyer, B) Fernbach y C) Garrafón.

A

Tiempo (días)	pH	A_t ($\mu\text{mol kg}^{-1}$)
0.00	7.726	2367.7
0.04	7.821	2455.5
1.00	7.961	2327.6
2.00	8.245	2457.5
3.00	8.652	2686.8
4.00	8.859	2756.1
5.00	8.987	3025.6

B

Tiempo (días)	pH	A_t ($\mu\text{mol kg}^{-1}$)	C_t ($\mu\text{mol kg}^{-1}$)
0.00	8.110	2199.2	1887.1
0.21	8.067	2450.1	1059.4
1.00	8.228	2463.9	476.9
2.00	8.508	2689.2	78.6
3.00	8.679	2744.9	n.d
4.00	8.688	2819.8	n.d

C

Tiempo (días)	pH	A_t ($\mu\text{mol kg}^{-1}$)	C_t ($\mu\text{mol kg}^{-1}$)
0.00	8.063	2189.2	1915.8
0.13	7.954	2369.4	1845.7
1.00	8.082	2405.7	1756.0
1.25	8.348	2482.2	1667.0
2.00	8.405	2632.2	1600.4
2.25	8.473	2667.3	1560.5
3.00	8.971	2687.9	1301.6
3.25	8.933	2694.1	1252.1
4.00	9.071	2821.6	1149.5
4.25	9.265	2973.5	1121.4
5.00	9.823	2985.8	793.7
5.25	9.835	2975.5	750.0
6.00	10.165	2937.0	585.3
6.25	9.724	2963.6	812.9
7.00	9.598	3050.6	1012.4
7.25	9.498	3106.0	1176.9

n.d.= no detectable

Tabla VI: Valores de pH, alcalinidad total (A_t) y carbono inorgánico total (C_t) en diferentes cultivos de *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) A) Erlenmeyer, B) Fernbach y C) Garrafón.

A		
Tiempo (días)	pH	A_t ($\mu\text{mol kg}^{-1}$)
0.00	7.726	2367.7
0.04	7.701	2337.7
1.00	7.916	2262.9
2.00	8.232	2412.6
3.00	8.570	2597.5
4.00	8.782	2809.3
5.00	8.799	2949.4

B			
Tiempo (días)	pH	A_t ($\mu\text{mol kg}^{-1}$)	C_t ($\mu\text{mol kg}^{-1}$)
0.00	8.110	2199.2	1887.1
0.21	7.914	2380.0	1138.0
1.00	8.155	2466.8	713.9
2.00	8.324	2597.6	439.2
3.00	8.597	2646.9	n.d
4.00	8.631	2778.6	n.d

C			
Tiempo (días)	pH	A_t ($\mu\text{mol kg}^{-1}$)	C_t ($\mu\text{mol kg}^{-1}$)
0.00	8.063	2189.2	1915.8
0.13	7.960	2348.9	1869.9
1.00	8.268	2452.9	1643.7
1.25	8.368	2448.7	1592.2
2.00	8.602	2531.0	1369.5
2.25	8.676	2549.1	1326.0
3.00	9.134	2567.9	1093.5
3.25	9.001	2535.2	1132.2
4.00	9.149	2609.4	1007.7
4.25	9.060	2664.4	1112.0
5.00	9.260	2654.2	1016.2
5.25	9.076	2687.9	1135.9
6.00	9.354	2707.1	973.8
6.25	9.119	2736.3	1111.7
7.00	9.267	2741.1	991.9
7.25	9.117	2776.2	1203.6

n.d.= no detectable

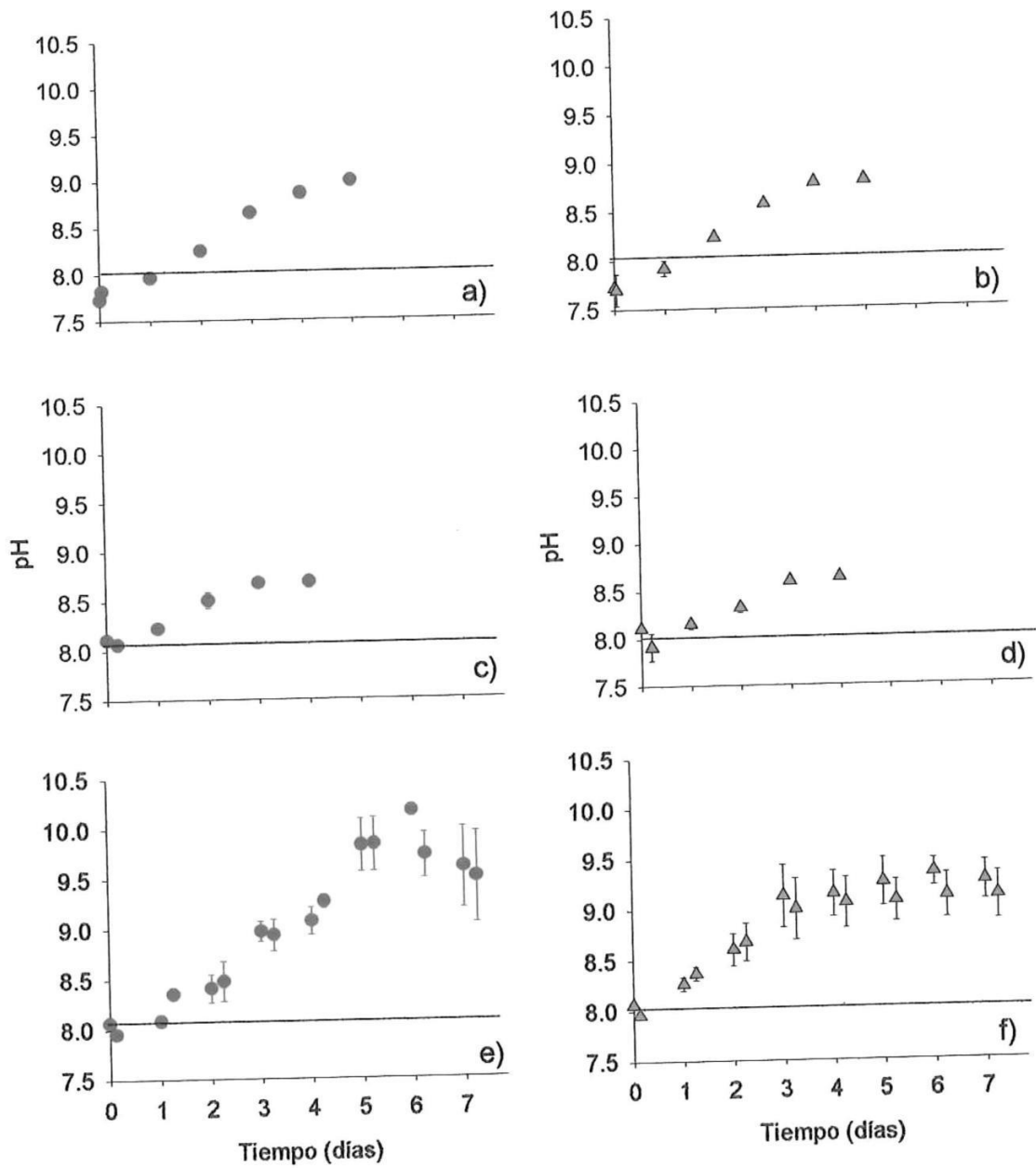


Figura 4. Valores de pH en cultivos de *Rhodomonas* sp. ● e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) ▲ cultivada en tres diferentes niveles de cultivo, Erlenmeyer (a-b), Fernbach (c-d) y Garrafón (e-f). La barra vertical indica el error estándar. La línea horizontal indica el valor en equilibrio.

aumento fue 0.366 y 0.338 para *Rhodomonas* sp. e *I. aff. galbana* (Clone T-ISO) respectivamente. En este nivel se presentaron las mayores variaciones entre réplicas.

4.2.2. Alcalinidad total (A_t).

En todos los cultivos, la A_t aumentó, sin embargo este incremento no fue similar entre los niveles de una misma especie.

En el nivel Erlenmeyer (Figura 5 a-b), la A_t inicial fue de 2367.7 $\mu\text{moles kg}^{-1}$, a partir de este día la A_t se incremento a una tasa de aumento de 169.5 y 176.9 $\mu\text{moles kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ en *Rhodomonas* sp. e *I. aff. galbana* (Clone T-ISO) respectivamente.

En el nivel Fernbach (Figura 5 c-d), el valor inicial de A_t antes del inóculo fue 2199.2 $\mu\text{moles kg}^{-1}$. Posterior a este valor la A_t aumentó a una tasa de 135.8 y 124.2 $\mu\text{moles kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ en *Rhodomonas* sp. e *I. aff. galbana* (Clone T-ISO) respectivamente.

En el nivel Garrafón (Figura 5 e-f), el valor antes del inóculo fue 2189.2 $\mu\text{moles kg}^{-1}$, sin embargo los valores aumentaron a una tasa de 110.9 y 62.6 $\mu\text{moles kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ en *Rhodomonas* sp. e *I. aff. galbana* (Clone T-ISO) respectivamente. En este nivel se obtuvieron las mayores diferencias entre réplicas en *Rhodomonas* sp, efectuadas el quinto y sexto día de cultivo. *I. aff. galbana* (Clone T-ISO) presentó variaciones solo el séptimo día.

