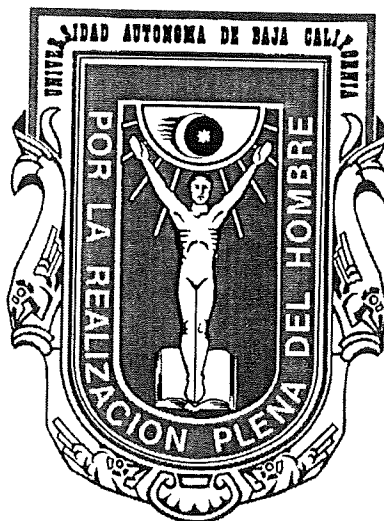
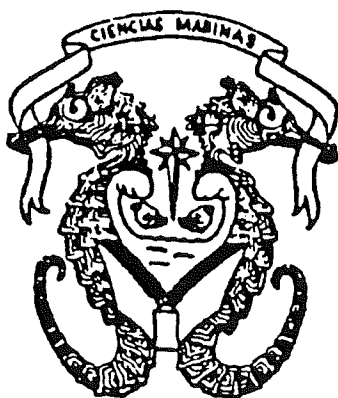


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLOGICAS



**"INTERACCIÓN ENTRE LUZ, CONSUMO DE NUTRIENTES,  
COMPOSICIÓN CELULAR Y PRODUCCIÓN DE *Rhodomonas* sp  
EN CULTIVOS ESTÁTICOS"**



**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**OC. FABIOLA LAFARGA DE LA CRUZ**

**Ensenada, Baja California, Mayo 2000**

**"INTERACCIÓN ENTRE LUZ, CONSUMO DE NUTRIENTES,  
COMPOSICIÓN CELULAR Y PRODUCCIÓN DE *Rhodomonas sp*  
EN CULTIVOS ESTÁTICOS"**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN  
OCEANOGRAFIA COSTERA

PRESENTA:

**FABIOLA LAFARGA DE LA CRUZ**

APROBADA POR



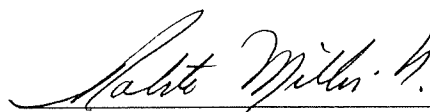
PRESIDENTE DEL JURADO

**M.C. ENRIQUE VALENZUELA ESPINOZA**



SINODAL PROPIETARIO

**Dr. RAMON CAJAL MEDRANO**



SINODAL PROPIETARIO

**Dr. ROBERTO MILLAN NUÑEZ**

## RESUMEN

El efecto de la irradiancia y la concentración de nutrientes en el crecimiento de *Rhodomonas* sp fue evaluado en cultivos estáticos de 200 ml (Etapa 1), mediante un diseño factorial con cuatro niveles de irradiancia: 52, 68, 103 y 142  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , y tres concentraciones de nutrientes: 661 y 29.3, 882 y 39, 1323 y 58.5  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaNO}_3$  y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , respectivamente. La condición de cultivo que resultó con mayor producción de *Rhodomonas* sp ( $\mu_{\text{prom}}=0.47 \text{ día}^{-1}$ , tiempo de duplicación=2.1 días y densidad celular final de  $1.61 \times 10^6 \text{ células ml}^{-1}$ ), fue la expuesta a 52  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de irradiancia con 1323  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaNO}_3$  y 58.5  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Con esta condición, se realizó un segundo experimento (Etapa 2), donde se comparó el efecto de la calidad de luz azul (LA) y luz blanca (LB) en el crecimiento y la composición proximal de *Rhodomonas* sp, cultivada en volúmenes de 18 L. En ambas etapas, los cultivos se mantuvieron a temperatura de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  y salinidad de 32, durante un periodo de siete días. La densidad celular, la concentración residual de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  y el contenido de clorofilas (a, c), se determinó diariamente. Además, en la etapa 1, se evaluó la tasa de fijación de carbono, mientras que, en la etapa 2 se estimó la composición proximal. En la etapa 1, la densidad celular en cultivos estáticos de *Rhodomonas* sp presentó una relación directa con la concentración de los nutrientes, mientras que, otras respuestas fisiológicas como el contenido de clorofilas y la tasa de fijación de carbono estuvieron determinadas por el efecto interactivo de la irradiancia y la disponibilidad de los nutrientes. Los tratamientos con menor concentración de nutrientes, en los cuatro niveles de irradiancia, limitaron el crecimiento a partir del sexto día de cultivo. En la segunda etapa experimental, el efecto de la calidad de luz en la densidad celular durante la fase de crecimiento exponencial ( $F_{\text{exp}}$ ) no fue significativo ( $p>0.05$ ), mientras que, durante la fase estacionaria ( $F_{\text{est}}$ ) los cultivos con LB presentaron densidades celulares mayores (15%) que los cultivos en LA. Asimismo, la calidad de luz, presentó un efecto significativo en la composición proximal. Las células de *Rhodomonas* sp cultivadas en LA, contienen un 14% más de proteínas y de un 6 a 30% más de lípidos, que aquellas en LB, sin embargo, por volumen de cultivo no hubo diferencias en la concentración de estos constituyentes respecto a la calidad. Mientras que, en la condición de LB, el contenido de carbohidratos fue mayor, tanto por célula (5.9-26.5%) como por volumen de cultivo (13-27%).

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Autónoma de Baja California, la Facultad de Ciencias Marinas y al Instituto de Investigaciones Oceanológicas, por las facilidades otorgadas para la realización de esta investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar los estudios de maestría.

Al M.C. Enrique Valenzuela Espinoza por dirigir, apoyar y detallar este trabajo hasta su culminación, y principalmente por invitarme a formar parte de su equipo de trabajo, el tiempo invertido, su paciencia, su amistad y además, por haberme soportado todo el tiempo.

A los doctores Roberto Millán Nuñez y Ramón Cajal Medrano por las revisiones y sugerencias hechas al trabajo, además de la oportunidad de aprender con ellos y a quienes considero de ahora en adelante como amigos.

A Gildardo y Filiberto por su apoyo desinteresado, su solidaridad durante la realización de los análisis químicos, la compañía que me hicieron en esas largas horas de trabajo y su amistad.

A los doctores Pilar Sánchez Saavedra, Santamaría Del Angel y Elizabeth Orellana Cepeda por el tiempo que me dedicaron y todas las enseñanzas que me han dejado.

A las personas que de manera directa o indirecta estuvieron involucradas en mi trabajo, con quienes compartí ideas y me hicieron sugerencias para mejorar este trabajo.

A todos mis maestros por formar parte de mi instrucción académica y humana.

A mis amigos: Miguel Angel, las Anitas, Ligeita, Erick, y los Stramboticos, por el calor de hogar que me brindaron y su amistad incondicional.

A mis compañeros, Mark, Jorge, Pedro, Sinhúe, Carlos, Nancy, Rana, Clarisa, Zac y Dulce por estar ahí en las buenas y en las malas.

## **DEDICATORIA**

### **A MIS PADRES**

Ma. Teresa y Jorge Enrique

### **A MIS HERMANOS**

Samantha, Jorge Enrique y Ma. Teresa

### **A MI ABUELO**

Manuel

### **A MIS TIAS**

Rosi, Leonor y Alma

## ÍNDICE

|                                                                                                       | PÁGINA |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1.- INTRODUCCIÓN.....                                                                                 | 1      |
| 2.- ANTECEDENTES.....                                                                                 | 5      |
| 3.- OBJETIVOS.....                                                                                    | 15     |
| 3.1. Objetivo general.....                                                                            | 15     |
| 3.2. Objetivos particulares.....                                                                      | 15     |
| 3.2.1. Etapa 1: Efecto de la irradiancia y la concentración de nutrientes<br>(nitrato y fosfato)..... | 15     |
| 3.2.2. Etapa 2: Efecto de la calidad de la luz.....                                                   | 15     |
| 4.- MATERIALES Y MÉTODOS.....                                                                         | 16     |
| 4.1. Selección de la especie.....                                                                     | 16     |
| 4.2. Etapa 1: Efecto de la irradiancia y la concentración de nutrientes (nitrato<br>y fosfato).....   | 16     |
| 4.3. Etapa 2: Efecto de la calidad de la luz.....                                                     | 18     |
| 4.4. Tratamiento estadístico de los datos.....                                                        | 21     |
| 5.- RESULTADOS.....                                                                                   | 22     |
| 5.1. Etapa 1: Efecto de la irradiancia y la concentración de nutrientes (nitrato<br>y fosfato).....   | 22     |
| 5.1.1. Crecimiento Microalgal.....                                                                    | 22     |
| 5.1.2. Consumo de Nitrato y Fosfato.....                                                              | 30     |
| 5.1.3. Contenido de Clorofilas.....                                                                   | 38     |
| 5.1.4. Fijación de Carbono.....                                                                       | 48     |
| 5.2. Etapa 2: Efecto de la calidad de la luz.....                                                     | 53     |
| 5.2.1. Crecimiento Microalgal.....                                                                    | 53     |
| 5.2.2. Consumo de Nitrato y Fosfato.....                                                              | 60     |
| 5.2.3. Contenido de Clorofilas.....                                                                   | 68     |
| 5.2.4. Composición proximal.....                                                                      | 75     |
| 6.- DISCUSIONES.....                                                                                  | 82     |

|                                                                                                  |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 6.1. Etapa 1: Efecto de la irradiancia y la concentración de nutrientes (nitrato y fosfato)..... | 82  |
| 6.1.1. Generalidades.....                                                                        | 82  |
| 6.1.2. Crecimiento microalgal.....                                                               | 84  |
| 6.1.3. Consumo de Nitrato y Fosfato.....                                                         | 87  |
| 6.1.4. Contenido de Clorofilas.....                                                              | 90  |
| 6.1.5. Fijación de Carbono.....                                                                  | 91  |
| 6.2. Etapa 2: Efecto de la calidad de la luz.....                                                | 95  |
| 6.2.1. Generalidades.....                                                                        | 95  |
| 6.2.2. Crecimiento microalgal.....                                                               | 96  |
| 6.2.3. Consumo de Nitrato y Fosfato.....                                                         | 97  |
| 6.2.4. Contenido de Clorofilas.....                                                              | 97  |
| 6.2.5. Composición proximal a nivel Garrafón (18 L) .....                                        | 99  |
| 6.2.5.1. Diferencias en el tiempo de cultivo (fases de crecimiento) .....                        | 99  |
| 6.2.5.2. Diferencias entre condiciones de luz.....                                               | 104 |
| 7.- CONCLUSIONES.....                                                                            | 107 |
| 8.- LITERATURA CITADA.....                                                                       | 108 |
| ANEXO A .....                                                                                    | 115 |
| ANEXO B .....                                                                                    | 124 |
| ANEXO C .....                                                                                    | 130 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | PAGINA |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| <b>Figura 1</b> Crecimiento promedio de <i>Rhodomonas</i> sp cultivada en volumen de 200 ml a diferentes irradiancias y concentración de nutrientes (● 661 y 29.3, □ 882 y 39, ◇ 1323 y 58.5 $\mu\text{M}$ de $\text{NaNO}_3$ y $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , respectivamente). La barra vertical indica el error estándar.....                                      | 25     |
| <b>Figura 2</b> Concentración residual promedio de nitrato en cultivos de <i>Rhodomonas</i> sp en volumen de 200 ml a diferentes irradiancias y concentración de nutrientes (● 661 y 29.3, □ 882 y 39, ◇ 1323 y 58.5 $\mu\text{M}$ de $\text{NaNO}_3$ y $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , respectivamente). La barra vertical indica el error estándar.....              | 34     |
| <b>Figura 3</b> Concentración residual promedio de fosfato en cultivos de <i>Rhodomonas</i> sp en volumen de 200 ml a diferentes irradiancias y concentración de nutrientes (● 661 y 29.3, □ 882 y 39, ◇ 1323 y 58.5 $\mu\text{M}$ de $\text{NaNO}_3$ y $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , respectivamente). La barra vertical indica el error estándar.....              | 36     |
| <b>Figura 4</b> Concentración promedio de clorofila <i>a</i> de <i>Rhodomonas</i> sp cultivada en volumen de 200 ml a diferentes irradiancias y concentración de nutrientes (● 661 y 29.3, □ 882 y 39, ◇ 1323 y 58.5 $\mu\text{M}$ de $\text{NaNO}_3$ y $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , respectivamente). La barra vertical indica el error estándar.....              | 42     |
| <b>Figura 5</b> Concentración promedio de clorofila <i>a</i> por volumen en cultivos estáticos de <i>Rhodomonas</i> sp de 200 ml a diferentes irradiancias y concentración de nutrientes (● 661 y 29.3, □ 882 y 39, ◇ 1323 y 58.5 $\mu\text{M}$ de $\text{NaNO}_3$ y $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , respectivamente). La barra vertical indica el error estándar..... | 43     |
| <b>Figura 6</b> Concentración promedio de clorofila <i>c</i> de <i>Rhodomonas</i> sp cultivada en volumen de 200 ml a diferentes irradiancias y concentración de nutrientes (● 661 y 29.3, □ 882 y 39, ◇ 1323 y 58.5 $\mu\text{M}$ de $\text{NaNO}_3$ y $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , respectivamente). La barra vertical indica el error estándar.....              | 45     |
| <b>Figura 7</b> Concentración promedio de clorofila <i>c</i> por volumen en cultivos estáticos de <i>Rhodomonas</i> sp de 200 ml a diferentes irradiancias y concentración de nutrientes (● 661 y 29.3, □ 882 y 39, ◇ 1323 y 58.5 $\mu\text{M}$ de $\text{NaNO}_3$ y $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , respectivamente). La barra vertical indica el error estándar..... | 46     |
| <b>Figura 8</b> Tasa promedio de asimilación de carbono por <i>Rhodomonas</i> sp cultivada en volumen de 200 ml a diferentes irradiancias y concentración de nutrientes (● 661 y 29.3, □ 882 y 39, ◇ 1323 y 58.5 $\mu\text{M}$ de $\text{NaNO}_3$ y $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , respectivamente). La barra vertical indica el error estándar.....                  | 50     |

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 9</b>  | Tasa promedio de asimilación de carbono por unidad de clorofila <i>a</i> en cultivos de <i>Rhodomonas</i> sp en 200 ml a diferentes irradiancias y concentración de nutrientes (● 661 y 29.3, □ 882 y 39, ◇ 1323 y 58.5 $\mu\text{M}$ de $\text{NaNO}_3$ y $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , respectivamente). La barra vertical indica el error estándar.....                       | 51 |
| <b>Figura 10</b> | Crecimiento promedio de <i>Rhodomonas</i> sp en diferentes volúmenes de cultivo: A) Erlenmeyer de 200 ml, B) Fernbach de 2 L y C) Garrafón de 18 L, expuestos a condiciones de luz blanca (○) y luz azul (●). La barra indica el error estándar.....                                                                                                                           | 56 |
| <b>Figura 11</b> | Concentración residual promedio (círculos) y consumo diario promedio (triángulos) de nitrato por <i>Rhodomonas</i> sp en diferentes volúmenes de cultivo: A) Erlenmeyer de 200 ml, B) Fernbach de 2 L y C) Garrafón de 18 L, expuestos a condiciones de luz blanca (símbolos abiertos) y luz azul (símbolos cerrados). La barra indica el error estándar.....                  | 64 |
| <b>Figura 12</b> | Concentración residual promedio (círculos) y consumo diario promedio (triángulos) de fosfato por <i>Rhodomonas</i> sp en diferentes volúmenes de cultivo: A) Erlenmeyer de 200 ml, B) Fernbach de 2 L y C) Garrafón de 18 L, expuestos a condiciones de luz blanca (símbolos abiertos) y luz azul (símbolos cerrados). La barra indica el error estándar.....                  | 66 |
| <b>Figura 13</b> | Concentración promedio de clorofila <i>a</i> por unidad celular ( $\text{pg célula}^{-1}$ ) y volumen ( $\text{pg} \times 10^6 \text{ L}^{-1}$ ) en diferentes niveles de cultivo de <i>Rhodomonas</i> sp: A) Erlenmeyer de 200 ml, B) Fernbach de 2 L y C) Garrafón de 18 L, expuestos a condiciones de luz blanca (○) y luz azul (●). La barra indica el error estándar..... | 72 |
| <b>Figura 14</b> | Concentración promedio de clorofila <i>c</i> por unidad celular ( $\text{pg célula}^{-1}$ ) y volumen ( $\text{pg} \times 10^6 \text{ L}^{-1}$ ) en diferentes niveles de cultivo de <i>Rhodomonas</i> sp: A) Erlenmeyer de 200 ml, B) Fernbach de 2 L y C) Garrafón de 18 L, expuestos a condiciones de luz blanca (○) y luz azul (●). La barra indica el error estándar..... | 73 |
| <b>Figura 15</b> | Composición promedio de proteínas (A), carbohidratos (B) y lípidos (C) de <i>Rhodomonas</i> sp en cultivos a nivel Garrafón con 18 L, expuestos a condiciones de luz blanca (○) y luz azul (●). La barra indica el error estándar.....                                                                                                                                         | 78 |
| <b>Figura 16</b> | Peso seco (A), peso orgánico (B) y cenizas (C) de <i>Rhodomonas</i> sp en cultivos a nivel Garrafón con 18 L, expuestos a condiciones de luz blanca (○) y luz azul (●). La barra indica el error estándar.....                                                                                                                                                                 | 79 |
| <b>Figura 17</b> | Porcentaje promedio de proteínas (A), carbohidratos (B) y lípidos (C), con respecto a peso orgánico, de <i>Rhodomonas</i> sp en cultivos a nivel Garrafón con 18 L, expuestos a condiciones de luz blanca (○) y luz azul (●). La barra indica el error estándar.....                                                                                                           | 80 |

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |     |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 18</b> | Crecimiento promedio ( $\text{Log}_{10}$ ) de <i>Rhodomonas</i> sp en volumen de 200 ml a diferentes irradiancias y concentración de nutrientes. (● 661 y 29.3, □ 882 y 39, ◇ 1323 y 58.5 $\mu\text{M}$ de $\text{NaNO}_3$ y $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , respectivamente). La barra vertical indica el error estándar.....                                                      | 117 |
| <b>Figura 19</b> | Valores de pH en cultivos de <i>Rhodomonas</i> sp en volumen de 200 ml a diferentes irradiancias y concentración de nutrientes. (● 661 y 29.3, □ 882 y 39, ◇ 1323 y 58.5 $\mu\text{M}$ de $\text{NaNO}_3$ y $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , respectivamente).....                                                                                                                   | 118 |
| <b>Figura 20</b> | Correlación entre densidad celular final y concentración de inicial de $\text{NaNO}_3$ para cultivos en etapa experimental 1.....                                                                                                                                                                                                                                               | 119 |
| <b>Figura 21</b> | Correlación entre densidad celular y concentración de clorofila a por volumen de cultivo en etapa experimental 1.....                                                                                                                                                                                                                                                           | 120 |
| <b>Figura 22</b> | Relación entre irradiancia y tasa de crecimiento en $F_{\text{exp}}$ ( $\mu_{\text{exp}}$ ), con datos de un experimento preliminar con medio f/2 (A) y datos de etapa experimental 1 (B). En (B), los símbolos representan la concentración inicial de nutrientes (● menor, □ control y ◇ mayor). En (A), el dato con símbolo (■) fue tomado de Lafarga-De la Cruz (1997)..... | 121 |
| <b>Figura 23</b> | Relación entre irradiancia y tasa de asimilación de C por célula en cultivos con diferentes concentraciones de nutrientes, durante siete días (—, — $F_{\text{exp}}$ , — $F_{\text{est}}$ y — $F_{\text{dec}}$ ). Los símbolos indican el día de cultivo: ○ día 1, ● día 2, □ día 3, ■ día 4, △ día 5, ▲ día 6 y ▽ día 7.....                                                   | 122 |
| <b>Figura 24</b> | Contenido promedio de clorofila a (A,B) y c (C, D), al culminar la $F_{\text{exp}}$ (Día 4) y la $F_{\text{est}}$ (Día 6), respecto al nivel de irradiancia para diferentes condiciones de nutrientes en cultivos de <i>Rhodomonas</i> sp (● menor, □ control y ◇ mayor). La barra indica el error estándar.....                                                                | 123 |
| <b>Figura 25</b> | Espectros de emisión de las fuentes de luz usadas en etapa experimental 2. A) Espectro de luz azul, tomado de Sánchez-Saavedra y Voltolina (1994). B) Espectro de luz blanca tipo "Daylight" tomado de Sánchez- Saavedra <i>et al.</i> (1996).....                                                                                                                              | 124 |
| <b>Figura 26</b> | Crecimiento promedio ( $\text{Log}_{10}$ ) de <i>Rhodomonas</i> sp en diferentes volúmenes de cultivo: A) Erlenmeyer de 200 ml, B) Fernbach de 2 L y C) Garrafón de 18 L, expuestos a condiciones de luz blanca (○) y luz azul (●). La barra indica el error estándar.....                                                                                                      | 125 |
| <b>Figura 27</b> | Valores de pH en diferentes niveles de cultivo de <i>Rhodomonas</i> sp: A) Erlenmeyer de 200 ml, B) Fernbach de 2 L y C) Garrafón de 18 L, expuestos a condiciones de luz blanca (○) y luz azul (●). La barra indica el error estándar.....                                                                                                                                     | 126 |
| <b>Figura 28</b> | Correlación entre densidad celular y concentración de clorofila a (A) y c (B) por volumen de cultivo en los diferentes niveles y condiciones de luz de la etapa experimental 2.....                                                                                                                                                                                             | 127 |

**Figura 29** Concentración promedio de proteínas (A), carbohidratos (B), lípidos (C) y peso orgánico (D) por volumen de cultivo, a nivel Garrafón (18 L), expuestos a condiciones de luz blanca (○) y luz azul (●)..... 129

## LISTA DE TABLAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | PAGINA |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| <b>Tabla I</b> Valores poblacionales promedio de <i>Rhodomonas</i> sp cultivada en 200 ml a irradiancia de $52 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con diferentes concentraciones de nutrientes (661 y 29.3, 882 y 39, 1323 y 58.5, $\mu\text{M}$ de $\text{NaNO}_3$ y $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , respectivamente).....    | 26     |
| <b>Tabla II</b> Valores poblacionales promedio de <i>Rhodomonas</i> sp cultivada en 200 ml a irradiancia de $68 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con diferentes concentraciones de nutrientes (661 y 29.3, 882 y 39, 1323 y 58.5, $\mu\text{M}$ de $\text{NaNO}_3$ y $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , respectivamente).....   | 27     |
| <b>Tabla III</b> Valores poblacionales promedio de <i>Rhodomonas</i> sp cultivada en 200 ml a irradiancia de $103 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con diferentes concentraciones de nutrientes (661 y 29.3, 882 y 39, 1323 y 58.5, $\mu\text{M}$ de $\text{NaNO}_3$ y $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , respectivamente)..... | 28     |
| <b>Tabla IV</b> Valores poblacionales promedio de <i>Rhodomonas</i> sp cultivada en 200 ml a irradiancia de $142 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con diferentes concentraciones de nutrientes (661 y 29.3, 882 y 39, 1323 y 58.5, $\mu\text{M}$ de $\text{NaNO}_3$ y $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , respectivamente).....  | 29     |
| <b>Tabla V</b> Concentración residual promedio (A), consumo diario promedio (B) y consumo promedio por célula (C) de nitrato en cultivos estáticos de <i>Rhodomonas</i> sp en volumen de 200 ml expuestos a diferente irradiancia y concentración inicial de nutrientes.....                                              | 35     |
| <b>Tabla VI</b> Concentración residual promedio (A) y consumo diario promedio (B) de fosfato en cultivos estáticos de <i>Rhodomonas</i> sp en volumen de 200 ml expuestos a diferente irradiancia y concentración inicial de nutrientes.....                                                                              | 37     |
| <b>Tabla VII</b> Concentración promedio de Clorofila <i>a</i> por unidad celular (A) y por volumen de cultivo (B) de <i>Rhodomonas</i> sp cultivada en volumen de 200 ml expuestos a diferente irradiancia y concentración inicial de nutrientes.....                                                                     | 44     |
| <b>Tabla VIII</b> Concentración promedio de Clorofila <i>c</i> por unidad celular (A) y por volumen de cultivo (B) de <i>Rhodomonas</i> sp cultivada en volumen de 200 ml expuestos a diferente irradiancia y concentración inicial de nutrientes.....                                                                    | 47     |
| <b>Tabla IX</b> Asimilación promedio de Carbono por unidad celular (A) y por unidad de clorofila <i>a</i> (B) en cultivos estáticos de <i>Rhodomonas</i> sp en volumen de 200 ml expuestos a diferente irradiancia y concentración inicial de nutrientes.....                                                             | 52     |
| <b>Tabla X</b> Valores poblacionales promedio de <i>Rhodomonas</i> sp cultivada en nivel Erlenmeyer (200 ml) con (A) luz azul y (B) luz blanca, a irradiancia de $52 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con $1323.6 \mu\text{M}$ de $\text{NaNO}_3$ y $58.5 \mu\text{M}$ de $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .....                | 57     |

|                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |     |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabla XI</b>    | Valores poblacionales promedio de <i>Rhodomonas</i> sp cultivada en nivel Fernbach (2 L) con (A) luz azul y (B) luz blanca, a irradiancia de $52 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con $1323.6 \mu\text{M}$ de $\text{NaNO}_3$ y $58.5 \mu\text{M}$ de $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .                                                                                                                                                                                                | 58  |
| <b>Tabla XII</b>   | Valores poblacionales promedio de <i>Rhodomonas</i> sp cultivada en nivel Garrafón (18 L) con (A) luz azul y (B) luz blanca, a irradiancia de $52 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con $1323.6 \mu\text{M}$ de $\text{NaNO}_3$ y $58.5 \mu\text{M}$ de $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .                                                                                                                                                                                               | 59  |
| <b>Tabla XIII</b>  | Concentración residual y consumo diario promedio de nitrato en cultivos estáticos de <i>Rhodomonas</i> sp en volumen de 200 ml (A), 2 L (B) y 18 L (C) expuestos a luz azul y luz blanca.....                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 65  |
| <b>Tabla XIV</b>   | Concentración residual y consumo diario promedio de fosfato en cultivos estáticos de <i>Rhodomonas</i> sp en volumen de 200 ml (A), 2 L (B) y 18 L (C) expuestos a luz azul y luz blanca.....                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 67  |
| <b>Tabla XV</b>    | Concentración promedio de Clorofila <i>a</i> y <i>c</i> por célula ( $\text{pg célula}^{-1}$ ) y por volumen de cultivo ( $\text{pg} \times 10^6 \text{ L}^{-1}$ ) de <i>Rhodomonas</i> sp en unidades experimentales de 200 ml (A), 2 L (B) y 18 L (C) expuestos a luz azul y luz blanca.....                                                                                                                                                                                    | 74  |
| <b>Tabla XVI</b>   | Composición proximal promedio de <i>Rhodomonas</i> sp expresada en pg por célula, porcentaje con respecto al peso orgánico (% P.O.) y mg por litro de cultivo, en volumen de 18 L (Garrafón) expuestos a luz azul (A) y luz blanca (B).....                                                                                                                                                                                                                                       | 81  |
| <b>Tabla XVII</b>  | Valores poblacionales promedio durante los siete días de cultivo de <i>Rhodomonas</i> sp en volumen de 200 ml con diferentes condiciones de irradiancia y nutrientes (nitrato y fosfato).....                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 115 |
| <b>Tabla XVIII</b> | Valores poblacionales máximos alcanzados en los cultivos de <i>Rhodomonas</i> sp en volumen de 200 ml con diferentes condiciones de irradiancia y nutrientes (nitratos y fosfatos). En la columna de tratamiento (T) se indica el día en el cual se alcanzó la máxima tasa de crecimiento.....                                                                                                                                                                                    | 116 |
| <b>Tabla XIX</b>   | Composición bioquímica de especies del género <i>Rhodomonas</i> sp por diversos autores.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 128 |
| <b>Tabla XX</b>    | Valores de probabilidad ( <i>p</i> ) resultantes de la prueba ANOVA no paramétrica de Kruskal-Wallis para datos obtenidos durante la etapa experimental 1. Los números en rojo indican valores significativos de <i>p</i> con un nivel de confianza del 95% ( <i>p</i> > 0.05 no significativa, <i>p</i> < 0.05 significativa).....                                                                                                                                               | 130 |
| <b>Tabla XXI</b>   | Valores de probabilidad ( <i>p</i> ) resultantes de la prueba ANOVA no paramétrica de Kruskal-Wallis para datos de clorofila <i>a</i> por unidad celular de la etapa experimental 1. Para el análisis los datos fueron agrupados por condición inicial de nutrientes (A) y por nivel de irradiancia (B). Los números en rojo indican valores significativos de <i>p</i> con un nivel de confianza del 95% ( <i>p</i> > 0.05 no significativa, <i>p</i> < 0.05 significativa)..... | 130 |

|                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |     |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabla XXII</b>  | Valores de probabilidad ( $p$ ) resultantes de la prueba ANOVA no paramétrica de Kruskal-Wallis para datos de asimilación de carbono por unidad celular por hora, en etapa experimental 1. Para el análisis los datos fueron agrupados por condición inicial de nutrientes (A) y por nivel de irradiancia (B). Los números en rojo indican valores significativos de $p$ con un nivel de confianza del 95% ( $p > 0.05$ no significativa, $p < 0.05$ significativa)..... | 131 |
| <b>Tabla XXIII</b> | Valores de probabilidad ( $p$ ) resultantes de la prueba ANOVA no paramétrica de Kruskal-Wallis para datos obtenidos en cultivos a nivel Erlenmeyer (200 ml) durante etapa experimental 2. Los números rojos indican valores significativos de $p$ con un nivel de confianza del 95% ( $p > 0.05$ no significativa, $p < 0.05$ significativa).....                                                                                                                       | 131 |
| <b>Tabla XXIV</b>  | Valores de probabilidad ( $p$ ) resultantes de la prueba ANOVA no paramétrica de Kruskal-Wallis para datos obtenidos en cultivos a nivel Fernbach (2 L) durante etapa experimental 2. Los números rojos indican valores significativos de $p$ con un nivel de confianza del 95% ( $p > 0.05$ no significativa, $p < 0.05$ significativa).....                                                                                                                            | 132 |
| <b>Tabla XXV</b>   | Valores de probabilidad ( $p$ ) resultantes de la prueba ANOVA no paramétrica de Kruskal-Wallis para datos obtenidos en cultivos a nivel Garrafón (18 L) durante etapa experimental 2. Los números rojos indican valores significativos de $p$ con un nivel de confianza del 95% ( $p > 0.05$ no significativa, $p < 0.05$ significativa).....                                                                                                                           | 132 |

## 1.- INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el cultivo masivo de microalgas ha cobrado gran auge y atención en el área de la biotecnología, por su uso en la extracción de productos químicos tales como vitaminas, pigmentos, ácidos grasos, lípidos y proteínas entre otros, que sirven de materia prima para la industria alimenticia, farmacéutica, textil y de cosméticos principalmente (Borowitzka, 1988).

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). En años recientes, se han llevado a cabo estudios relacionados con la formulación de dietas alternativas elaboradas con microalgas preservadas, micro-encapsulados, pastas y otros sustitutos con el objeto de disminuir los costos de producción del alimento vivo (Jones *et al.*, 1974; Sommer *et al.*, 1990; Coutteau y Sorgeloos, 1992). Sin embargo, hasta el momento ninguna de las dietas alternativas propuestas garantiza niveles de sobrevivencia y crecimiento comparables con los obtenidos con microalgas frescas, además los resultados son inconsistentes y presentan gran variabilidad (Coutteau y Sorgeloos, 1992). Por ello, se siguen llevando a cabo investigaciones sobre el valor alimenticio de las microalgas y las condiciones de cultivo que lo modifican (Flaak y Epifanio, 1978; Wikfors, 1986; Fabregas *et al.*, 1989; Correa-Reyes, 1993).

Tanto con fines biotecnológicos como acuaculturales, es importante reconocer los factores que influyen en el crecimiento y la composición bioquímica microalgal, con el objeto de optimizar la producción de biomasa y productos químicos específicos. La fisiología microalgal es regulada por parámetros ambientales, y las funciones metabólicas presentan respuestas a factores físico-químicos tales como: concentración y especiación química de los nutrientes, intensidad, periodicidad y calidad de la luz, temperatura, salinidad y

pH, entre otros (Wikfors, 1986; Richmond, 1986; Fabregas, *et al.*, 1989; López-Muñoz, *et al.*, 1992; Sanchez-Saavedra, 1994).

Los nutrientes como formadores del material orgánico celular influyen directamente en el metabolismo, e indiscutiblemente, su disponibilidad es uno de los factores primarios que regulan la fisiología y las características poblacionales que presentan las microalgas (Herzig y Falkowski, 1989; Graziano *et al.*, 1996). Los nutrientes pueden llegar a limitar las tasas de crecimiento y productividad, e inclusive, en algunos casos, pueden controlar la composición bioquímica, la reproducción y el desarrollo algal (DeBoer, 1994).

La luz, por otra parte, es un factor importante en el control de la productividad debido a su papel primario en el proceso fotosintético (Darley, 1987). Es bien conocido, que por su disponibilidad, la luz puede llegar a limitar la producción primaria tanto en ecosistemas acuáticos (Ryther, 1965; Álvarez-Borrego, 1986) como en sistemas de cultivo en laboratorio (Brand y Guillard, 1981).