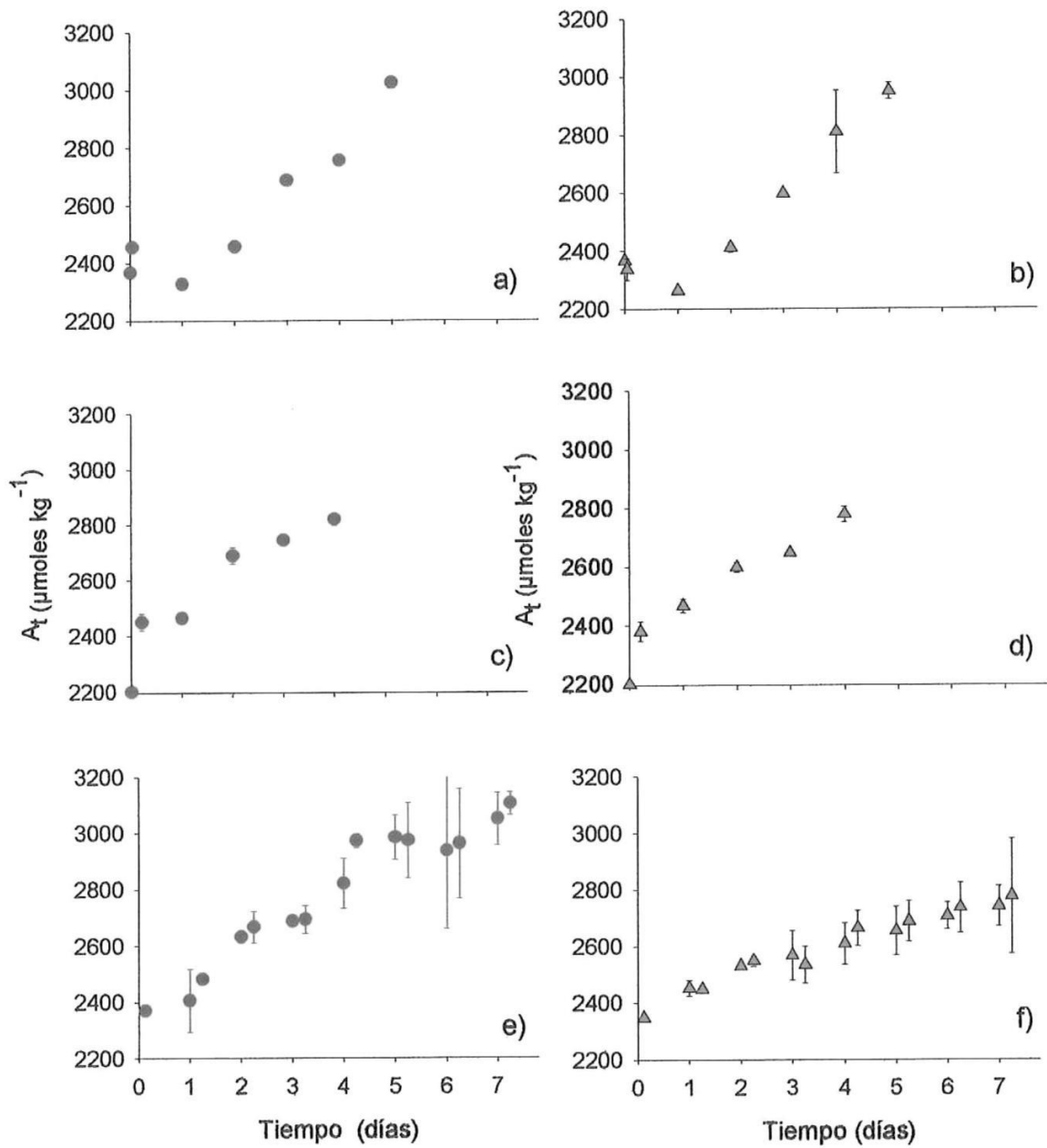


Figura 5. Valores de alcalinidad total (A_t) en cultivos de *Rhodomonas* sp. ● e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) ▲ cultivada en tres diferentes niveles de cultivo, Erlenmeyer (a-b), Fernbach (c-d) y Garrafón (e-f). La barra vertical indica el error estándar.

4.2.3. Carbono inorgánico total (C_t).

Los valores del nivel Erlenmeyer, no se muestran debido a la limitación de volumen de muestra.

En el nivel Fernbach (Figura 6 a-b), las tasas de consumo fueron 788.5 y 613.9 $\mu\text{moles kg}^{-1}\text{día}^{-1}$ para *Rhodomonas* sp. e *I. aff. galbana* (Clone T-ISO) respectivamente en un intervalo de cero a dos días de cultivo. Los valores de la concentración de C_t para el tercer y cuarto día, en ambos cultivos de microalgas fueron indetectables. El valor mínimo medido fue 78.6 $\mu\text{moles kg}^{-1}$ durante el segundo día de cultivo para *Rhodomonas* sp.

En el nivel Garrafón (Figura 6 c-d), tanto *Rhodomonas* sp. como *I. aff. galbana* (Clone T-ISO) consumieron 219.9 y 237.9 $\mu\text{moles kg}^{-1}\text{día}^{-1}$ respectivamente. En *Rhodomonas* sp. se observó el consumo hasta el sexto día, el valor mínimo medido fue 585.3 $\mu\text{moles kg}^{-1}$, sin embargo el C_t aumentó proporcionalmente las últimas tres mediciones, hasta llegar a un valor de 1176.9 $\mu\text{moles kg}^{-1}$. En *I. aff. galbana* (Clone T-ISO) el C_t fue consumido solo hasta el cuarto día con un valor mínimo de 1007.7 $\mu\text{moles kg}^{-1}$, las mediciones posteriores a este día se mantuvieron en 1077.9 $\mu\text{moles kg}^{-1}$ en promedio.

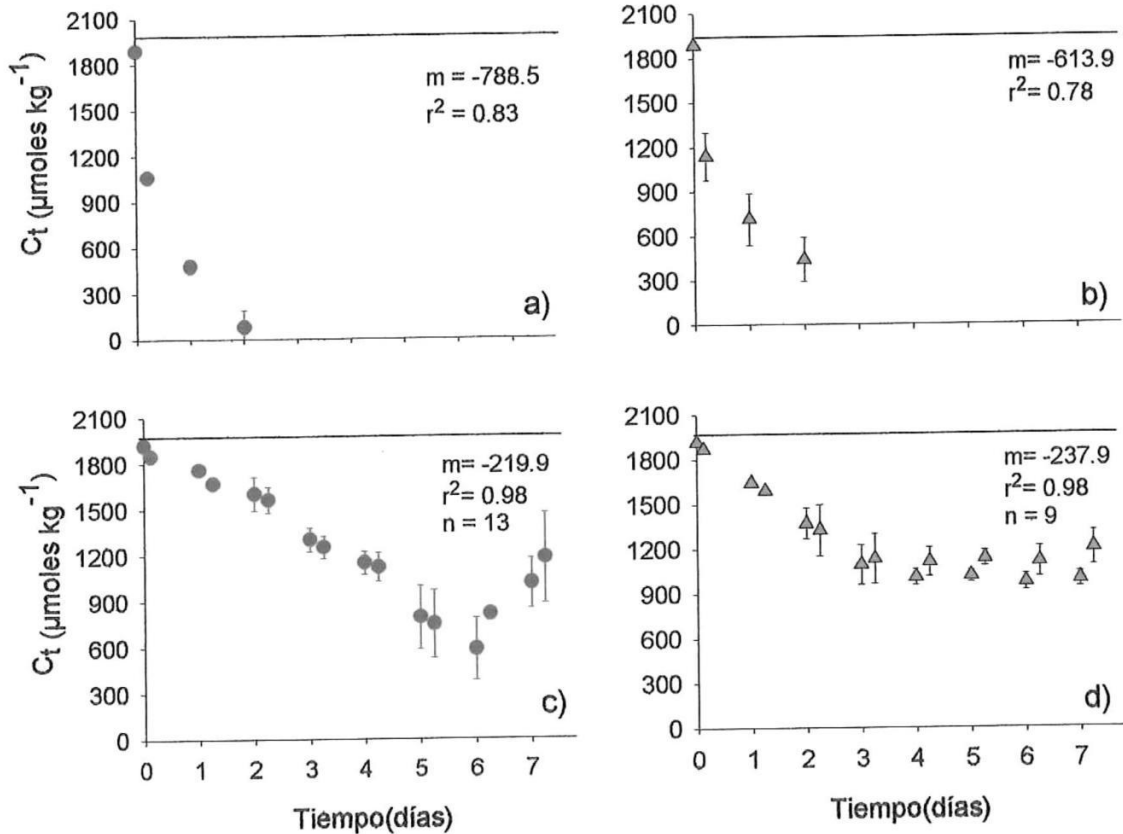


Figura 6. Valores de carbono inorgánico total (C_t) en cultivos de *Rhodomonas* sp. ● e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) ▲ cultivada en diferentes niveles de cultivo, Fernbach (a-b), y Garrafón (c-d). La barra vertical indica el error estándar. La línea horizontal indica el valor en equilibrio.

4.2.4. Correlación pH vs Carbono inorgánico total (C_t).

Para el nivel Fernbach (Figura 7 a-b), el coeficiente de correlación fue -0.74 y -0.51 para *Rhodomonas* sp. e *I. aff. galbana* (Clone T-ISO) respectivamente.

En el nivel Garrafón (Figura 7 c-d), se obtuvieron tanto para *Rhodomonas* sp. e *I. aff. galbana* (Clone T-ISO) coeficientes de correlación de -0.98.

4.3. Nutrientes

A continuación se presenta la variación en la concentración (μM) de fosfatos (PO_4^{-3}), nitratos (NO_3^-), nitritos (NO_2^-) y amonía (NH_4^+), durante los días de cultivo del nivel Garrafón en *Rhodomonas* sp. e *I. aff. galbana* (Clone T-ISO). El consumo de nutrientes en ambas especies fue similar: los fosfatos y nitratos disminuyeron en su concentración en el medio, en tanto que el nitrito y el amonio aumentaron conforme transcurrió el tiempo de cultivo (Figura 8).

4.3.1. Consumo de PO_4^{-3} y NO_3^-

La concentración de PO_4^{-3} disminuyó hasta el sexto día en ambos cultivos de microalgas, la tasa de consumo fue de 9.466 y 8.154 $\mu\text{M día}^{-1}$ en *Rhodomonas* sp. e *I. aff. galbana*(Clone T-ISO) respectivamente, lo cual corresponde a un porcentaje de PO_4^{-3} total consumido de 88 y 84 %. En ambas especies existió un ligero aumento en

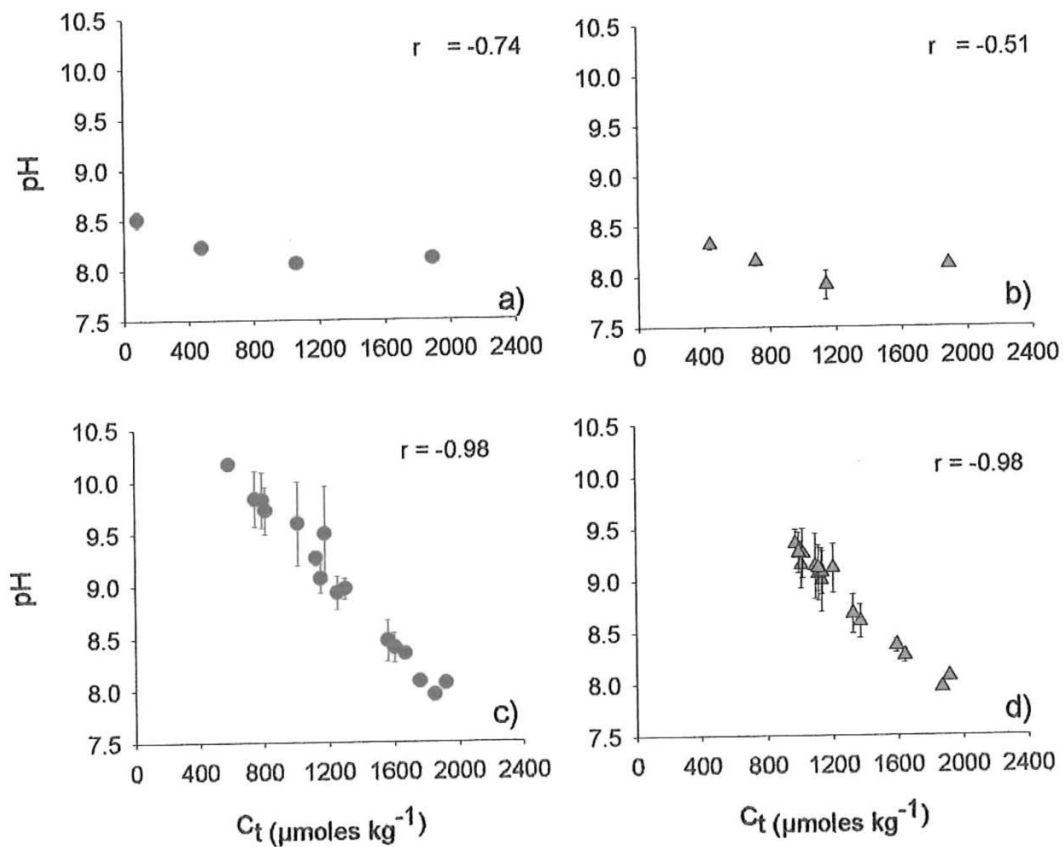


Figura 7. Correlación pH vs C_t en *Rhodomonas sp.* ● e *Isochrysis aff. galbana* (Clone T-ISO) ▲ cultivada en nivel Fernbach (a-b) y Garrafón (c-d). La barra vertical indica el error estándar.

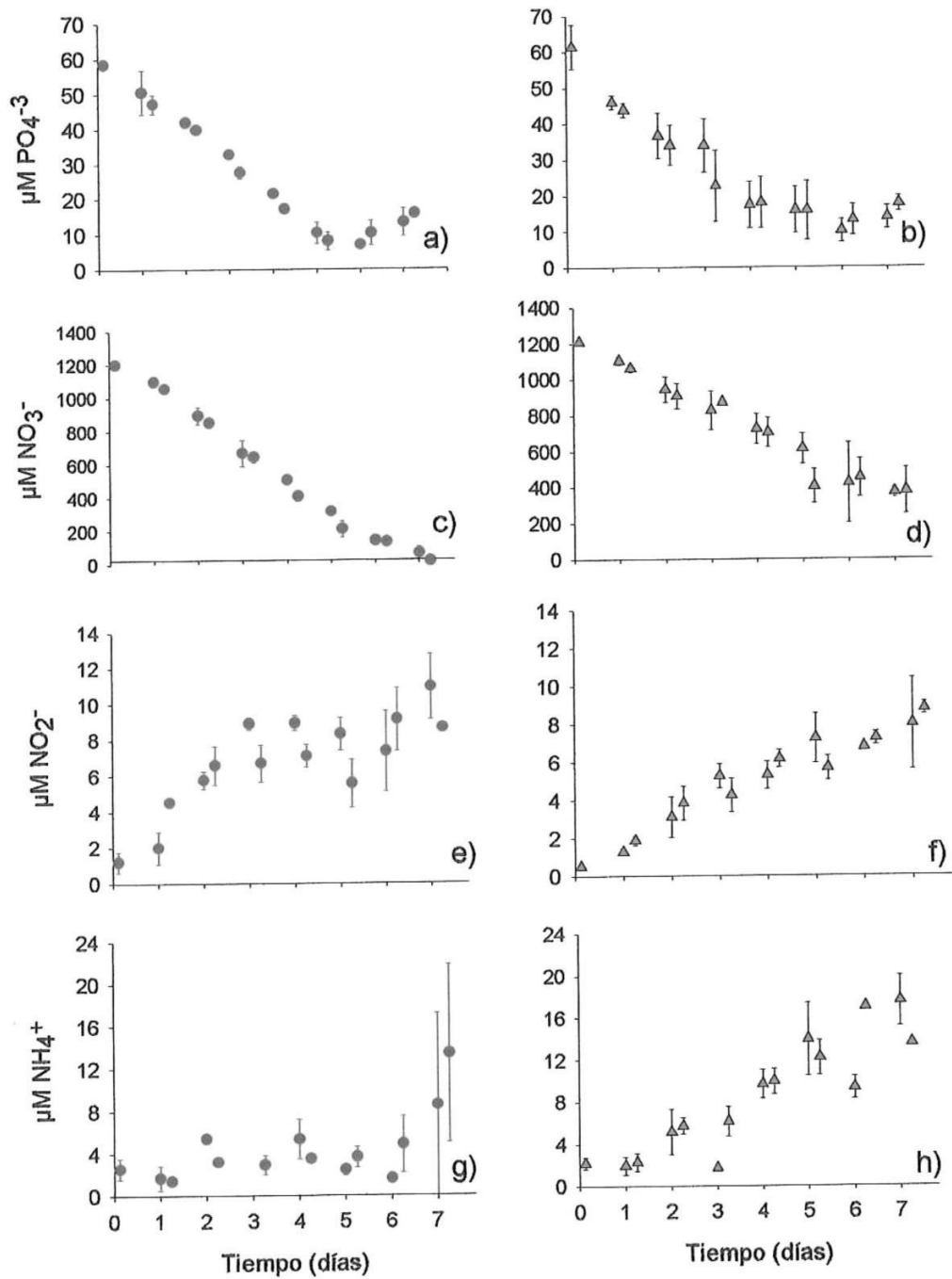


Figura 8. Cambio en la concentración promedio de fosfato (PO_4^{3-}) (a-b), nitrato (NO_3^-) (c-d), nitrito (NO_2^-) (e-f) y amonio (NH_4^+) (g-h) en *Rhodomonas* sp. ● e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) ▲ cultivada en nivel Garrafón. La barra vertical indica el error estándar.

las últimas tres mediciones, el aumento total fue de 8.9 μM para *Rhodomonas* sp. y 7.6 μM en *I. aff. galbana* (Clon T-ISO) (Figura 8 a-b).

Los NO_3^- fueron consumidos durante todo el transcurso del cultivo. La tasa de consumo fue 172.5 y 124.29 $\mu\text{M día}^{-1}$ para *Rhodomonas* sp. e *I. aff. galbana* (Clon T-ISO) respectivamente. *Rhodomonas* sp. consumió el 100% del NO_3^- del medio de cultivo, mientras que *I. aff. galbana* (Clon T-ISO) solo consumió el 69% (Figura 8 c-d).

4.3.2. Aumento de NO_2^- y NH_4^+ .

La concentración de NO_2^- en ambos cultivos de microalgas, se incrementó con el tiempo, sin embargo, en *Rhodomonas* sp. durante el tercer y sexto día la concentración tuvo fluctuaciones, posterior a esto volvió a aumentar hasta un valor final de 10.97 μM el séptimo día de cultivo (Figura 8 e). En *I. aff. galbana* (Clon T-ISO) se observaron pequeñas fluctuaciones, sin embargo fue clara la tendencia a aumentar hasta obtener un valor final de 8.8 μM (Figura 8 f).

La concentración de NH_4^+ , en *Rhodomonas* sp. se mantuvo por debajo de 5.4 μM desde el inicio del cultivo hasta el sexto día, sin embargo, el séptimo día de cultivo los valores de NH_4^+ aumentaron hasta 13.4 μM (Figura 8 g). Para *I. aff. galbana* (Clon T-ISO), la concentración de NH_4^+ aumentó de manera continua durante los siete días de cultivo, hasta un valor final de 17.6 μM (Figura 8 h).

4.4. Bases extras

A continuación, se presentan los valores de A_t medida y calculada en el nivel Garrafón (Tabla VII, Figura 9 a-b). El valor medido y calculado, al día cero, fue muy similar, 2189.2-2210.6 $\mu\text{moles kg}^{-1}$, posterior a esto los valores medidos aumentaron.

En la figura 10 se observa la cuantificación de bases extras en *Rhodomonas* sp. e *I. aff. galbana* (Clone T-ISO). Las bases extras aumentan durante el transcurso de los cultivos, a una tasa de 100.7 $\mu\text{moles kg}^{-1}\text{día}^{-1}$ durante cinco días, en *Rhodomonas* sp. y de 47.2 $\mu\text{moles kg}^{-1}\text{día}^{-1}$ durante todo el cultivo en *I. aff. galbana* (Clone T-ISO).

Tabla VII. Valores de A_t medida y calculada, en el nivel Garrafón para *Rhodomonas* sp. e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO).

Tiempo (días)	<i>Rhodomonas</i> sp. A_t ($\mu\text{moles kg}^{-1}$)			<i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (Clone T-ISO) A_t ($\mu\text{moles kg}^{-1}$)		
	$A_{t(\text{med})}$	$A_{t(\text{cal})}$	$A_{t(\text{med})}-A_{t(\text{cal})}$	$A_{t(\text{med})}$	$A_{t(\text{cal})}$	$A_{t(\text{med})}-A_{t(\text{cal})}$
0.00	2189.2	2210.6		2189.2	2210.6	
0.13	2369.4	2136.4	233.0	2348.9	2169.0	179.9
1.00	2405.7	2103.6	302.1	2452.9	2102.0	350.9
1.25	2482.2	2197.2	285.0	2448.7	2121.2	327.5
2.00	2632.2	2161.2	471.0	2531.0	2051.0	480.0
2.25	2667.3	2172.7	494.6	2549.1	2063.0	486.1
3.00	2687.9	2338.6	349.3	2567.9	2187.9	380.0
3.25	2694.1	2216.8	477.3	2535.2	2037.7	497.5
4.00	2821.6	2193.4	628.2	2609.4	2118.8	490.6
4.25	2973.5	2332.5	641.0	2664.4	2151.0	513.4
5.00	2985.8	2282.9	702.9	2654.2	2167.7	486.5
5.25	2975.5	2209.9	765.6	2687.9	2154.9	533.0
6.00	2937.0	2406.4	530.6	2707.1	2167.7	539.4
6.25	2963.6	2210.6	753.0	2736.3	2167.7	568.6
7.00	3050.6	2456.1	594.5	2741.1	2113.1	628.0
7.25	3106.0	2655.7	450.3	2776.2	2318.8	457.4
		promedio	511.9		promedio	461.2

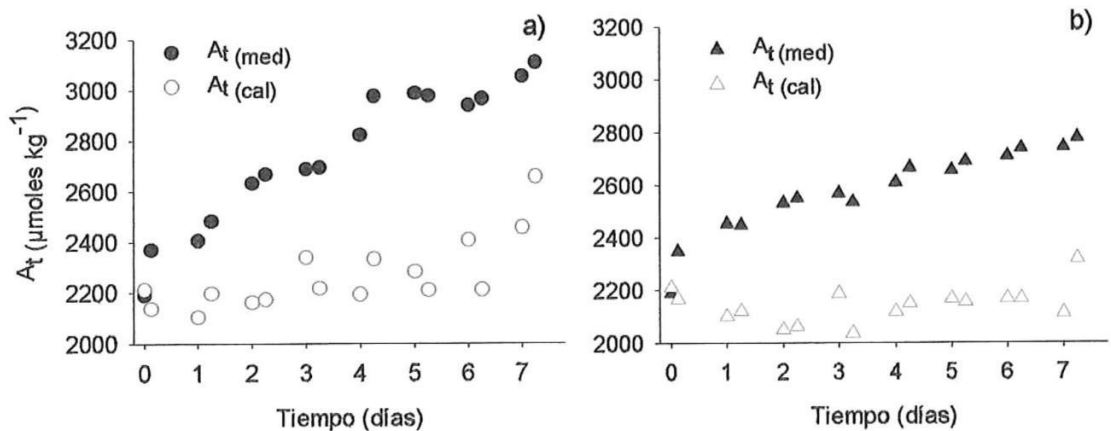


Figura 9. Valores de alcalinidad total (A_t) calculada y medida en nivel Garrafón para *Rhodomonas* sp. (a) ● e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) (b) ▲.

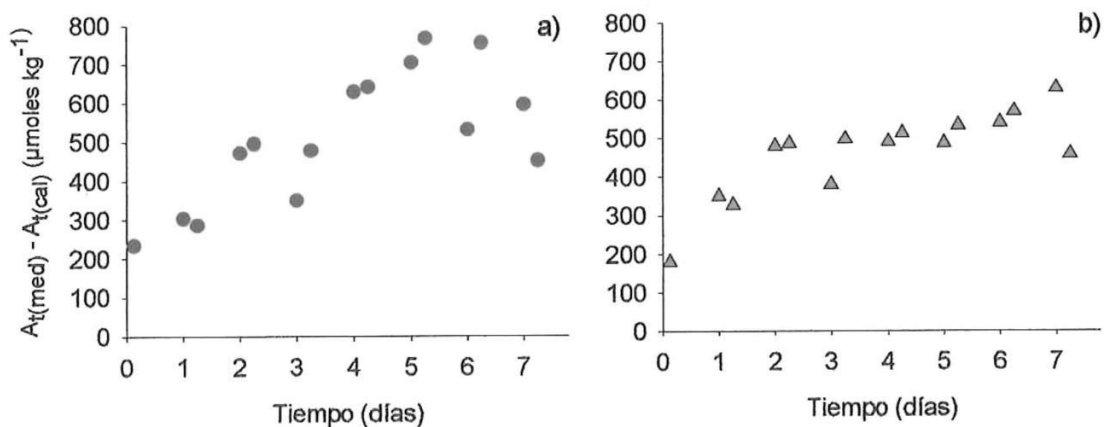


Figura 10. Cuantificación de bases extras, obtenidas a través de las diferencias encontradas entre $A_t(\text{med}) - A_t(\text{cal})$ para el nivel Garrafón, en *Rhodomonas* sp. ● (a) e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) ▲ (b).