En sistemas diseñados para producir microalgas a nivel comercial, las condiciones de nutrientes y luz son parámetros que de manera individual o sinérgica modifican la productividad y los rendimientos (Kaplan *et al.*, 1986). La influencia de la variación cualitativa y/o cuantitativa de los nutrientes y la luz en la fisiología microalgal incluye cambios específicos en la tasa de crecimiento y el volumen celular (Faust y Gantt, 1973; Brown y Geen, 1974; Durbin, 1974; Ostroff *et al.*, 1980; Brand y Guillard, 1981; Claustre y Gostan, 1987; Lewitus y Caron, 1990; Lewitus *et al.*, 1991; Graziano *et al.*, 1996), la composición bioquímica (Wallen y Geen, 1971a, b; Flaak y Epifanio, 1978; Wikfors, 1986; Fabregas, *et al.*, 1989; Sanchez-Saavedra, 1994), el contenido y composición de pigmentos (Jeffrey y Vesk, 1977; Falkowski *et al.*, 1989; López-Muñoz *et al.*, 1992; Geider *et al.*, 1993) y productos extracelulares (Brown y Geen, 1974), así como en la tasa fotosintética (Falkowski y Owens, 1978; Herzig y Falkowski, 1989) y de consumo de nutrientes (Cloern, 1977; Morgan y Kalff, 1979).

Debido a que, tanto los requerimientos de nutrientes y luz, como las respuestas fisiológicas a ellos, son específicas para cada microorganismo, éstas condiciones, deben ser cuidadosamente estudiadas y determinadas a fin de garantizar el éxito en la producción masiva de cada especie. Asimismo, la optimización en los sistemas de producción masiva, implica que los costos operacionales pueden ser reducidos significativamente (Lafarga-De la Cruz, 1997).

La microalga marina *Rhodomonas* sp, es una especie flagelada perteneciente a la División Cryptophyta y Clase Cryptophyceae, que se cultiva en la actualidad con fines acuaculturales. Su uso como alimento de larvas de erizo (Hinegardner, 1969; Zuñiga-Cortes, 1994), copépodos (Jónasdóttir, 1994), larvas y juveniles de diferentes especies de ostión (Ferreiro *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 1998; McCausland *et al.*, 1999) y de almejas gigantes (Aldana-Aranda y Patiño-Suárez, 1998) ha sido satisfactorio.

A nivel regional, *Rhodomonas* sp, comúnmente se encuentra en el medio marino y su producción forma parte importante en el desarrollo de la biotecnología para el cultivo de erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus* y erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus* (Martínez-López, 1994; Zuñiga-Cortes, 1994). El interés económico que presenta la pesquería de erizo en Baja California y el problema que en épocas recientes enfrenta debido a la sobreexplotación, hacen que la acuacultura de este recurso se plantee como una alternativa viable para su recuperación, llevando a cabo principalmente, estrategias de repoblamiento con organismos juveniles (Martínez-López, 1994).

Estudios relacionados con el desarrollo de las larvas equinoplutei hasta su metamorfosis demuestran que *Rhodomonas* sp satisface los requerimientos nutricionales del erizo (Zuñiga-Cortes, 1994). Sin embargo, a pesar de su importancia, los estudios sobre aspectos fisiológicos y estrategias de cultivo de *Rhodomonas* sp son escasos (Fernández-Reiriz, 1989; Lafarga-De la Cruz,

1997), e inclusive se desconocen las características nutricionales que hacen de esta microalga uno de los mejores alimentos para larvas de erizo.

El presente estudio, se plantea con el objeto de aportar información sobre la fisiología de *Rhodomonas* sp y poder aplicar estos conocimientos en el área de acuacultural o biotecnológica. Para conocer los requerimientos específicos de nutrientes y luz de *Rhodomonas* sp, se consideraron las siguientes hipótesis de trabajo: 1) que habrá diferencias en la producción de *Rhodomonas* sp debidas a las condiciones de concentración de nutrientes e irradiancia en los cultivos y 2) que habrá diferencias en el crecimiento y la composición bioquímica de *Rhodomonas* sp entre cultivos expuestos a calidad de luz azul y luz blanca (control).

## 2.- ANTECEDENTES

Una de las adaptaciones fenotípicas microalgales más estudiada, es la respuesta a los niveles de irradiancia, referida comúnmente como “fotoaclimatación” (Falkowski y La Roche, 1991). Sin embargo, a pesar de que un gran número de especies han sido estudiadas al respecto, los estudios sobre el género *Rhodomonas* son escasos y además, no consideran a la luz como factor. Investigaciones sobre el efecto de las fases de cultivo y la calidad de los nutrientes en el crecimiento y la composición bioquímica de *Rhodomonas* sp han sido realizados por Fernández-Reiriz (1989) y Lafarga-De la Cruz (1997). Más recientemente, otros autores han determinado su composición bioquímica con el objeto de evaluar su calidad nutricional en la alimentación de invertebrados marinos importantes (Ferreiro *et al.*, 1990; Jónasdóttir, 1994; Brown *et al.*, 1998; McCausland *et al.*, 1999).

La influencia de la luz en la fisiológica microalgal de otras especies, entre ellas algunos géneros pertenecientes a la Clase Cryptophyceae, han sido llevados a cabo con el objeto de comprender su ecología en el medio natural (Durbin, 1974), modelar la productividad primaria (Falkowski y Owens, 1978), comparar respuestas entre grupos filogenéticos (Chan, 1978 y 1980), optimizar la producción de compuestos de interés económico (Shifrin y Chisholm, 1981; Borowitzka, 1988) e incrementar su valor alimenticio para la acuicultura de invertebrados (Flaak y Epifanio, 1978; Thompson *et al.*, 1993; Sanchez-Saavedra, 1994).

La relación de la irradiancia con la tasa fotosintética y de crecimiento microalgal, indica que existen condiciones de saturación de luz en las cuales se obtienen máximos de fotosíntesis ( $P_{\text{máx}}$ ) y crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ ), así como condiciones de limitación (subsaturación) e inhibición (sobresaturación) de dichos procesos (Faust y Gantt, 1973; Chan, 1978 y 1980; Brand y Guillard,

1981; Falkowski y Owens, 1978; Cabrera y Montecino, 1987; Lewitus y Caron, 1990).

Para observar el efecto de la irradiancia en el crecimiento, Brand y Guillard (1981) realizaron cultivos de 22 especies de fitoplancton marino de zonas costeras y oceánicas, con luz continua y ciclos de luz:oscuridad. Sus resultados demuestran que el crecimiento fue dependiente de la especie y/o clase de la microalga cultivada y esta relacionado con el hábitat en el cual vive y se desarrolla (historia de luz). Resultados similares son expuestos por Chan (1978 y 1980), quién reporta que especies pertenecientes al grupo de los dinoflagelados requieren menores niveles de saturación de luz que las diatomeas para alcanzar su máxima tasa de fotosíntesis y crecimiento.

La calidad de luz, es también un agente modificador de la tasa fotosintética y de crecimiento. Wallen y Geen (1971a) en cultivos de *Cyclotella nana* y *Dunaliella tertiolecta*, reportan que tanto la tasa fotosintética como el crecimiento fue menor en células expuestas a luz verde y mayor en luz azul con respecto a luz blanca control, siendo las diferencias consistentes a baja y alta irradiancia ( $2.4$  vs.  $7.9 \times 10^3$  ergs  $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). La misma respuesta se obtuvo en cultivos de *Chlamydomonas reinhardtii* (Brown y Geen, 1974), *Amphidinium* sp y *Biddulphia* sp (Humprey, 1983) sometidas a regímenes de luz verde y azul. En estos dos últimos trabajos, se incluye además el efecto de la luz roja. En cultivos de *C. reinhardtii* la luz roja, al igual que la luz azul, aumenta la tasa de crecimiento, mientras que en cultivos de *Amphidinium* sp y *Biddulphia* sp el efecto fue similar al observado en luz verde (disminuye). Brown y Geen (1974), reportan que existe una relación inversa entre la tasa de reproducción y el volumen celular promedio, siendo este mayor en células cultivadas con luz verde ( $198 \mu\text{m}^3$ ), seguido por aquellas cultivadas en luz roja ( $114 \mu\text{m}^3$ ), azul ( $91 \mu\text{m}^3$ ) y blanca ( $70 \mu\text{m}^3$ ). Asimismo, la duración de la fase de retardo ( $F_{\text{lag}}$ ) varió con respecto a la calidad de luz, en cultivos con luz verde y roja la  $F_{\text{lag}}$  duró 8 días, mientras en los de luz azul y blanca duró sólo 2 días.

Claustre y Gostan (1978), demuestran que la irradiancia influye también en el volumen celular microalgal, y que esta influencia presenta una variabilidad interespecífica. En cultivos estáticos de *Isochrysis galbana* y *Hymenomonas elongata* expuestas a luz PAR a saturación y limitación ( $400$  y  $25 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), el volumen celular de *I. galbana* fue independiente de la irradiancia, mientras que para *H. elongata* el volumen decreció significativamente un 25% de mayor a menor irradiancia.

La influencia de la luz, en intensidad o calidad, en el volumen celular esta asociada normalmente al incremento o decremento de la tasa de crecimiento, el contenido de productos de reserva y/o la síntesis adicional de pigmentos o enzimas necesarios para la aclimatación a la condición de luz circundante (Brown y Geen, 1974; Claustre y Gostan, 1978; Lewitus *et al.*, 1991). Sin embargo, Flaak y Epifanio (1978) no encuentran diferencias significativas en el peso seco de *Thalassiosira pseudonana* en diferentes fases de crecimiento (exponencial y estacionaria) respecto a la calidad de luz (azul, agrolite, blanca), a pesar de que las constantes relativas de crecimiento y el porcentaje de proteínas variaron entre tratamientos. El crecimiento fue similar en cultivos con luz blanca y azul, e inferior con luz agrolite, mientras que el contenido de proteínas, varió según el patrón esperado: altos niveles durante la fase de crecimiento exponencial comparados con la fase estacionaria, con valores mayores para luz azul y menores para luz blanca y agrolite.

Siendo el metabolismo microalgal afectado por las condiciones de luz, es de esperarse que la composición bioquímica, como consecuencia sea también alterada (Morris, 1974; Darley, 1987). En la alimentación de invertebrados marinos, donde la calidad del alimento resulta fundamental para el desarrollo, crecimiento y sobrevivencia, es importante que el cultivo de microalgas se realice en las condiciones óptimas que permitan mantener el valor nutricional deseado y alta productividad. Además, las variaciones en la condición de luz de cultivo, permite obtener una sola especie de microalga con características

nutricionales diferentes que puede ser usada en estudios de requerimientos nutritivos de invertebrados marinos (Flaak y Epifanio, 1978; Correa-Reyes, 1993; Thompson *et al.*, 1993; Jónasdóttir, 1994).

En cultivos microalgales, la influencia de la irradiancia en la composición bioquímica esta relacionada con la disponibilidad de energía para llevar a cabo las funciones metabólicas de fotosíntesis y producción de material celular (Cloern, 1977). En células cultivadas en baja irradiancia, el contenido proteico es menor que en células cultivadas en alta irradiancia, debido al bajo nivel energético de las intensidades de luz que limitan el crecimiento y la síntesis de proteínas (Morris, 1981). Thompson y colaboradores (1993), realizaron cultivos de *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* y *Phaeodactylum tricornutum*, en diferentes condiciones de irradiancia, con el objeto de variar su composición bioquímica y evaluar su calidad nutricional en larvas de ostión de *Crassostrea gigas*. Sin embargo, a pesar de no encontrar diferencias significantes en el contenido de carbono, nitrógeno, proteínas, lípidos y carbohidratos, en estas especies fitoplanctónicas con respecto al nivel de irradiancia, la composición de ácidos grasos varió. El rápido crecimiento de las larvas de *C. gigas*, estuvo consistentemente asociado al incremento en la proporción de ácidos grasos saturados de cadena corta (14:0 + 16:0) obtenido en células cultivadas con alta irradiancia.

Respecto a la influencia de la calidad de luz en la composición bioquímica de las microalgas, los estudios que se han llevado a cabo son pocos, pero coinciden en que la luz azul promueve la síntesis de aminoácidos y proteínas (Wallen y Geen, 1971 a, b; Brown y Geen, 1974; Flaak y Epifanio, 1978; Sanchez-Saavedra, 1994), mientras que la luz roja y/o blanca favorece la síntesis de carbohidratos (Brown y Geen, 1974). Sin embargo, existen excepciones, por ejemplo: *Stephanophyxis turris*, en cultivos con luz verde-azul aumenta 40% su contenido de lípidos y mantiene el contenido de proteínas similar a células cultivadas con luz blanca (Jeffrey y Vesk, 1977a).

Por otro lado, la calidad de luz determina la concentración y composición de los productos orgánicos extracelulares. Brown y Geen (1974) en cultivos de *C. reinhardtii* reportan que del total de  $^{14}\text{C}$  incorporado por las células, aproximadamente el 36% es exudado en luz blanca, mientras que en luz azul y roja se exuda sólo un 6.6% y 4%, respectivamente. Además, la composición de los exudados varió con la calidad de luz. En luz blanca los productos de exudación estuvieron constituidos principalmente por aminoácidos libres, ácidos orgánicos y azúcares, mientras que en luz azul fueron azúcares y en luz roja ácidos orgánicos.

Otro proceso evidente en las microalgas, es la fotoadaptación relacionada con el contenido y composición de los pigmentos celulares. La respuesta es similar en la mayoría de los organismos fotoautótrofos, el contenido total de pigmentos por célula y la razón de los pigmentos accesorios mayores respecto a las clorofilas varían inversamente con la irradiancia (Durbin, 1974; Chan, 1978; Claustre y Gostan, 1987; López-Muñoz *et al.*, 1992). Los cambios en el contenido y la composición pigmentaria, pueden estar también determinados por la calidad de la luz. Debido a que, la luz en el medio ambiente penetra de manera diferencial, la captación de energía luminosa que es utilizada para la excitación de la clorofila *a* en el proceso fotosintético es limitada, y las células se ven en la necesidad de fotoadaptarse a tales condiciones mediante el aumento o decremento de sus pigmentos (Wallen y Geen, 1971b; Cabrera y Montecino, 1987).

Jeffrey y Vesk (1977a, b), analizaron el contenido de pigmentos en 18 especies de fitoplancton cultivadas en luz blanca y verde-azul a irradiancia constante ( $400 \mu\text{W cm}^{-2}$ ). Quince de las especies, incrementaron de un 20-146% su contenido de clorofilas en luz verde-azul, y sólo la cryptofita *Chroomonas* sp presentó un incremento significativo en la proporción relativa de biliproteína:clorofila *a*, que sugiere que esta especie presenta una adaptación cromática a la luz verde-azul. Diferencias en la concentración relativa de

pigmentos accesorios mayores y clorofilas, respecto a la calidad de luz han sido reportados también para otras especies del fitoplancton (Wallen y Geen, 1971a, b; Humprey, 1983).

Otro efecto importante de la luz, íntimamente ligado con la respuesta en la producción de pigmentos, son los cambios estructurales en el aparato fotosintético. Se ha observado que el número y tamaño de los cloroplastos así como el área, empaque y número de tilacoides, la distribución y tamaño de las partículas asociadas a la membrana tilacoidal guardan una relación inversa con la intensidad de luz (Faust y Gantt, 1973; Falkowski y La Roche, 1991; Lewitus y Caron, 1991). Independientemente del nivel de irradiancia de cultivo, la influencia de la calidad de luz en el número de cloroplastos, su forma y estructura interna ha sido observada en diversas especies de fitoplancton (Jeffrey y Vesk, 1977a, b).

Otros factores físico-químicos que han sido relacionados con los niveles de irradiancia y el fotoperíodo, son la temperatura y la salinidad. Durbin (1974) señala que la temperatura y el fotoperíodo determinan los requerimientos de irradiancia necesarios para que *Thalassiosira nordenskiöldii* alcance su máximo crecimiento. Ostroff *et al.* (1980), realizó cultivos de *Pseudopedinella pyriforme* con el objeto de conocer los niveles óptimos de luz, temperatura y salinidad. La tasa de crecimiento se correlacionó directamente con la temperatura y la irradiancia, mientras con la salinidad se dio una relación inversa. A temperatura de 5°C, la irradiancia necesaria para obtener máximas tasas de crecimiento fue menor ( $285 \mu\text{W cm}^{-2}$ ) que a temperatura de 15°C ( $571 \mu\text{W cm}^{-2}$ ) para todas las salinidades analizadas. Estos resultados son consistentes con trabajos anteriores de otros autores (Cloern, 1977; Morgan y Kalff, 1979).

Cloern (1977), además de estudiar el efecto de la luz y temperatura en la tasa de crecimiento de *Cryptomonas ovata*, estudió las tasas de consumo de nitrato, amonio y fosfato. Sus resultados indican que el consumo de nitrato y amonio fue estimulado por luz y temperatura, mientras que el consumo de

fosfato fue dependiente únicamente de la temperatura. Morgan y Kalff (1979), por su parte, estudiaron el consumo de carbono por *Cryptomonas erosa* en diferentes condiciones de irradiancia y temperatura, encontraron que la temperatura guarda una relación directa con la máxima tasa de consumo de  $^{14}\text{C}$  y la irradiancia a la cual el consumo de  $^{14}\text{C}$  es saturado e inhibido. López-Muñoz *et al.* (1992), evaluaron la composición de pigmentos fotosintéticos en cuatro microalgas cultivadas en diferentes condiciones de luz y temperatura, encontraron que el contenido de clorofila *a* se relaciona directamente con la temperatura e inversamente con la irradiancia.

La concentración y especiación de los macro y micronutrientes (nitrógeno, fósforo y hierro, principalmente) son también factores fundamentales que afectan el crecimiento, las funciones metabólicas, la composición bioquímica y el rendimiento final en sistemas de producción (Kaplan *et al.*, 1986; Fabregas *et al.*, 1989; DeBoer, 1994). En cultivos estáticos de *Pyrenomonas salina*, Lewitus y Caron (1990), reportan una correlación directa entre la densidad celular obtenida en la fase de crecimiento estacionario y la concentración inicial de nitrato (N:P de 0.2-4) o fosfato (N:P de 50-50000) disponible en los medios de cultivo.

En la actualidad, se han realizado numerosos estudios que analizan por un lado, las respuestas adaptativas de las microalgas a la irradiancia, y por otro lado las respuestas a la limitación de nutrientes importantes como el nitrógeno, fósforo y hierro, entre otros. En estudios de limitación de nutrientes, se han obtenido respuestas adaptativas en el aparato fotosintético que muestran ciertas similitudes con las respuestas fotoadaptativas observadas a altas irradiancias (Falkowski *et al.*, 1989; Herzig y Falkowski, 1989; Turpin, 1991; Geider *et al.*, 1993; Graziano *et al.*, 1996). Herzig y Falkowski (1989), en cultivos de *Isochrysis galbana*, a irradiancia continua de  $175 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , encuentran que las células cultivadas en limitación de nitrógeno presentan menores contenidos de clorofila *a* y pigmentos accesorios, que células

cultivadas en medios ricos en nitrógeno. La respuesta a la limitación de nutrientes, en la razón de pigmentos accesorios mayores:clorofila *a*, presenta una variabilidad interespecífica, mientras que la razón de carotenoides: clorofila *a* normalmente se incrementa, y esta asociada a la función fotoprotectora de estos pigmentos (Falkowski *et al.*, 1989; Herzig y Falkowski, 1989; Turpin, 1991; Geider *et al.*, 1993).

En una revisión realizada por Turpin (1991), sobre los efectos de la disponibilidad de nitrógeno inorgánico en la fotosíntesis y el metabolismo del carbono, se señala que la tasa de fotosíntesis máxima ( $P_{\text{máx}}$ ), el nivel de saturación de luz ( $I_k$ ) y la eficiencia fotosintética celular, decrecen en respuesta a la limitación de N. Asimismo, la razón N:C, el contenido de N y proteínas celulares decae, mientras la acumulación de compuestos orgánicos de reserva (carbohidratos y/o lípidos) aumenta (Morris, 1981; Syrett, 1981; Turpin, 1991).

La disminución de los pigmentos o de algunas proteínas funcionales de la fotosíntesis localizadas en el cloroplasto (i.e. RubisCO, citocromos), sugieren que en condiciones de limitación por N, éstas sirven como reservorios transitorios del N que será usado para continuar con el crecimiento celular (Falkowski *et al.*, 1989; Lewitus y Caron, 1990; Turpin, 1991; Geider *et al.*, 1993).

Las respuestas adaptativas en el aparato fotosintético debidas a la limitación por fósforo, son similares pero menos drásticas que las obtenidas por limitación de N. Graziano *et al.* (1996), en estudios de limitación por P de *Dunaliella tertiolecta*, reporta un decremento del contenido de clorofila *a*, razón de clorofila *a*:clorofila *c*, en el contenido de RubisCO y de la eficiencia fotoquímica. Aunado a ello, la absorción de la clorofila *a*, la pérdida de energía por fluorescencia, la razón C:P y la tasa máxima de consumo de fosfato incrementaron. En el caso concreto de *D. tertiolecta*, se reporta la presencia de una proteína indicadora de estrés por deficiencia de P. Esta proteína no fue observada en células cultivadas en medios ricos de nutrientes, ni de limitación

de N o Fe, pero si en condiciones de limitación por P, donde su abundancia estuvo correlacionada directamente con el grado de limitación del nutriente. La actividad de las fosfatasas alcalinas, también fue evaluada, sin embargo, este indicador respondió sólo a condiciones extremas de deficiencia de P y no a ciertos grados de limitación.

El efecto de la interacción entre irradiancia y concentración de macronutrientes en el crecimiento del fitoplancton, ha sido poco estudiado y hasta el momento no está completamente bien entendido. Maddux y Jones (1964), reportan que las diferencias en la concentración de nutrientes, producen cambios en los requerimientos de luz necesarios para obtener la tasa de crecimiento máxima en cultivos de *Nitzschia closterium* y *Tetraselmis* sp. Para ambas especies, se tuvieron menores requerimientos de luz en cultivos con bajo contenido de N y P, que los obtenidos para altos nutrientes. Asimismo, en el intervalo de irradiancias evaluadas, las tasas de crecimiento en los cultivos con altos nutrientes, fueron dos veces del valor correspondiente obtenido en bajos nutrientes.

Una relación diferente se observó en cultivos de *Scenedesmus* sp (Rhee y Gotham, 1981) y *Synechococcus linearis* (Healey, 1985), donde los requerimientos de nutrientes se incrementan conforme el nivel de irradiancia disminuye. Además, para todas las irradiancias estudiadas, la concentración celular de N aumenta conforme el grado de limitación del nutriente disminuye y la tasa de crecimiento aumenta.

Lewitus y Caron (1990), al evaluar el efecto de la irradiancia y la concentración de nitrógeno y fósforo en la producción de pigmentos por *Pyrenomonas salina*, encuentran que, durante el crecimiento exponencial cuando las concentraciones de nutrientes son altas, la luz es el factor determinante en la contenido celular de ficoeritrina. Mientras que, en la fase de crecimiento estacionario, cuando la limitación por nutrientes es evidente, el

contenido de ficoeritrina fue resultado de un efecto sinérgico entre la luz y la disponibilidad de los nutrientes.

La primera etapa de este trabajo fue diseñada con el objetivo de determinar el efecto simultáneo de las condiciones de luz y nutrientes (N y P) en el crecimiento de *Rhodomonas* sp en sistemas de cultivo estático. Para posteriormente, evaluar el efecto de la luz azul en su crecimiento y composición bioquímica.

### 3.- OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo general

Estimar la relación entre las condiciones de luz (intensidad y calidad) y concentración de nutrientes (nitrato y fosfato) en la respuesta fisiológica de la microalga marina *Rhodomonas* sp (Cryptophyceae) en cultivos estáticos.

#### 3.2. Objetivos particulares

##### 3.2.1. Etapa 1: Efecto de la irradiancia y la concentración de nutrientes (nitratos y fosfatos) en la producción de *Rhodomonas* sp.

Comparar el crecimiento, la tasa de consumo de nutrientes ( $^{14}\text{C}$ ,  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ ) y la concentración de clorofilas en cultivos estáticos de *Rhodomonas* sp en volúmenes de 200 ml, expuestos a diferentes irradiancias y concentración de nutrientes ( $\text{NO}_3^-$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ ).

##### 3.2.2. Etapa 2: Efecto de la calidad de la luz en la producción de *Rhodomonas* sp.

Determinar el efecto de la calidad de luz (azul vs blanca) en la producción y la composición proximal (cenizas, proteínas, carbohidratos y lípidos) de *Rhodomonas* sp en cultivos estáticos de 18 L.

## 4.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Selección de la especie.

La cepa de *Rhodomonas* sp con la cual se realizó este estudio, se adquirió de la colección de cultivos unialgales que se encuentran en el laboratorio de producción de microalgas del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California. Esta especie se seleccionó como objeto de estudio debido al interés acuacultural que representa como alimento vivo (Brown *et al.*, 1998).

### 4.2. Etapa 1: Efecto de la irradiancia y la concentración de nutrientes (nitrato y fosfato) en la producción de *Rhodomonas* sp.

Para conocer el efecto de la irradiancia y la concentración de nitrógeno y fósforo en el medio sobre la producción de *Rhodomonas* sp, se creó un diseño factorial 4x3, donde se establecieron cuatro niveles de irradiancia: 52, 68, 103 y 142  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , y tres concentraciones de nutrientes: 661.8 y 29.3, 882.4 y 39 (control f/2) y 1323.6 y 58.5  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaNO}_3$  y  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , respectivamente. La elaboración del medio de cultivo se basó en la formulación del medio f/2 propuesto por Guillard (1975), como se menciona anteriormente las variaciones estuvieron dadas en la concentración de nitrógeno y fósforo, manteniendo siempre la razón N:P constante ( $\sim 22.6$ ). En cuanto a los demás constituyentes del medio, éstos se mantuvieron constantes en las siguientes concentraciones:  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (11.7  $\mu\text{M}$ ),  $\text{FeCl}_3$  (11.7  $\mu\text{M}$ ),  $\text{CuSO}_4$  (0.04  $\mu\text{M}$ ),  $\text{ZnSO}_4$  (0.08  $\mu\text{M}$ ),  $\text{CoCl}_2$  (0.05  $\mu\text{M}$ ),  $\text{MnCl}_2$  (0.9  $\mu\text{M}$ ) y  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  (0.03  $\mu\text{M}$ ), usados para la preparación de la solución madre de metales traza; para vitaminas se preparó una mezcla con soluciones preparadas de 0.1  $\text{mg L}^{-1}$  de Tiamina hidrocloreídrica, 0.5  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Biotina y 0.5  $\mu\text{g L}^{-1}$  de vitamina  $\text{B}_{12}$ , esta mezcla fue esterilizada en autoclave durante 5 minutos a  $121^\circ\text{C}$  y  $1.05 \text{ kg cm}^{-2}$ .

También se utilizó una solución amortiguadora de TRIS-HCl preparada con 200 g L<sup>-1</sup>.

Los cultivos experimentales se llevaron a cabo en un cuarto con temperatura controlada de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . El agua de mar utilizada para la preparación de los medios se trató mediante dos filtros de cartucho (cuno) de 1 y 0.65  $\mu\text{m}$  y se irradió con un sistema de luz ultravioleta modelo H-50. Los cultivos se realizaron a nivel Erlenmeyer (200 ml) empleando un volumen de medio de 190 ml, el cual se esterilizó en autoclave a  $121^\circ\text{C}$  y  $1.05 \text{ kg cm}^{-2}$  de presión durante 10 minutos. Una vez enfriados los medios y en una atmósfera aséptica generada por dos mecheros de alta temperatura, cada Erlenmeyer recibió 190  $\mu\text{L}$  de la mezcla de vitaminas y un volumen de inóculo de 10 ml de la cepa de *Rhodomonas* sp. El inóculo utilizado provenía de una condición de cultivo, aclimatada por cuatro semanas, con medio f/2 y  $92 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

La iluminación durante esta etapa experimental fue continua y estuvo proporcionada por 4 lámparas Day-light General Electrics de 8 pies y 75 watts (número de catálogo F96T12-D-EX). La intensidad de luz fue medida directamente con un irradiómetro PAR (modelo QSL-100,  $4\pi$  sensor, Biospherical Instruments), al centro en la base de los recipientes de cultivo. Se mantuvo a todos los tratamientos aislados de la luz ambiental mediante la instalación de una cortina blanca en la mesa de cultivo. Los cultivos fueron agitados diariamente para impedir el asentamiento de las células y favorecer el intercambio gaseoso entre el medio y la atmósfera circundante.

Para cada combinación propuesta de luz y nutrientes se trabajó con cinco unidades de cultivo (réplicas), de todas las unidades se muestreó diario y de manera independiente un mililitro de cultivo para cuantificar la biomasa microalgal.

La cuantificación de las células se realizó mediante conteos directos al microscopio compuesto con una cámara Neubauer de 0.1 mm de profundidad. De los resultados obtenidos de crecimiento se determinó la tasa de crecimiento

( $\mu$ ), divisiones por día (D), tiempo de duplicación (TD) y producción diaria (PD) de acuerdo a las metodologías propuestas por Guillard (1975) y De la Cruz y Alfonso (1975).

De dos unidades se filtró diario un volumen de 8 ml de cultivo, mediante filtros de fibra de vidrio GF/C de 1.2  $\mu$ m y 25 mm de diámetro, el agua del filtrado se almacenó en frascos de vidrio (8 ml) a -60°C para el análisis posterior de nitrato y fosfato, mientras que el filtrado fue puesto en acetona al 90% para la extracción de clorofilas. La determinación de nitrato, fosfato y clorofilas se llevó a cabo de acuerdo a las metodologías descritas por Parsons *et al.* (1985). Previo a la determinación se realizaron curvas de calibración para cada uno de los nutrientes. Para conocer la concentración de clorofilas en las muestras se utilizaron las ecuaciones tricómicas propuestas por Millán-Núñez y Álvarez-Borrego (1978).

De otras dos unidades se filtró un volumen de 10 ml de cultivo, el agua de filtrado fue puesta en frascos de 20 ml donde se llevó a cabo la incubación con 200  $\mu$ L de  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  de una densidad celular conocida proveniente de las mismas unidades de cultivo, esto se realizó para proporcionar a las células las mismas condiciones de cultivo. Una unidad más de cultivo, fue puesta con el objeto de contar con un respaldo y poder llevar un registro de salinidad (refractómetro manual Reichert-Jung, con una precisión de  $\pm 1$ ), temperatura (termómetro Ertco con escala de -20 a +110°C con  $\pm 1^\circ\text{C}$  de precisión) y pH (potenciómetro Chemcadet Jr.), durante los siete días de duración del experimento.

#### **4.3. Etapa 2: Efecto de la calidad de la luz en la producción de *Rhodomonas* sp.**

Una vez determinada la condición óptima de irradiancia y concentración de nutrientes ( $\text{NO}_3^-$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ ), para el crecimiento de *Rhodomonas* sp, se procedió a estudiar el efecto de la calidad de luz sobre su producción y

composición proximal. Para ello, se utilizó cepa de *Rhodomonas* sp aclimatada a  $52 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de irradiancia con  $1323.6 \mu\text{M}$  de  $\text{NaNO}_3$  y  $58.5 \mu\text{M}$  de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y calidad de luz azul (LA) y blanca (LB) por un período de 12 semanas. Durante esta etapa la iluminación de los cultivos fue continua. Las características de la luz blanca están dadas en la etapa anterior, la luz azul fue proporcionada por lámparas fluorescentes General Electrics de 4 pies y 40 watts (número de catálogo F40B), que emiten principalmente en la banda experimental de luz azul entre los 430 y 470 nm de longitud de onda (Sanchez-Saavedra, 1994).

Para esta etapa experimental se usaron tres niveles de cultivo: Erlenmeyer (200 ml), Fernbach (2 L) y Garrafón (18 L).

La preparación de los cultivos a nivel Erlenmeyer y Fernbach se realizó bajo las mismas condiciones de esterilización e inoculación expuestas en la etapa 1, utilizándose al séptimo día de cultivo los 200 ml generados a nivel Erlenmeyer como inóculo para el nivel Fernbach. En ambos niveles se contó con cuatro réplicas por condición de luz, que fueron muestreadas diariamente para conteos, determinación de clorofilas, consumo de nutrientes y medición de pH.

A nivel Garrafón (18 L), el agua de mar usada para la preparación de los medios se trató mediante hipoclorito de sodio en una razón de  $0.25 \text{ ml L}^{-1}$  y se dejó reposar por 24 horas. Posteriormente, se usó  $0.1 \text{ ml L}^{-1}$  de tiosulfato de sodio y aireación por 3 horas (Pruder y Bolton, 1978). Realizado esto se empleó el volumen total del Fernbach, a su sexto día de cultivo, para sembrar el garrafón bajo las condiciones asépticas descritas con anterioridad. Durante este nivel de cultivo se suministró un flujo de aire de  $4.5 \text{ L min}^{-1}$  (flujómetro Gilmont) mediante un compresor de aire seco Conde 12.

A nivel Garrafón se contó con cuatro unidades de cultivo por condición de luz. De cada réplica fueron tomadas muestras diarias para determinar densidad celular, consumo de nitrato y fosfato, concentración de clorofilas,

composición proximal (proteínas, lípidos, carbohidratos y cenizas), pH, temperatura y salinidad.