5. DISCUSIÓN

La aplicación del sistema potenciométrico en cultivos de microalgas, como el que se presenta en este trabajo, permitió medir de manera precisa y exacta, la tasa de consumo de carbono inorgánico total (C_t) en dos especies de microalgas, *Rhodomonas* sp. e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) (Tabla II). La tasa de consumo de C_t fluctuó entre 200-700 $\mu\text{moles kg}^{-1}\text{dia}^{-1}$ según el nivel de cultivo, y como la precisión y exactitud obtenida fueron para la A_t de $\sim 1 \pm 8.8 \mu\text{moles kg}^{-1}$ y de C_t $\sim 5.9 \pm 11.4 \mu\text{moles kg}^{-1}$ respectivamente. (Tabla II), ambos indican que los cambios de C_t (Figura 6) obtenidos en las muestras analizadas, fueron debidos a cambios de los cultivos y en menor grado a las variaciones analíticas. Además, la reproducibilidad de los datos es confiable, debido a la exactitud y precisión obtenida la cual, se comprueba aún más, debido a que se observó la misma tendencia, en las dos especies de microalgas, en dos diferentes niveles de cultivo (Fernbach y Garrafón) y por duplicado.

Para tener una visión más clara de cómo, el C_t disminuyó conforme transcurrió el tiempo, a continuación se muestran las gráficas (obtenidas a partir de la técnica de la derivada) empalmadas de *Rhodomonas* sp. solo como ejemplo para ilustrar dichos cambios. En estas gráficas, se observan los dos picos de la derivada, así como la disminución de la distancia entre estos, lo cual es una medida de la disminución del C_t en los niveles Fernbach y Garrafón (Figura 11).

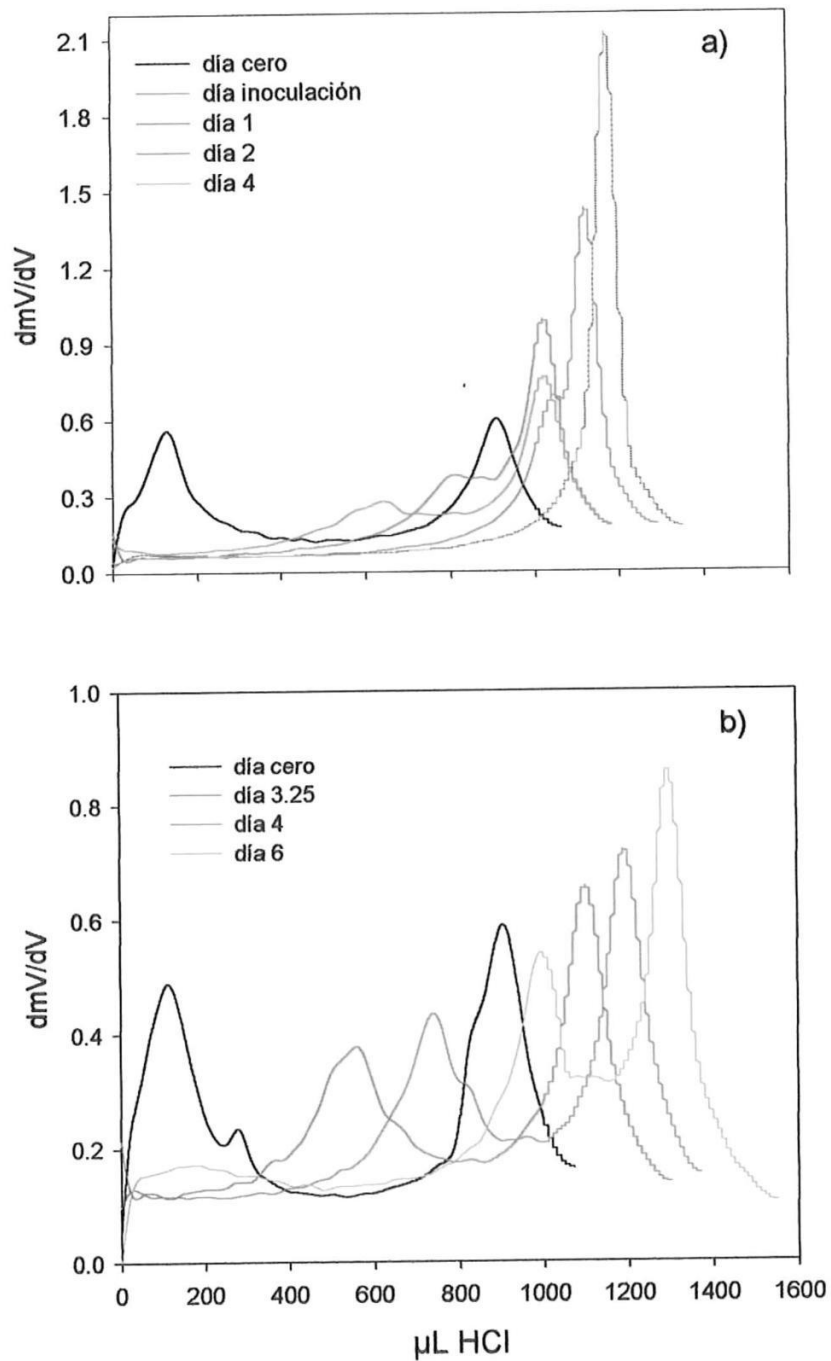


Figura 11. Gráficas obtenidas mediante la derivación de los datos de milivoltaje con respecto a los microlitros de HCl adicionados en *Rhodomonas* sp. en Fernbach (a) y Garrafón (b). Los días se especifican en cada gráfica.

Así mismo, se puede observar que en el nivel Fernbach, la altura del primer pico (día cero), fue más alta que la siguiente medición (día de inoculación), esto también ocurrió en el nivel Garrafón, sin embargo, en ambos niveles de cultivo, ambos picos aumentan de tamaño (Figura 11).

A pesar de esto, los cambios de tamaño, no repercuten en las mediciones de C_t o A_t (Hernández-Ayón *et al.*, 1999). Una posible explicación a esto, es la posible interferencia de sustancias desconocidas en altas concentraciones con un pK cercano a las disociaciones del carbono, lo cual se puede observar en la desaparición del primer pico (Figura 11 a). El primer pico indica la protonación del carbonato (CO_3^{-2}) al ion bicarbonato (HCO_3^-), y el segundo pico, del HCO_3^- al ácido carbónico (H_2CO_3) (Hernández-Ayón *et al.*, 1999). Por lo que la desaparición del primer pico (Figura 11 a) sugiere escasas o nulas concentraciones de CO_3^{-2} . Cuando la especie de carbono consumida es HCO_3^- para la fotosíntesis microalgal, parte del CO_3^{-2} contenido en el medio toma protones del agua para formar HCO_3^- con el objeto de compensar la disminución en su concentración. Este proceso equilibra al medio en donde, debido a la liberación de iones OH^- , el pH se incrementa, mientras la concentración de C_t disminuye (Uusitalo, 1996).

Los factores que afectan la fijación de carbono en los cultivos se pueden dividir en: externos e internos. Los externos se refieren a las condiciones del medio de cultivo como luz (intensidad y longitud de onda), niveles de oxígeno, y las concentraciones de nutrientes orgánicos e inorgánicos (Ralph, 1967). Sin embargo, las condiciones en las

que crecieron los cultivos, en cuanto a luz (en promedio fue $150.05 \mu\text{Mm}^{-2}\text{seg}^{-1}$), temperatura ($20^{\circ}\text{C}\pm 1$) y aireación, todas fueron controladas y constantes, exceptuando las concentraciones de nutrientes, puesto que estos se adicionaron al inicio de cada cultivo y su consumo (Figura 8 a-c) o producción (Figura 8 d-c) varió durante la evolución del mismo. La luz tiene también efectos sobre la producción primaria como un agente que modifica los requerimientos de nutrientes, así como también tiene efectos sobre la naturaleza de los productos de la fotosíntesis, por otro lado el contenido de clorofila depende de la irradiancia ya que, al disminuir esta en el cultivo, existe un aumento en el contenido de clorofila por célula. (Valenzuela-Espinoza, 1997). En ambos cultivos de microalgas, se presentó un efecto de autosombreado, debido al aumento de la densidad celular, el cual ocasiona una disminución la disponibilidad de luz en general por las microalgas, solo las microalgas que se encuentran en contacto directo con la luz fotosintetizan (Fogg y Thake, 1987).

Brown *et al.*, 1996, reportaron que el aumento de la densidad celular, ocasiona una reducción de la irradiancia en donde la disponibilidad de luz, disminuye hasta un 30–40% durante la fase de crecimiento estacionario. Lafarga-De la Cruz (2000) no observó un efecto estadísticamente significativo en el consumo de ^{14}C a diferentes irradiancias ($52, 68, 103$ y $142 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-2}$) en cultivos estáticos de *Rhodomonas* sp. Esto podría explicar, porqué en el nivel Garrafón el consumo de C_1 fue similar hasta el sexto día (Figura 6 c), aún cuando el cultivo se encuentra en fase estacionaria y la disponibilidad de luz disminuye por la misma abundancia de microalgas. El caso fue diferente, para *I. aff. galbana* (Clone T.ISO) en donde el consumo terminó el cuarto día (comienzo de la

fase estacionaria) (Figura 4c). Se pudo notar que a partir de este día se mantuvo cierto equilibrio de concentración de C_i con fluctuaciones de alrededor de $1076 \mu\text{moles kg}^{-1}$ (Figura 6 d). La luz, no pudo ser un factor limitante, para el nivel Fernbach, puesto que ambas microalgas agotaron la concentración de este a partir del tercer día de cultivo (Figura 6 a-b).

Los factores internos se refieren a las características propias de cada especie cultivada y la fase (Ralph, 1967). Uno de estos factores fue la razón superficie/volumen, la cual es 0.63 para *Rhodomonas* sp. y 0.88 para *I. aff. galbana* (Clone T-ISO). Esta estimación tiene cierto grado de error porque *Rhodomonas* sp. presenta una forma ovoidal y para los cálculos se considero ambas microalgas esféricas, sin embargo difieren en un 30% aproximadamente. En el nivel Garrafón, *Rhodomonas* sp. tuvo un consumo total de $1330.5 \mu\text{moles kg}^{-1}$ mientras que para *I. aff. galbana* (Clone T-ISO) fue de $908 \mu\text{moles kg}^{-1}$, es decir *Rhodomonas* sp. consumió 30 % más C_i , lo cual esta relacionado con el estado fisiológico del cultivo por lo tanto con la tasa promedio de crecimiento exponencial, la cual fue 1.729 para *Rhodomonas* sp. y 0.806 para *I. aff. galbana* (Clone T-ISO). Sin embargo la tasa de consumo, fue 10% menor para *Rhodomonas* sp. que para *I. aff. galbana* (Clone T-ISO), 219.9 y $237.9 \mu\text{moleskg}^{-1}\text{día}^{-1}$ respectivamente, y referido con la abundancia celular entre ambas microalgas, *Rhodomonas* sp. es 6.5 veces menor.