Para determinar composición proximal, se filtró diario un volumen de densidad celular conocida a través de filtros de fibra de vidrio GF/C de 1.2  $\mu\text{m}$  y 47 mm de diámetro, previamente incinerados a 450°C. El volumen de filtrado varió conforme aumentó el tiempo de cultivo, para las 0 y 24 horas de cultivo se filtró un volumen de 250 ml de muestra; para las 48 y 72 horas 150 ml; para las 96 y 120 horas 100 ml, y finalmente para las 144 y 168 horas 80 ml. Una vez filtrada la muestra, los filtros fueron lavados con formato de amonio al 2.25% con el objeto de eliminar las sales. La biomasa retenida en los filtros se colocó en sobres de papel aluminio y el agua del filtrado se recolectó en frascos de vidrio de 8 ml. Inmediatamente después de tomadas las muestras se procedió a su preservación en un ultracongelador a -60°C.

Para determinar peso seco, las muestras fueron secadas durante 24 horas a 60°C y puestas a peso constante. Posteriormente, los filtros fueron sometidos a combustión a 450°C por 6 horas y pesados, esto para remover el material orgánico y determinar el peso del material inorgánico (Sorokin, 1973).

Previo a la cuantificación de proteínas, lípidos y carbohidratos se realizaron curvas de calibración. Seroalbumina-bovina para proteínas, ácido esteárico para lípidos y D-glucosa para carbohidratos. La determinación se realizó en un espectrofotómetro digital Spectronic Genesys 2.

Para proteínas se realizó doble extracción de las muestras a 100°C con 5 ml NaOH 1N por 10 minutos (Raush, 1981) y la cuantificación se hizo por el método de Bradford (1976). Los lípidos fueron extraídos de acuerdo al método descrito por Bligh y Dyer (1959) con una mezcla de cloroformo:metanol:agua (1:2:1) y la cuantificación se estimó por el método de Pande *et al.* (1963). En cuanto a los carbohidratos, se utilizó el método de fenol-sulfúrico descrito por Kochert (1978) previa hidrólisis de las muestras con 10 ml de ácido sulfúrico 2N a 100°C durante dos horas.

#### **4.4. Tratamiento estadístico de los datos.**

En ambas etapas experimentales, a los datos diarios por tratamiento se les aplicó la Prueba de Normalidad Q-Q con el objeto de determinar si la distribución de los datos obtenidos correspondía o no a una distribución normal. Ya que no todos los tratamientos resultaron tener distribución normal, se llevó a cabo el Análisis no-paramétrico de Kruskal-Wallis. Este análisis, es análogo al ANOVA paramétrico, y se realizó con el objetivo de determinar diferencias entre los tratamientos propuestos en cada etapa experimental. Cuando se presentaron diferencias significativas entre tratamientos, se realizó la evaluación de las medianas y las sumas de rangos obtenidas del análisis Kruskal-Wallis para estimar estas diferencias. El análisis estadístico se efectuó con el programa MINITAB 12.1, manejando un nivel de confianza del 95%.

## RESULTADOS

### 5.1. Etapa 1: Efecto de la irradiancia y la concentración de nutrientes (nitrato y fosfato) en la producción de *Rhodomonas* sp.

Las condiciones físico-químicas promedios bajo las cuales se desarrollaron los cultivos estáticos de *Rhodomonas* sp fueron: temperatura de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  y salinidad de 32. El pH inicial de los cultivos fue  $7.6 \pm 0.1$ , a partir del cual, se incrementó hasta un pH de 10 para el tercer día (Anexo A, Fig. 19). Del cuarto al séptimo día, el pH disminuyó a un valor promedio de 9.5. No hubo diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en los valores de pH entre tratamientos (Anexo C, Tabla XX).

#### 5.1.1. Crecimiento microalgal

Para cada una de las 12 combinaciones resultantes del gradiente de irradiancia y concentración de nutrientes, se obtuvo una curva de crecimiento promedio de los siete días de cultivo (Fig. 1). Todos los tratamientos, iniciaron con una densidad celular similar, la cual en promedio fue  $5.7 \times 10^4$  células  $\text{ml}^{-1}$  con una desviación estándar de  $1 \times 10^4$  células  $\text{ml}^{-1}$  (Tablas I-IV).

La fase de crecimiento exponencial ( $F_{\text{exp}}$ ), se presentó desde el primer día, en todos los tratamientos, y tuvo una duración de 96 horas, culminando al cuarto día de cultivo (Anexo A, Fig. 18; Tablas I-IV). Durante las primeras 48 horas, se observó un incremento similar en la densidad celular de los cultivos expuestos a distintas irradiancias y concentraciones de nutrientes. Para este tiempo, no hubo diferencias significativas en la densidad celular entre tratamientos (Anexo C, Tabla XX). Las diferencias en densidad celular entre tratamientos, se presentaron a partir de las 48 horas (Día 2), e independientemente del nivel de irradiancia el crecimiento de *Rhodomonas* sp fue mayor en los cultivos con mayor concentración inicial de nitrato y fosfato,

seguido por los cultivos control (f/2) y de menor concentración de nutrientes respectivamente (Fig. 1).

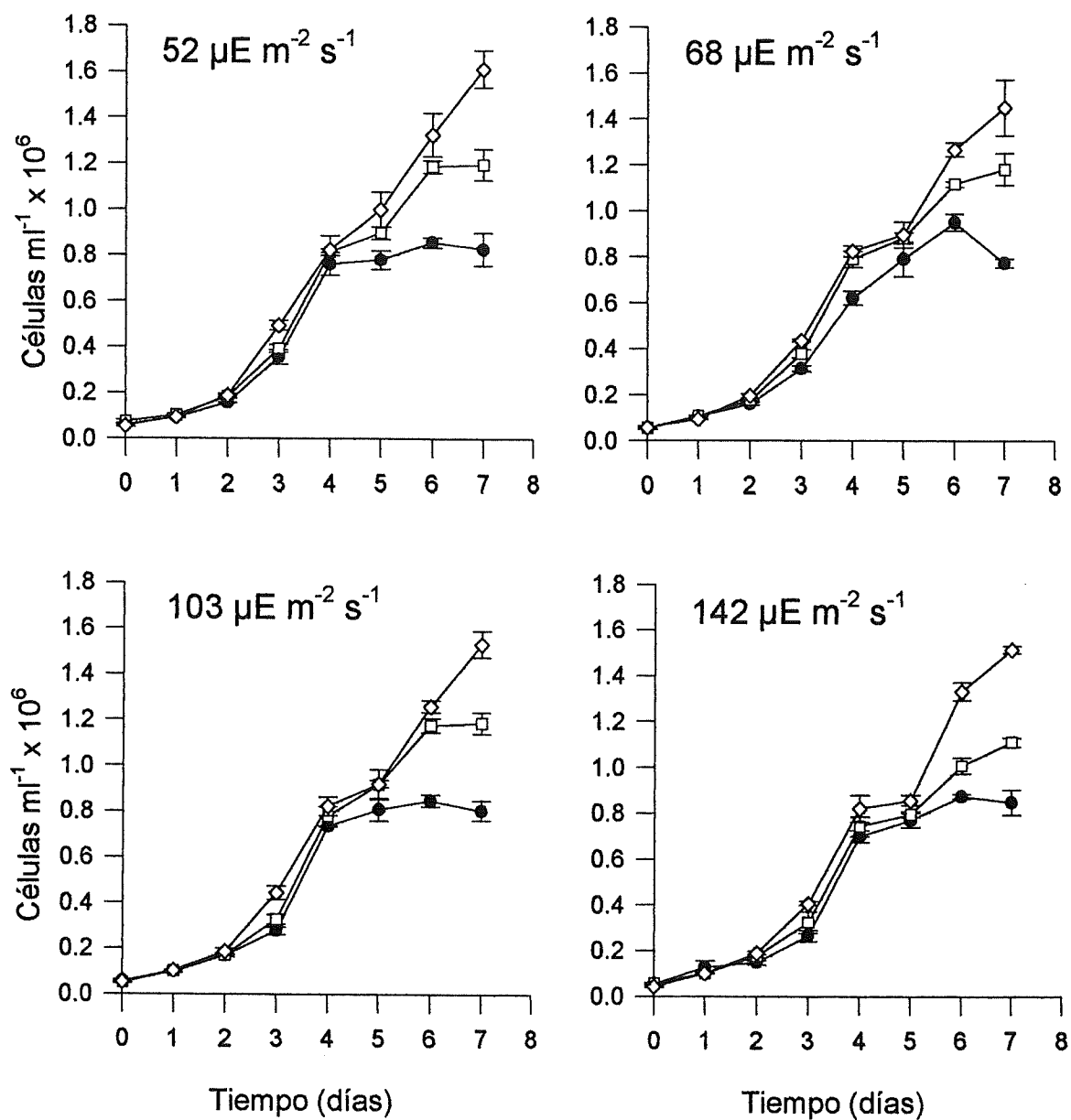
A partir del cuarto día, dio inicio la fase de crecimiento estacionario ( $F_{est}$ ), la cual se caracterizó por la reducción significativa en la división celular ( $\mu$ ) y el aumento en el tiempo de duplicación de la población ( $TD$ ; Tablas I-IV). En la mayoría de los tratamientos, la  $F_{est}$  se presentó del quinto al séptimo día, a excepción de los cultivos con menor concentración de nutrientes. Los cultivos con menor concentración de nutrientes, en todas las irradiancias estudiadas, presentaron la fase de decaimiento ( $F_{dec}$ ) después del sexto día (Fig. 1; Tablas I-IV).

En general, la máxima densidad celular se obtuvo al séptimo día (Fig. 1), ésta varió de  $1.4\text{-}1.6 \times 10^6$  células  $\text{ml}^{-1}$  para los cultivos con mayor nutriente, de  $1.1\text{-}1.19 \times 10^6$  células  $\text{ml}^{-1}$  para los tratamientos control, y  $0.77\text{-}0.84 \times 10^6$  células  $\text{ml}^{-1}$  para aquellos con menor nutriente (Anexo A, Tabla XVII).

Las tasas de crecimiento promedio ( $\mu_{prom}$ ), por condición de nutriente, fueron en promedio de  $0.45 \pm 0.01$  para los cultivos con mayor nutriente,  $0.39 \pm 0.005$  para los cultivos control y  $0.45 \pm 0.01$  para los de menor nutriente (Anexo A, Tabla XVII). Sin embargo, a pesar de que los parámetros poblacionales promedio de los tratamientos con menor nutriente fueron similares a los obtenidos en tratamientos con mayor nutriente, el cálculo para los de menor nutriente se hizo tomando en consideración sólo seis días de cultivo, ya que al séptimo día se presentó la  $F_{dec}$ . Calculando  $\mu_{prom}$ , para los siete días de cultivo (Día 0-7), los tratamientos con menor nutriente, presentan un valor de  $0.38 \pm 0.009$  día<sup>-1</sup> con  $0.55 \pm 0.01$  divisiones día<sup>-1</sup>. Además, las densidades celulares finales obtenidas para estos tratamientos, en todas las irradiancias evaluadas, fueron significativamente menores a las cuantificadas en los tratamientos control y de mayor nutriente, respectivamente (Tablas I-IV).

Los parámetros poblacionales máximos, durante el tiempo de experimentación, y la densidad celular final alcanzada en cada tratamiento se

resumen en la tabla XVIII (Anexo A). La máxima producción de biomasa microalgal fue  $1.61 \times 10^6$  células  $\text{ml}^{-1}$  y se obtuvo en condiciones de  $52 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de irradiancia con  $1323 \mu\text{M}$  de  $\text{NaNO}_3$  y  $58.5 \mu\text{M}$  de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . En esta condición, la tasa de crecimiento máxima ( $\mu_{\text{máx}}$ ) fue  $0.96 \text{ día}^{-1}$  con 1.39 divisiones por día y un tiempo de duplicación ( $TD$ ) de 0.71 días, para el tercer día de cultivo ( $F_{\text{exp}}$ ). Asimismo, esta condición presentó los mejores parámetros poblacionales promedio, con  $\mu_{\text{prom}}$  de  $0.47 \text{ día}^{-1}$ , 0.68 divisiones  $\text{día}^{-1}$  y un  $TD_{\text{prom}}$  de  $2.1 \text{ días}^{-1}$  durante los siete días de cultivo (Anexo A, Tabla XVII).



**Figura 1.** Crecimiento promedio de *Rhodomonas* sp cultivada en volumen de 200 ml a diferentes irradiancias y concentración de nutrientes (● 661 y 29.3, □ 882 y 39, ◇ 1323 y 58.5  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaNO}_3$  y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , respectivamente). La barra vertical indica el error estándar.

Tabla I. Valores poblacionales promedio de *Rhodomonas* sp cultivada en 200 ml a irradiancia de  $52 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  con diferentes concentraciones de nutrientes (661 y 29.3, 882 y 39, 1323 y 58.5,  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaNO}_3$  y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , respectivamente).

| <b><math>52 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}</math> con 661 <math>\mu\text{M}</math> de <math>\text{NaNO}_3</math> y 29.3 <math>\mu\text{M}</math> de <math>\text{NaH}_2\text{PO}_4</math></b> |                                              |                                |                                      |              |                                   |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|--------------|-----------------------------------|
| Tiempo<br>(días)                                                                                                                                                                               | Concentración<br>(células $\text{ml}^{-1}$ ) | $\mu$<br>( $\text{día}^{-1}$ ) | D<br>(divisiones $\text{día}^{-1}$ ) | TD<br>(días) | PD<br>(células $\text{ml}^{-1}$ ) |
| 0                                                                                                                                                                                              | 61111                                        | ---                            | ---                                  | ---          | ---                               |
| 1                                                                                                                                                                                              | 91666                                        | 0.40                           | 0.58                                 | 1.70         | 30555                             |
| 2                                                                                                                                                                                              | 156111                                       | 0.53                           | 0.76                                 | 1.30         | 64445                             |
| 3                                                                                                                                                                                              | 356111                                       | 0.82                           | 1.18                                 | 0.84         | 200000                            |
| 4                                                                                                                                                                                              | 762222                                       | 0.76                           | 1.09                                 | 0.91         | 406111                            |
| 5                                                                                                                                                                                              | 780000                                       | 0.02                           | 0.03                                 | 30.06        | 17778                             |
| 6                                                                                                                                                                                              | 855555                                       | 0.09                           | 0.13                                 | 7.49         | 75555                             |
| 7                                                                                                                                                                                              | 826666                                       | ---                            | ---                                  | ---          | ---                               |
|                                                                                                                                                                                                | <b>Promedio</b>                              | <b>0.44</b>                    | <b>0.63</b>                          | <b>7.05</b>  | <b>132407</b>                     |

| <b><math>52 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}</math> con 882 <math>\mu\text{M}</math> de <math>\text{NaNO}_3</math> y 39 <math>\mu\text{M}</math> de <math>\text{NaH}_2\text{PO}_4</math></b> |                                              |                                |                                      |              |                                   |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|--------------|-----------------------------------|
| Tiempo<br>(días)                                                                                                                                                                             | Concentración<br>(células $\text{ml}^{-1}$ ) | $\mu$<br>( $\text{día}^{-1}$ ) | D<br>(divisiones $\text{día}^{-1}$ ) | TD<br>(días) | PD<br>(células $\text{ml}^{-1}$ ) |
| 0                                                                                                                                                                                            | 74444                                        | ---                            | ---                                  | ---          | ---                               |
| 1                                                                                                                                                                                            | 102777                                       | 0.32                           | 0.46                                 | 2.14         | 28333                             |
| 2                                                                                                                                                                                            | 182777                                       | 0.57                           | 0.83                                 | 1.20         | 80000                             |
| 3                                                                                                                                                                                            | 392222                                       | 0.76                           | 1.10                                 | 0.90         | 209445                            |
| 4                                                                                                                                                                                            | 813333                                       | 0.72                           | 1.05                                 | 0.95         | 421111                            |
| 5                                                                                                                                                                                            | 896666                                       | 0.09                           | 0.14                                 | 7.10         | 83333                             |
| 6                                                                                                                                                                                            | 1186667                                      | 0.28                           | 0.40                                 | 2.47         | 290001                            |
| 7                                                                                                                                                                                            | 1195556                                      | 0.007                          | 0.01                                 | 92.88        | 8889                              |
|                                                                                                                                                                                              | <b>Promedio</b>                              | <b>0.40</b>                    | <b>0.59</b>                          | <b>17.6</b>  | <b>182130</b>                     |

| <b><math>52 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}</math> con 1323 <math>\mu\text{M}</math> de <math>\text{NaNO}_3</math> y 58.5 <math>\mu\text{M}</math> de <math>\text{NaH}_2\text{PO}_4</math></b> |                                              |                                |                                      |              |                                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|--------------|-----------------------------------|
| Tiempo<br>(días)                                                                                                                                                                                | Concentración<br>(células $\text{ml}^{-1}$ ) | $\mu$<br>( $\text{día}^{-1}$ ) | D<br>(divisiones $\text{día}^{-1}$ ) | TD<br>(días) | PD<br>(células $\text{ml}^{-1}$ ) |
| 0                                                                                                                                                                                               | 56111                                        | ---                            | ---                                  | ---          | ---                               |
| 1                                                                                                                                                                                               | 95555                                        | 0.53                           | 0.76                                 | 1.30         | 39444                             |
| 2                                                                                                                                                                                               | 187777                                       | 0.67                           | 0.97                                 | 1.02         | 92222                             |
| 3                                                                                                                                                                                               | 493888                                       | 0.96                           | 1.39                                 | 0.71         | 306111                            |
| 4                                                                                                                                                                                               | 823333                                       | 0.51                           | 0.73                                 | 1.35         | 329445                            |
| 5                                                                                                                                                                                               | 1000000                                      | 0.19                           | 0.28                                 | 3.56         | 176667                            |
| 6                                                                                                                                                                                               | 1325556                                      | 0.28                           | 0.40                                 | 2.45         | 325556                            |
| 7                                                                                                                                                                                               | 1612222                                      | 0.19                           | 0.28                                 | 3.54         | 286666                            |
|                                                                                                                                                                                                 | <b>Promedio</b>                              | <b>0.47</b>                    | <b>0.68</b>                          | <b>2.1</b>   | <b>252778</b>                     |

Tabla II. Valores poblacionales promedio de *Rhodomonas* sp cultivada en 200 ml a irradiancia de  $68 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  con diferentes concentraciones de nutrientes (661 y 29.3, 882 y 39, 1323 y 58.5,  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaNO}_3$  y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , respectivamente).

| <b><math>68 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}</math> con 661 <math>\mu\text{M}</math> de <math>\text{NaNO}_3</math> y 29.3 <math>\mu\text{M}</math> de <math>\text{NaH}_2\text{PO}_4</math></b> |                                              |                                |                                      |              |                                   |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|--------------|-----------------------------------|
| Tiempo<br>(días)                                                                                                                                                                               | Concentración<br>(células $\text{ml}^{-1}$ ) | $\mu$<br>( $\text{día}^{-1}$ ) | D<br>(divisiones $\text{día}^{-1}$ ) | TD<br>(días) | PD<br>(células $\text{ml}^{-1}$ ) |
| 0                                                                                                                                                                                              | 52777                                        | ---                            | ---                                  | ---          | ---                               |
| 1                                                                                                                                                                                              | 105000                                       | 0.68                           | 0.99                                 | 1.00         | 52223                             |
| 2                                                                                                                                                                                              | 160000                                       | 0.42                           | 0.60                                 | 1.64         | 55000                             |
| 3                                                                                                                                                                                              | 315000                                       | 0.67                           | 0.97                                 | 1.02         | 155000                            |
| 4                                                                                                                                                                                              | 622222                                       | 0.68                           | 0.99                                 | 1.00         | 307222                            |
| 5                                                                                                                                                                                              | 791111                                       | 0.24                           | 0.34                                 | 2.88         | 168889                            |
| 6                                                                                                                                                                                              | 950000                                       | 0.18                           | 0.26                                 | 3.78         | 158889                            |
| 7                                                                                                                                                                                              | 773333                                       | ---                            | ---                                  | ---          | ---                               |
|                                                                                                                                                                                                | <b>Promedio</b>                              | <b>0.48</b>                    | <b>0.69</b>                          | <b>1.89</b>  | <b>149537</b>                     |

| <b><math>68 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}</math> con 882 <math>\mu\text{M}</math> de <math>\text{NaNO}_3</math> y 39 <math>\mu\text{M}</math> de <math>\text{NaH}_2\text{PO}_4</math></b> |                                              |                                |                                      |              |                                   |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|--------------|-----------------------------------|
| Tiempo<br>(días)                                                                                                                                                                             | Concentración<br>(células $\text{ml}^{-1}$ ) | $\mu$<br>( $\text{día}^{-1}$ ) | D<br>(divisiones $\text{día}^{-1}$ ) | TD<br>(días) | PD<br>(células $\text{ml}^{-1}$ ) |
| 0                                                                                                                                                                                            | 55555                                        | ---                            | ---                                  | ---          | ---                               |
| 1                                                                                                                                                                                            | 106666                                       | 0.65                           | 0.94                                 | 1.06         | 51111                             |
| 2                                                                                                                                                                                            | 176666                                       | 0.50                           | 0.72                                 | 1.37         | 70000                             |
| 3                                                                                                                                                                                            | 378888                                       | 0.76                           | 1.10                                 | 0.90         | 202222                            |
| 4                                                                                                                                                                                            | 790000                                       | 0.73                           | 1.06                                 | 0.94         | 411112                            |
| 5                                                                                                                                                                                            | 882222                                       | 0.11                           | 0.15                                 | 6.27         | 92222                             |
| 6                                                                                                                                                                                            | 1115556                                      | 0.23                           | 0.33                                 | 2.95         | 233334                            |
| 7                                                                                                                                                                                            | 1180000                                      | 0.05                           | 0.08                                 | 12.34        | 64444                             |
|                                                                                                                                                                                              | <b>Promedio</b>                              | <b>0.40</b>                    | <b>0.57</b>                          | <b>4.13</b>  | <b>178889</b>                     |

| <b><math>68 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}</math> con 1323 <math>\mu\text{M}</math> de <math>\text{NaNO}_3</math> y 58.5 <math>\mu\text{M}</math> de <math>\text{NaH}_2\text{PO}_4</math></b> |                                              |                                |                                      |              |                                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|--------------|-----------------------------------|
| Tiempo<br>(días)                                                                                                                                                                                | Concentración<br>(células $\text{ml}^{-1}$ ) | $\mu$<br>( $\text{día}^{-1}$ ) | D<br>(divisiones $\text{día}^{-1}$ ) | TD<br>(días) | PD<br>(células $\text{ml}^{-1}$ ) |
| 0                                                                                                                                                                                               | 59444                                        | ---                            | ---                                  | ---          | ---                               |
| 1                                                                                                                                                                                               | 93333                                        | 0.45                           | 0.65                                 | 1.53         | 33889                             |
| 2                                                                                                                                                                                               | 195555                                       | 0.73                           | 1.06                                 | 0.93         | 102222                            |
| 3                                                                                                                                                                                               | 436666                                       | 0.80                           | 1.15                                 | 0.86         | 241111                            |
| 4                                                                                                                                                                                               | 824444                                       | 0.63                           | 0.91                                 | 1.09         | 387778                            |
| 5                                                                                                                                                                                               | 896666                                       | 0.08                           | 0.12                                 | 8.25         | 72222                             |
| 6                                                                                                                                                                                               | 1266667                                      | 0.34                           | 0.49                                 | 2.00         | 370001                            |
| 7                                                                                                                                                                                               | 1447778                                      | 0.13                           | 0.19                                 | 5.18         | 181111                            |
|                                                                                                                                                                                                 | <b>Promedio</b>                              | <b>0.45</b>                    | <b>0.65</b>                          | <b>3.05</b>  | <b>225741</b>                     |

Tabla III. Valores poblacionales promedio de *Rhodomonas* sp cultivada en 200 ml a irradiancia de  $103 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  con diferentes concentraciones de nutrientes (661 y 29.3, 882 y 39, 1323 y 58.5,  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaNO}_3$  y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , respectivamente).

| <b><math>103 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}</math> con 661 <math>\mu\text{M}</math> de <math>\text{NaNO}_3</math> y 29.3 <math>\mu\text{M}</math> de <math>\text{NaH}_2\text{PO}_4</math></b> |                                              |                                |                                      |              |                                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|--------------|-----------------------------------|
| Tiempo<br>(días)                                                                                                                                                                                | Concentración<br>(células $\text{ml}^{-1}$ ) | $\mu$<br>( $\text{día}^{-1}$ ) | D<br>(divisiones $\text{día}^{-1}$ ) | TD<br>(días) | PD<br>(células $\text{ml}^{-1}$ ) |
| 0                                                                                                                                                                                               | 56666                                        | ---                            | ---                                  | ---          | ---                               |
| 1                                                                                                                                                                                               | 100000                                       | 0.56                           | 0.81                                 | 1.22         | 43334                             |
| 2                                                                                                                                                                                               | 167777                                       | 0.51                           | 0.74                                 | 1.33         | 67777                             |
| 3                                                                                                                                                                                               | 277222                                       | 0.50                           | 0.72                                 | 1.38         | 109445                            |
| 4                                                                                                                                                                                               | 733333                                       | 0.97                           | 1.40                                 | 0.71         | 456111                            |
| 5                                                                                                                                                                                               | 807777                                       | 0.09                           | 0.13                                 | 7.16         | 74444                             |
| 6                                                                                                                                                                                               | 846666                                       | 0.04                           | 0.06                                 | 14.74        | 38889                             |
| 7                                                                                                                                                                                               | 803333                                       | ---                            | ---                                  | ---          | ---                               |
|                                                                                                                                                                                                 | <b>Promedio</b>                              | <b>0.45</b>                    | <b>0.64</b>                          | <b>4.42</b>  | <b>131667</b>                     |

| <b><math>103 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}</math> con 882 <math>\mu\text{M}</math> de <math>\text{NaNO}_3</math> y 39 <math>\mu\text{M}</math> de <math>\text{NaH}_2\text{PO}_4</math></b> |                                              |                                |                                      |              |                                   |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|--------------|-----------------------------------|
| Tiempo<br>(días)                                                                                                                                                                              | Concentración<br>(células $\text{ml}^{-1}$ ) | $\mu$<br>( $\text{día}^{-1}$ ) | D<br>(divisiones $\text{día}^{-1}$ ) | TD<br>(días) | PD<br>(células $\text{ml}^{-1}$ ) |
| 0                                                                                                                                                                                             | 50000                                        | ---                            | ---                                  | ---          | ---                               |
| 1                                                                                                                                                                                             | 100555                                       | 0.69                           | 1.00                                 | 0.99         | 50555                             |
| 2                                                                                                                                                                                             | 171666                                       | 0.53                           | 0.77                                 | 1.29         | 71111                             |
| 3                                                                                                                                                                                             | 327222                                       | 0.64                           | 0.93                                 | 1.07         | 155556                            |
| 4                                                                                                                                                                                             | 778888                                       | 0.86                           | 1.25                                 | 0.79         | 451666                            |
| 5                                                                                                                                                                                             | 916666                                       | 0.16                           | 0.23                                 | 4.25         | 137778                            |
| 6                                                                                                                                                                                             | 1175556                                      | 0.24                           | 0.35                                 | 2.78         | 25889                             |
| 7                                                                                                                                                                                             | 1185556                                      | 0.008                          | 0.01                                 | 81.82        | 10000                             |
|                                                                                                                                                                                               | <b>Promedio</b>                              | <b>0.41</b>                    | <b>0.59</b>                          | <b>15.33</b> | <b>142000</b>                     |

| <b><math>103 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}</math> con 1323 <math>\mu\text{M}</math> de <math>\text{NaNO}_3</math> y 58.5 <math>\mu\text{M}</math> de <math>\text{NaH}_2\text{PO}_4</math></b> |                                              |                                |                                      |              |                                   |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|--------------|-----------------------------------|
| Tiempo<br>(días)                                                                                                                                                                                 | Concentración<br>(células $\text{ml}^{-1}$ ) | $\mu$<br>( $\text{día}^{-1}$ ) | D<br>(divisiones $\text{día}^{-1}$ ) | TD<br>(días) | PD<br>(células $\text{ml}^{-1}$ ) |
| 0                                                                                                                                                                                                | 54444                                        | ---                            | ---                                  | ---          | ---                               |
| 1                                                                                                                                                                                                | 104444                                       | 0.65                           | 0.93                                 | 1.06         | 50000                             |
| 2                                                                                                                                                                                                | 187222                                       | 0.58                           | 0.84                                 | 1.18         | 82778                             |
| 3                                                                                                                                                                                                | 444444                                       | 0.86                           | 1.24                                 | 0.80         | 257222                            |
| 4                                                                                                                                                                                                | 822222                                       | 0.61                           | 0.88                                 | 1.12         | 377778                            |
| 5                                                                                                                                                                                                | 920000                                       | 0.11                           | 0.16                                 | 6.16         | 97778                             |
| 6                                                                                                                                                                                                | 1258889                                      | 0.31                           | 0.45                                 | 2.21         | 338889                            |
| 7                                                                                                                                                                                                | 1530000                                      | 0.19                           | 0.28                                 | 3.55         | 271111                            |
|                                                                                                                                                                                                  | <b>Promedio</b>                              | <b>0.44</b>                    | <b>0.64</b>                          | <b>2.50</b>  | <b>237593</b>                     |

Tabla IV. Valores poblacionales promedio de *Rhodomonas* sp cultivada en 200 ml a irradiancia de  $142 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  con diferentes concentraciones de nutrientes (661 y 29.3, 882 y 39, 1323 y 58.5,  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaNO}_3$  y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , respectivamente).

| <b><math>142 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}</math> con 661 <math>\mu\text{M}</math> de <math>\text{NaNO}_3</math> y 29.3 <math>\mu\text{M}</math> de <math>\text{NaH}_2\text{PO}_4</math></b> |                                              |                                |                                      |              |                                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|--------------|-----------------------------------|
| Tiempo<br>(días)                                                                                                                                                                                | Concentración<br>(células $\text{ml}^{-1}$ ) | $\mu$<br>( $\text{día}^{-1}$ ) | D<br>(divisiones $\text{día}^{-1}$ ) | TD<br>(días) | PD<br>(células $\text{ml}^{-1}$ ) |
| 0                                                                                                                                                                                               | 53333                                        | ---                            | ---                                  | ---          | ---                               |
| 1                                                                                                                                                                                               | 102221                                       | 0.65                           | 0.93                                 | 1.06         | 48888                             |
| 2                                                                                                                                                                                               | 147776                                       | 0.36                           | 0.53                                 | 1.88         | 45555                             |
| 3                                                                                                                                                                                               | 264998                                       | 0.58                           | 0.84                                 | 1.18         | 117222                            |
| 4                                                                                                                                                                                               | 698886                                       | 0.96                           | 1.39                                 | 0.71         | 433888                            |
| 5                                                                                                                                                                                               | 768886                                       | 0.09                           | 0.13                                 | 7.26         | 70000                             |
| 6                                                                                                                                                                                               | 873330                                       | 0.12                           | 0.18                                 | 5.44         | 104444                            |
| 7                                                                                                                                                                                               | 847775                                       | ---                            | ---                                  | ---          | ---                               |
|                                                                                                                                                                                                 | <b>Promedio</b>                              | <b>0.46</b>                    | <b>0.67</b>                          | <b>2.92</b>  | <b>136666</b>                     |

| <b><math>142 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}</math> con 882 <math>\mu\text{M}</math> de <math>\text{NaNO}_3</math> y 39 <math>\mu\text{M}</math> de <math>\text{NaH}_2\text{PO}_4</math></b> |                                              |                                |                                      |              |                                   |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|--------------|-----------------------------------|
| Tiempo<br>(días)                                                                                                                                                                              | Concentración<br>(células $\text{ml}^{-1}$ ) | $\mu$<br>( $\text{día}^{-1}$ ) | D<br>(divisiones $\text{día}^{-1}$ ) | TD<br>(días) | PD<br>(células $\text{ml}^{-1}$ ) |
| 0                                                                                                                                                                                             | 57222                                        | ---                            | ---                                  | ---          | ---                               |
| 1                                                                                                                                                                                             | 101111                                       | 0.56                           | 0.82                                 | 1.21         | 43889                             |
| 2                                                                                                                                                                                             | 175555                                       | 0.55                           | 0.79                                 | 1.25         | 74444                             |
| 3                                                                                                                                                                                             | 323333                                       | 0.61                           | 0.88                                 | 1.13         | 147778                            |
| 4                                                                                                                                                                                             | 742222                                       | 0.83                           | 1.19                                 | 0.83         | 418889                            |
| 5                                                                                                                                                                                             | 794444                                       | 0.06                           | 0.09                                 | 10.19        | 52222                             |
| 6                                                                                                                                                                                             | 1006667                                      | 0.23                           | 0.34                                 | 2.92         | 212223                            |
| 7                                                                                                                                                                                             | 1110000                                      | 0.09                           | 0.14                                 | 7.09         | 103333                            |
|                                                                                                                                                                                               | <b>Promedio</b>                              | <b>0.40</b>                    | <b>0.57</b>                          | <b>3.90</b>  | <b>168148</b>                     |

| <b><math>142 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}</math> con 1323 <math>\mu\text{M}</math> de <math>\text{NaNO}_3</math> y 58.5 <math>\mu\text{M}</math> de <math>\text{NaH}_2\text{PO}_4</math></b> |                                              |                                |                                      |              |                                   |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|--------------|-----------------------------------|
| Tiempo<br>(días)                                                                                                                                                                                 | Concentración<br>(células $\text{ml}^{-1}$ ) | $\mu$<br>( $\text{día}^{-1}$ ) | D<br>(divisiones $\text{día}^{-1}$ ) | TD<br>(días) | PD<br>(células $\text{ml}^{-1}$ ) |
| 0                                                                                                                                                                                                | 42777                                        | ---                            | ---                                  | ---          | ---                               |
| 1                                                                                                                                                                                                | 103333                                       | 0.88                           | 1.27                                 | 0.78         | 60556                             |
| 2                                                                                                                                                                                                | 190000                                       | 0.60                           | 0.87                                 | 1.13         | 86667                             |
| 3                                                                                                                                                                                                | 405555                                       | 0.75                           | 1.09                                 | 0.91         | 215555                            |
| 4                                                                                                                                                                                                | 820000                                       | 0.70                           | 1.01                                 | 0.98         | 414445                            |
| 5                                                                                                                                                                                                | 855555                                       | 0.04                           | 0.06                                 | 16.32        | 35555                             |
| 6                                                                                                                                                                                                | 1332222                                      | 0.44                           | 0.63                                 | 1.56         | 476667                            |
| 7                                                                                                                                                                                                | 1513333                                      | 0.12                           | 0.18                                 | 5.43         | 181111                            |
|                                                                                                                                                                                                  | <b>Promedio</b>                              | <b>0.44</b>                    | <b>0.64</b>                          | <b>4.39</b>  | <b>235000</b>                     |

### 5.1.2. Consumo de Nitrato y Fosfato

La variación en la concentración residual de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ , durante los siete días de cultivo de *Rhodomonas* sp en volumen de 200 ml, se presenta en las figuras 2, 3 y tablas V-VI, respectivamente.

La concentración residual de  $\text{NO}_3^-$  disminuye respecto al tiempo de cultivo, mostrando una relación inversa con el crecimiento (Figs. 1, 2). En los cultivos con mayor concentración inicial de nutrientes, fue similar el consumo diario promedio de  $\text{NO}_3^-$  en las cuatro condiciones de irradiancia ensayadas (Fig. 2; Tabla V-B).

En las primeras 24 horas, los cultivos control (f/2) expuestos a irradiancia de 52 y 68  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , presentaron el mayor consumo de  $\text{NO}_3^-$ , que fue 350 y 270  $\mu\text{M}$ , respectivamente. A irradiancia de 142  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  el consumo de  $\text{NO}_3^-$  en los cultivos control fue 197  $\mu\text{M}$ , mientras a 103  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fue sólo de 9  $\mu\text{M}$ . Estas diferencias ocasionan que a partir del primer día (24 horas), el consumo de  $\text{NO}_3^-$  en condiciones de baja irradiancia (52-68  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) sea similar entre los cultivos control y de menor concentración de nutrientes. Mientras que, a alta irradiancia (103-142  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), el consumo de  $\text{NO}_3^-$  entre condición de nutrientes difiere (Fig. 2; Tabla V).

El consumo acumulado de  $\text{NO}_3^-$  para el cuarto día de cultivo, en el cual culmina  $F_{\text{exp}}$ , representó aproximadamente el 50, 80 y 95% respecto a la concentración inicial de  $\text{NO}_3^-$ , en la condición de mayor nutriente, control y de menor nutriente respectivamente. Esto indica que cuando la población microalgal entra a la  $F_{\text{est}}$ , los cultivos que inicialmente contenían una mayor concentración de nutrientes cuentan con 660  $\mu\text{M}$  (50%) de  $\text{NO}_3^-$  disponibles en el medio y 660  $\mu\text{M}$  han sido consumidos. En los cultivos control hay 175  $\mu\text{M}$  (20%) en el medio y 707  $\mu\text{M}$  consumidos, mientras en los de menor nutriente sólo quedan 33  $\mu\text{M}$  (5%) y han sido consumidos 628  $\mu\text{M}$ . Es decir, que para un período de cuatro días (96 horas), la población microalgal de *Rhodomonas* sp con una densidad celular promedio, para los 12 tratamientos, de  $7.7 \times 10^5$

células  $\text{ml}^{-1}$  ( $\pm 0.62 \times 10^5$  células  $\text{ml}^{-1}$ ), ha consumido entre 628 y 707  $\mu\text{M}$  de  $\text{NO}_3^-$ .

Después del cuarto día, las diferencias en la concentración residual de  $\text{NO}_3^-$  entre tratamientos tiene una influencia directa en el comportamiento de las curvas de crecimiento durante la  $F_{\text{est}}$ . Al cuarto día, los cultivos con mayor concentración de nutrientes, tenían una concentración residual de  $\text{NO}_3^-$  de 660  $\mu\text{M}$ , lo cual permitió mantener a la población microalgal con tasas de crecimiento relativamente altas y generar densidades finales mayores en todas las condiciones de irradiancia (Fig. 1; Tablas I-IV). Los resultados demuestran que existe una correlación directa entre la densidad celular final (Día 7) y la concentración inicial de  $\text{NaNO}_3$ , encontrándose valores de coeficientes de correlación ( $r$ ) entre 0.95 y 0.99, para las diferentes condiciones de irradiancia (Anexo A, Fig. 20).

La concentración residual final (Día 7) de  $\text{NO}_3^-$ , presentó valores en un intervalo de 40-80  $\mu\text{M}$  en tratamientos con mayor nutriente, de 2-13  $\mu\text{M}$  en los control y de 4-18  $\mu\text{M}$  en los cultivos con menor nutriente (Tabla V-A). A pesar de que los cultivos control y de menor nutriente, tuvieron un intervalo de concentraciones residuales finales similares (Día 6-7), el consumo por célula (Tabla V-C) fue menor en los tratamientos con menor nutriente, y fue sólo en éstos donde se presentó la  $F_{\text{dec}}$  (Fig. 1).

El consumo de  $\text{NO}_3^-$  por célula, que se presenta en la Tabla V-C, fue calculado en cada tratamiento a partir del consumo promedio de  $\text{NO}_3^-$  (Tabla V-B) y la densidad celular promedio (Tablas I-IV). Los valores del consumo de  $\text{NO}_3^-$  por célula, muestran una disminución conforme aumenta el tiempo de cultivo, lo cual se relaciona con la disminución y disponibilidad del nutriente en el medio. En las primeras 24 horas de cultivo, la mayoría de los tratamientos presentaron altos valores de consumo ( $0.94\text{-}5.77$   $\text{pg NO}_3^- \text{ célula}^{-1}$ ), a excepción del tratamiento con  $103 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de irradiancia y concentración de nutrientes control, donde se calculo un consumo de sólo  $0.16$   $\text{pg NO}_3^- \text{ célula}^{-1}$ .

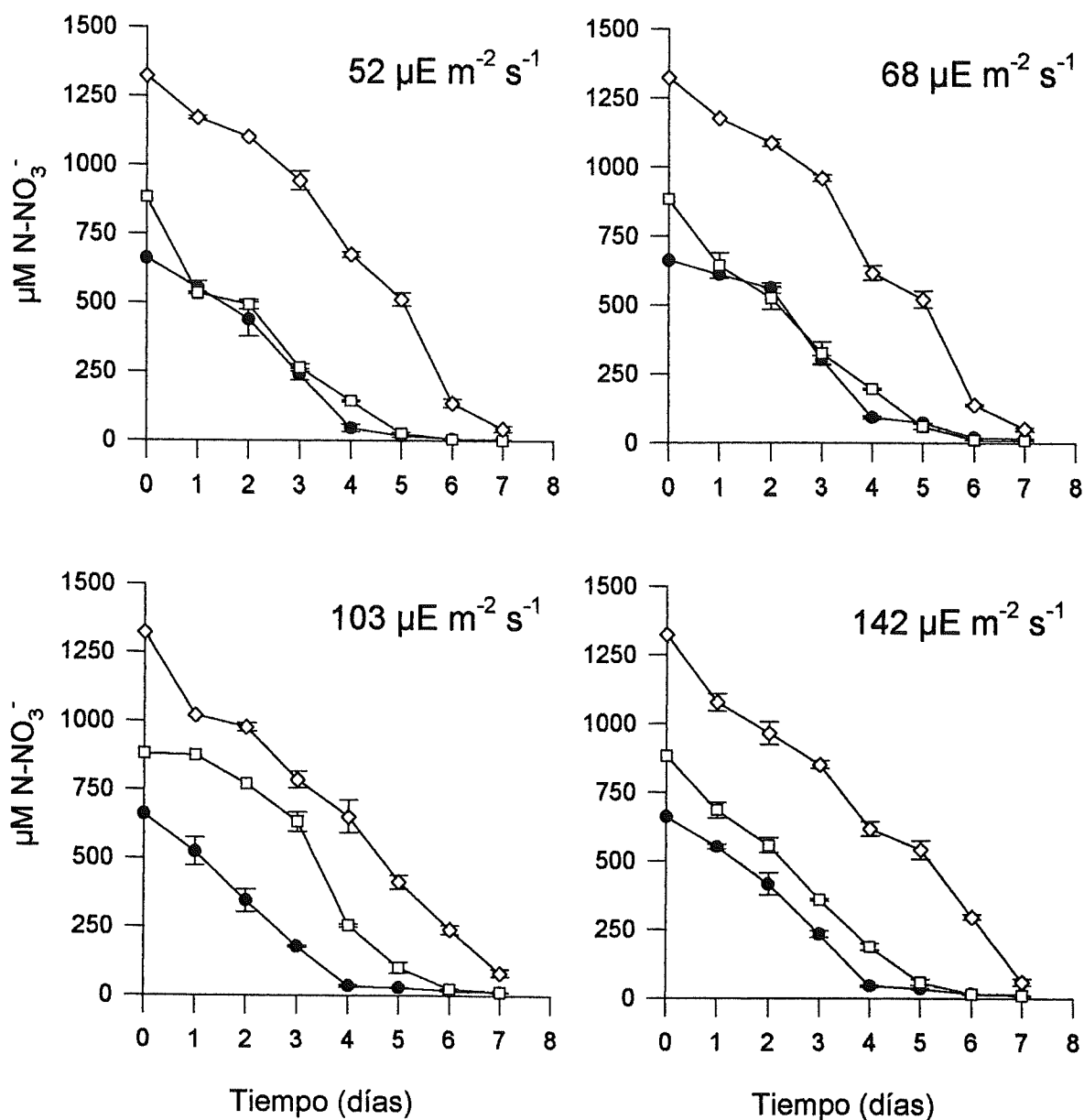
Durante la  $F_{exp}$ , el consumo celular de  $NO_3^-$  se relacionó inversamente con la concentración inicial de nutrientes, mientras que, con respecto al nivel de irradiancia no se observó una tendencia definida. Para el tercer día, el consumo promedio por condición de nutriente, fue de  $1.28 \pm 0.26$  pg  $NO_3^-$  célula $^{-1}$  en los cultivos con menor nutriente, seguido de los control con  $1.13 \pm 0.23$  pg  $NO_3^-$  célula $^{-1}$  y de mayor nutriente con  $0.77 \pm 0.2$  pg  $NO_3^-$  célula $^{-1}$ . Para el cuarto día, el consumo fue de  $0.61 \pm 0.09$ ,  $0.58 \pm 0.39$  y  $0.55 \pm 0.19$  pg  $NO_3^-$  célula $^{-1}$ , para la condición de menor, control y mayor nutriente, respectivamente (Tabla V-C).

Durante el tiempo de cultivo correspondiente a la  $F_{est}$  (Día 4-7), los consumos celulares de  $NO_3^-$  fueron mayores en los tratamientos de mayor nutriente, seguidos por los control y de menor nutriente. Esto, como resultado de las diferencias en la concentración residual del nutriente en el medio, entre los tratamientos, durante este tiempo (Tabla V-A).

La concentración residual de  $PO_4^{3-}$  en cultivos de *Rhodomonas* sp, presentó también una relación inversa respecto al tiempo de cultivo y al crecimiento microalgal (Figs. 1, 3). Pero, a diferencia de la concentración residual de  $NO_3^-$ , para el cuarto día de cultivo (96 horas), el  $PO_4^{3-}$  del medio casi se ha agotado en todos los tratamientos. Como resultado, la concentración residual promedio de  $PO_4^{3-}$  fue 2.93  $\mu$ M (5%) en los cultivos con mayor nutriente, 0.33  $\mu$ M (0.83%) en los control y 0.24  $\mu$ M (0.8%) en aquellos con menor nutriente (Tabla VI-A).

En términos del porcentaje respecto al valor inicial de  $PO_4^{3-}$ , para el cuarto día, se consumió el 95% (55.6  $\mu$ M), 99.17% (38.67  $\mu$ M) y 99.2% (29  $\mu$ M) del  $PO_4^{3-}$  contenido en los tratamientos con mayor, control y menor nutriente, respectivamente. Estos datos reflejan, que existe una relación directa entre la concentración de  $PO_4^{3-}$  en el medio de cultivo y el consumo de este, en otras palabras, a mayor contenido de  $PO_4^{3-}$ , mayor su consumo por parte de la población microalgal presente. Además, durante este período de tiempo (Día 0-4), el consumo de  $PO_4^{3-}$  se relacionó de manera directa con la tasa de

crecimiento y la producción de biomasa en todos los tratamientos. A partir del cuarto, quinto y sexto día, la concentración residual de  $\text{PO}_4^{3-}$  se incrementó ligeramente, en los cultivos con menor, control y mayor nutriente, respectivamente (Fig. 3; Tabla VI-B).



**Figura 2.** Cambio en la concentración promedio de nitrato en cultivos de *Rhodomonas* sp en volumen de 200 ml a diferentes irradiancias y concentración de nutrientes (● 661 y 29.3, □ 882 y 39, ◇ 1323 y 58.5  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaNO}_3$  y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , respectivamente). La barra vertical indica el error estándar.

Tabla V. Concentración residual promedio (A), consumo diario promedio (B) y consumo promedio por célula (C) de nitrato en cultivos estáticos de *Rhodomonas* sp en volumen de 200 ml expuestos a diferente irradiancia y concentración inicial de nutrientes.

## A

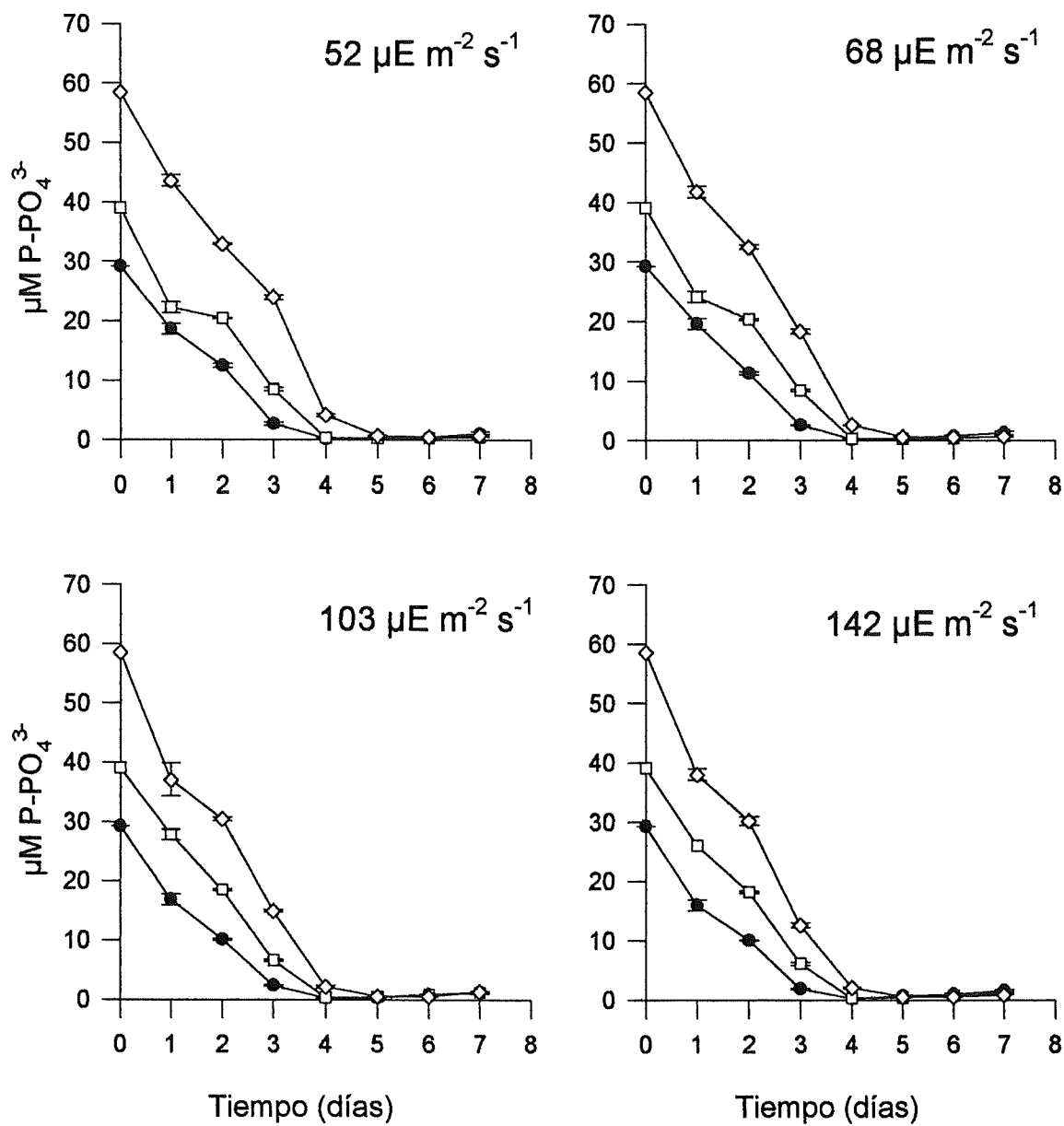
| Condición de Cultivo                               |                                   | Concentración residual promedio de $\text{NO}_3^-$ ( $\mu\text{M}$ ) |       |       |       |       |       |       |
|----------------------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Irradiancia ( $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) | $\text{NaNO}_3$ ( $\mu\text{M}$ ) | Día 1                                                                | Día 2 | Día 3 | Día 4 | Día 5 | Día 6 | Día 7 |
| 52                                                 | 661                               | 530                                                                  | 440   | 240   | 44    | 20    | 5     | 4     |
|                                                    | 882                               | 553                                                                  | 498   | 264   | 143   | 26    | 5     | 2     |
|                                                    | 1323                              | 1171                                                                 | 1102  | 943   | 675   | 511   | 136   | 43    |
| 68                                                 | 661                               | 611                                                                  | 561   | 301   | 92    | 72    | 19    | 18    |
|                                                    | 882                               | 610                                                                  | 557   | 325   | 196   | 59    | 11    | 9     |
|                                                    | 1323                              | 1176                                                                 | 1086  | 958   | 617   | 520   | 138   | 50    |
| 103                                                | 661                               | 523                                                                  | 345   | 179   | 35    | 29    | 14    | 13    |
|                                                    | 882                               | 874                                                                  | 771   | 633   | 255   | 101   | 24    | 13    |
|                                                    | 1323                              | 1021                                                                 | 978   | 787   | 652   | 414   | 240   | 83    |
| 142                                                | 661                               | 551                                                                  | 415   | 233   | 44    | 34    | 16    | 14    |
|                                                    | 882                               | 685                                                                  | 557   | 358   | 188   | 58    | 15    | 12    |
|                                                    | 1323                              | 1076                                                                 | 961   | 854   | 616   | 540   | 296   | 60    |

## B

| Condición de Cultivo                               |                                   | Consumo diario promedio de $\text{NO}_3^-$ ( $\mu\text{M}$ ) |     |     |     |     |     |     |
|----------------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Irradiancia ( $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) | $\text{NaNO}_3$ ( $\mu\text{M}$ ) | 0-1                                                          | 1-2 | 2-3 | 3-4 | 4-5 | 5-6 | 6-7 |
| 52                                                 | 661                               | 131                                                          | 90  | 200 | 196 | 24  | 15  | 1   |
|                                                    | 882                               | 329                                                          | 55  | 234 | 121 | 117 | 21  | 3   |
|                                                    | 1323                              | 152                                                          | 69  | 159 | 268 | 164 | 375 | 93  |
| 68                                                 | 661                               | 50                                                           | 50  | 260 | 209 | 20  | 53  | 1   |
|                                                    | 882                               | 272                                                          | 53  | 232 | 129 | 137 | 48  | 2   |
|                                                    | 1323                              | 147                                                          | 90  | 128 | 341 | 97  | 382 | 88  |
| 103                                                | 661                               | 138                                                          | 178 | 166 | 144 | 6   | 14  | 1   |
|                                                    | 882                               | 8                                                            | 103 | 138 | 378 | 154 | 77  | 11  |
|                                                    | 1323                              | 302                                                          | 43  | 191 | 135 | 238 | 174 | 157 |
| 142                                                | 661                               | 110                                                          | 136 | 182 | 189 | 10  | 20  | 2   |
|                                                    | 882                               | 197                                                          | 128 | 199 | 170 | 130 | 43  | 3   |
|                                                    | 1323                              | 247                                                          | 115 | 107 | 238 | 76  | 244 | 236 |

## C

| Condición de Cultivo                               |                                   | Consumo promedio de $\text{NO}_3^-$ por célula ( $\text{pg NO}_3^- \text{célula}^{-1}$ ) |       |       |       |       |       |       |
|----------------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Irradiancia ( $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) | $\text{NaNO}_3$ ( $\mu\text{M}$ ) | 0-1                                                                                      | 1-2   | 2-3   | 3-4   | 4-5   | 5-6   | 6-7   |
| 52                                                 | 661                               | 2.144                                                                                    | 0.982 | 1.281 | 0.550 | 0.031 | 0.019 | 0.001 |
|                                                    | 882                               | 4.419                                                                                    | 0.535 | 1.280 | 0.308 | 0.144 | 0.023 | 0.003 |
|                                                    | 1323                              | 2.709                                                                                    | 0.722 | 0.847 | 0.543 | 0.199 | 0.375 | 0.070 |
| 68                                                 | 661                               | 0.947                                                                                    | 0.476 | 1.625 | 0.663 | 0.032 | 0.067 | 0.001 |
|                                                    | 882                               | 4.896                                                                                    | 0.497 | 1.313 | 0.340 | 0.173 | 0.054 | 0.002 |
|                                                    | 1323                              | 2.473                                                                                    | 0.964 | 0.655 | 0.781 | 0.118 | 0.426 | 0.069 |
| 103                                                | 661                               | 2.435                                                                                    | 1.780 | 0.989 | 0.519 | 0.008 | 0.017 | 0.001 |
|                                                    | 882                               | 0.160                                                                                    | 1.024 | 0.804 | 1.155 | 0.198 | 0.084 | 0.009 |
|                                                    | 1323                              | 5.547                                                                                    | 0.412 | 1.020 | 0.304 | 0.289 | 0.189 | 0.125 |
| 142                                                | 661                               | 2.063                                                                                    | 1.330 | 1.232 | 0.713 | 0.014 | 0.023 | 0.003 |
|                                                    | 882                               | 3.443                                                                                    | 1.266 | 1.134 | 0.526 | 0.175 | 0.054 | 0.003 |
|                                                    | 1323                              | 5.774                                                                                    | 1.113 | 0.563 | 0.587 | 0.093 | 0.285 | 0.177 |



**Figura 3.** Cambio en la concentración promedio de fosfato en cultivos de *Rhodomonas* sp en volumen de 200 ml a diferentes irradiancias y concentración de nutrientes (● 661 y 29.3, □ 882 y 39, ◇ 1323 y 58.5  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaNO}_3$  y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , respectivamente). La barra vertical indica el error estándar.

Tabla VI. Concentración residual promedio (A) y consumo diario promedio (B) de fosfato en cultivos estáticos de *Rhodomonas* sp en volumen de 200 ml expuestos a diferente irradiancia y concentración inicial de nutrientes.

## A

| Condición de Cultivo                               |                                             | Concentración residual promedio de $\text{PO}_4^{3-}$ ( $\mu\text{M}$ ) |       |       |       |       |       |       |
|----------------------------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Irradiancia ( $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) | $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ( $\mu\text{M}$ ) | Día 1                                                                   | Día 2 | Día 3 | Día 4 | Día 5 | Día 6 | Día 7 |
| 52                                                 | 29.3                                        | 18.69                                                                   | 12.50 | 2.72  | 0.21  | 0.39  | 0.46  | 1.12  |
|                                                    | 39                                          | 22.32                                                                   | 20.47 | 8.53  | 0.35  | 0.32  | 0.35  | 0.57  |
|                                                    | 58.5                                        | 43.66                                                                   | 32.99 | 23.9  | 4.11  | 0.75  | 0.46  | 0.79  |
| 68                                                 | 29.3                                        | 19.60                                                                   | 11.33 | 2.64  | 0.21  | 0.35  | 0.79  | 1.34  |
|                                                    | 39                                          | 24.14                                                                   | 20.38 | 8.43  | 0.32  | 0.32  | 0.39  | 0.75  |
|                                                    | 58.5                                        | 41.77                                                                   | 32.50 | 18.3  | 2.64  | 0.64  | 0.60  | 0.75  |
| 103                                                | 29.3                                        | 16.89                                                                   | 10.16 | 2.34  | 0.25  | 0.32  | 0.89  | 1.30  |
|                                                    | 39                                          | 27.80                                                                   | 18.53 | 6.58  | 0.35  | 0.46  | 0.82  | 1.19  |
|                                                    | 58.5                                        | 37.08                                                                   | 30.46 | 14.9  | 2.17  | 0.60  | 0.50  | 1.33  |
| 142                                                | 29.3                                        | 15.99                                                                   | 10.05 | 1.90  | 0.28  | 0.68  | 1.00  | 1.56  |
|                                                    | 39                                          | 25.97                                                                   | 18.20 | 6.07  | 0.28  | 0.43  | 0.75  | 1.04  |
|                                                    | 58.5                                        | 38.01                                                                   | 30.19 | 12.6  | 2.09  | 0.60  | 0.53  | 0.89  |

## B

| Condición de Cultivo                               |                                             | Consumo diario promedio de $\text{PO}_4^{3-}$ ( $\mu\text{M}$ ) |       |       |       |       |       |       |
|----------------------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Irradiancia ( $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) | $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ( $\mu\text{M}$ ) | 0-1                                                             | 1-2   | 2-3   | 3-4   | 4-5   | 5-6   | 6-7   |
| 52                                                 | 29.3                                        | 10.31                                                           | 6.20  | 9.78  | 2.51  | -0.18 | -0.07 | -0.66 |
|                                                    | 39                                          | 16.68                                                           | 1.85  | 11.94 | 8.18  | 0.04  | -0.04 | -0.21 |
|                                                    | 58.5                                        | 14.34                                                           | 10.67 | 9.00  | 19.88 | 3.36  | 0.29  | -0.32 |
| 68                                                 | 29.3                                        | 9.40                                                            | 8.27  | 8.69  | 2.42  | -0.14 | -0.43 | -0.55 |
|                                                    | 39                                          | 14.86                                                           | 3.76  | 11.95 | 8.11  | 0.00  | -0.07 | -0.36 |
|                                                    | 58.5                                        | 16.23                                                           | 9.27  | 14.13 | 15.73 | 2.00  | 0.04  | -0.14 |
| 103                                                | 29.3                                        | 12.41                                                           | 6.73  | 7.82  | 2.09  | -0.07 | -0.57 | -0.40 |
|                                                    | 39                                          | 11.20                                                           | 9.27  | 11.95 | 6.23  | -0.11 | -0.36 | -0.37 |
|                                                    | 58.5                                        | 21.42                                                           | 6.62  | 15.49 | 12.80 | 1.56  | 0.11  | -0.84 |
| 142                                                | 29.3                                        | 13.31                                                           | 5.94  | 8.15  | 1.62  | -0.39 | -0.33 | -0.56 |
|                                                    | 39                                          | 13.03                                                           | 7.77  | 12.13 | 5.78  | -0.14 | -0.32 | -0.29 |
|                                                    | 58.5                                        | 20.49                                                           | 7.82  | 17.57 | 10.53 | 1.49  | 0.07  | -0.36 |

### 5.1.3. Contenido de Clorofilas

El contenido de clorofila *a* por célula y por volumen de cultivo se muestra en las figuras 4, 5 y tabla VII, respectivamente. Durante los siete días de experimentación, el contenido de clorofila *a* por unidad celular varió de 0.9 a 2.3 pg, en los diferentes niveles de irradiancia y concentración de nutrientes.

En condiciones de baja irradiancia ( $52\text{-}68 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), los valores mínimos de clorofila *a* por célula se dieron el primer día (24 horas) con variaciones entre 0.99-1.42 pg entre las distintas condiciones de nutrientes. Mientras que, al quinto día (120 horas), se obtuvieron valores máximos de 1.64-1.87 pg, a excepción de la condición con  $68 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y menor nutriente, cuyo valor máximo fue 2.06 pg clorofila *a* célula<sup>-1</sup> para el tercer día de cultivo (Fig. 4; Tabla VII-A).

En los cultivos expuestos a altas irradiancias ( $103$  y  $142 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), se obtuvieron valores máximos de clorofila *a* por célula entre 1.52-2.30 pg para el tercer día. A partir de este tiempo y durante el resto del cultivo, el contenido de este pigmento disminuyó a valores de 0.9-1.14 pg célula<sup>-1</sup> (Día 7).

En los diferentes niveles de irradiancia, los tratamientos con menor concentración de nutrientes presentaron valores más altos de clorofila *a* por célula, mientras que los cultivos con mayor nutriente y control presentaron valores diarios similares (Fig. 4). Sin embargo, el contenido de clorofila *a* por célula fue significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos para los siete días de cultivo (Anexo C, Tabla XX).

Con el objetivo de determinar si las diferencias en el contenido de clorofila *a* célula<sup>-1</sup> respondían a la concentración de nutrientes o al nivel de irradiancia, se realizó un análisis Kruskal-Wallis para los datos bloqueados por concentración inicial de nutrientes (Anexo C, Tabla XXI-A), y otro análisis para los datos bloqueados por nivel de irradiancia (Anexo C, Tabla XXI-B). Contrastando los valores de significancia ( $p$ ) de ambos análisis, se observó que del primer al tercer día (Día 1-3), las diferencias son explicadas por las

condiciones iniciales de nutrientes. Mientras que, del quinto al séptimo día (Día 5-7), el contenido de clorofila *a* celular responde al nivel de irradiancia. El cuarto día, existieron diferencias significativas tanto por condición de nutrientes como de irradiancia, lo cual significa que el contenido de clorofila *a* célula<sup>-1</sup> fue resultado de la interacción de ambos factores.

El contenido de clorofila *a* por célula, al culminar la  $F_{exp}$  (Día 4) y la  $F_{est}$  (Día 6), presentó una relación inversa con el nivel de irradiancia de cultivo (Anexo A, Fig. 24). El contenido de clorofila *a* en células cultivadas a baja irradiancia fue mayor que el obtenido a alta irradiancia. Además, durante la  $F_{exp}$ , los tratamientos con menor concentración de nutrientes presentaron mayor contenido de clorofila *a* por célula que los tratamientos control y de mayor nutriente (Anexo A, Fig. 24-A). Mientras que, en  $F_{est}$ , el contenido celular de clorofila *a* entre condiciones de nutrientes fue similar (Anexo A, Fig. 24-B).

En los 12 tratamientos, la concentración de clorofila *a* por volumen de cultivo presentó valores mínimos de 102 a 136 pg x 10<sup>6</sup> L<sup>-1</sup> para el primer día, y máximos de 810 a 1978 pg x 10<sup>6</sup> L<sup>-1</sup> al séptimo día de cultivo (Fig. 5; Tabla VII-B). Al analizar los datos estadísticos, se encontró que el primer y segundo día no hubo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la concentración total de clorofila *a* entre tratamientos, pero a partir del tercer día existen diferencias significativas (Anexo C, Tabla XX).

En los diferentes niveles de irradiancia, los cultivos con mayor nutriente presentaron mayor concentración de clorofila *a* por volumen, seguidos por los cultivo control y de menor nutriente. Asimismo, a partir del cuarto día las diferencias en la concentración de clorofila *a* por litro de cultivo son muy marcadas entre los tratamientos, y se observa que conforme aumenta el nivel de irradiancia disminuye el contenido total de clorofila *a* (Fig. 5; Tabla VII-B).

Al correlacionar las variables de clorofila *a* por volumen y densidad celular (Figs. 1, 5) para los 12 tratamientos estudiados, se encontró una relación directa. Los valores de los coeficientes de correlación ( $r$ ) estuvieron entre 0.92 y

0.99 (Anexo A, Fig. 21). Por otra parte, ya que existe una relación directa entre densidad celular y tiempo de cultivo, el contenido de clorofila *a* por volumen y el tiempo de cultivo estuvieron también directamente relacionados.

La máxima concentración de clorofila *a* por volumen de cultivo obtenida fue  $1978 \text{ pg} \times 10^6 \text{ L}^{-1}$ , y se alcanzó en la condición de  $52 \text{ } \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de irradiancia con  $1323 \text{ } \mu\text{M}$  de  $\text{NaNO}_3$  y  $58.5 \text{ } \mu\text{M}$  de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Fig. 5).

Los resultados del contenido de clorofila *c* por unidad celular y volumen de cultivo se muestran en las figuras 6, 7 y tabla VIII, respectivamente. La concentración de clorofila *c* por célula varió de 0.12-0.59 pg, entre los 12 tratamientos durante los siete días de cultivo. A diferencia de los datos de clorofila *a* por célula, los valores máximos de clorofila *c* por célula se presentaron al tercer día, con concentraciones de 0.4-0.56 pg y los mínimos para el sexto día con 0.12-0.24 pg (Tabla VIII-A). No hubo una tendencia definida en los datos de clorofila *c* célula<sup>-1</sup>, con variaciones entre 0.18-0.59 pg a  $52 \text{ } \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de irradiancia, 0.17-0.56 pg a  $68 \text{ } \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , 0.14-0.49 pg a  $103 \text{ } \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  y 0.12-0.40 pg a  $142 \text{ } \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Fig. 6).