Con respecto a las diferencias encontradas entre niveles de cultivo (Figura 6 a-c), referentes a la tasa de consumo de C_i se muestra que el nivel Fernbach fue mayor en un 70% que el nivel Garrafón. Lo esperado, sería que debido a la aireación continúa en el

nivel Garrafón el coeficiente de difusión del CO_2 aumentara y existiera un mayor consumo en éste, sin embargo no fue así, por otro lado, las diferencias que caracterizan cada nivel de cultivo como el volumen total, la geometría del recipiente, la cantidad y calidad del inóculo y el tipo de aireación influyen en la tasa de consumo de C_t , sin embargo mediante este trabajo no fue posible explicar el porque de dicha diferencia. En el caso del nivel Erlenmeyer, aún cuando el C_t no se pudo medir, se esperaría obtener una tasa de consumo similar al nivel Fernbach, debido a la similitud de las condiciones de cultivo.

Por otro lado la técnica potenciométrica como se explicó, permitió medir los cambios de las especies HCO_3^- y $\text{CO}_{2(\text{ac})}$ a partir de pH y C_t . Esto a su vez ayudo en evaluar la preferencia en cualquiera de estas especies entre las microalgas estudiadas. En la figura 12 se muestra que el consumo de ambas especies de carbono fue simultáneo, sin embargo también existe una disminución de la disponibilidad de estas especies solamente por cambios en el pH. Estos valores fueron calculados a partir del valor de C_t inicial fijo y variando el pH. En la misma figura la línea en cada especie, representa la diferencia que existe entre el cambio de carbono medido y el termodinámico, indicando el consumo biológico. En el caso del $\text{CO}_{2(\text{ac})}$, la diferencia corresponde en promedio solo al 2% del total y el 84% restante representa los cambios debidos a la termodinámica en ambas microalgas. Para este ion, la mayor diferencia se encontró durante los primeros tres días, sin embargo la proporción fue muy pequeña. En el caso del ión HCO_3^- la diferencia correspondió en promedio a un 11 y 18% en *Rhodomonas* sp. e *I. aff. galbana* (Clone T-ISO) contra un 50% por termodinámica. En ambos casos se observó un aumento en el

consumo durante la fase exponencial y una disminución en la fase de crecimiento estacionario, al tercer y segundo día para *Rhodomonas* sp. e *I. aff. galbana* (Clon T-ISO) respectivamente, lo cual está relacionado con la disminución en la tasa de crecimiento y las divisiones celulares por día (Tabla III C y IV C).

Elzenga *et al.*, (2000), encontraron mediante la inhibición de la anhidrasa carbónica (AC) que *Rhodomonas* sp. asimilaba solo $\text{CO}_2(\text{ac})$. Sin embargo, el autor acepta que existe la posibilidad de que *Rhodomonas* sp. consuma ambas especies de carbono (comunicación personal T. Elzenga) y de igual manera *I. aff. galbana* (Clon T-ISO).

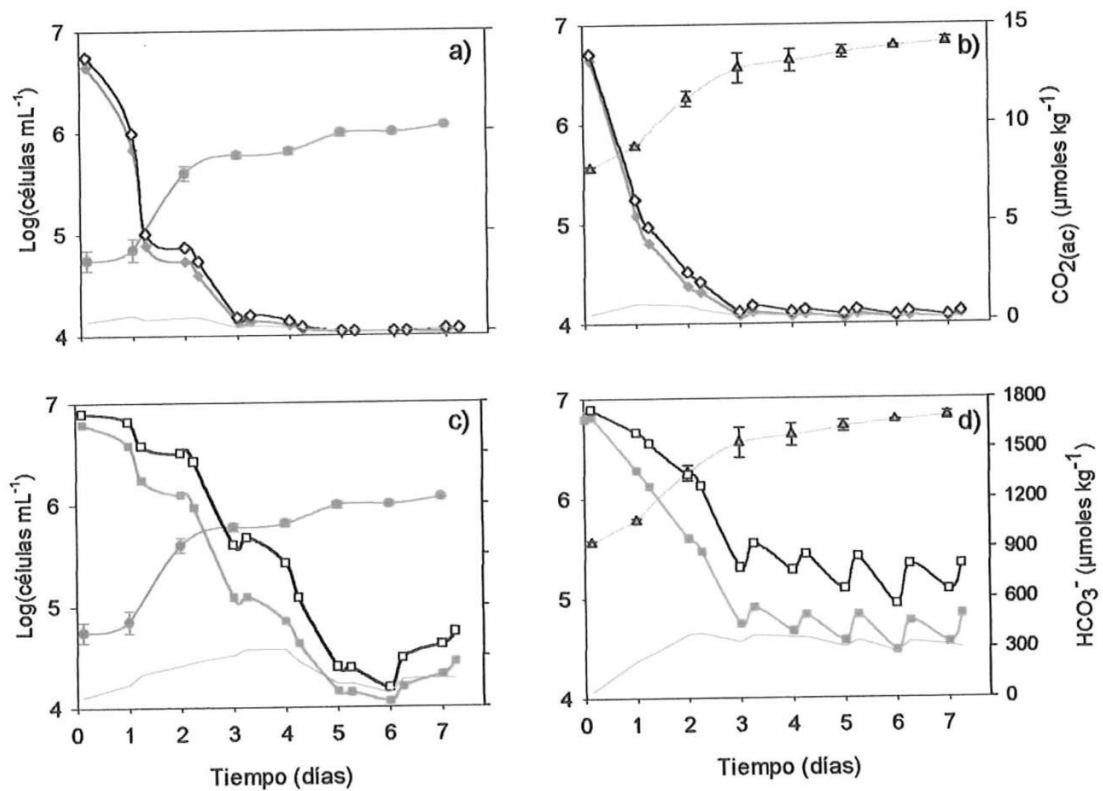


Figura 12. Relación entre el crecimiento logarítmico promedio de *Rhodomonas* sp. ● (a) e *Isochrysis aff. galbana* (Clon T-ISO) ▲ (b), y la concentración medida en símbolos llenos ($\mu\text{moles kg}^{-1}$) del $\text{CO}_2(\text{ac})$ (a-b)(◆) y HCO_3^- (c-d)(■) en el nivel Garrafón. Los símbolos vacíos corresponden al cambio de las especies de carbono por el cambio termodinámico. La línea (—) corresponde a la diferencia entre las especies de carbono medidas y el cambio termodinámico, en cada caso.

Estos valores demuestran que ambas microalgas consumieron de manera simultánea ambas especies de carbono. Lo anterior señala que en futuros estudios si se utiliza un inhibidor de AC y la medición potenciométrica de C_t sería posible evaluar, la preferencia y consumo de una u otra especie (HCO_3^- y $\text{CO}_{2(ac)}$) en distintas microalgas.

De acuerdo a lo anterior, es de esperarse que las deficiencias de C_t en los cultivos de microalgas y el aumento de la densidad celular, disminuyan la cantidad de carbono consumido por célula. Adicionalmente, durante el consumo de C_t , la disponibilidad de las especies de carbono utilizadas como fuente de carbono, cada vez son mas limitantes (Figura 12). Esto se puede observar mas claramente en la figura 13 donde se muestra el consumo de C_t expresado en $\text{pmoles } C_t \mu\text{m}^{-3} \text{ día}^{-1}$, contra la disminución de las especies de carbono consumidas ($\text{CO}_{2(ac)}$ o HCO_3^-).

El consumo de C_t se obtuvo a partir de las diferencias de concentración de C_t en unidades de pmoles kg^{-1} , normalizando con el promedio de número de células ml^{-1} por el volumen en $\mu\text{m}^3 \text{ cel}^{-1}$, considerando la densidad del agua en una relación uno a uno ($1000 \text{ mL} = 1 \text{ kg}$), en unidad de tiempo (día). El volumen celular en micrómetros cúbicos, se obtuvo a partir de la medición del diámetro de las microalgas, con un analizador de partículas, el diámetro de *Rhodomonas* sp. fue de $9.57 \mu\text{m}$ y de *I. aff. galbana* (Clone T-ISO) de $6.8 \mu\text{m}$, considerando ambas microalgas esféricas. Las tasas de consumo de C_t , fueron similares a los obtenidos a partir solo del HCO_3^- por microalgas (Figura 12 c-d), lo cual indica que el cambio se debió al consumo principalmente del HCO_3^- . Riebesell *et al.*, (1993), mostraron valores de consumo de

carbono dos ordenes de magnitud mayores a los encontrados en este trabajo al utilizar tres especies de diatomeas de radio $\sim 15 \mu\text{m}$, este radio indica que las diatomeas fueron cuatro veces más grandes en promedio que *Rhodomonas* sp. e *I. aff. galbana* (Clone T-ISO). Por otro lado, Lafarga-De la Cruz (2000) reportó valores obtenidos a partir de ^{14}C similares a los obtenidos en este trabajo pero utilizando el nivel Erlenmeyer.

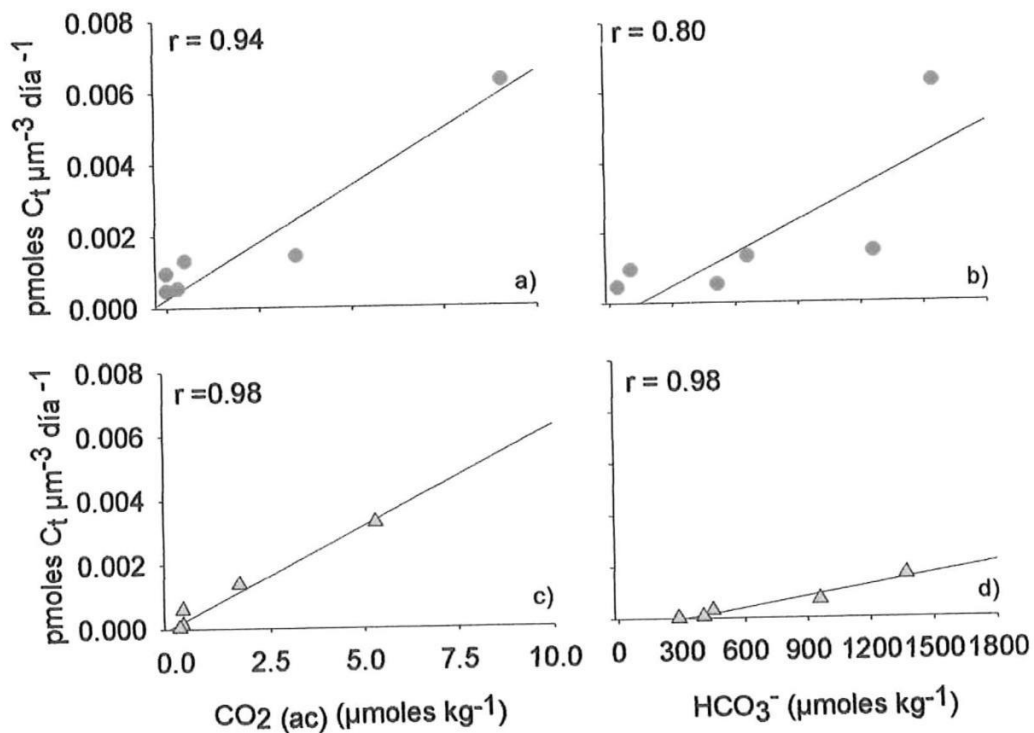


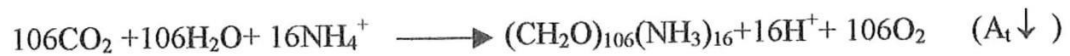
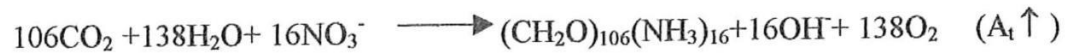
Figura 13. Tasa de consumo de carbono ($\text{p moles } C_t \mu\text{m}^{-3} \text{ día}^{-1}$) vs concentración de $\text{CO}_{2(\text{ac})}$ y HCO_3^- , en *Rhodomonas* sp. ● (a-b) e *I. aff. galbana* (Clone T-ISO) ▲ (c-d). para el nivel Garrafón. Para la correlación se empleó una $n = 7$.