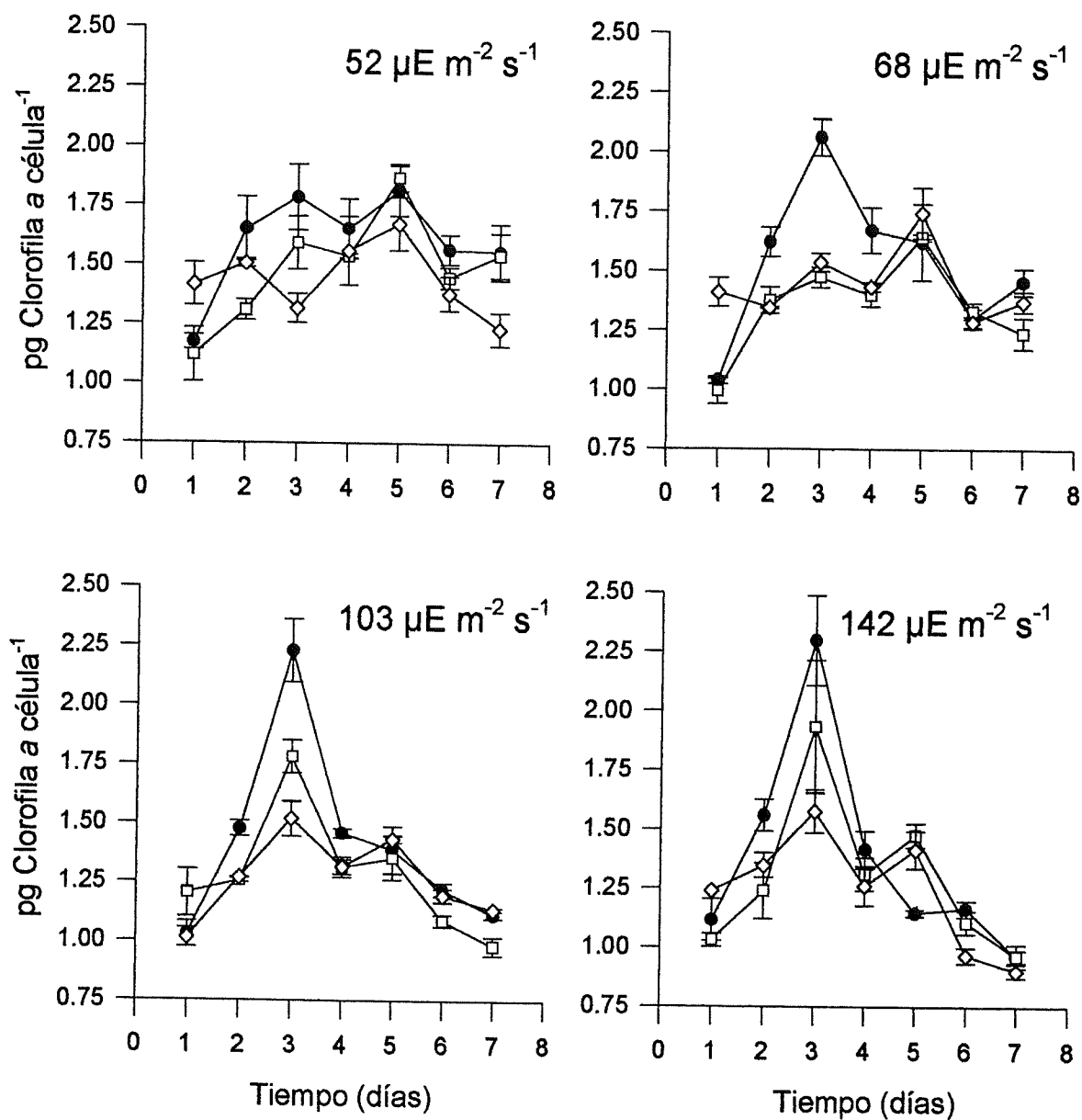
El contenido de clorofila *c* por célula, al culminar la  $F_{\text{est}}$  (Día 6), presentó una relación inversa con el nivel de irradiancia de cultivo (Anexo A, Fig. 24-D). Mientras que, al final de la  $F_{\text{exp}}$ , el contenido de clorofila *c* por célula respecto al nivel de irradiancia no presentó una tendencia definida (Anexo A, Fig. 24-C). Además, durante la  $F_{\text{est}}$ , los tratamientos con menor concentración de nutrientes presentaron menor contenido de clorofila *c* por célula que los tratamientos control y de mayor nutriente (Anexo A, Fig. 24-D).

El contenido de clorofila *c* por unidad de volumen de cultivo, mostró un incremento del primer al quinto día, en el cual alcanzó valores máximos entre  $207\text{-}428 \text{ pg} \times 10^6 \text{ L}^{-1}$  para las diferentes condiciones. Del quinto al sexto día disminuye, mientras del sexto al séptimo aumenta de nuevo y alcanza un segundo máximo, que en algunos casos resultó ser mayor que el máximo del

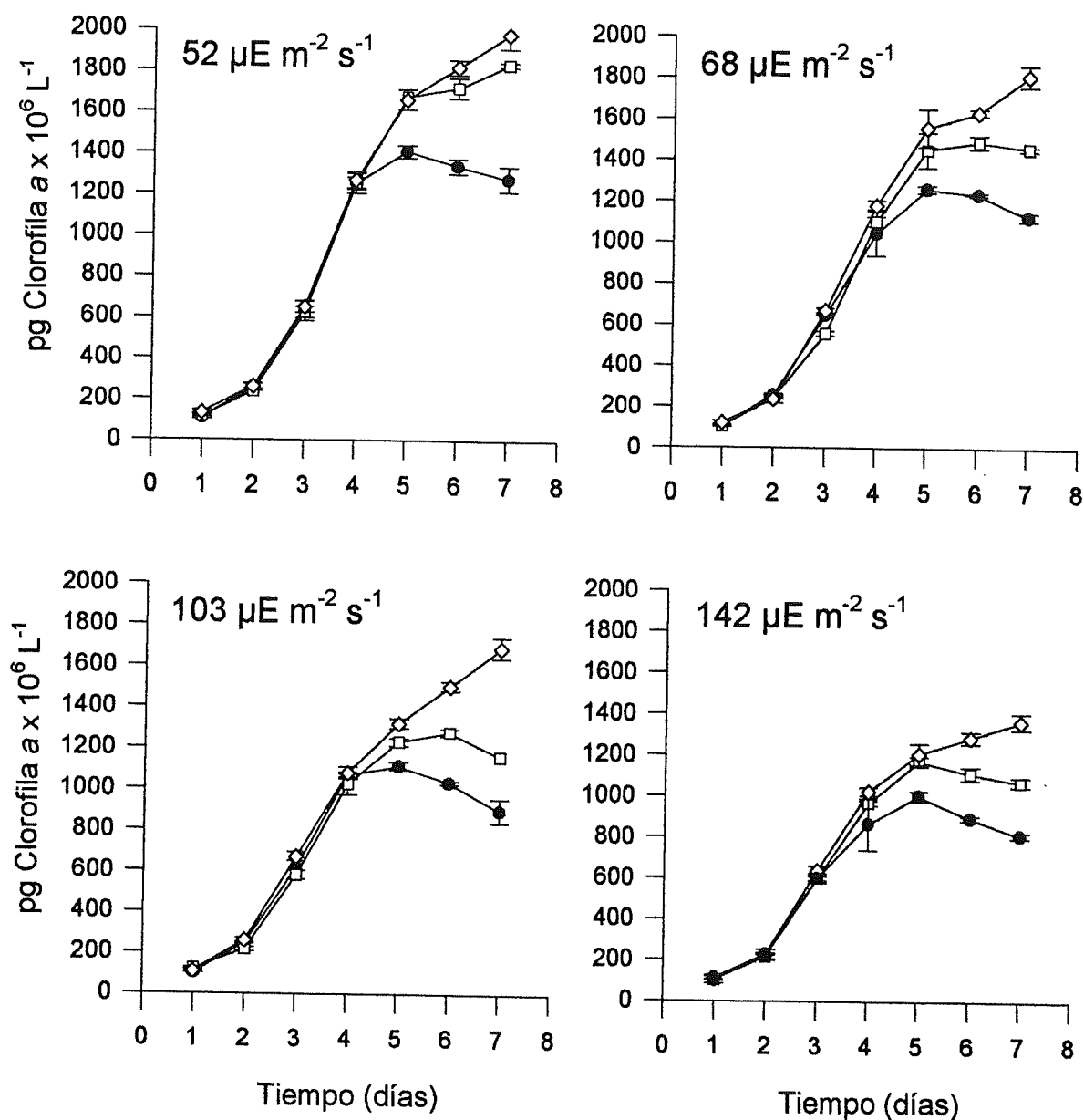
quinto día (Fig.7). Las diferencias entre tratamientos fueron significativas para los días 3, 5, 6 y 7 (Anexo C, Tabla XX).

La diferencia en el contenido de clorofila *c* por volumen, respecto a la concentración de nutrientes en altas irradiancias ( $103$  y  $142 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), fue similar a la observada para clorofila *a* por volumen. Bajo estas irradiancias, la relación clorofila *c* por volumen y concentración de nutrientes fue directa (Fig. 7; Tabla VIII-B). Mientras que, para los tratamientos expuestos a bajas irradiancias ( $52$ - $68 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) los primeros cinco días no se observó esta relación, ya que existe traslape de las curvas de mayor, control y menor nutriente. Del quinto al séptimo día, se estableció la relación directa.

La influencia de la irradiancia en la concentración de clorofila *c* por unidad de volumen fue inversa. Lo cual, significa que a mayor irradiancia, menor concentración de clorofila *c* por unidad de volumen de cultivo (Tabla VIII-B).



**Figura 4.** Concentración promedio de clorofila *a* de *Rhodomonas* sp cultivada en volumen de 200 ml a diferentes irradiancias y concentración de nutrientes (● 661 y 29.3, □ 882 y 39, ◇ 1323 y 58.5  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaNO}_3$  y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , respectivamente). La barra vertical indica el error estándar.



**Figura 5.** Concentración promedio de clorofila a por volumen en cultivos estáticos de *Rhodomonas* sp de 200 ml a diferentes irradiancias y concentración de nutrientes (● 661 y 29.3, □ 882 y 39, ◇ 1323 y 58.5  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaNO}_3$  y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , respectivamente). La barra vertical indica el error estándar.

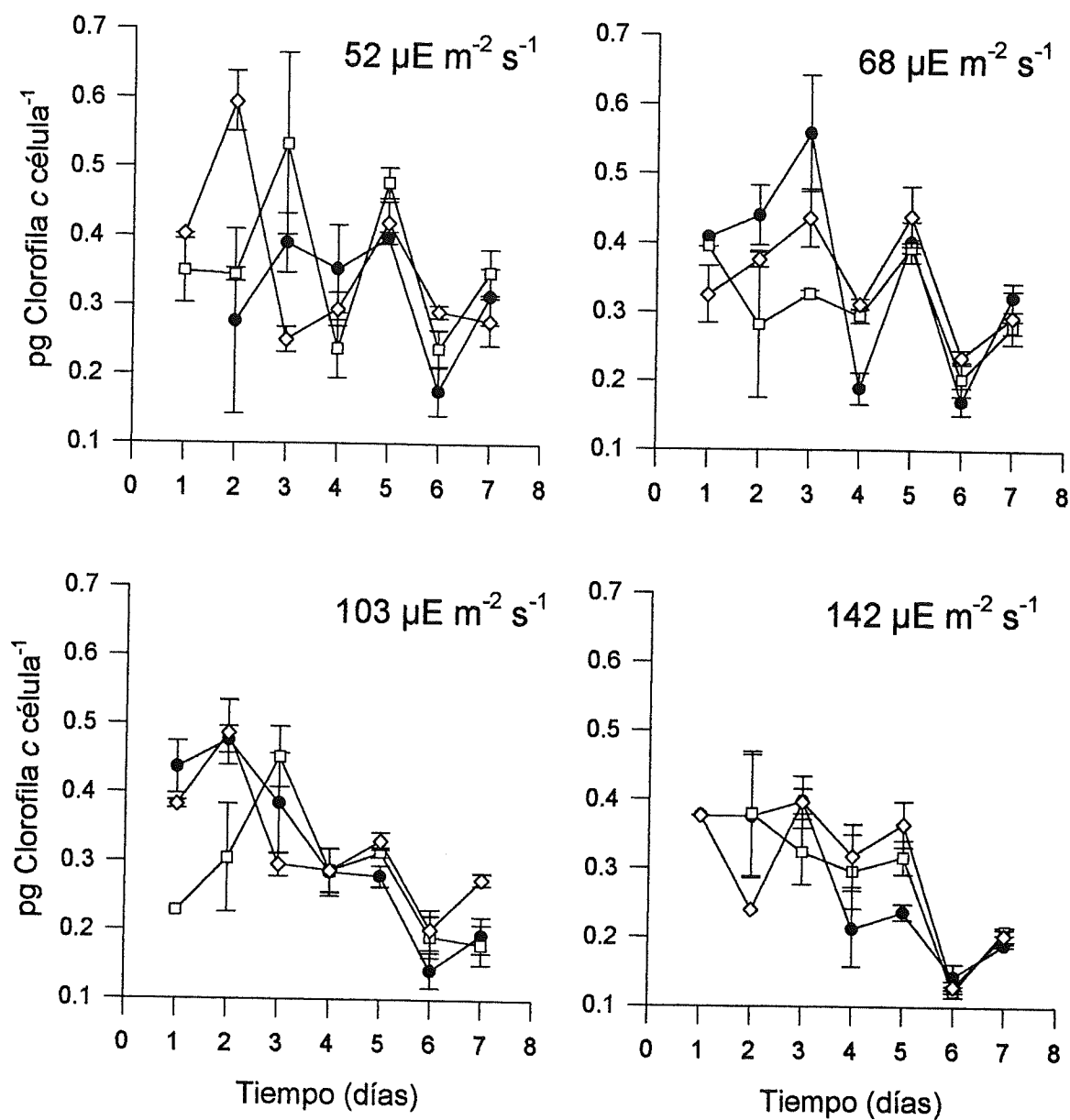
Tabla VII. Concentración promedio de Clorofila *a* por unidad celular (A) y por volumen de cultivo (B) de *Rhodomonas* sp cultivada en volumen de 200 ml expuestos a diferente irradiancia y concentración inicial de nutrientes.

## A

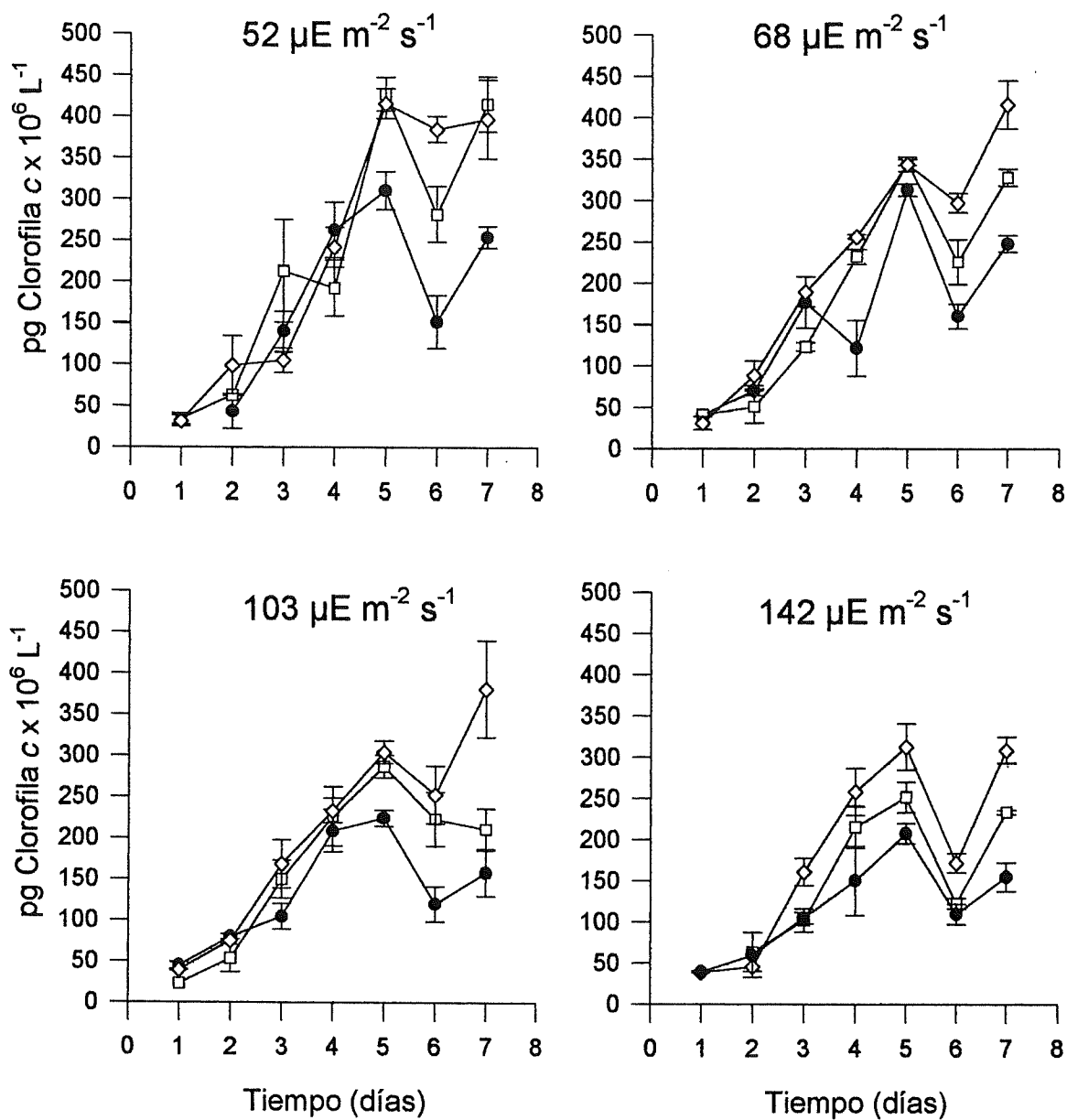
| Condición de Cultivo                                  |                                                                          | Concentración promedio de Clorofila <i>a</i> (pg célula <sup>-1</sup> ) |       |       |       |       |       |       |
|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Irradiancia<br>( $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) | NaNO <sub>3</sub> -NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>( $\mu\text{M}$ ) | Día 1                                                                   | Día 2 | Día 3 | Día 4 | Día 5 | Día 6 | Día 7 |
| 52                                                    | 661-29.3                                                                 | 1.17                                                                    | 1.65  | 1.78  | 1.65  | 1.81  | 1.57  | 1.56  |
|                                                       | 882-39                                                                   | 1.12                                                                    | 1.31  | 1.59  | 1.54  | 1.87  | 1.45  | 1.54  |
|                                                       | 1323-58.5                                                                | 1.42                                                                    | 1.51  | 1.32  | 1.56  | 1.67  | 1.38  | 1.23  |
| 68                                                    | 661-29.3                                                                 | 1.04                                                                    | 1.62  | 2.06  | 1.67  | 1.62  | 1.30  | 1.46  |
|                                                       | 882-39                                                                   | 0.99                                                                    | 1.38  | 1.47  | 1.40  | 1.64  | 1.33  | 1.24  |
|                                                       | 1323-58.5                                                                | 1.41                                                                    | 1.35  | 1.54  | 1.43  | 1.74  | 1.29  | 1.38  |
| 103                                                   | 661-29.3                                                                 | 1.03                                                                    | 1.48  | 2.23  | 1.46  | 1.39  | 1.22  | 1.11  |
|                                                       | 882-39                                                                   | 1.20                                                                    | 1.26  | 1.78  | 1.31  | 1.35  | 1.09  | 0.98  |
|                                                       | 1323-58.5                                                                | 1.02                                                                    | 1.27  | 1.52  | 1.32  | 1.43  | 1.19  | 1.14  |
| 142                                                   | 661-29.3                                                                 | 1.12                                                                    | 1.56  | 2.30  | 1.41  | 1.15  | 1.16  | 0.96  |
|                                                       | 882-39                                                                   | 1.03                                                                    | 1.24  | 1.93  | 1.31  | 1.47  | 1.11  | 0.96  |
|                                                       | 1323-58.5                                                                | 1.24                                                                    | 1.35  | 1.57  | 1.26  | 1.41  | 0.97  | 0.90  |

## B

| Condición de Cultivo                                  |                                                                          | Concentración promedio de Clorofila <i>a</i> (pg x 10 <sup>6</sup> L <sup>-1</sup> ) |       |       |       |       |       |       |
|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Irradiancia<br>( $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) | NaNO <sub>3</sub> -NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>( $\mu\text{M}$ ) | Día 1                                                                                | Día 2 | Día 3 | Día 4 | Día 5 | Día 6 | Día 7 |
| 52                                                    | 661-29.3                                                                 | 108                                                                                  | 257   | 631   | 1251  | 1406  | 1337  | 1273  |
|                                                       | 882-39                                                                   | 115                                                                                  | 239   | 622   | 1251  | 1671  | 1717  | 1830  |
|                                                       | 1323-58.5                                                                | 136                                                                                  | 262   | 649   | 1267  | 1660  | 1818  | 1978  |
| 68                                                    | 661-29.3                                                                 | 109                                                                                  | 259   | 647   | 1046  | 1260  | 1235  | 1126  |
|                                                       | 882-39                                                                   | 106                                                                                  | 243   | 557   | 1103  | 1449  | 1488  | 1455  |
|                                                       | 1323-58.5                                                                | 122                                                                                  | 239   | 671   | 1182  | 1557  | 1631  | 1808  |
| 103                                                   | 661-29.3                                                                 | 102                                                                                  | 247   | 614   | 1069  | 1111  | 1031  | 896   |
|                                                       | 882-39                                                                   | 120                                                                                  | 216   | 580   | 1022  | 1228  | 1277  | 1160  |
|                                                       | 1323-58.5                                                                | 110                                                                                  | 261   | 670   | 1079  | 1319  | 1502  | 1688  |
| 142                                                   | 661-29.3                                                                 | 114                                                                                  | 229   | 600   | 863   | 1000  | 893   | 810   |
|                                                       | 882-39                                                                   | 104                                                                                  | 216   | 599   | 966   | 1169  | 1111  | 1069  |
|                                                       | 1323-58.5                                                                | 107                                                                                  | 227   | 637   | 1023  | 1205  | 1285  | 1364  |



**Figura 6.** Concentración promedio de clorofila *c* de *Rhodomonas* sp cultivada en volumen de 200 ml a diferentes irradiancias y concentración de nutrientes (● 661 y 29.3, □ 882 y 39, ◇ 1323 y 58.5  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaNO}_3$  y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , respectivamente). La barra vertical indica el error estándar.



**Figura 7.** Concentración promedio de clorofila c por volumen en cultivos estáticos de *Rhodomonas* sp de 200 ml a diferentes irradiancias y concentración de nutrientes (● 661 y 29.3, □ 882 y 39, ◇ 1323 y 58.5  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaNO}_3$  y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , respectivamente). La barra vertical indica el error estándar.

Tabla VIII. Concentración promedio de Clorofila *c* por unidad celular (A) y por volumen de cultivo (B) de *Rhodomonas* sp cultivada en volumen de 200 ml expuestos a diferente irradiancia y concentración inicial de nutrientes.

## A

| Condición de Cultivo                                  |                                                                          | Concentración promedio de Clorofila <i>c</i> (pg célula <sup>-1</sup> ) |       |       |       |       |       |       |
|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Irradiancia<br>( $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) | NaNO <sub>3</sub> -NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>( $\mu\text{M}$ ) | Día 1                                                                   | Día 2 | Día 3 | Día 4 | Día 5 | Día 6 | Día 7 |
| 52                                                    | 661-29.3                                                                 | ----                                                                    | 0.28  | 0.39  | 0.35  | 0.40  | 0.18  | 0.31  |
|                                                       | 882-39                                                                   | 0.35                                                                    | 0.34  | 0.53  | 0.24  | 0.48  | 0.24  | 0.35  |
|                                                       | 1323-58.5                                                                | 0.40                                                                    | 0.59  | 0.25  | 0.29  | 0.42  | 0.29  | 0.28  |
| 68                                                    | 661-29.3                                                                 | 0.41                                                                    | 0.44  | 0.56  | 0.19  | 0.40  | 0.17  | 0.32  |
|                                                       | 882-39                                                                   | 0.39                                                                    | 0.28  | 0.33  | 0.29  | 0.39  | 0.20  | 0.28  |
|                                                       | 1323-58.5                                                                | 0.33                                                                    | 0.38  | 0.44  | 0.31  | 0.44  | 0.24  | 0.29  |
| 103                                                   | 661-29.3                                                                 | 0.44                                                                    | 0.48  | 0.38  | 0.28  | 0.28  | 0.14  | 0.19  |
|                                                       | 882-39                                                                   | 0.23                                                                    | 0.30  | 0.45  | 0.29  | 0.31  | 0.19  | 0.18  |
|                                                       | 1323-58.5                                                                | 0.38                                                                    | 0.49  | 0.30  | 0.29  | 0.33  | 0.20  | 0.28  |
| 142                                                   | 661-29.3                                                                 | 0.38                                                                    | 0.38  | 0.40  | 0.21  | 0.24  | 0.14  | 0.19  |
|                                                       | 882-39                                                                   | ----                                                                    | 0.38  | 0.32  | 0.30  | 0.32  | 0.12  | 0.21  |
|                                                       | 1323-58.5                                                                | 0.38                                                                    | 0.24  | 0.40  | 0.32  | 0.36  | 0.13  | 0.20  |

## B

| Condición de Cultivo                                  |                                                                          | Concentración promedio de Clorofila <i>c</i> (pg x 10 <sup>8</sup> L <sup>-1</sup> ) |       |       |       |       |       |       |
|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Irradiancia<br>( $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) | NaNO <sub>3</sub> -NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>( $\mu\text{M}$ ) | Día 1                                                                                | Día 2 | Día 3 | Día 4 | Día 5 | Día 6 | Día 7 |
| 52                                                    | 661-29.3                                                                 | ----                                                                                 | 43    | 140   | 263   | 311   | 152   | 255   |
|                                                       | 882-39                                                                   | 35                                                                                   | 63    | 213   | 192   | 428   | 282   | 415   |
|                                                       | 1323-58.5                                                                | 32                                                                                   | 99    | 105   | 242   | 416   | 385   | 397   |
| 68                                                    | 661-29.3                                                                 | 41                                                                                   | 70    | 177   | 122   | 313   | 161   | 249   |
|                                                       | 882-39                                                                   | 41                                                                                   | 50    | 123   | 232   | 346   | 227   | 328   |
|                                                       | 1323-58.5                                                                | 31                                                                                   | 89    | 190   | 257   | 345   | 298   | 416   |
| 103                                                   | 661-29.3                                                                 | 45                                                                                   | 80    | 105   | 209   | 224   | 120   | 158   |
|                                                       | 882-39                                                                   | 23                                                                                   | 54    | 150   | 226   | 287   | 223   | 211   |
|                                                       | 1323-58.5                                                                | 40                                                                                   | 76    | 168   | 233   | 304   | 253   | 381   |
| 142                                                   | 661-29.3                                                                 | 40                                                                                   | 60    | 105   | 150   | 207   | 109   | 154   |
|                                                       | 882-39                                                                   | ----                                                                                 | 63    | 102   | 215   | 251   | 122   | 233   |
|                                                       | 1323-58.5                                                                | 38                                                                                   | 46    | 161   | 258   | 312   | 172   | 308   |

#### 5.1.4. Fijación de Carbono

Los resultados presentados en las figuras 8, 9 y tabla IX, muestran la tasa de fijación de carbono por unidad celular y por unidad de clorofila *a*, para las 12 tratamientos en los siete días de cultivo.

Se observó un patrón similar en la fijación de carbono, tanto por unidad celular como por clorofila *a*. Al inicio de la  $F_{exp}$  (Día 1-2), no hubo diferencias en la tasa de fijación de carbono entre los días de cultivo, pero a partir del segundo día, la fijación aumentó a valores máximos en todos los tratamientos (Figs. 8 y 9). La máxima fijación de carbono se dio al cuarto día, y varió entre tratamientos de 20-51 pg C célula<sup>-1</sup> hr<sup>-1</sup> y 12.8-33.6 pg C pg Clorofila *a* hr<sup>-1</sup> (Tabla IXA-B).

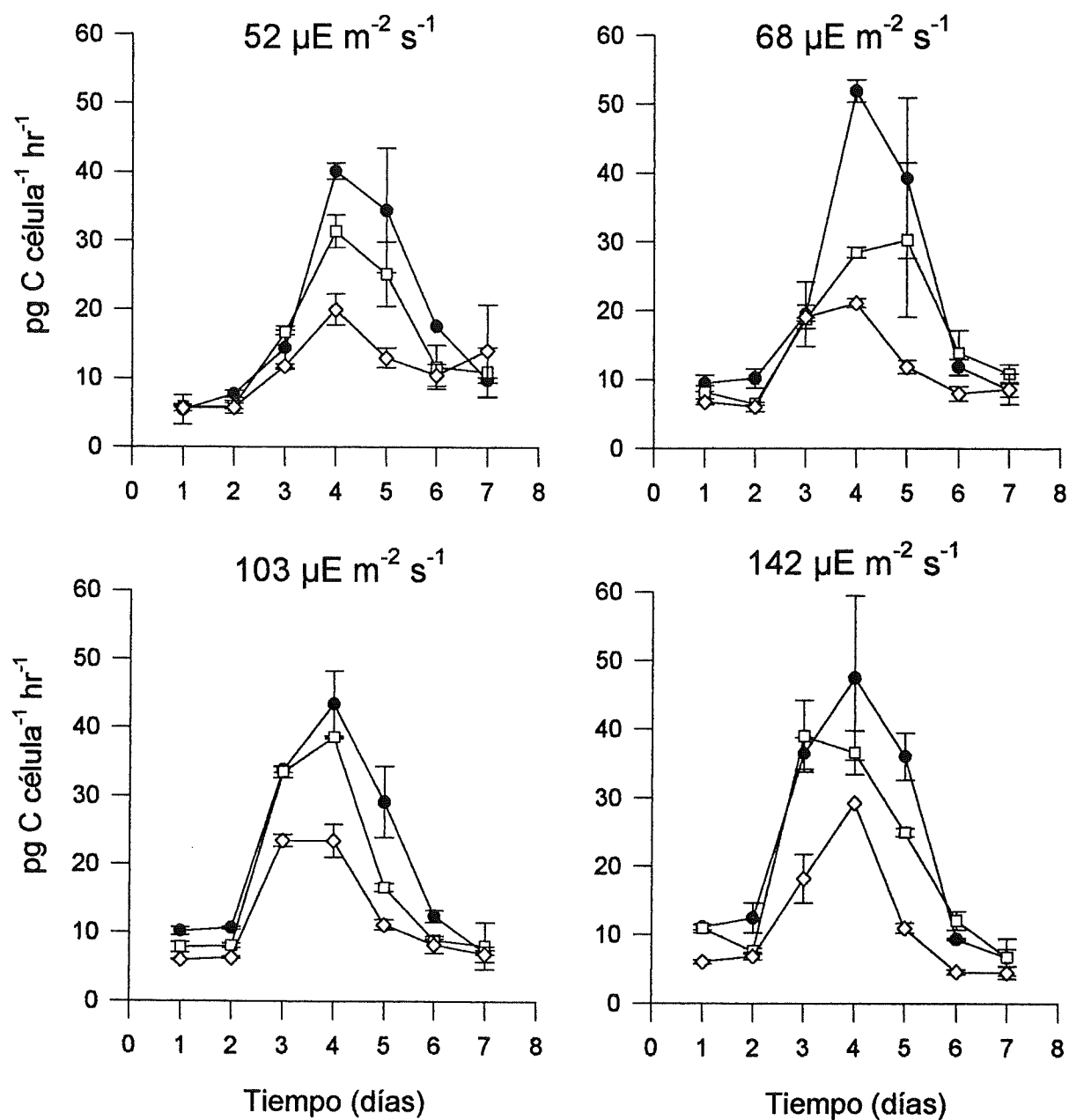
Del cuarto día en adelante, los valores de fijación disminuyen gradualmente hasta valores similares, y en algunos casos inferiores, a los determinados para el primer y segundo día de cultivo (Figs. 8 y 9). El aumento en la fijación de carbono coincidió con la  $F_{exp}$  y se observó una relación directa con la tasa de crecimiento diaria ( $\mu_{diaria}$ ). Mientras que, la disminución en la fijación de carbono coincide con la  $F_{est}$  y muestra también una relación directa con las tasas de crecimiento para este período de tiempo, sin embargo la disminución del crecimiento resultó menos drástica que la observada en las tasas de fijación de carbono. Además, durante la  $F_{est}$ , la disminución de la tasa de fijación coincide con valores altos de pH (Anexo A, Fig. 19).

En la figura 23 (Anexo A) se da la relación del nivel de irradiancia con la tasa de fijación de C por célula, para cada concentración de nutrientes por día de cultivo. En esta gráfica, se puede observar claramente el efecto de la edad del cultivo y las fases de crecimiento en las tasas de fijación. Durante las primeras 48 horas de la  $F_{exp}$  (línea roja), se obtuvieron tasas bajas de fijación, que resultan similares entre tratamientos. En  $F_{exp}$  (línea verde), hay un aumento significativo en las tasas de fijación de carbono, siendo mayor este en los tratamientos de menor nutriente, seguido de los control y mayor nutriente respectivamente. En  $F_{est}$  (línea azul), disminuyó de forma gradual la tasa de

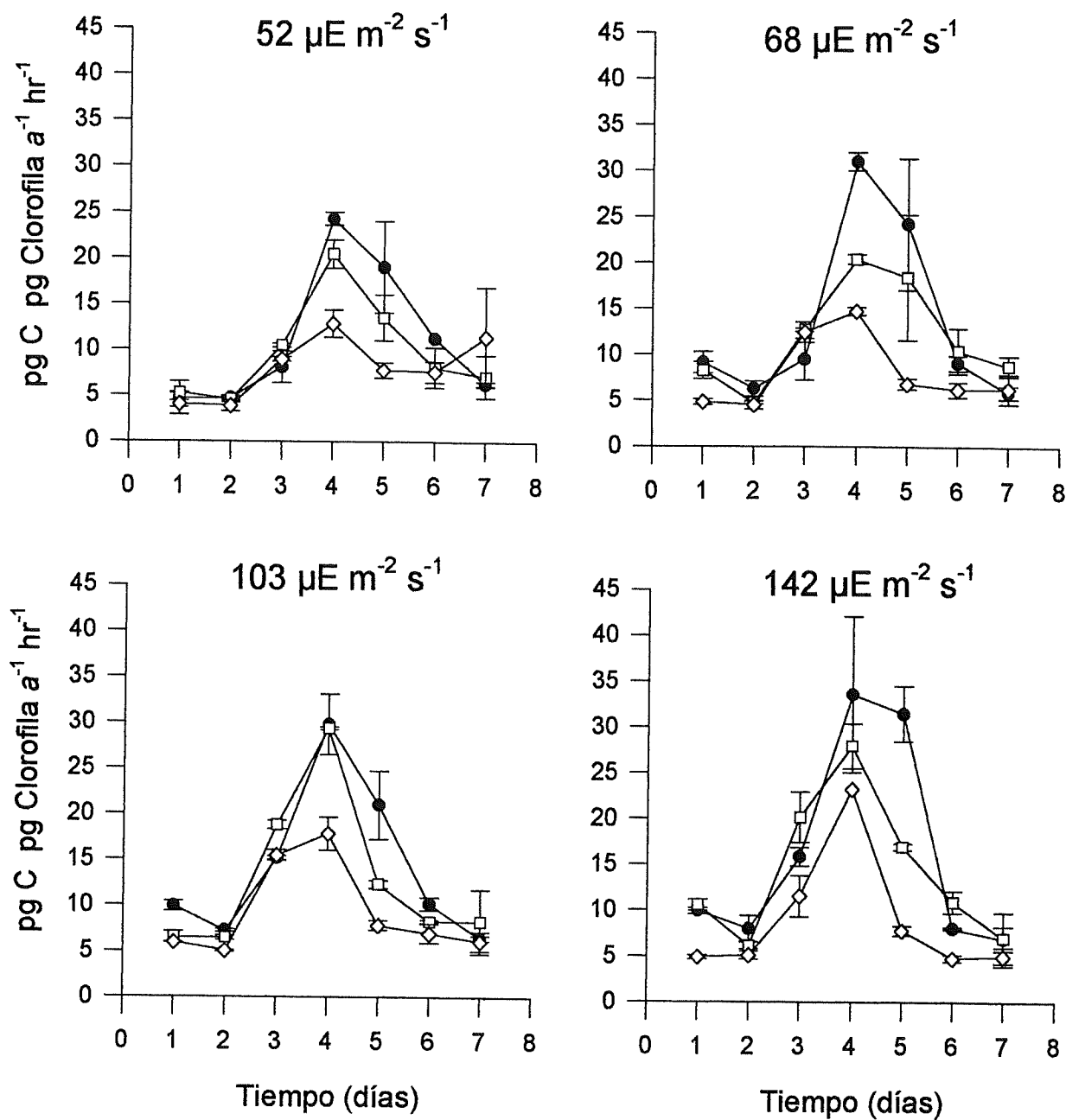
fijación y se alcanzaron tasas tan bajas o inclusive menores que las obtenidas al inicio de los cultivos. En la  $F_{dec}$  (línea rosa), presente sólo en los tratamientos con menor nutriente, se presentaron las mínimas tasas de fijación.

La tasa de fijación de carbono, por célula o por unidad de clorofila *a*, se relacionó inversamente con la concentración de nutrientes. Para todos los niveles de irradiancia, hubo mayor fijación en los tratamientos con menor nutriente, seguida por los cultivos control y de mayor nutriente. La máxima tasa de fijación (Día 4), presentó valores promedio de  $45.7 \pm 0.5$  pg C célula<sup>-1</sup> hr<sup>-1</sup> en los tratamientos con menor nutriente,  $33.7 \pm 4.6$  pg C célula<sup>-1</sup> hr<sup>-1</sup> en los control y  $23.5 \pm 4.1$  pg C célula<sup>-1</sup> hr<sup>-1</sup> en los de mayor nutriente (Tabla IX-A). Mientras que, la tasa de fijación expresada por unidad de clorofila *a*, presentó valores promedio de:  $19.6 \pm 3.9$ ,  $24.5 \pm 4.8$  y  $17.2 \pm 4.5$  pg C por pg clorofila *a* hr<sup>-1</sup>, para los tratamientos de menor, control y mayor nutriente, respectivamente (Tabla IX-B).

Las tasas de fijación de carbono por unidad celular, entre tratamientos, fueron significativas del segundo al cuarto día (Anexo C, Tabla XX). Sin embargo, el valor de significancia (*p*), para algunos días, estuvo en su valor límite para rechazar o aceptar la hipótesis nula de que al menos un tratamiento era diferente. Por lo tanto, se realizó un análisis estadístico de Kruskal-Wallis de los datos bloqueados por condición de nutrientes, y otro para los datos bloqueados por nivel de irradiancia (Anexo C, Tabla XXII). Los resultados muestran que, entre los tratamientos por concentración de nutrientes, existen diferencias en la fijación de carbono por célula los días 1, 2, 4, 5 y 6. Mientras que, por nivel de irradiancia las diferencias se presentaron los días 1, 3 y 7.



**Figura 8.** Tasa promedio de fijación de carbono por *Rhodomonas* sp cultivada en volumen de 200 ml a diferentes irradiancias y concentración de nutrientes (● 661 y 29.3, □ 882 y 39, ◇ 1323 y 58.5  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaNO}_3$  y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , respectivamente). La barra vertical indica el error estándar.



**Figura 9.** Tasa promedio de fijación de carbono por unidad de clorofila *a* en cultivos de *Rhodomonas* sp en 200 ml a diferentes irradiancias y concentración de nutrientes (● 661 y 29.3, □ 882 y 39, ◇ 1323 y 58.5  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaNO}_3$  y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , respectivamente). La barra vertical indica el error estándar.

Tabla IX. Fijación promedio de Carbono por unidad celular (A) y por unidad de clorofila *a* (B) en cultivos estáticos de *Rhodomonas* sp en volumen de 200 ml expuestos a diferente irradiancia y concentración inicial de nutrientes.

## A

| Condición de Cultivo                              |                                                          | Fijación promedio de Carbono por unidad celular (pg C célula <sup>-1</sup> hr <sup>-1</sup> ) |       |       |       |       |       |       |
|---------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Irradiancia (μE m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ) | NaNO <sub>3</sub> -NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (μM) | Día 1                                                                                         | Día 2 | Día 3 | Día 4 | Día 5 | Día 6 | Día 7 |
| 52                                                | 661-29.3                                                 | 5.5                                                                                           | 7.7   | 14.4  | 40.1  | 34.4  | 17.6  | 9.8   |
|                                                   | 882-39                                                   | 5.9                                                                                           | 5.9   | 16.7  | 31.4  | 25.2  | 11.6  | 10.9  |
|                                                   | 1323-58.5                                                | 5.7                                                                                           | 5.8   | 13.0  | 20.0  | 13.0  | 10.5  | 14.1  |
| 68                                                | 661-29.3                                                 | 9.5                                                                                           | 10.2  | 19.6  | 51.9  | 39.2  | 11.9  | 8.6   |
|                                                   | 882-39                                                   | 8.2                                                                                           | 6.5   | 18.8  | 28.5  | 30.3  | 13.9  | 10.9  |
|                                                   | 1323-58.5                                                | 6.8                                                                                           | 6.1   | 19.1  | 21.2  | 11.9  | 8.0   | 8.7   |
| 103                                               | 661-29.3                                                 | 10.2                                                                                          | 10.7  | 33.8  | 43.4  | 29.1  | 12.4  | 7.2   |
|                                                   | 882-39                                                   | 7.9                                                                                           | 8.1   | 33.5  | 38.6  | 16.7  | 9.0   | 8.1   |
|                                                   | 1323-58.5                                                | 6.1                                                                                           | 6.4   | 23.5  | 23.5  | 11.2  | 8.3   | 6.9   |
| 142                                               | 661-29.3                                                 | 11.1                                                                                          | 12.5  | 36.5  | 47.5  | 36.0  | 9.4   | 6.7   |
|                                                   | 882-39                                                   | 10.9                                                                                          | 7.6   | 39.0  | 36.6  | 25.0  | 12.1  | 6.8   |
|                                                   | 1323-58.5                                                | 6.1                                                                                           | 6.9   | 18.2  | 29.2  | 11.0  | 4.6   | 4.5   |

## B

| Condición de Cultivo                              |                                                          | Fijación promedio de Carbono por unidad de clorofila <i>a</i> (pg C x pg Clorofila <i>a</i> hr <sup>-1</sup> ) |       |       |       |       |       |       |
|---------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Irradiancia (μE m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ) | NaNO <sub>3</sub> -NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (μM) | Día 1                                                                                                          | Día 2 | Día 3 | Día 4 | Día 5 | Día 6 | Día 7 |
| 52                                                | 661-29.3                                                 | 4.6                                                                                                            | 4.7   | 8.1   | 24.3  | 19.0  | 11.2  | 6.3   |
|                                                   | 882-39                                                   | 5.2                                                                                                            | 4.5   | 10.5  | 20.4  | 13.5  | 8.0   | 7.1   |
|                                                   | 1323-58.5                                                | 4.0                                                                                                            | 3.8   | 9.0   | 12.8  | 7.8   | 7.6   | 11.4  |
| 68                                                | 661-29.3                                                 | 9.1                                                                                                            | 6.3   | 9.5   | 31.0  | 24.2  | 9.1   | 5.9   |
|                                                   | 882-39                                                   | 8.3                                                                                                            | 4.7   | 12.7  | 20.4  | 18.4  | 10.4  | 8.8   |
|                                                   | 1323-58.5                                                | 4.8                                                                                                            | 4.5   | 12.5  | 14.7  | 6.8   | 6.2   | 6.3   |
| 103                                               | 661-29.3                                                 | 9.9                                                                                                            | 7.2   | 15.2  | 29.8  | 21.0  | 10.2  | 6.5   |
|                                                   | 882-39                                                   | 6.6                                                                                                            | 6.5   | 18.8  | 29.4  | 12.3  | 8.2   | 8.3   |
|                                                   | 1323-58.5                                                | 6.0                                                                                                            | 5.0   | 15.5  | 17.8  | 7.8   | 6.9   | 6.1   |
| 142                                               | 661-29.3                                                 | 10.0                                                                                                           | 8.0   | 15.9  | 33.6  | 31.5  | 8.0   | 6.9   |
|                                                   | 882-39                                                   | 10.6                                                                                                           | 6.2   | 20.2  | 27.9  | 16.9  | 10.9  | 7.0   |
|                                                   | 1323-58.5                                                | 4.9                                                                                                            | 5.1   | 11.6  | 23.2  | 7.8   | 4.8   | 5.0   |

## 5.2. Etapa 2: Efecto de la calidad de luz en la producción de *Rhodomonas* sp.

En la etapa experimental 2, los cultivos a nivel Erlenmeyer (200 ml) y Fernbach (2 L), tanto en luz azul (LA) como en luz blanca (LB) presentaron valores similares de temperatura, salinidad y pH (Anexo B, Fig. 27) a los obtenidos en los cultivos de la etapa experimental 1. Las diferencias diarias de pH, en ambos niveles de cultivo, no fueron significativas ( $p > 0.05$ ) entre condiciones de luz (Anexo C, Tablas XXIII- XXIV).

A nivel Garrafón (18 L), la temperatura promedio fue  $19 \pm 1^\circ\text{C}$ , salinidad de 32 y pH inicial de  $8.0 \pm 0.1$  en ambas condiciones de luz. Durante la  $F_{\text{exp}}$  (Día 0-3), el pH aumentó hasta un máximo de 8.6 y 8.9 en LA y LB respectivamente. Posteriormente, durante la  $F_{\text{est}}$  (Día 3-7), el pH disminuyó a valores de  $8.3 \pm 0.2$  en LA y  $8.8 \pm 0.4$  en LB (Anexo A, Fig. 25-C). Las diferencias de pH entre condiciones de luz, resultaron significativas ( $p < 0.05$ ) a partir del tercer día de cultivo (Anexo C, Tabla XXV).

### 5.2.1. Crecimiento microalgal

El crecimiento microalgal promedio, en los tres niveles de cultivo y las dos condiciones de luz estudiadas en esta etapa experimental, se observa en la figura 10.

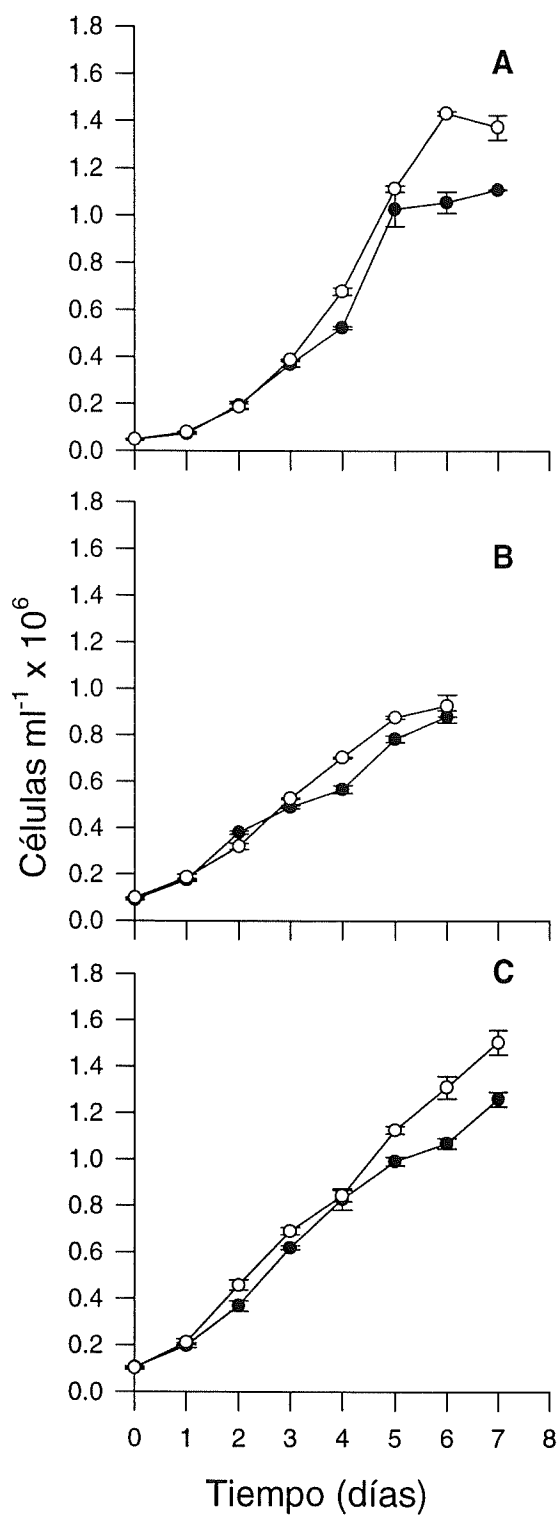
A nivel Erlenmeyer la densidad celular inicial, en los cultivos con LA como LB, fue de  $0.46 \times 10^5$  células  $\text{ml}^{-1}$  (Fig. 10-A). Tanto en los cultivos con LA como con LB, la fase de retardo ( $F_{\text{lag}}$ ) tuvo una duración de 24 horas, y la  $F_{\text{exp}}$  se presentó a partir del primer día. Esta fase tuvo una duración de 96 horas y culminó al quinto día para dar paso a la  $F_{\text{est}}$ . Sólo los cultivos expuestos a LB, presentaron la  $F_{\text{dec}}$  del sexto al séptimo día. Aún así, la densidad celular final, para el séptimo día de cultivo, fue mayor en LB que en LA ( $1.37$  vs  $1.10 \times 10^6$  células  $\text{ml}^{-1}$ ). La  $\mu_{\text{prom}}$ , en los siete días de cultivo a nivel Erlenmeyer y LA, fue de  $0.45 \text{ día}^{-1}$  con 0.65 divisiones por día (Tabla X). Mientras que, la  $\mu_{\text{prom}}$ , para

seis días de cultivo en LB fue  $0.57 \text{ día}^{-1}$  con 0.82 divisiones  $\text{día}^{-1}$ . Calculando  $\mu_{prom}$ , para los siete días de cultivo en la condición con LB, se obtuvo un valor de  $0.48 \text{ día}^{-1}$  con 0.69 divisiones  $\text{día}^{-1}$ . Aún cuando en las condiciones con LB se presentó la  $F_{dec}$  al final de los cultivos, la velocidad de crecimiento promedio fue ligeramente mayor que la obtenida para los cultivos en LA. Lo anterior, se refleja también en las diferencias en la densidad celular, durante los días 4, 6 y 7, obtenidas entre las condiciones de luz estudiadas (Anexo C, Tabla XXIII).

En los cultivos a nivel Fernbach (2 L), la densidad celular inicial (Día 0) fue de  $0.90$  y  $0.98 \times 10^5 \text{ células ml}^{-1}$  en LA y LB respectivamente (Fig. 1-B). En este nivel y para ambas condiciones de luz, la  $F_{exp}$  se presentó desde el inicio de los cultivos y tuvo una duración de 72 horas (Día 0-3). Mientras que, la  $F_{est}$ , se presentó a partir del tercer día y culminó al sexto día de cultivo (Anexo B, Fig. 25-B). Diferencias en la densidad celular, entre los cultivos con LA y LB, fueron detectadas sólo para al cuarto y quinto día (Anexo C, Tabla XXIV). La densidad celular final alcanzada en este nivel (2L), fue de  $0.88 \times 10^6 \text{ células ml}^{-1}$  en LA y  $0.92 \times 10^6 \text{ células ml}^{-1}$  en LB. Los parámetros poblacionales promedio fueron similares entre condiciones de luz, con un valor de  $\mu_{prom}$  de  $0.38$  y  $0.37 \text{ día}^{-1}$  con 0.54 y 0.53 divisiones por día en LA y LB, respectivamente (Tabla XI).

A nivel Garrafón (18 L), la densidad celular inicial fue similar entre los cultivos con LA y LB, con aproximadamente  $1.03 \times 10^5 \text{ células ml}^{-1}$  ( $\pm 0.023 \times 10^5$ ; Fig. 1-C, Tabla XII). En este nivel, al igual que en el anterior, la  $F_{exp}$  en ambas condiciones de luz, se observó desde el inicio de los cultivos hasta el tercer día (Día 0-3). A partir de este tiempo (Día 3), se presentó la  $F_{est}$ , que duró hasta al séptimo día. La  $F_{est}$ , se caracterizó por la disminución en la tasa de crecimiento (Tabla XII). Sin embargo, a pesar de la disminución en las tasas de crecimiento y el aumento en los tiempos de duplicación de la población, los cultivos continuaron creciendo hasta alcanzar densidades celulares finales de  $1.25$  y  $1.50 \times 10^6 \text{ células ml}^{-1}$  en LA y LB, respectivamente. La  $\mu_{prom}$ , durante los siete días de cultivo, fue  $0.35 \text{ día}^{-1}$  en LA y  $0.38 \text{ día}^{-1}$  en LB, con 0.50 y 0.55

divisiones por día, respectivamente (Tabla XII). A nivel Garrafón, la densidad celular entre condiciones de luz, presentó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) durante los días correspondientes a la  $F_{est}$  (Anexo C, Tabla XXV).



**Figura 10.** Crecimiento promedio de *Rhodomonas* sp en diferentes volúmenes de cultivo: A) Erlenmeyer de 200 ml, B) Fernbach de 2 L y C) Garrafón de 18 L, expuestos a condiciones de luz blanca (○) y luz azul (●). La barra indica el error estándar.

Tabla X. Valores poblacionales promedio de *Rhodomonas* sp cultivada en nivel Erlenmeyer (200 ml) con (A) luz azul y (B) luz blanca, a irradiancia de  $52 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  con  $1323.6 \mu\text{M}$  de  $\text{NaNO}_3$  y  $58.5 \mu\text{M}$  de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .

A) LUZ AZUL

| Tiempo<br>(días) | Concentración<br>(células $\text{ml}^{-1}$ ) | $\mu$<br>( $\text{día}^{-1}$ ) | D<br>(divisiones $\text{día}^{-1}$ ) | TD<br>(días) | PD<br>(células $\text{ml}^{-1}$ ) |
|------------------|----------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|--------------|-----------------------------------|
| 0                | 46666                                        | ---                            | ---                                  | ---          | ---                               |
| 1                | 73333                                        | 0.45                           | 0.65                                 | 1.53         | 26667                             |
| 2                | 195000                                       | 0.97                           | 1.41                                 | 0.70         | 121667                            |
| 3                | 368333                                       | 0.63                           | 0.91                                 | 1.08         | 173333                            |
| 4                | 523333                                       | 0.35                           | 0.50                                 | 1.97         | 155000                            |
| 5                | 1026667                                      | 0.67                           | 0.97                                 | 1.02         | 503334                            |
| 6                | 1055000                                      | 0.02                           | 0.03                                 | 25.46        | 28333                             |
| 7                | 1108333                                      | 0.04                           | 0.07                                 | 14.05        | 53333                             |
|                  | <b>Promedio</b>                              | <b>0.45</b>                    | <b>0.65</b>                          | <b>6.54</b>  | <b>151667</b>                     |

B) LUZ BLANCA

| Tiempo<br>(días) | Concentración<br>(células $\text{ml}^{-1}$ ) | $\mu$<br>( $\text{día}^{-1}$ ) | D<br>(divisiones $\text{día}^{-1}$ ) | TD<br>(días) | PD<br>(células $\text{ml}^{-1}$ ) |
|------------------|----------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|--------------|-----------------------------------|
| 0                | 46666                                        | ---                            | ---                                  | ---          | ---                               |
| 1                | 80000                                        | 0.53                           | 0.77                                 | 1.28         | 33334                             |
| 2                | 188333                                       | 0.85                           | 1.23                                 | 0.80         | 108333                            |
| 3                | 388333                                       | 0.72                           | 1.04                                 | 0.95         | 200000                            |
| 4                | 678333                                       | 0.55                           | 0.80                                 | 1.24         | 290000                            |
| 5                | 1113333                                      | 0.49                           | 0.71                                 | 1.39         | 435000                            |
| 6                | 1431667                                      | 0.25                           | 0.36                                 | 2.75         | 318334                            |
| 7                | 1371667                                      | ---                            | ---                                  | ---          | ---                               |
|                  | <b>Promedio</b>                              | <b>0.57</b>                    | <b>0.82</b>                          | <b>1.40</b>  | <b>230834</b>                     |

Tabla XI. Valores poblacionales promedio de *Rhodomonas* sp cultivada en nivel Fernbach (2 L) con (A) luz azul y (B) luz blanca, a irradiancia de  $52 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  con  $1323.6 \mu\text{M}$  de  $\text{NaNO}_3$  y  $58.5 \mu\text{M}$  de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .

A) LUZ AZUL

| Tiempo<br>(días) | Concentración<br>(células $\text{ml}^{-1}$ ) | $\mu$<br>( $\text{día}^{-1}$ ) | D<br>(divisiones $\text{día}^{-1}$ ) | TD<br>(días) | PD<br>(células $\text{ml}^{-1}$ ) |
|------------------|----------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|--------------|-----------------------------------|
| 0                | 90000                                        | ---                            | ---                                  | ---          | ---                               |
| 1                | 176666                                       | 0.67                           | 0.97                                 | 1.02         | 86666                             |
| 2                | 380000                                       | 0.76                           | 1.10                                 | 0.90         | 203334                            |
| 3                | 490000                                       | 0.25                           | 0.36                                 | 2.72         | 110000                            |
| 4                | 566666                                       | 0.14                           | 0.20                                 | 4.76         | 76666                             |
| 5                | 783333                                       | 0.32                           | 0.46                                 | 2.14         | 216667                            |
| 6                | 880000                                       | 0.11                           | 0.16                                 | 5.95         | 96667                             |
|                  | <b>Promedio</b>                              | <b>0.38</b>                    | <b>0.54</b>                          | <b>2.92</b>  | <b>131667</b>                     |

B) LUZ BLANCA

| Tiempo<br>(días) | Concentración<br>(células $\text{ml}^{-1}$ ) | $\mu$<br>( $\text{día}^{-1}$ ) | D<br>(divisiones $\text{día}^{-1}$ ) | TD<br>(días) | PD<br>(células $\text{ml}^{-1}$ ) |
|------------------|----------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|--------------|-----------------------------------|
| 0                | 98333                                        | ---                            | ---                                  | ---          | ---                               |
| 1                | 186666                                       | 0.64                           | 0.92                                 | 1.08         | 88333                             |
| 2                | 320000                                       | 0.53                           | 0.77                                 | 1.28         | 133334                            |
| 3                | 526666                                       | 0.49                           | 0.71                                 | 1.39         | 206666                            |
| 4                | 703333                                       | 0.28                           | 0.41                                 | 2.39         | 176667                            |
| 5                | 876666                                       | 0.22                           | 0.31                                 | 3.14         | 173333                            |
| 6                | 926666                                       | 0.05                           | 0.08                                 | 12.49        | 50000                             |
|                  | <b>Promedio</b>                              | <b>0.37</b>                    | <b>0.53</b>                          | <b>3.63</b>  | <b>138056</b>                     |

Tabla XII. Valores poblacionales promedio de *Rhodomonas* sp cultivada en nivel Garrafón (18 L) con (A) luz azul y (B) luz blanca, a irradiancia de  $52 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  con  $1323.6 \mu\text{M}$  de  $\text{NaNO}_3$  y  $58.5 \mu\text{M}$  de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .

A) LUZ AZUL

| Tiempo<br>(días) | Concentración<br>(células $\text{ml}^{-1}$ ) | $\mu$<br>( $\text{día}^{-1}$ ) | D<br>(divisiones $\text{día}^{-1}$ ) | TD<br>(días) | PD<br>(células $\text{ml}^{-1}$ ) |
|------------------|----------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|--------------|-----------------------------------|
| 0                | 105000                                       | ---                            | ---                                  | ---          | ---                               |
| 1                | 198333                                       | 0.63                           | 0.91                                 | 1.08         | 93333                             |
| 2                | 368333                                       | 0.61                           | 0.89                                 | 1.11         | 170000                            |
| 3                | 619166                                       | 0.51                           | 0.74                                 | 1.33         | 250833                            |
| 4                | 827500                                       | 0.29                           | 0.41                                 | 2.38         | 208334                            |
| 5                | 990833                                       | 0.18                           | 0.25                                 | 3.84         | 163333                            |
| 6                | 1068333                                      | 0.07                           | 0.10                                 | 9.20         | 77500                             |
| 7                | 1257778                                      | 0.16                           | 0.23                                 | 4.24         | 189445                            |
|                  | <b>Promedio</b>                              | <b>0.35</b>                    | <b>0.50</b>                          | <b>3.31</b>  | <b>164683</b>                     |

B0 LUZ BLANCA

| Tiempo<br>(días) | Concentración<br>(células $\text{ml}^{-1}$ ) | $\mu$<br>( $\text{día}^{-1}$ ) | D<br>(divisiones $\text{día}^{-1}$ ) | TD<br>(días) | PD<br>(células $\text{ml}^{-1}$ ) |
|------------------|----------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|--------------|-----------------------------------|
| 0                | 101666                                       | ---                            | ---                                  | ---          | ---                               |
| 1                | 213333                                       | 0.74                           | 1.06                                 | 0.93         | 111667                            |
| 2                | 457500                                       | 0.76                           | 1.10                                 | 0.90         | 244167                            |
| 3                | 690000                                       | 0.41                           | 0.59                                 | 1.68         | 232500                            |
| 4                | 842500                                       | 0.19                           | 0.28                                 | 3.47         | 152500                            |
| 5                | 1125833                                      | 0.28                           | 0.41                                 | 2.39         | 283333                            |
| 6                | 1310000                                      | 0.15                           | 0.21                                 | 4.57         | 184167                            |
| 7                | 1504167                                      | 0.13                           | 0.19                                 | 5.01         | 194167                            |
|                  | <b>Promedio</b>                              | <b>0.38</b>                    | <b>0.55</b>                          | <b>2.71</b>  | <b>200357</b>                     |

A nivel Garrafón (18 L), debido al remanente de  $\text{NO}_3^-$  en los cultivos utilizados como inoculo, la concentración inicial de  $\text{NO}_3^-$  en los cultivos con LA fue 1382.4  $\mu\text{M}$  y 1378.9  $\mu\text{M}$  para aquellos expuestos a LB (Fig. 11-C; Tabla XIII-C). La diferencia en la concentración inicial de  $\text{NO}_3^-$  no fue significativa ( $p>0.05$ ). Sin embargo, del primer al séptimo día, la concentración residual de  $\text{NO}_3^-$  difiere entre las condiciones de luz debido al consumo diferencial que se observó durante las primeras 48 horas de cultivo. Para el segundo día, el consumo acumulado de  $\text{NO}_3^-$  en los cultivos con LB fue mayor que el determinado en cultivos con LA (336.9 vs 257.4  $\mu\text{M}$  de  $\text{NO}_3^-$ ). Mientras que, el promedio para las primeras 48 horas, del consumo de  $\text{NO}_3^-$  por célula fue 1.07 pg en LB y  $0.83 \pm 0.06$  pg en LA (Tabla XIII-C).

Durante la  $F_{\text{est}}$  (Día 3-7), el consumo diario total de  $\text{NO}_3^-$  fue superior a 100  $\mu\text{M}$  y resultó similar entre los cultivos con LA y LB (Tabla XIII-C; Anexo C, Tabla XXIV). El consumo total de  $\text{NO}_3^-$ , en este mismo período de tiempo, disminuyó de 155.2 a 106.9  $\mu\text{M}$  en LA y de 179 a 117.62  $\mu\text{M}$  en LB. Mientras que, por célula, el consumo disminuyó de 0.40 a 0.09 pg  $\text{NO}_3^-$  en ambas condiciones de luz (Tabla XIII-C).

Al final del cultivo (Día 7), bajo condiciones de LA, el consumo acumulado de  $\text{NO}_3^-$  representó el 68.4% (945.4  $\mu\text{M}$ ) del  $\text{NO}_3^-$  inicial, quedando en el medio 31.6% (437  $\mu\text{M}$ ). Mientras que, en cultivos expuestos a LB, se consumió el 79.6% (1097.4  $\mu\text{M}$ ) del  $\text{NO}_3^-$  inicial y quedó el 20.4% (281.5  $\mu\text{M}$ ) disponible (Tabla XIII-C).

La concentración residual de  $\text{PO}_4^{3-}$  y el consumo diario total de este nutriente por *Rhodomonas* sp, se puede observar en la figura 12 y tabla XIV.

A nivel Erlenmeyer y Fernbach, el consumo de  $\text{PO}_4^{3-}$  aumentó durante las primeras 72 horas de cultivo (Fig. 12-A y B), midiéndose un consumo acumulado de  $\text{PO}_4^{3-}$  a nivel Erlenmeyer del 86.1% (50.4  $\mu\text{M}$ ) en LA y 68.9% (40.4  $\mu\text{M}$ ) en LB. Mientras que, a nivel Fernbach, el consumo acumulado, fue 88.8% (52  $\mu\text{M}$ ) y 84.5% (49.5  $\mu\text{M}$ ), respectivamente. Durante este período (Día

0-3), se observaron también las mayores tasas diarias de consumo de  $\text{PO}_4^{3-}$  por célula, en ambos niveles (Tabla XIV-A y B). Además, a partir del tercer día, la concentración residual y el consumo de  $\text{PO}_4^{3-}$ , total y por célula, disminuyó significativamente.

A nivel Erlenmeyer, la concentración residual mínima de  $\text{PO}_4^{3-}$  se presentó al sexto día de cultivo con  $0.85 \mu\text{M}$  en LA y  $0.91 \mu\text{M}$  en LB. Del sexto al séptimo día, en ambas condiciones de luz, la concentración de  $\text{PO}_4^{3-}$  en el medio aumentó a  $1.38 \mu\text{M}$  en LA y  $1.67 \mu\text{M}$  en LB.

A nivel Fernbach, la mínima concentración de  $\text{PO}_4^{3-}$  en el medio se obtuvo también el sexto día de cultivo con valores de  $0.61$  y  $0.67 \mu\text{M}$  en LA y LB respectivamente.