Otro factor interno importante es el incremento poblacional (Figura 3), en donde los parámetros como la tasa de crecimiento, los tiempos de duplicación y las divisiones celulares por día, dan una respuesta a la condición o estado fisiológico de las células para el consumo de los nutrientes, correspondiente a cada día de cultivo (Tabla III y IV). Del

mismo modo el aumento de pH estuvo relacionado directamente con el crecimiento poblacional, producto de la alta actividad fotosintética (Fogg y Thake, 1987; Darley, 1978). Por lo que la tasa promedio exponencial para ambas microalgas fue 0.862, 0.657 y 1.267, y la tasa de incremento del pH, de 0.262, 0.171 y 0.352 día⁻¹, en Erlenmeyer, Fernbach y Garrafón respectivamente. El aumento de pH es producido por la liberación de iones OH⁻, durante los procesos de fotosíntesis y durante la asimilación de NO₃⁻ en los cultivos de microalgas (Brewer y Goldam, 1976, Geider *et al.*, 1992), por esto mismo se puede explicar el mayor incremento de pH (hasta 10.165) en el nivel Garrafón para *Rhodomonas* sp. (Figura 4 e-f), ya que consumió en el 30% más C_t y NO₃⁻, que *I. aff. galbana* (Clone T-ISO). En este trabajo, el consumo de NO₃⁻ y PO₄⁻³ por célula, disminuyó conforme evolucionan ambos cultivos al igual que la tasa de crecimiento, de manera similar a lo reportado por Lafarga-De la Cruz (2000) para *Rhodomonas* sp. y por Valenzuela-Espinoza (1997) para *I. aff. galbana* (Clone T-ISO). Por otro lado el pH estuvo altamente correlacionado con la concentración de C_t (Figura 7) y del mismo modo, el incremento de pH estuvo relacionado directamente con la A_t, NO₂⁻ y NH₄⁺, e inversamente con el PO₄⁻³ y NO₃⁻ en ambas especies cultivadas.

En el océano, los procesos de fotosíntesis o respiración, no influyen en los cambios de A_t (Morel y Hering, 1993). Sin embargo, en ambos cultivos de microalgas, la A_t aumentó (Figura 5) debido a que el NO₃⁻ fue el tipo de fuente de nitrógeno consumido (Figura 8 c-d). La asimilación de NO₃⁻ y NO₂⁻ aumentan la A_t, y la asimilación de NH₄⁺ y la nitrificación bacteriana la disminuyen. El aumento de A_t se debe a la liberación de iones OH⁻ y la disminución a la liberación de iones H⁺ (Brewer

y Goldman, 1976; Geider y Osborne, 1992; Morel y Hering, 1993), como se observa en las siguientes reacciones.



Cabe señalar, la forma preferencial de consumo, en cuanto a las especies de nitrógeno en las microalgas. El orden es el siguiente: NH_4^+ , NO_2^- y NO_3^- , ya que el transporte de NH_4^+ , hacia el interior de la célula se realiza por difusión activa mientras que el NO_3^- , entra por transporte activo primario (Conn *et al.*, 1996). Trabajos sobre consumo de NH_4^+ y NO_3^- , realizados por Thomson *et al.*, (1989) y Dortch *et al.* (1991) demuestran que cuando ambas fuentes de nitrógeno están presentes en el mismo medio de cultivo, el NH_4^+ es preferentemente consumido debido al menor costo energético que implica su consumo. Sin embargo, en este trabajo y en Lafarga-De la Cruz (2000) el consumo de NO_3^- en *Rhodomonas* sp., continuó hasta el último día de cultivo (Figura 8 c), aún cuando la concentración de NH_4^+ aumentó o se mantuvo por arriba de 1 μM (Figura 8 g). En *I. aff. galbana* (Clone T-ISO), el consumo de NO_3^- fue menor (Figura 8 d), y el aumento de NH_4^+ fue continuo (Figura 8 h).

Las concentraciones de NO_2^- y NH_4^+ (Figura 8 e-h), estimulan la presencia de bacterias nitrificantes como *Nitrosomas* y *Nitrobacter*, debido a la degradación de la materia orgánica, las bacterias nitrificantes oxidan el NH_4^+ a NO_2^- y después a NO_3^- (Libes, 1992). Actualmente, se realizan estudios que muestran la presencia de bacterias nitrificantes y heterótrofas en cultivos de *Rhodomonas* sp. e *I. aff. galbana* (Clone T-

ISO) (Simental-Oceguera, Tesis en preparación), en donde se ha observado una sucesión de especies nitrificantes y el aumento de bacterias heterótrofas.

En *Rhodomonas* sp., la contribución de C_i al final del cultivo en el nivel Garrafón (Figura 6 e), se puede deber a respiración por bacterias heterotróficas o por las mismas microalgas que realizan procesos de fotorespiración (Ralph, 1967). Cabe considerar que para este día de cultivo, los PO_4^{-3} y NO_3^- (Figura 8 a-b y c-d) son escasos (día seis y siete), y la presencia de sustancias tóxicas (producto de las exudaciones) afectan al cultivo (Ralph, 1967). Sin embargo, las bacterias heterotróficas, generan procesos como la remineralización de nutrientes dentro del sistema.

La remineralización es conocida como un proceso en el cual, las bacterias oxidan el material orgánico producto de la fotosíntesis utilizando oxígeno y liberando nutrientes y $CO_{2(ac)}$ a la columna de agua (Libes, 1992; Zhang, 2000). Este proceso se observó claramente, el último día de cultivo en el nivel Garrafón, para *Rhodomonas* sp, en donde se presentaron los siguientes indicadores de remineralización, disminución de pH, aumento en el C_i , NH_4^+ y PO_4^{-3} (Figura 4 e-f, 6 e-f y 8 a, b, g y h) respectivamente.

En los cultivos de microalgas es interesante evaluar las razones de consumo (Figura 14) entre los nutrientes y contrastar su comportamiento con la relación de Redfield, (1963) ($C_{106}N_{16}P_1$). La razón N:P, fue 19.42 y 12.26 (Figura 14 a-b) para *Rhodomonas* sp. e *I. aff. galbana* (Clone T-ISO) respectivamente, las cuales son cercanas a lo esperado (~16), sin embargo el consumo de ambos nutrientes fue mayor

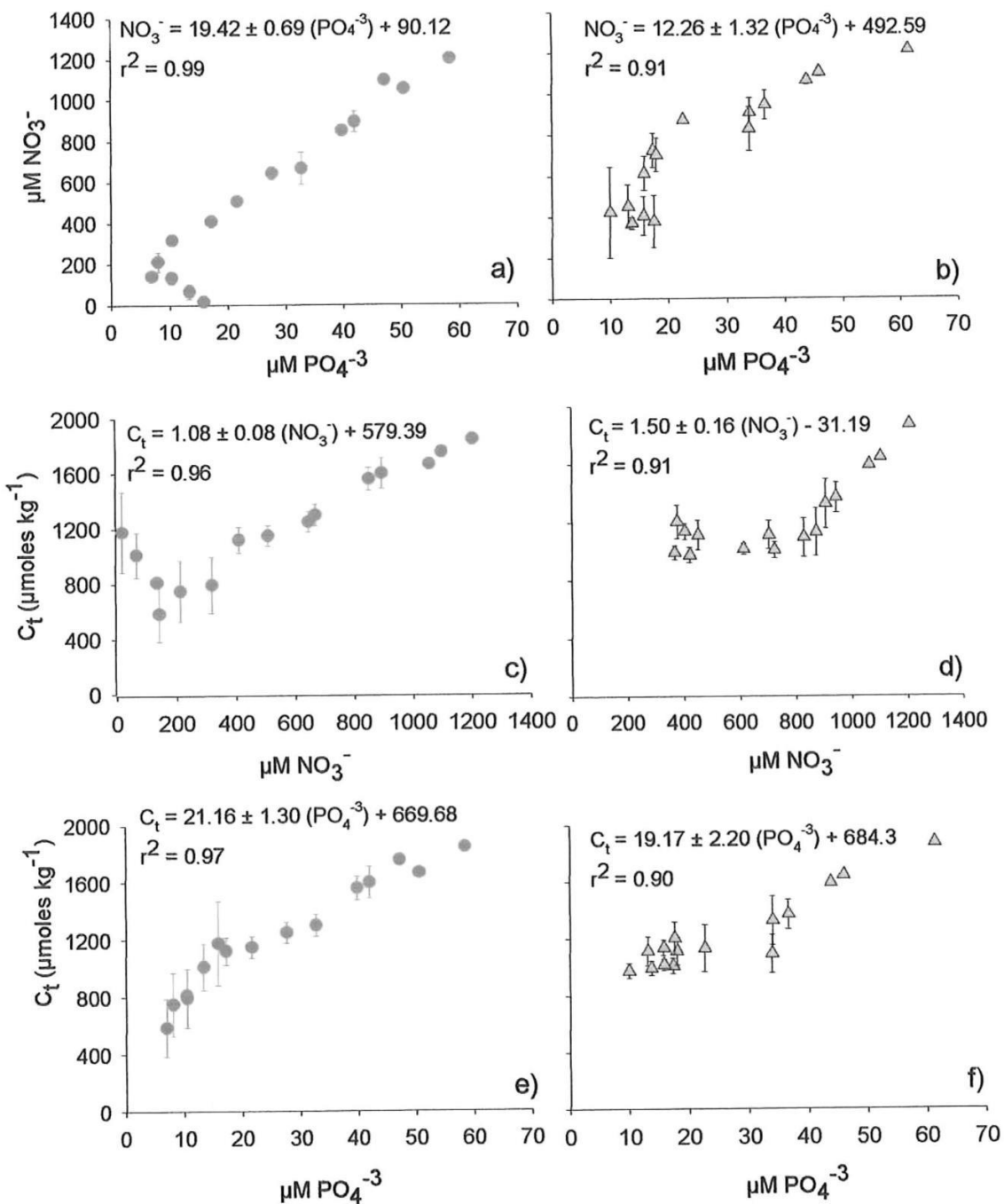


Figura 14. Correlaciones NO_3^- vs PO_4^{-3} (a-b), C_t vs NO_3^- (c-d) y C_t vs PO_4^{-3} (e-f), en *Rhodomonas* sp. ● e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) ▲. En todos los cálculos se utilizó una $n = 10$. La barra vertical indica el error estándar.

para *Rhodomonas* sp. en un 36 %, lo cual se vio también reflejado en la mayor tasa de incremento de pH alrededor del 8 % (Figura 4 c-d) y en un 36% mayor en el aumento de A_t (Figura 5 c-d), respecto a *I. aff. galbana* (Clone T-ISO).

La razón C:N esperada debió ser aproximadamente 6.6, sin embargo fueron 1.08 y 1.5 para *Rhodomonas* sp. y *I. aff. galbana* (Clone T-ISO) (Figura 14 c-d), esto nos indica que en ambas especies, existió un consumo similar de ambos nutrientes, ya que existe una competencia por los metabolitos (NADPH, ATP, esqueletos de carbono) empleados durante la asimilación de nitrógeno y la carboxilación (Ciclo de Calvin) (Raven y Beardall, 1981; Ivor y Turpin, 1987; Falkowski y Raven, 1997). Esta razón de consumo fue mayor en un 30 % para *I. aff. galbana*, lo cual está asociado a la tasa de consumo de C_t (Figura 6 d) aunque posteriormente se estabilizó. La razón C:P deberían ser aproximadamente 106, sin embargo fue 21.16 y 19.17 para *Rhodomonas* sp. e *I. aff. galbana* (Clone T-ISO) respectivamente (Figura 14 e-f). Ambas razones obtenidas de C:N y C:P indican limitación de carbono, para las dos microalgas estudiadas.