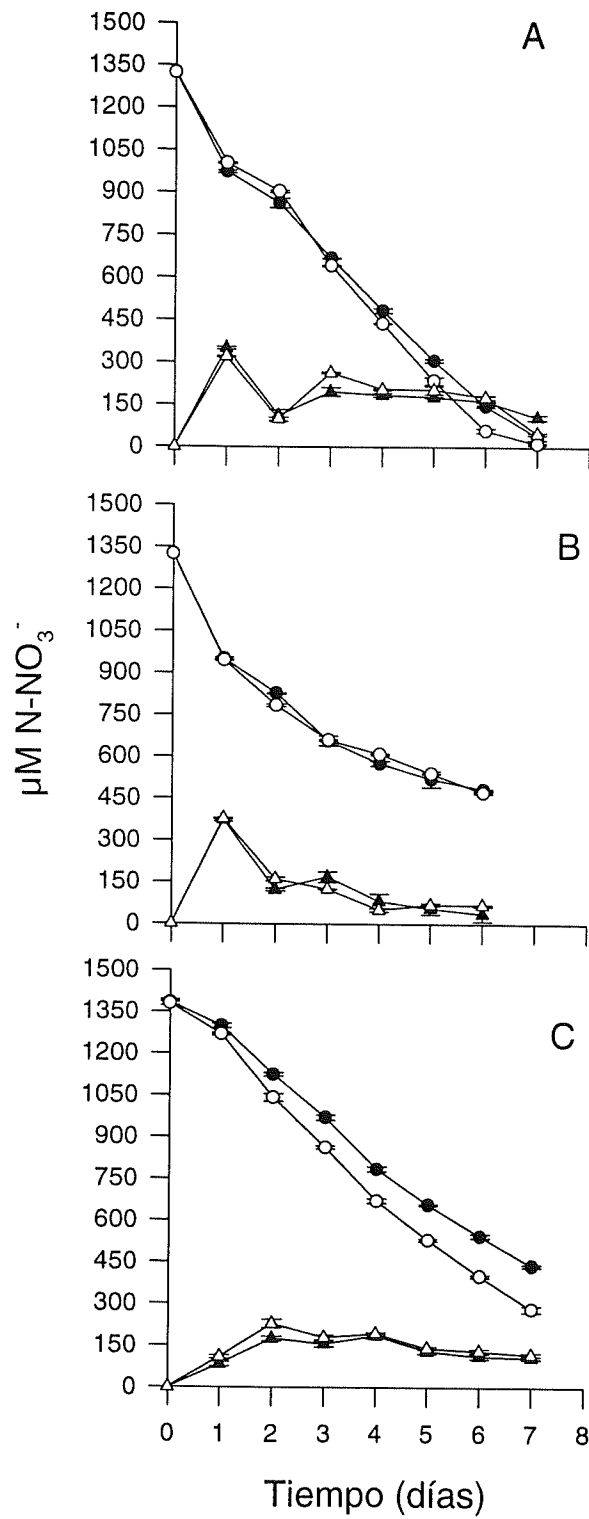
Durante el tiempo de cultivo, la concentración residual y el consumo diario de  $\text{PO}_4^{3-}$ , para ambos niveles, fue similar entre condiciones de LA y LB (Anexo C, Tabla XXIII y XXIV).

A nivel Garrafón, los cultivos con LA iniciaron con concentraciones de  $\text{PO}_4^{3-}$  de  $70.42 \mu\text{M}$ , mientras que, los cultivos con LB inician con  $69.23 \mu\text{M}$ . Esta diferencia en concentración inicial, no fue significativa ( $p > 0.05$ ; Anexo C, Tabla XXIV). Durante las primeras 48 horas, tanto en LA como en LB, el consumo de  $\text{PO}_4^{3-}$  aumentó de  $11.4$  a  $25.3 \mu\text{M día}^{-1}$ . Para el segundo día de cultivo, el consumo acumulado de  $\text{PO}_4^{3-}$  representó más del 50% de la concentración inicial del nutriente en ambas condiciones de luz (Fig. 12-C).

Del segundo al tercer día, el consumo de  $\text{PO}_4^{3-}$  disminuyó a  $3.55 \mu\text{M}$  en LA y  $4.44 \mu\text{M}$  en LB, y a partir de este tiempo, tanto la concentración residual como el consumo total de  $\text{PO}_4^{3-}$ , resultaron significativos entre condiciones de luz ( $p < 0.05$ ; Anexo C, Tabla XXV).

Durante el período que corresponde a la  $F_{\text{est}}$  (Día 3-7), el consumo total diario de  $\text{PO}_4^{3-}$  varió de  $2.69$ - $4.77 \mu\text{M}$  en LA y  $4.44$ - $6.13 \mu\text{M}$  en LB (Tabla XIV-C). Encontrándose, para el séptimo día de cultivo, una concentración residual promedio de  $16.52 \mu\text{M}$  (23.5%) de  $\text{PO}_4^{3-}$  en LA y  $6.11 \mu\text{M}$  (8.9%) en LB.

Las diferencias en la concentración residual final de  $\text{PO}_4^{3-}$ , indican que en los cultivos expuestos a LB se consumió más  $\text{PO}_4^{3-}$  (91.1%, 63.1  $\mu\text{M}$ ) que en aquellos expuestos a LA (76.5%, 53.9  $\mu\text{M}$ ). Este consumo diferencial, fue producto de las diferencias en las tasas de consumo por célula medidas para LA y LB. Del primer al cuarto día de cultivo, el consumo de  $\text{PO}_4^{3-}$  por célula, fue similar entre condiciones de luz. Pero a partir del cuarto día, el consumo de  $\text{PO}_4^{3-}$  fue mayor en las células cultivadas con LB, respecto a las células en LA (Tabla XIV-C).



**Figura 11.** Concentración residual promedio (círculos) y consumo diario promedio (triángulos) de nitrato por *Rhodomonas* sp en diferentes volúmenes de cultivo: A) Erlenmeyer de 200 ml, B) Fernbach de 2 L y C) Garrafón de 18 L, expuestos a condiciones de luz blanca (símbolos abiertos) y luz azul (símbolos cerrados). La barra indica el error estándar.

Tabla XIII. Concentración residual y consumo diario promedio de nitrato en cultivos estáticos de *Rhodomonas* sp en volumen de 200 ml (A), 2 L (B) y 18 L (C) expuestos a luz azul y luz blanca.

A) NIVEL ERLNMEYER

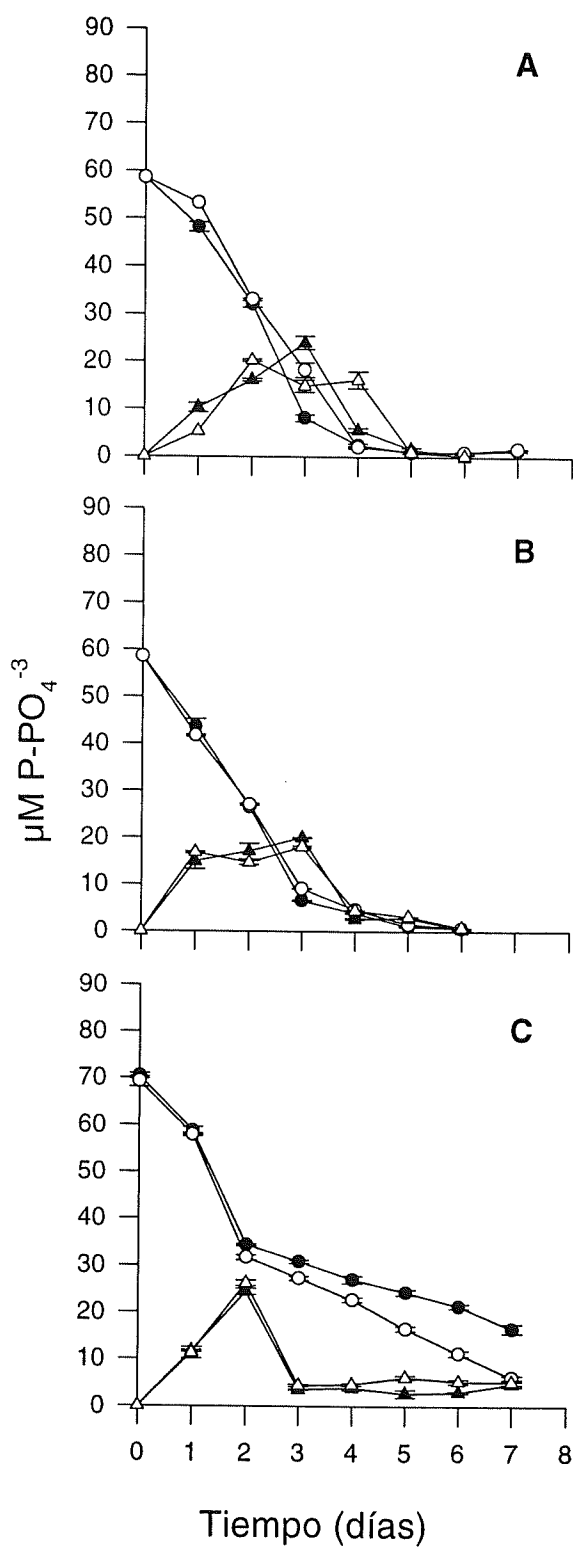
| Día | LUZ AZUL                         |                                    |                                     |      |                                | LUZ BLANCA                       |                                    |                                     |      |                                |
|-----|----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|------|--------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|------|--------------------------------|
|     | Conc. residual ( $\mu\text{M}$ ) | Consumo ( $\mu\text{M día}^{-1}$ ) | Consumo acumulado ( $\mu\text{M}$ ) | %    | pg $\text{NO}_3^-$ cél $^{-1}$ | Conc. residual ( $\mu\text{M}$ ) | Consumo ( $\mu\text{M día}^{-1}$ ) | Consumo acumulado ( $\mu\text{M}$ ) | %    | pg $\text{NO}_3^-$ cél $^{-1}$ |
| 0   | 1323.6                           | ----                               | ----                                | ---- | ----                           | 1323.6                           | ----                               | ----                                | ---- | ----                           |
| 1   | 974.16                           | 349.45                             | 349.45                              | 26.4 | 7.49                           | 1003.8                           | 319.76                             | 319.76                              | 24.2 | 6.85                           |
| 2   | 863.03                           | 111.13                             | 460.58                              | 34.8 | 1.52                           | 904.80                           | 99.05                              | 418.81                              | 31.6 | 1.23                           |
| 3   | 667.47                           | 195.56                             | 656.14                              | 49.6 | 1.00                           | 641.78                           | 263.02                             | 681.83                              | 51.5 | 1.39                           |
| 4   | 483.16                           | 184.31                             | 840.45                              | 63.5 | 0.50                           | 437.35                           | 204.43                             | 886.26                              | 67.0 | 0.52                           |
| 5   | 306.30                           | 176.86                             | 1017.3                              | 76.9 | 0.34                           | 235.10                           | 202.25                             | 1088.5                              | 82.2 | 0.29                           |
| 6   | 144.91                           | 161.40                             | 1178.7                              | 89.1 | 0.16                           | 59.17                            | 175.92                             | 1264.4                              | 95.5 | 0.15                           |
| 7   | 39.19                            | 105.72                             | 1284.4                              | 97.0 | 0.10                           | 11.43                            | 47.75                              | 1312.1                              | 99.1 | 0.03                           |

B ) NIVEL FERNBACH

| Día | LUZ AZUL                         |                                    |                                     |      |                                | LUZ BLANCA                       |                                    |                                     |      |                                |
|-----|----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|------|--------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|------|--------------------------------|
|     | Conc. residual ( $\mu\text{M}$ ) | Consumo ( $\mu\text{M día}^{-1}$ ) | Consumo acumulado ( $\mu\text{M}$ ) | %    | pg $\text{NO}_3^-$ cél $^{-1}$ | Conc. residual ( $\mu\text{M}$ ) | Consumo ( $\mu\text{M día}^{-1}$ ) | Consumo acumulado ( $\mu\text{M}$ ) | %    | pg $\text{NO}_3^-$ cél $^{-1}$ |
| 0   | 1323.6                           | ----                               | ----                                | ---- | ----                           | 1323.6                           | ----                               | ----                                | ---- | ----                           |
| 1   | 949.76                           | 373.85                             | 373.85                              | 28.2 | 4.15                           | 945.37                           | 378.24                             | 378.24                              | 28.6 | 3.85                           |
| 2   | 826.59                           | 123.17                             | 497.02                              | 37.6 | 0.70                           | 784.25                           | 161.12                             | 539.36                              | 40.7 | 0.86                           |
| 3   | 657.92                           | 168.67                             | 665.69                              | 50.3 | 0.44                           | 659.38                           | 124.87                             | 664.23                              | 50.2 | 0.39                           |
| 4   | 576.03                           | 81.89                              | 747.58                              | 56.5 | 0.17                           | 609.08                           | 50.29                              | 714.52                              | 54.0 | 0.10                           |
| 5   | 520.53                           | 55.5                               | 803.08                              | 60.7 | 0.10                           | 540.58                           | 68.51                              | 783.03                              | 59.2 | 0.10                           |
| 6   | 484.84                           | 35.69                              | 838.77                              | 63.4 | 0.05                           | 472.69                           | 67.89                              | 850.92                              | 64.3 | 0.08                           |

C) NIVEL GARRAFON

| Día | LUZ AZUL                         |                                    |                                     |      |                                | LUZ BLANCA                       |                                    |                                     |      |                                |
|-----|----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|------|--------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|------|--------------------------------|
|     | Conc. residual ( $\mu\text{M}$ ) | Consumo ( $\mu\text{M día}^{-1}$ ) | Consumo acumulado ( $\mu\text{M}$ ) | %    | pg $\text{NO}_3^-$ cél $^{-1}$ | Conc. residual ( $\mu\text{M}$ ) | Consumo ( $\mu\text{M día}^{-1}$ ) | Consumo acumulado ( $\mu\text{M}$ ) | %    | pg $\text{NO}_3^-$ cél $^{-1}$ |
| 0   | 1382.4                           | ----                               | ----                                | ---- | ----                           | 1378.8                           | ----                               | ----                                | ---- | ----                           |
| 1   | 1299.6                           | 82.79                              | 82.79                               | 6.0  | 0.79                           | 1269.9                           | 108.94                             | 108.94                              | 7.9  | 1.07                           |
| 2   | 1125                             | 174.63                             | 257.42                              | 18.6 | 0.88                           | 1042                             | 227.93                             | 336.87                              | 24.4 | 1.07                           |
| 3   | 969.8                            | 155.19                             | 412.61                              | 29.8 | 0.42                           | 862.93                           | 179.07                             | 515.94                              | 37.4 | 0.39                           |
| 4   | 784.64                           | 185.17                             | 597.78                              | 43.2 | 0.30                           | 670.22                           | 192.71                             | 708.65                              | 51.4 | 0.28                           |
| 5   | 655.37                           | 129.27                             | 727.05                              | 52.6 | 0.16                           | 529.46                           | 140.75                             | 849.4                               | 61.6 | 0.17                           |
| 6   | 543.93                           | 111.44                             | 838.49                              | 60.7 | 0.11                           | 399.14                           | 130.32                             | 979.72                              | 71.1 | 0.12                           |
| 7   | 437.06                           | 106.87                             | 945.36                              | 68.4 | 0.10                           | 281.52                           | 117.62                             | 1097.3                              | 79.6 | 0.09                           |



**Figura 12.** Concentración residual promedio (círculos) y consumo diario promedio (triángulos) de fosfato por *Rhodomonas* sp en diferentes volúmenes de cultivo: A) Erlenmeyer de 200 ml, B) Fernbach de 2 L y C) Garrafón de 18 L, expuestos a condiciones de luz blanca (símbolos abiertos) y luz azul (símbolos cerrados). La barra indica el error estándar.

Tabla XIV. Concentración residual y consumo diario promedio de fosfato en cultivos estáticos de *Rhodomonas* sp en volumen de 200 ml (A), 2 L (B) y 18 L (C) expuestos a luz azul y luz blanca.

A) NIVEL ERLLENMEYER

| Día | LUZ AZUL                         |                                    |                                     |      |                            | LUZ BLANCA                       |                                    |                                     |      |                            |
|-----|----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|------|----------------------------|----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|------|----------------------------|
|     | Conc. residual ( $\mu\text{M}$ ) | Consumo ( $\mu\text{M día}^{-1}$ ) | Consumo acumulado ( $\mu\text{M}$ ) |      | pg x $10^{-2}$ cél $^{-1}$ | Conc. residual ( $\mu\text{M}$ ) | Consumo ( $\mu\text{M día}^{-1}$ ) | Consumo acumulado ( $\mu\text{M}$ ) |      | pg x $10^{-2}$ cél $^{-1}$ |
| 0   | 58.55                            | ---                                | ---                                 | ---  | ---                        | 58.55                            | ---                                | ---                                 | ---  | ---                        |
| 1   | 48.24                            | 10.31                              | 10.31                               | 17.6 | 22.0                       | 53.24                            | 5.3                                | 5.3                                 | 9.1  | 11.4                       |
| 2   | 32.09                            | 16.15                              | 26.46                               | 45.2 | 22.0                       | 33.03                            | 20.22                              | 25.52                               | 43.6 | 25.3                       |
| 3   | 8.13                             | 23.96                              | 50.42                               | 86.1 | 12.2                       | 18.2                             | 14.83                              | 40.35                               | 68.9 | 7.87                       |
| 4   | 2.47                             | 5.65                               | 56.07                               | 95.8 | 1.53                       | 2.04                             | 16.16                              | 56.51                               | 96.5 | 4.16                       |
| 5   | 0.85                             | 1.63                               | 57.7                                | 98.5 | 0.31                       | 1.08                             | 0.96                               | 57.47                               | 98.2 | 0.14                       |
| 6   | 0.85                             | 0                                  | 57.7                                | 98.5 | ---                        | 0.91                             | 0.17                               | 57.64                               | 98.4 | 0.02                       |
| 7   | 1.38                             | ---                                | 57.7                                | 98.5 | ---                        | 1.67                             | ---                                | 57.64                               | 98.4 | ---                        |

B) NIVEL FERNBACH

| Día | LUZ AZUL                         |                                    |                                     |      |                            | LUZ BLANCA                       |                                    |                                     |      |                            |
|-----|----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|------|----------------------------|----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|------|----------------------------|
|     | Conc. residual ( $\mu\text{M}$ ) | Consumo ( $\mu\text{M día}^{-1}$ ) | Consumo acumulado ( $\mu\text{M}$ ) |      | pg x $10^{-2}$ cél $^{-1}$ | Conc. residual ( $\mu\text{M}$ ) | Consumo ( $\mu\text{M día}^{-1}$ ) | Consumo acumulado ( $\mu\text{M}$ ) |      | pg x $10^{-2}$ cél $^{-1}$ |
| 0   | 58.55                            | ---                                | ---                                 | ---  | ---                        | 58.55                            | ---                                | ---                                 | ---  | ---                        |
| 1   | 43.64                            | 14.91                              | 14.91                               | 25.5 | 16.5                       | 41.74                            | 16.81                              | 16.81                               | 28.7 | 17.1                       |
| 2   | 26.54                            | 17.1                               | 32.01                               | 54.7 | 9.68                       | 27.1                             | 14.64                              | 31.45                               | 53.7 | 7.84                       |
| 3   | 6.57                             | 19.98                              | 51.99                               | 88.8 | 5.26                       | 9.1                              | 18                                 | 49.45                               | 84.5 | 5.62                       |
| 4   | 3.89                             | 2.68                               | 54.67                               | 93.4 | 0.55                       | 4.63                             | 4.47                               | 53.92                               | 92.1 | 0.85                       |
| 5   | 1.08                             | 2.81                               | 57.48                               | 98.2 | 0.50                       | 1.49                             | 3.14                               | 57.06                               | 97.5 | 0.45                       |
| 6   | 0.61                             | 0.46                               | 57.94                               | 99.0 | 0.06                       | 0.67                             | 0.82                               | 57.88                               | 98.9 | 0.09                       |

C) NIVEL GARRAFON

| Día | LUZ AZUL                         |                                    |                                     |      |                            | LUZ BLANCA                       |                                    |                                     |      |                            |
|-----|----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|------|----------------------------|----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|------|----------------------------|
|     | Conc. residual ( $\mu\text{M}$ ) | Consumo ( $\mu\text{M día}^{-1}$ ) | Consumo acumulado ( $\mu\text{M}$ ) |      | pg x $10^{-2}$ cél $^{-1}$ | Conc. residual ( $\mu\text{M}$ ) | Consumo ( $\mu\text{M día}^{-1}$ ) | Consumo acumulado ( $\mu\text{M}$ ) |      | pg x $10^{-2}$ cél $^{-1}$ |
| 0   | 70.42                            | ---                                | ---                                 | ---  | ---                        | 69.23                            | ---                                | ---                                 | ---  | ---                        |
| 1   | 58.71                            | 11.71                              | 11.71                               | 16.6 | 11.1                       | 57.91                            | 11.32                              | 11.32                               | 16.4 | 11.1                       |
| 2   | 34.34                            | 24.37                              | 36.08                               | 51.2 | 12.3                       | 31.69                            | 26.22                              | 37.54                               | 54.2 | 12.3                       |
| 3   | 30.79                            | 3.55                               | 39.63                               | 56.2 | 0.96                       | 27.25                            | 4.44                               | 41.98                               | 60.6 | 0.97                       |
| 4   | 26.96                            | 3.83                               | 43.46                               | 61.7 | 0.62                       | 22.65                            | 4.59                               | 46.57                               | 67.3 | 0.67                       |
| 5   | 24.27                            | 2.69                               | 46.15                               | 65.5 | 0.32                       | 16.52                            | 6.13                               | 52.7                                | 76.1 | 0.73                       |
| 6   | 21.29                            | 2.97                               | 49.12                               | 69.7 | 0.30                       | 11.26                            | 5.26                               | 57.96                               | 83.7 | 0.47                       |
| 7   | 16.52                            | 4.77                               | 53.89                               | 76.5 | 0.45                       | 6.11                             | 5.14                               | 63.1                                | 91.1 | 0.39                       |

### 5.2.3. Contenido de Clorofilas

El contenido de clorofila *a* y *c*, por unidad celular y volumen de cultivo, para los diferentes niveles se muestran en las figuras 13 y 14, y tabla XV. Tanto en los cultivos a nivel Erlenmeyer como Fernbach expuestos a LB, el contenido de clorofila *a* por célula aumentó durante las primeras 72 horas (Fig. 13-A y B). La variación en el contenido de clorofila *a* en cultivos con LB, del primer al tercer día, fue 1.26-2.06 pg célula<sup>-1</sup> en nivel Erlenmeyer y 1.29-1.88 pg célula<sup>-1</sup> en Fernbach (Tabla XV-A y B).

En células expuestas a LA, tanto en nivel Erlenmeyer como Fernbach, se observó un comportamiento similar, éstas aumentaron su contenido de clorofila *a* por célula conforme transcurrió el tiempo de cultivo y su máximo contenido se presentó al cuarto día. En estos casos, la concentración de clorofila *a*, aumentó de 1.25 a 1.99 pg célula<sup>-1</sup> en nivel Erlenmeyer y 0.95 a 2.23 pg célula<sup>-1</sup> en Fernbach. Posterior al máximo obtenido en cada condición de luz y volumen de cultivo, se observó una disminución en el contenido de este pigmento. A nivel Erlenmeyer, el contenido de clorofila *a* por célula para el séptimo día de cultivo fue 1.09 pg en LA y 1.41 pg en LB. Mientras que, a nivel Fernbach fue 1.61 y 1.69 pg clorofila *a* célula<sup>-1</sup> en LA y LB respectivamente (Tabla XV-A y B).

A nivel Garrafón, el contenido de clorofila *a* por célula fue similar entre las condiciones de luz. Los valores iniciales promedio fueron 1.58 pg célula<sup>-1</sup> en LA y 1.46 pg célula<sup>-1</sup> en LB. A partir del primer día, en ambas condiciones de luz, se dió un ligero incremento en el contenido celular de este pigmento (Fig. 13-C). Durante el período de cultivo, en células expuestas a LA el contenido de clorofila *a* aumentó de 1.58 a 2.10 pg célula<sup>-1</sup>, mientras que, en LB el aumento fue de 1.46 a 2.15 pg (Tabla XV-C).

No hubo diferencias significativas ( $p>0.05$ ) en la concentración de clorofila *a* por célula entre LA y LB, para ninguno de los niveles de cultivo evaluado (Anexo C, Tablas XXIII-XXV).

El contenido de clorofila *a* por volumen de cultivo, en los diferentes volúmenes y condiciones de luz, reflejó una correlación directa con la edad del cultivo (Fig. 13) y la densidad celular (Anexo B, Fig. 28-A).

El patrón de esta variable, en cultivos a nivel Erlenmeyer expuestos a LB, coincidió con lo observado en cultivos de la etapa experimental 1 que fueron expuestos a las mismas condiciones de luz y concentración de nutrientes (Fig. 5; Tabla VII). A nivel Erlenmeyer, el máximo contenido de clorofila *a* por volumen de cultivo se presentó al sexto día con  $1364.3 \text{ pg} \times 10^6 \text{ L}^{-1}$  en LA y  $2182.8 \text{ pg} \times 10^6 \text{ L}^{-1}$  en LB (Fig. 13-A; Tabla XV-A). Del cuarto día de cultivo en adelante, el contenido de clorofila *a* por volumen mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las condiciones de luz (Anexo C, Tabla XXIII).

A nivel Fernbach, la máxima concentración de clorofila *a* por volumen de cultivo se presentó el último día (Día 6) con  $1415.4$  y  $1568.9 \text{ pg} \times 10^6 \text{ L}^{-1}$  en cultivos con LA y LB respectivamente (Fig. 13-B; Tabla XV-B). En este nivel, no hubo diferencias en el contenido de clorofila *a* por volumen de cultivo entre la condición de LA y LB (Anexo C, Tabla XXIV).

A nivel Garrafón, se obtuvo la mayor concentración de clorofila *a* por volumen el séptimo día de cultivo en ambas condiciones (Fig. 13-C). Tanto en condiciones de LA como LB, la concentración de clorofila *a* por litro que se determinó en este nivel fue superior a la estimada en nivel Erlenmeyer y Fernbach (Fig. 13). La máxima concentración de clorofila *a* fue  $2642.6 \text{ pg} \times 10^6 \text{ L}^{-1}$  en cultivos con LA y  $3221 \text{ pg} \times 10^6 \text{ L}^{-1}$  en LB. La diferencia en concentración final de clorofila *a* por litro entre niveles de cultivo, estuvo directamente asociada con la densidad celular que se alcanzó en cada uno de ellos (Anexo B, Fig. 28-A).

Respecto al contenido de clorofila *c* por célula y por volumen de cultivo, se tuvo un comportamiento similar al observado con el contenido de clorofila *a* (Fig. 13 vs 14). La diferencia se dio en el orden de magnitud de los valores, ya

que la clorofila *c* es un pigmento accesorio (secundario) su contenido en las células fue menor que el de clorofila *a* (pigmento primario).

A nivel Erlenmeyer, el intervalo de concentración de clorofila *c* por célula fue 0.2-0.5 pg en LA y 0.41-0.65 pg en LB, mientras que el contenido por volumen aumentó de 39-333.8 y 38-636.6 pg x 10<sup>6</sup> L<sup>-1</sup> en LA y LB, respectivamente (Fig. 14-A; Tabla XV-A). En el contenido de clorofila *c* por célula no hubo diferencias durante el tiempo de cultivo entre las condiciones de luz, mientras que en contenido de clorofila *c* por volumen, se dieron diferencias del cuarto día en adelante (Anexo C, Tabla XXIII).

A nivel Fernbach, la concentración de clorofila *c* por célula durante los seis días de cultivo, varió de 0.19-0.6 pg en LA y 0.4-0.53 pg en LB. Del primer al sexto día, el contenido de clorofila *c* por volumen aumentó de 32-403.6 pg x 10<sup>6</sup> L<sup>-1</sup> en cultivos con LA y de 73.8-394.6 pg x 10<sup>6</sup> L<sup>-1</sup> en LB (Fig. 14-B; Tabla XV-B).

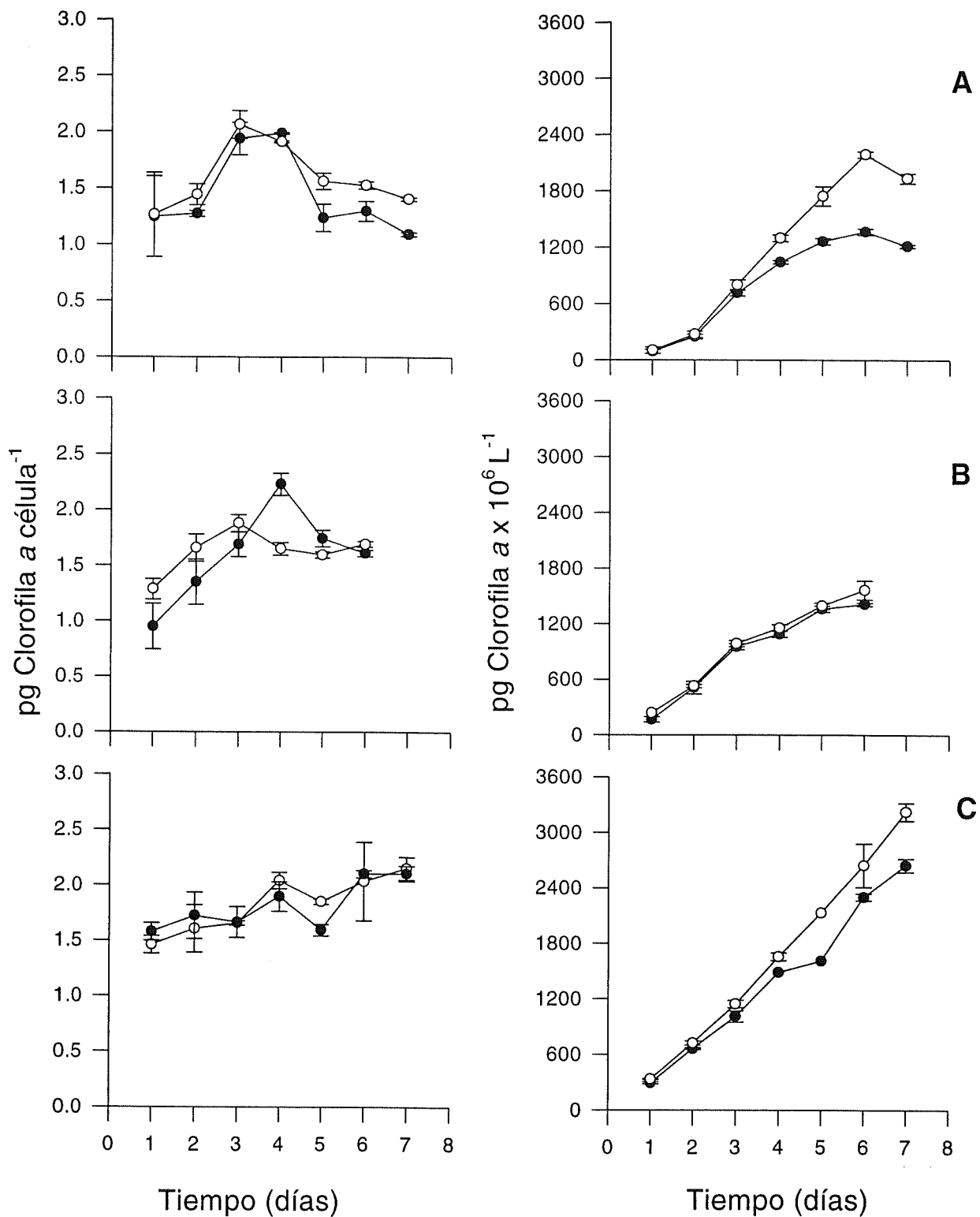
El contenido de clorofila *c* por célula, en cultivos de 18 L, varió de 0.41-0.64 pg en LA y 0.38-0.66 pg en LB, mientras que, su contenido por volumen aumentó de 76.3-788.8 pg x 10<sup>6</sup> L<sup>-1</sup> y 86.6-992.3 pg x 10<sup>6</sup> L<sup>-1</sup> en LA y LB respectivamente (Fig. 14-C; Tabla XV-C).

En los niveles Fernbach y Garrafón, las diferencias en el contenido de clorofila *c* entre condiciones de luz no fueron significativas ( $p > 0.05$ ; Anexo C; Tabla XXIV y XXV).