Un rasgo que resaltó de manera muy clara fue el aumento de la A_t conforme al tiempo de cultivo en ambas microalgas. Como se mencionó anteriormente, Brewer y Goldman (1976) determinaron incrementos o disminuciones de dicho parámetro, debidos al tipo de fuente de nitrógeno en tres diferentes microalgas cultivadas, por lo que, si la microalga consume NO_3^- la A_t aumenta y si consume NH_4^+ disminuye. Sin embargo, se ha reportado que en cultivos de microalgas existen exudaciones que pudieran participar como bases extras y así participar con una fracción como parte de

la A_t . Una manera de conocer la cantidad de bases extras liberadas por los organismos es mediante la diferenciación de la A_t medida con respecto a la A_t termodinámica (Hernández-Ayón, 2000) (Figura 9). La A_t termodinámica se calculó a partir de valores de pH y C_t , usando el programa CO2SYSTEM, el cual considera además, nutrientes como (PO_4^{3-} y SiO_4), salinidad, temperatura y las constantes K1 y K2 del sistema del CO_2 . Todo lo anterior, corresponde a la porción A de la definición de A_t (ver ecuación). La porción B generalmente se ignora pues en el mar abierto es una cantidad muy pequeña, sin embargo suelen estar presente en grandes cantidades en zonas costeras (Hernández-Ayón, 2000).

$$A_t = \underbrace{[HCO_3^-] + 2[CO_3^{2-}] + [B(OH)_4^-] + [Nutrientes] + [OH^-] - [H^+]}_A + \underbrace{Bases\ extras}_B$$

En este trabajo, sabemos que parte de las bases extras medidas durante la titulación contienen iones OH^- los cuales fueron liberados por la asimilación de NO_3^- (Figura 8 c-d) y el consumo de HCO_3^- (Figura 12 a-b), así como también a bases debidas a exudaciones (Figura 10). A partir de la ecuación de Redfield (estequiométricamente), es posible determinar la proporción de iones OH^- producidos por el consumo de ambos nutrientes, sin embargo es incierta la cantidad de iones OH^- que reaccionaron con otros compuestos (exudaciones o aceptores de protones). Por lo que las mediciones de pH, determinarán la concentración de OH^- libres y estos son menores a los producidos.

Los valores de A_t medida y calculada en el nivel Garrafón, al tiempo cero fueron casi idénticas y a partir de la siguiente medición solo 4 horas después, los valores comenzaron a separarse cada vez más. La tasa de aumento de la A_t medida fue de 100.9 y 62.6 $\mu\text{moles kg}^{-1}\text{día}^{-1}$ para *Rhodomonas* sp. e *I. aff. galbana* (Clone T-ISO) respectivamente (Figura 5 e-f). Esta diferencia de aumento de A_t medida corresponde en parte a que *Rhodomonas* sp. consumió en mayor proporción NO_3^- y a la razón N:P (Figura 8 c, 14 a) respectivamente.

En la figura 10, se muestra la diferencia de A_t calculada-medida, la tasa de incremento de las bases extras fue 100.7 y 47.2 $\mu\text{moles kg}^{-1}\text{día}^{-1}$ para *Rhodomonas* sp. e *I. aff. galbana* (Clone T-ISO) respectivamente, lo cual es atribuido en parte a que la razón N:P para *Rhodomonas* sp. es 36% mayor, es importante señalar que *Rhodomonas* sp. consumió NO_3^- durante todo el experimento a una tasa de consumo de 172.5 $\mu\text{moles día}^{-1}$. Sin embargo en *I. aff. galbana* (Clone T-ISO) consumió NO_3^- a una tasa de 124.29 $\mu\text{moles día}^{-1}$, solo hasta el quinto día, a pesar de esto, la A_t medida siguió aumentando hasta el final del experimento. En ambos cultivos, dicha diferencia se debe a los iones OH^- liberados del consumo de NO_3^- y HCO_3^- y a las exudaciones de las microalgas, sin embargo no es posible determinar su naturaleza mediante este tipo de análisis. Las exudaciones pueden ser carbohidratos, sustancias nitrogenadas, ácidos orgánicos, lípidos, fenoles, fosfatos orgánicos, sustancias volátiles, enzimas, vitaminas, factores sexuales, tóxicos e inhibidores o estimuladores del crecimiento (Ralph, 1967). Durante la fase de crecimiento estacionario en *Rhodomonas* sp. e *Isochrysis galbana*, se tiene reportado la excreción de polisacáridos (Ralph, 1967). El ácido orgánico que con mayor frecuencia es liberado por las algas es el ácido Glicólico, esta liberación se

ve favorecida por la disminución de los niveles de CO_2 que limitan la fotosíntesis (Ralph, 1967). Este ácido tiene un pKa de ~ 3.8 por lo que se descarta su interferencia puesto que queda afuera de las determinaciones de A_t .

Existe la presencia de bases extras en los niveles, Erlenmeyer, debido al aumento de la A_t , y tuvieron una tasa de aumento en promedio de 173.2 y 130 $\mu\text{moles kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ respectivamente (Figura 5 a-d), pero no se cuenta con valores de PO_4^{3-} , los cuales son indispensables para la determinación de la A_t termodinámica, sin embargo, no se puede dudar su presencia puesto que se tiene reportado altos consumos de NO_3^- por célula en ambos niveles para *Rhodomonas* sp. (Lafarga-Dela Cruz, 2000) y para *I. aff. galbana* (Clone T-ISO) (Valenzuela-Espinoza, 1997) y muy seguramente exudaciones.

Como parte final, una recomendación en lugares donde no se cuenta con el sistema de titulación potenciométrico como el que se presenta en este trabajo: es posible, calcular de manera indirecta el C_t mediante mediciones continuas de pH y determinar el valor inicial de la A_t , antes de la inoculación o adición de nutrientes, ya que como se mostró (Figura 8 c-d) el consumo de nitratos y las exudaciones cambian la A_t . En la figura 15 se puede observar los cambios de C_t medidos para ambas especies de microalgas y adicionalmente el $C_t(\text{pH}-A_t)$ calculado termodinámicamente, los cuales fueron similares a las medidas y por lo tanto, las tasas de consumo fueron muy semejantes ($\sim 200 \mu\text{moles kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$).

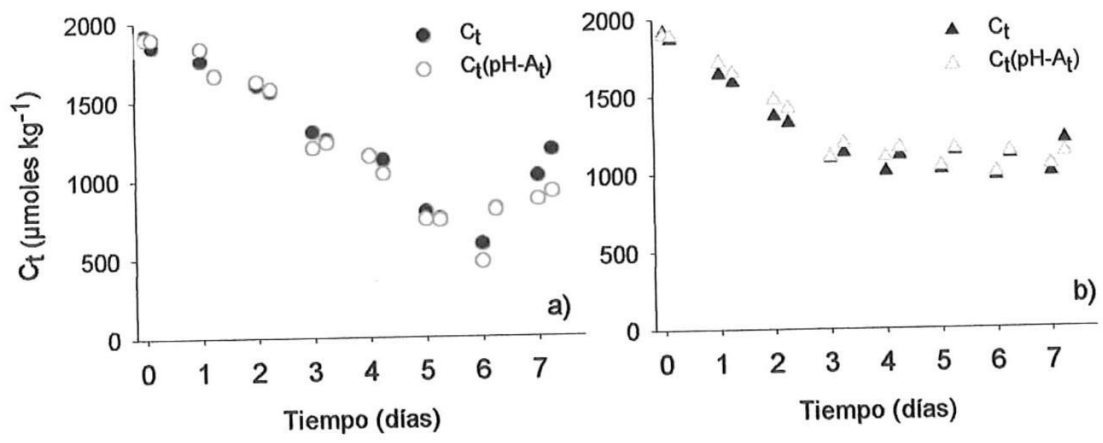


Figura 15. Valores de carbono inorgánico total C_t y $C_t(\text{pH}-A_t)$ (símbolos vacíos) en *Rhodomonas* sp. ● (a) e *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) ▲ (b). Para los cálculos de $C_t(\text{pH}-A_t)$ se mantuvo la A_t inicial.

6. CONCLUSION

1.- En ambos cultivos de microalgas, el C_t disminuyó mientras que los valores de pH y A_t aumentaron.

2.- Los valores iniciales de C_t en ambos niveles de cultivo fueron alrededor de 1901.5 $\mu\text{moles kg}^{-1}$. Al tercer día de cultivo en el nivel Fernbach los valores fueron indetectables mientras que en el nivel Garrafón los valores de C_t fueron mayores a 500 $\mu\text{moles kg}^{-1}$. En ambos cultivos de microalgas, la tasa de consumo de C_t fue mayor en un 70 % en el nivel Fernbach que en el nivel Garrafón, sin embargo fue posible explicar dicha diferencia. En el nivel Erlenmeyer, no se determinó el consumo de C_t , por limitación de volumen.

3.- *Rhodomonas* sp. tuvo un consumo total de 1330.5 $\mu\text{moles kg}^{-1}$ mientras que para *I. aff. galbana* (Clone T-ISO) fue de 908 $\mu\text{moles kg}^{-1}$, sin embargo la tasa de consumo fue 10 % menor para *Rhodomonas* sp. que para *I. aff. galbana* (Clone T-ISO) debido a diferentes factores.

4.- *Rhodomonas* sp. e *I. aff. galbana* (Clone T-ISO) consumieron simultáneamente ambas especies de carbono (HCO_3^- y $\text{CO}_{2(\text{ac})}$), con un porcentaje promedio de 15 y 2% con respecto al C_t medido. Se observó que el consumo de HCO_3^- disminuyó al final de la fase exponencial, los días tres y dos para *Rhodomonas* sp. e *I. aff. galbana* (Clone T-ISO) respectivamente.

5.- La razón de consumo C:N fue 1.08 para *Rhodomonas* sp. mientras que para *I. aff. galbana* (Clon T-ISO) fue 1.5. Del mismo modo, la razón C:P fue 21.2 y 19.2 para *Rhodomonas* sp. e *I. aff. galbana* (Clon T-ISO) respectivamente. Así mismo, se observó la disminución en las tasas de consumo como resultado de la baja concentración de especies de $\text{CO}_{2(\text{ac})}$ y HCO_3^- . Los anteriores resultados indican que ambos cultivos de microalgas se encontraron limitados por carbono.

6.- Se observó una diferencia entre niveles de cultivo, con respecto a la tasa de aumento del pH, las cuales fueron 0.262, 0.171 y 0.352 día^{-1} , en Erlenmeyer, Fernbach y Garrafón respectivamente, lo cual se atribuye a la actividad fotosintética asociada a cada nivel de cultivo. Sin embargo, *Rhodomonas* sp. aumentó el pH a una tasa mayor (8 %) que *I. aff. galbana* (Clon T-ISO), debido a que consumió un 30% más C_t que *I. aff. galbana* (Clon T-ISO) y que la razón N:P fue 19.4 mientras que para *I. aff. galbana* (Clon T-ISO) fue 12.3, en el nivel Garrafón.

7.- En ambos cultivos de microalgas la A_t se incrementó por la producción de bases extras producto de las exudaciones de las microalgas y la liberación de iones OH^- , por el consumo de nitratos y HCO_3^- . La tasa de incremento de las bases extras fue 100.7 y 47.2 $\mu\text{moles kg}^{-1}\text{día}^{-1}$ para *Rhodomonas* sp. e *I. aff. galbana* (Clon T-ISO) respectivamente, lo cual es atribuido en parte a que la razón N:P para *Rhodomonas* sp. es 35% mayor.

8.- El sistema potenciométrico permitió medir las tasas de consumo de C_t y las de incremento de pH y A_t , adicionalmente, se estimó la proporción en que fueron consumidas las diferentes especies del carbono.

9.- Finalmente, para el nivel Garrafón, se propone la utilización de la pareja A_t inicial (sin efecto de bases extras) y el pH como una forma de evaluar los cambios de C_t en cultivos de microalgas.

7. LITERATURA CITADA

Aldana-Aranda, D. and V. Patiño-Suarez. 1998. Overview of diets uses in larviculture of three Caribben conch: Queen conch *Strombus gigas*, Milk conch *Strombus costatus* and fighting conch *Strombus pugilis*. *Aquaculture*, 167: 163-178.

Blasco, D., T.T. Packard y P.C. Gardfield., 1982. Size dependence of growth rate, respiratory electron transport system activity, and chemical composition in marine diatoms in the laboratory. *J. Phycol.* 18:58-63.

Brewer P.G. and J.C. Goldam, 1976. Alkalinity changes generated by phytoplankton growth. *Limnol. Oceanogr.* 21(1). 108-117.

Brown, M.R., G. A. Dunstan, S.J. Norwood y K.A. Miller. 1996. Effects of harvest stage and lighth on the biochemical composition of the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *J. Phycol.*, 32:64-73.

Cajal-Medrano, J. R.. 1999. Eficiencia de crecimiento del bacterioplancton marino en cultivos continuos y en el campo. Tesis Doctorado. CICESE. Oceanología. Depto Ecol.

Clausen, I. and H.U. Riisgard. 1996. Growth, filtration and respiration in the mussel *Mytilus edulis*: No evidence for physiological regulation of the filter-pump to nutritional needs. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 141(1-3):37-45.

Darley, W. M.. 1987. *Biología de las algas*. México. Ed. Limusa. 518 pp.

Dickson, A. G. y Millero, F. J. 1987. A comparison of the equilibrium constants for the dissociation of carbonic acid in seawater media, *Deep Sea Res.* 34: 1733-1743.

Elzelnga, J. T. M., Prins, H.B.A. and J. Stefels, 2000. The role of extracellular carbonic anhydrase activity in inorganic carbon utilization of *Phaeocystis globosa* (Prymnesiophyceae): A comparison with other marine algae using the isotopic disequilibrium technique. *Limnol. Oceanogr.* 45 (2), 372-380.

Falkowski P.G. y J.A. Raven, 1997. *Aquatic photosynthesis*. Blackwell Sci., Inc. Malden, Massachusetts. 375 pp.

Ferreiro, M. J., A. Pérez-Camacho, U. Labarta, R. Beiras, M. Planas and M.J. Fernández-Reiriz. 1990. Changes in the biochemical composition of *Ostrea edulis* larvae fed on different food regimes. *Mar. Biol.*, 106: 395-401.

Fogg, G. E. y B. Thake. 1987. *Algal cultures and phytoplankton ecology*. The University of Wisconsin Press. 259 pp.

García-Sánchez, M.J., J.A. Fernández and F.X. Niell. 1996. The influence of inorganic carbon concentration on the photosynthetic acclimation of *Gracilacia tenuistipitata*. *Sci. Mar. (Supl. 1)* 223-226.

Gavis J. and J. F. Ferguson, 1975. Kinetics of carbon dioxide uptake by phytoplankton at high pH. *Limnol. Oceanogr.* 2(2):211-221.

Geider R.J. and B.A. Osborne 1992. *Algal Photo- Synthesis. The Measurement of algal gas exchange*. Chapman & Hall, Inc. USA. 256 pp.

González-Del Valle, M.A. 1997. Caracterización y crecimiento de las poblaciones bacterianas asociadas a cultivos de microalgas marinas. Producción de compuestos de potencial interés. Universidad de Sevilla. Tesis Doctorado. 157 pp.

Guillard, R.R.L. 1975. Culture of Phytoplankton for feeding marine invertebrates animals. 29-60. En: *Culture of Marine Invertebrates Animals*. Smith, W.L. and M. H. Chanley (Eds). Plenum Publishing Corp., New York, 338.

Hernández-Ayón, J. M., Belli, S.L. and A. Zirino, 1999. pH, alkalinity and total CO₂ in coastal seawater by potentiometric titration with a difference derivative readout. *Anal. Chim. Acta* 394.101-108.

Hernández-Ayón, J.M. 2000. Efectos de procesos físicos, químicos y biológicos sobre parámetros del sistema del CO₂ en dos regiones costeras: El Golfo de California y una región de la Antártica. UABC. Tesis Doctorado. 157 pp.

Libes S. M., 1992. *An Introduction to marine biogeochemistry*. John Wiley & Sons, Inc. 734 pp.

Jiménez-Del Río, M., G. García-Reina, and Z. Ramazanov. 1996. The ultrastructure and Polypeptide composition of the pyrenoid from *Dunaliella tertiolecta*. *Sci. Mar.*, 60 (Supl. 1):155-160.

Kremer, B. P. 1981. Dark Reactions of Photosynthesis. *Physiological Bases of Phytoplankton Ecology*. Canadian Bull. of Fisheries and Aquatic Sciences. 44-45.

Lafarga-De la Cruz, F. 1997. Relación entre el consumo de nutrientes y los cambios en la composición bioquímica de *Rhodomonas* sp. cultivada con medio f/2 y fertilizantes agrícolas. Tesis Licenciatura. FCM. 56 pp.

Lafarga-De la Cruz, F. 2000. Interacción entre luz, consumo de nutrientes composición celular y producción de *Rhodomonas* sp en cultivos estáticos. Tesis Maestría. FCM. 128 pp.

Lewis D. and Wallace, W. R. 1998. Program developed for CO₂ system calculation. Oak Ridge National Laboratory. ORNL/CDIA-105.

Martínez-López, R.E. 1994. Descripción en el desarrollo larvario en el erizo *Stroglyocentrotus franciscanus* (Echinoidea: Echinodermata), y efectos de la densidad, ración alimenticia y cambios de agua. Tesis de Licenciatura, FCM. Ensenada, Baja California. 50 pp.

Mernbach, C., Culbertson, C. H., Hawley, J.E. y Pytowicz, R.M. 1973. Measurement of the apparent dissociation constants of carbonic acid in seawater at atmospheric pressure. *Limnol. Oceanogr.* 18: 897-90.

Millero, F.J., 1994. The CO₂ system in seawater. *Sea Technology*. 17--20.

Morel F.M.M. and J. G. Hering, 1993. *Principles and Applications of Aquatic Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc., 440 pp.

Moroney J.V. y A. Somanchi, 1999. How do algae concentrate CO₂ to increase the efficiency of photosynthetic carbon fixation. *Plant Physiol.* Vol 119. 9-16.

Nabil, A.N, M. D. Iglesias-Rodríguez y M. Merrett. 1997. Bicarbonate utilization by marine phytoplankton species. *J. Phycol.* 33, 625-631.

Osinga, R., P.B. De-Beukelaer, E. M. Meijer, J. Tramper and R. H. Wijffels. 1999. Growth of the sponge *Pseudosuberites* (aff.) *andrewsi* in a closed system. *J. Biotechnol.*, 70 (1-3):155-161.

Pares-Sierra, G. y G.A. Leyva. 1982. Cultivo semicontinuo de las microalgas *Isochrysis galbana* y *Tetraselmis suecica* para su uso como alimento de larvas y adultos de *Mytilus californianicus*. Tesis Licenciatura. Escuela Superior de Ciencias Marinas. 57 pp.

Payne, M.F. 2000. Evaluation of diets for culture of the calanoid copepod *Gladioferens imparipes*. *Aquaculture*. 187:85-96.

Ralph, L. A. 1967. *Physiology and Biochemistry of algae*. 3^{er} ed. Academic Press. New York and London. 929 pp.

Ramazanov Z., M. Rawat, C.B. Mason, and J. V. Moroney. 1995. Ultrastructural and biochemical adaptation of algal cell to limiting CO₂ concentrations. *Sci. Mar.* 141-148.

Redfield, A.C., B.H. Ketchum and F.A. Richard. 1963. The influence of organisms on the composition of sea water. In: M.N. Hill (ed), *The sea*, V.2. *Interscience*. 26-77 pp.

Rhee, W.Y. and J.P. Davis. 1997. Larval survival of the rock scallop, *Crassadoma gigantea* in the hatchery. *J. Shellfish Res.* 16(1):348-349.

Riebesell, U. and D.A. Wolf-Gladrow, V. Smetacek. 1993. Carbon dioxide limitation of marine phytoplankton growth rates. *Nature*. 361. 249-251 pp.

Riley J.P. and G. Skirrow, 1965. *Chemical oceanography*. Academic Press. 712 pp.

Sánchez-Saavedra, M del Pilar. 1994. Efectos de la calidad de luz sobre el crecimiento y la composición bioquímica de microalgas. Tesis de Doctorado. CICESE, Ensenada, Baja California. 74 pp.

Shipp, G.R., J.M.P. Bosmans and A.J. Marshall, 1999. A method for hatchery culture of tropical calanoid copepods, *Acartia* sp. *Aquaculture*. 174(1-2). 81-88.

Sibly, R.M. T.D. Williams and M.B. Jones, 2000. How environmental stress affects density dependence and carrying capacity in a marine copepod. *J. Ap. Ecol.* 37(3). 388-397.

Starr, M., J.A. Runge and J.C. Therriault, 1999. Effects of diatom on the reproduction of the planktonic copepod *Calanus finmarchucus*. *Sarsia*.84 (5-6). 379-389.

Tortell, P.D. 1997. Active uptake of bicarbonate by diatoms. *Nature*.390:243-244.

Uusitalo J. 1996. Algal carbon uptake and the difference between alkalinity and high pH ("alkalization"), exemplified with a pH drift experiment. *Sci. Mar.*, 60 (Supl. 1): 129-134.

Valenzuela-Espinoza, E. 1997. Uso de un medio alterno al f/2 para el cultivo de *Isochrysis aff. galbana* (Clone T-ISO). Tesis Maestría.FCM. 51 pp.

Ward C. J. Levinton, J. Shumway and S.T. Cucci, 1996. Looking into the "black box": Feeding strategies and limitations of suspension-feeding bivalves. *J. Shellfish Res.* 15(2). 507 pp.

Williams, P. J. LeB., R.C.T. Raine, and J.R. Bryan, 1979. Agreement between the ¹⁴C and oxygen methods of measuring phytoplankton production: Reassessment of the photosynthetic quotient. *Oceanol. Acta*.2 (4): 411-416.

Yokota. A. and D. T. Canvin. 1986. Changes of ribulosa biphosphate carboxylase/oxygenase content, ribulosa biphosphate concentration, and photosynthetic activity during adaptation of high-CO₂-grown to low-CO₂ conditions in *Chlorella pyreïnodosa*. *Plant Physiol.*80: 341-345.

Zhang Z., 2000. The use of pH and buffer intensity to quantify the carbon cycle in the ocean. *Mar. Chem.* 70:121-131.

Zhukova, N.V., A.B. Imbs, y L. F. Yi, 1998. Diet-induced changes in lipid and fatty acid composition *Artemia salina*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 120B(3). 499-506.

Zuñiga-Cortes, A. 1994. Desove, fertilización y desarrollo larval del erizo rojo *Stroglyocentrotus franciscanus*. Dentro del proyecto. "Métodos alternativos para la producción de semilla de abulón". Memorias del servicio social. FCM. 52 pp.