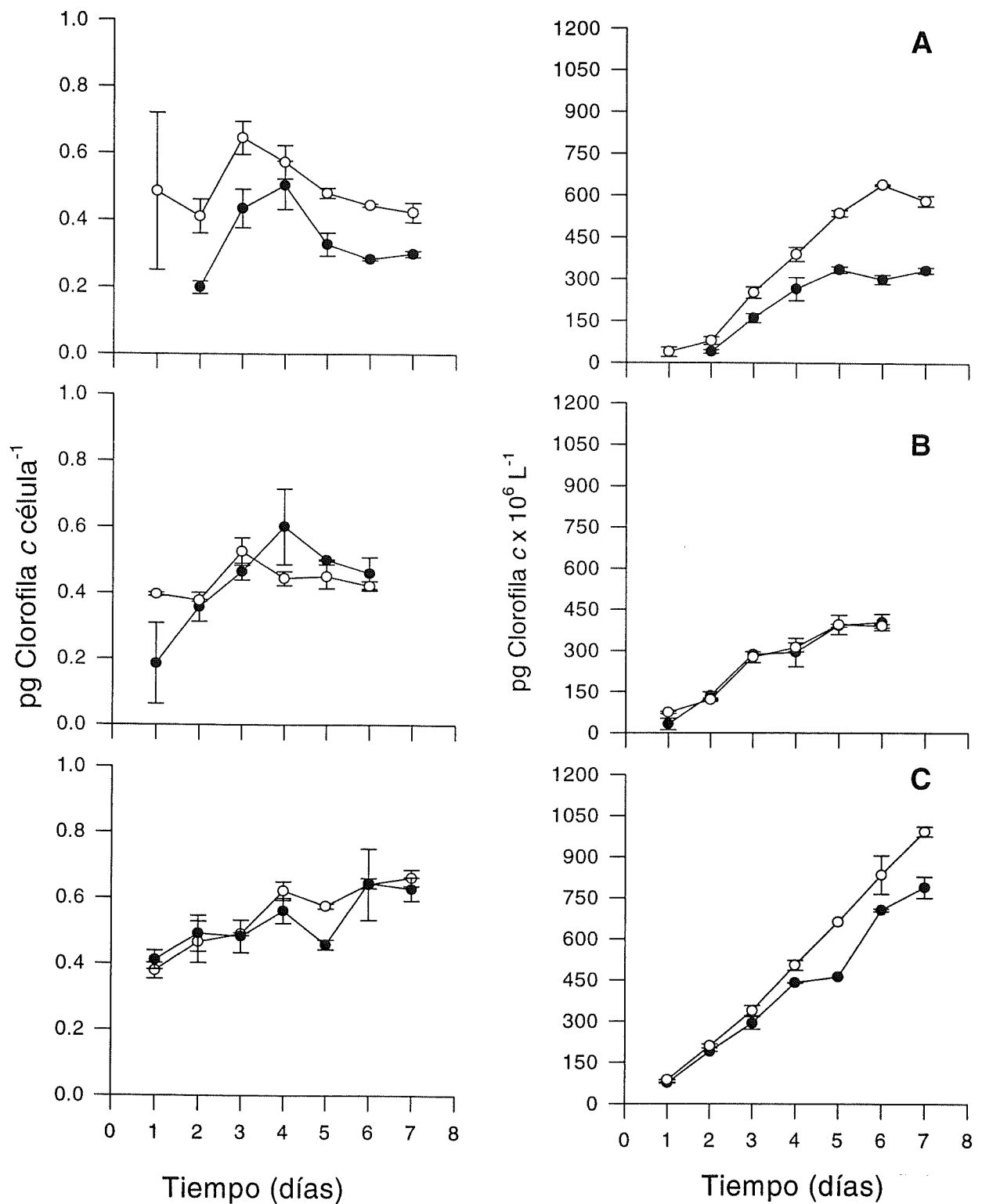
Durante los diferentes tiempos de cultivo, de cada nivel de esta etapa experimental, se observó una relación directa entre el contenido de clorofila *c* por unidad de volumen y la densidad celular (Anexo B, Fig. 28-B). Asimismo, al igual que el contenido de clorofila *a* por volumen, el valor de clorofila *c* para el último día de cultivo, en cada nivel, estuvo directamente relacionado con su densidad final.

A pesar de los cambios en el contenido de clorofila *a* y *c*, los datos obtenidos de la razón *a/c* por célula, muestran que no existe una variación

significativa respecto al tiempo, nivel ó condición de luz (Tabla XV). En general, el 85% de los valores de la razón  $a/c$  estuvieron entre 3 y 4, lo que indicaría, que en la mayoría de los casos hubo de tres a cuatro veces más clorofila  $a$  que clorofila  $c$ .



**Figura 13.** Concentración promedio de clorofila *a* por unidad celular (pg célula<sup>-1</sup>) y volumen (pg x 10<sup>6</sup> L<sup>-1</sup>) en diferentes niveles de cultivo de *Rhodomonas* sp: A) Erlenmeyer de 200 ml, B) Fernbach de 2 L y C) Garrafón de 18 L, expuestos a condiciones de luz blanca (○) y luz azul (●). La barra indica el error estándar.



**Figura 14.** Concentración promedio de clorofila *c* por unidad celular (pg célula<sup>-1</sup>) y volumen (pg x 10<sup>6</sup> L<sup>-1</sup>) en diferentes niveles de cultivo de *Rhodomonas* sp: A) Erlenmeyer de 200 ml, B) Fernbach de 2 L y C) Garrafón de 18 L, expuestos a condiciones de luz blanca (○) y luz azul (●). La barra indica el error estándar.

Tabla XV. Concentración promedio de Clorofila *a* y *c* por célula (pg célula<sup>-1</sup>) y por volumen de cultivo (pg x 10<sup>6</sup> L<sup>-1</sup>) de *Rhodomonas* sp en unidades experimentales de 200 ml (A), 2 L (B) y 18 L (C) expuestos a luz azul y luz blanca.

A) NIVEL ERLLENMEYER

| Día | LUZ AZUL                |                                         |                         |                                         |                     | LUZ BLANCA              |                                         |                         |                                         |                     |
|-----|-------------------------|-----------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------------|---------------------|-------------------------|-----------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------------|---------------------|
|     | Clorofila <i>a</i>      |                                         | Clorofila <i>c</i>      |                                         | Razón               | Clorofila <i>a</i>      |                                         | Clorofila <i>c</i>      |                                         | Razón               |
|     | pg<br>cél <sup>-1</sup> | pg x 10 <sup>6</sup><br>L <sup>-1</sup> | pg<br>cél <sup>-1</sup> | pg x 10 <sup>6</sup><br>L <sup>-1</sup> | <i>a</i> / <i>c</i> | Pg<br>cél <sup>-1</sup> | pg x 10 <sup>6</sup><br>L <sup>-1</sup> | pg<br>cél <sup>-1</sup> | pg x 10 <sup>6</sup><br>L <sup>-1</sup> | <i>a</i> / <i>c</i> |
| 0   | ---                     | ---                                     | ---                     | ---                                     | ---                 | ---                     | ---                                     | ---                     | ---                                     | ---                 |
| 1   | 1.25                    | 90.3                                    | ---                     | ---                                     | ---                 | 1.26                    | 102.3                                   | 0.49                    | 38.1                                    | 2.57                |
| 2   | 1.27                    | 248.7                                   | 0.20                    | 39                                      | 6.35                | 1.44                    | 272.8                                   | 0.41                    | 78                                      | 3.51                |
| 3   | 1.94                    | 712.6                                   | 0.43                    | 159.4                                   | 4.51                | 2.06                    | 801.5                                   | 0.65                    | 251                                     | 3.16                |
| 4   | 1.99                    | 1040.2                                  | 0.50                    | 264.7                                   | 3.98                | 1.91                    | 1296                                    | 0.57                    | 388.2                                   | 3.35                |
| 5   | 1.24                    | 1261.9                                  | 0.33                    | 333.8                                   | 3.75                | 1.56                    | 1739.4                                  | 0.48                    | 534.9                                   | 3.25                |
| 6   | 1.30                    | 1364.3                                  | 0.28                    | 299.4                                   | 4.64                | 1.52                    | 2182.8                                  | 0.44                    | 636.6                                   | 3.45                |
| 7   | 1.09                    | 1210.7                                  | 0.30                    | 332.7                                   | 3.63                | 1.41                    | 1927                                    | 0.42                    | 579.8                                   | 3.35                |

B) NIVEL FERNBACH

| Día | LUZ AZUL                |                                         |                         |                                         |                     | LUZ BLANCA              |                                         |                         |                                         |                     |
|-----|-------------------------|-----------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------------|---------------------|-------------------------|-----------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------------|---------------------|
|     | Clorofila <i>a</i>      |                                         | Clorofila <i>c</i>      |                                         | Razón               | Clorofila <i>a</i>      |                                         | Clorofila <i>c</i>      |                                         | Razón               |
|     | pg<br>cél <sup>-1</sup> | pg x 10 <sup>6</sup><br>L <sup>-1</sup> | pg<br>cél <sup>-1</sup> | pg x 10 <sup>6</sup><br>L <sup>-1</sup> | <i>a</i> / <i>c</i> | Pg<br>cél <sup>-1</sup> | pg x 10 <sup>6</sup><br>L <sup>-1</sup> | pg<br>cél <sup>-1</sup> | pg x 10 <sup>6</sup><br>L <sup>-1</sup> | <i>a</i> / <i>c</i> |
| 0   | ---                     | ---                                     | ---                     | ---                                     | ---                 | ---                     | ---                                     | ---                     | ---                                     | ---                 |
| 1   | 0.95                    | 166.3                                   | 0.19                    | 32                                      | 5                   | 1.29                    | 238.7                                   | 0.40                    | 73.8                                    | 3.22                |
| 2   | 1.35                    | 511.6                                   | 0.36                    | 135.4                                   | 3.75                | 1.66                    | 528.6                                   | 0.38                    | 120.7                                   | 4.36                |
| 3   | 1.69                    | 954.9                                   | 0.46                    | 285.8                                   | 3.67                | 1.88                    | 988.9                                   | 0.53                    | 276.5                                   | 3.56                |
| 4   | 2.23                    | 1091.4                                  | 0.60                    | 293.7                                   | 3.71                | 1.65                    | 1159.6                                  | 0.44                    | 312.3                                   | 3.75                |
| 5   | 1.74                    | 1364.3                                  | 0.50                    | 391.7                                   | 3.48                | 1.59                    | 1398.4                                  | 0.45                    | 394.6                                   | 3.53                |
| 6   | 1.61                    | 1415.4                                  | 0.46                    | 403.6                                   | 3.5                 | 1.69                    | 1568.9                                  | 0.42                    | 389.7                                   | 4.02                |

C) NIVEL GARRAFON

| Día | LUZ AZUL                |                                         |                         |                                         |                     | LUZ BLANCA              |                                         |                         |                                         |                     |
|-----|-------------------------|-----------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------------|---------------------|-------------------------|-----------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------------|---------------------|
|     | Clorofila <i>a</i>      |                                         | Clorofila <i>c</i>      |                                         | Razón               | Clorofila <i>a</i>      |                                         | Clorofila <i>c</i>      |                                         | Razón               |
|     | pg<br>cél <sup>-1</sup> | pg x 10 <sup>6</sup><br>L <sup>-1</sup> | pg<br>cél <sup>-1</sup> | pg x 10 <sup>6</sup><br>L <sup>-1</sup> | <i>a</i> / <i>c</i> | Pg<br>cél <sup>-1</sup> | pg x 10 <sup>6</sup><br>L <sup>-1</sup> | pg<br>cél <sup>-1</sup> | pg x 10 <sup>6</sup><br>L <sup>-1</sup> | <i>a</i> / <i>c</i> |
| 0   | ---                     | ---                                     | ---                     | ---                                     | ---                 | ---                     | ---                                     | ---                     | ---                                     | ---                 |
| 1   | 1.58                    | 293                                     | 0.41                    | 76.3                                    | 3.85                | 1.46                    | 334.4                                   | 0.38                    | 86.6                                    | 3.84                |
| 2   | 1.72                    | 662.3                                   | 0.49                    | 189.5                                   | 3.51                | 1.61                    | 723.1                                   | 0.47                    | 209.8                                   | 3.42                |
| 3   | 1.66                    | 1009.5                                  | 0.48                    | 293                                     | 3.45                | 1.65                    | 1143.2                                  | 0.49                    | 339                                     | 3.36                |
| 4   | 1.90                    | 1487                                    | 0.56                    | 440.1                                   | 3.39                | 2.04                    | 1654.8                                  | 0.62                    | 504.3                                   | 3.29                |
| 5   | 1.59                    | 1607.1                                  | 0.46                    | 461.7                                   | 3.45                | 1.85                    | 2128.2                                  | 0.57                    | 662.1                                   | 3.24                |
| 6   | 2.10                    | 2298.8                                  | 0.64                    | 705.7                                   | 3.28                | 2.03                    | 2643.2                                  | 0.64                    | 834.4                                   | 3.17                |
| 7   | 2.10                    | 2642.6                                  | 0.63                    | 788.8                                   | 3.33                | 2.15                    | 3221                                    | 0.66                    | 992.3                                   | 3.25                |

#### 5.2.4. Composición proximal en volúmenes de 18 litros (Garrafón)

Al inicio de los cultivos, la concentración promedio de proteína por unidad celular presentó su valor máximo en ambas condiciones de luz, con 27.8 pg en LA vs 31 pg en LB (Fig. 15-A, Tabla XVI). A pesar de la diferencia en la concentración inicial de proteína por célula entre condiciones de luz ( $p<0.05$ ; Anexo C, Tabla XXV), la proporción que representa este constituyente con respecto al peso orgánico (%P.O.) fue igual en LA y LB (19.5%; Fig. 17-A; Tabla XVI).

El contenido promedio de proteínas, carbohidratos y lípidos en *Rhodomonas* sp, disminuyó durante las primeras 72 horas (Día 0-3) en los cultivos con LA y LB (Fig. 15). La concentración de proteína fue de 25.3 a 18.7 pg célula<sup>-1</sup> en LA y de 26.3 a 16.2 pg célula<sup>-1</sup> en LB. Del tercer al sexto día, la concentración celular de proteína permaneció constante, y hacia el séptimo día mostró un ligero incremento (Fig. 15-A). Los valores de concentración final fueron de 23.1 (23.6%) y 19.2 (22.2%) pg de proteína por célula en LA y LB respectivamente (Tabla XVI).

A excepción de las primeras 48 horas (Día 0-1), la concentración diaria de proteínas por célula en los cultivos con LA fue mayor que la estimada para cultivos con LB (Fig. 15-A). Sin embargo, sólo hay diferencias estadísticas los días 2, 3, 4 y 7 (Anexo C, Tabla XXV).

El porcentaje de proteínas, aumentó durante las primeras 24 horas en cultivos con LA, mientras que en LB este aumento se dio en 48 horas, El resto del tiempo de cultivo los porcentajes de proteína se mantuvieron constantes en ambas condiciones de luz (Fig 17-A). En células expuestas a LA, se presentó una variación de 19.5-27.3%, mientras que en cultivos con LB fue 19.5-23.8% (Tabla XVI).

El contenido de carbohidratos por célula, al inicio de los cultivos (Día 0), fue significativo entre condiciones de luz ( $p<0.05$ ; Anexo C, Tabla XXV). En cultivos con LA, el contenido inicial de carbohidratos fue 18.85 pg (13.2%) y en

LB 25.59 pg (16%; Fig. 15-B y 17-B). A las 24 horas de cultivo (Día 1), se presentó el máximo contenido de este constituyente en LA y LB, con 25.58 (25.6%) y 29.76 (22.7%) pg célula<sup>-1</sup> respectivamente (Fig. 15-B y 17-B). Después de este día, el contenido celular de carbohidratos disminuyó hasta 8.94 pg célula<sup>-1</sup> (11.9%) en LA y 9.54 pg célula<sup>-1</sup> (13.2%) en LB, para el tercer día. El tiempo restante (Día 3-7), la concentración de carbohidratos fue constante entre valores de  $8.89 \pm 0.34$  pg célula<sup>-1</sup> en LA vs  $9.68 \pm 0.55$  pg célula<sup>-1</sup> en LB (Tabla XVI).

El contenido de carbohidratos, expresado en por ciento y concentración, fue mayor y significativo en las células con LB, durante seis días de cultivo (Fig. 15-B y 17-B; Anexo C, Tabla XXV).

Las figuras 15-C y 17-C, muestran los resultados del contenido de lípidos, para cada condición de luz. Al inicio (Día 0), el contenido de lípidos en células expuestas a LB fue mayor y significativo ( $p < 0.05$ ) respecto al contenido en LA (21.47 vs 19.26 pg célula<sup>-1</sup>). Al igual que el contenido de proteínas y carbohidratos, el contenido de lípidos por célula en ambas condiciones de luz disminuyó de 19.26-11.34 pg en cultivos con LA, y de 21.47-10.64 pg en LB, durante el período de tiempo que comprende la  $F_{exp}$  (Día 0-3; Fig. 15-C).

Durante la  $F_{est}$  (Día 3-7), en ambas condiciones de luz, el contenido de lípidos aumentó a 18.03 pg célula<sup>-1</sup> en LA y 14.65 pg célula<sup>-1</sup> en LB (Fig. 15-C; Tabla XVI).

A excepción del día de inoculación (Día 0), el resto del tiempo de cultivo, el contenido de lípidos en células expuestas a LA fue mayor y significativo ( $p < 0.05$ ) respecto al obtenido en células con LB (Anexo C, Tabla XXV).

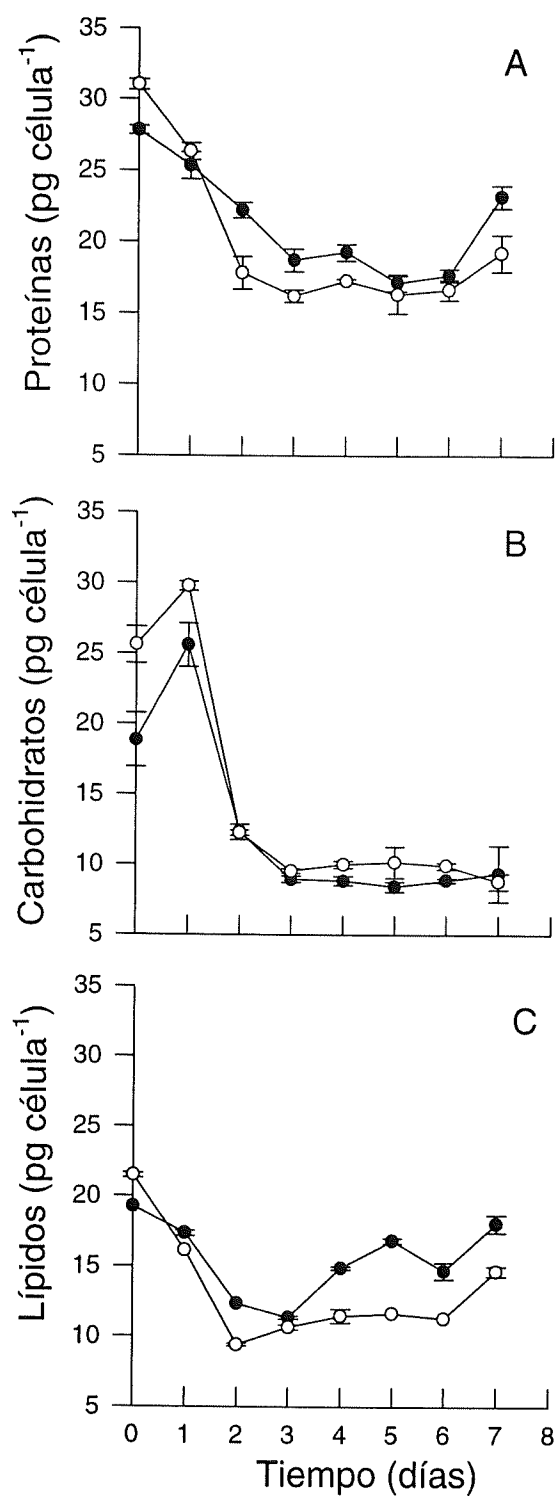
En cultivos con LA, la variación en el contenido porcentual de lípidos fue mayor que en cultivos con LB, el intervalo varió de 13.2-23.6% en LA, y de 12.3-16.9% en LB (Fig. 17-C; Tabla XVI). No se observó una tendencia definida, en el por ciento de lípidos para ninguna condición de luz. Sin embargo, si se comparan los resultados en por ciento de proteínas contra el de lípidos en la

condición de LA, el patrón de las curvas es el mismo. Mientras que en los cultivos con LB, el comportamiento coincide sólo del cuarto día en adelante (Fig. 15-A vs 15-C).

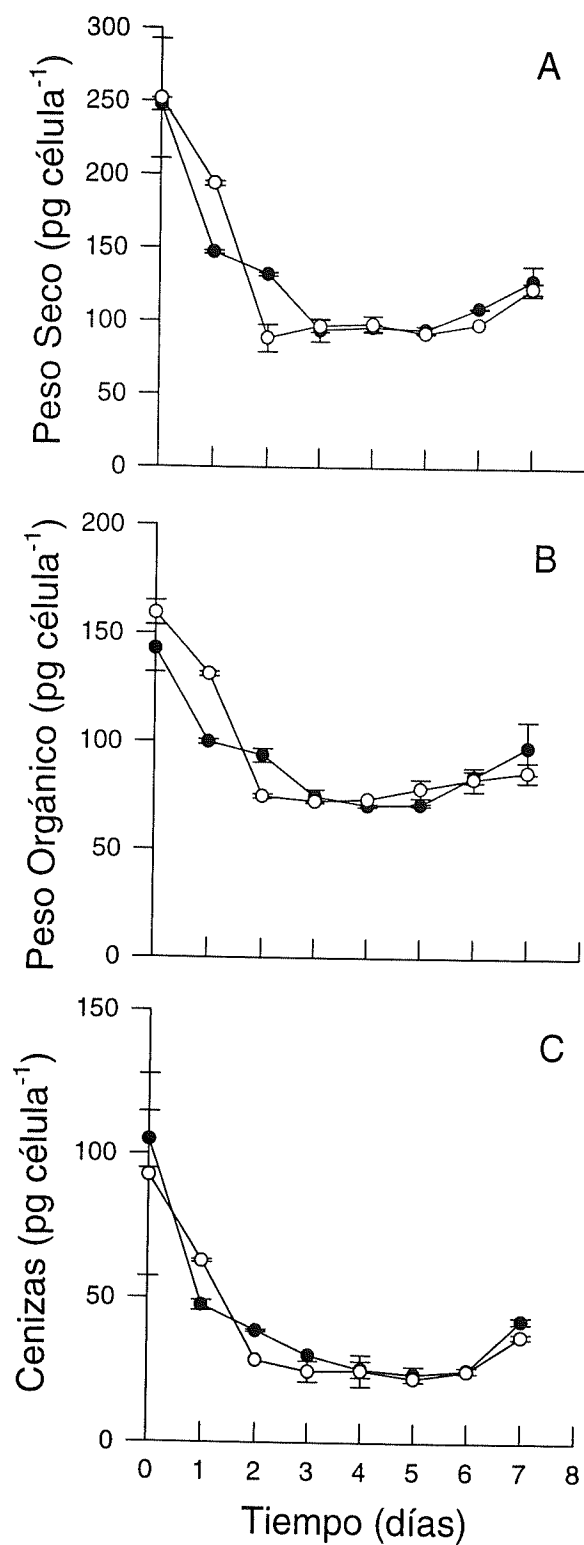
En cuanto a peso seco, peso orgánico y cenizas por célula, se observó un patrón similar entre variables y condiciones de luz (Fig. 16). El día de inoculación (Día 0), el valor de las tres variables es máximo y, de este al tercer día se da una disminución significativa. Del tercer al sexto día, los valores se mantienen constantes y aumentan ligeramente para el séptimo día de cultivo (Tabla XVI). Las diferencias entre condiciones de luz, se presentaron los días 1,2 y 6 para la variable peso seco, los días 1,2 y 7 para peso orgánico y los días 1,2,4 y 7 para cenizas (Anexo C, Tabla XXV).

La concentración promedio de los constituyentes bioquímicos y el contenido de material orgánico por unidad de volumen de cultivo se presenta en la figura 29 (Anexo B), Tabla XVI. En ambas condiciones de luz, los constituyentes bioquímicos aumentan su concentración respecto al tiempo de cultivo, como resultado del crecimiento poblacional.

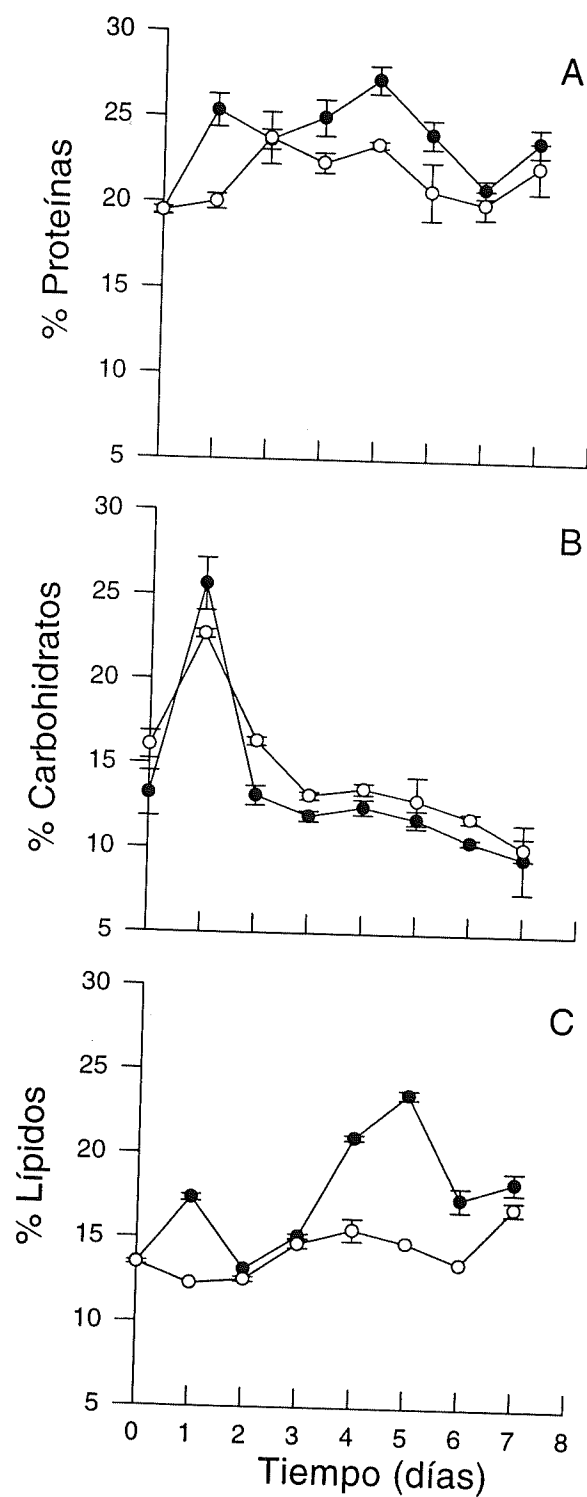
A pesar de las diferencias en el contenido celular de proteínas, la concentración de proteínas por litro de cultivo, fue similar entre condiciones de luz, durante los siete días de cultivo (Anexo B, Fig. 29-A). Sin embargo, la concentración de carbohidratos, lípidos y material orgánico presentó diferencias entre condiciones de luz. En LA, la concentración de lípidos por litro de cultivo fue mayor que en LB, del tercer al séptimo día (Anexo B, Fig. 29-C). Mientras que, en LB el contenido de carbohidratos y material orgánico por litro fue mayor que en LA, en todo el tiempo de cultivo (Anexo B, Fig. 29-B y D).



**Figura 15.** Composición promedio de proteínas (A), carbohidratos (B) y lípidos (C) de *Rhodomonas* sp en cultivos a nivel Garrafón con 18 L, expuestos a condiciones de luz blanca (○) y luz azul (●). La barra indica el error estándar.



**Figura 16.** Peso seco (A), peso orgánico (B) y cenizas (C) de *Rhodomonas* sp en cultivos a nivel Garrafón con 18 L, expuestos a condiciones de luz blanca (○) y luz azul (●). La barra indica el error estándar.



**Figura 17.** Porcentaje promedio de proteínas (A), carbohidratos (B) y lípidos (C), con respecto a peso orgánico, de *Rhodomonas* sp en cultivos a nivel Garrafón con 18 L, expuestos a condiciones de luz blanca (○) y luz azul (●). La barra indica el error estándar.

Tabla XVI. Composición proximal promedio de *Rhodomonas* sp expresada en pg por célula, porcentaje con respecto al peso orgánico (% P.O.) y mg por litro de cultivo, en volumen de 18 L (Garrafón) expuestos a luz azul (A) y luz blanca (B).

A) LUZ AZUL

| Día | Proteínas |           |         | Carbohidratos |           |         | Lípidos   |           |         | Cenizas   |           |         | P.O.    |
|-----|-----------|-----------|---------|---------------|-----------|---------|-----------|-----------|---------|-----------|-----------|---------|---------|
|     | pg<br>cél | %<br>P.O. | mg<br>L | pg<br>cél     | %<br>P.O. | mg<br>L | pg<br>cél | %<br>P.O. | mg<br>L | pg<br>cél | %<br>P.O. | mg<br>L | mg<br>L |
| 0   | 27.8      | 19.4      | 2.9     | 18.8          | 13.2      | 2.0     | 19.3      | 13.5      | 2.0     | 104.7     | 73.3      | 11.0    | 15.0    |
| 1   | 25.3      | 25.3      | 5.0     | 25.5          | 25.6      | 5.1     | 17.3      | 17.4      | 3.4     | 47.4      | 47.5      | 9.4     | 19.8    |
| 2   | 22.2      | 23.7      | 8.2     | 12.3          | 13.1      | 4.5     | 12.3      | 13.2      | 4.5     | 38.7      | 41.3      | 14.3    | 34.5    |
| 3   | 18.7      | 25.0      | 11.6    | 8.94          | 11.9      | 5.5     | 11.3      | 15.1      | 7.0     | 30.1      | 40.3      | 18.7    | 46.3    |
| 4   | 19.3      | 27.2      | 15.9    | 8.85          | 12.5      | 7.3     | 14.9      | 21.0      | 12.3    | 25.4      | 35.9      | 21.0    | 58.5    |
| 5   | 17.1      | 24.1      | 17.0    | 8.41          | 11.8      | 8.3     | 16.8      | 23.6      | 16.7    | 23.7      | 33.3      | 23.5    | 70.5    |
| 6   | 17.6      | 20.9      | 18.9    | 8.87          | 10.5      | 9.5     | 14.7      | 17.4      | 15.7    | 25.2      | 29.9      | 26.9    | 90.0    |
| 7   | 23.1      | 23.6      | 29.1    | 9.36          | 9.6       | 11.8    | 18.0      | 18.4      | 22.7    | 42.4      | 42.7      | 53.3    | 123.0   |

B) LUZ BLANCA

| Día | Proteínas |           |         | Carbohidratos |           |         | Lípidos   |           |         | Cenizas   |           |         | P.O.    |
|-----|-----------|-----------|---------|---------------|-----------|---------|-----------|-----------|---------|-----------|-----------|---------|---------|
|     | pg<br>cél | %<br>P.O. | mg<br>L | pg<br>cél     | %<br>P.O. | mg<br>L | pg<br>cél | %<br>P.O. | mg<br>L | pg<br>cél | %<br>P.O. | mg<br>L | mg<br>L |
| 0   | 31.0      | 19.5      | 3.2     | 25.6          | 16.1      | 2.6     | 21.5      | 13.5      | 2.2     | 92.5      | 58.0      | 9.4     | 16.2    |
| 1   | 26.3      | 20.1      | 5.6     | 29.8          | 22.7      | 6.3     | 16.1      | 12.3      | 3.4     | 62.8      | 47.9      | 13.4    | 28.0    |
| 2   | 17.8      | 23.8      | 8.2     | 12.2          | 16.3      | 5.6     | 9.4       | 12.5      | 4.3     | 28.4      | 37.9      | 13.0    | 34.2    |
| 3   | 16.2      | 22.4      | 11.2    | 9.5           | 13.2      | 6.6     | 10.6      | 14.7      | 7.3     | 24.6      | 34.0      | 17.0    | 50.0    |
| 4   | 17.2      | 23.4      | 14.5    | 10.0          | 13.6      | 8.4     | 11.4      | 15.6      | 9.6     | 24.9      | 33.9      | 21.0    | 62.0    |
| 5   | 16.3      | 20.7      | 18.4    | 10.2          | 12.9      | 11.4    | 11.6      | 14.8      | 13.1    | 22.2      | 28.2      | 25.0    | 88.5    |
| 6   | 16.6      | 20.0      | 21.8    | 9.9           | 11.9      | 13.0    | 11.3      | 13.6      | 14.8    | 24.8      | 29.9      | 32.5    | 108.8   |
| 7   | 19.2      | 22.2      | 28.9    | 8.8           | 10.2      | 13.2    | 14.6      | 16.9      | 22.0    | 36.9      | 42.9      | 56.3    | 130.0   |

## 6. DISCUSIONES

### 6.1. Etapa 1: Efecto de la irradiancia y la concentración de nutrientes (nitrato y fosfato)

#### 6.1.1. Generalidades

La temperatura que se seleccionó para los experimentos fue  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , y representa el promedio del intervalo de temperaturas ( $16\text{-}25^\circ\text{C}$ ) que han sido reportadas para el cultivo de especies de este género (Jónasdóttir, 1994; Brown *et al.*, 1997). Debido a que este parámetro se mantuvo constante entre tratamientos, los resultados expuestos aquí no presentan una influencia directa de este factor en la fisiología de *Rhodomonas* sp.

El intervalo de irradiancias ensayadas en este estudio, se seleccionó a partir de un experimento previo, donde se evaluó la tasa de crecimiento de *Rhodomonas* sp durante la  $F_{\text{exp}}$  bajo diferentes irradiancias (Anexo A, Fig. 22-A). En este experimento previo, el valor de irradiancia necesario para alcanzar el crecimiento máximo ( $I_k$ ) fue  $90 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  con una  $\mu_{\text{máx}}$  de  $0.9 \text{ día}^{-1}$ . Sin embargo, en el trabajo reportado aquí, la máxima tasa de crecimiento fue menor ( $0.73 \text{ día}^{-1}$ ). Esto posiblemente, dada la diferencia en la calidad de luz, entre experimentos. En el trabajo previo, se utilizó luz blanca fría (cool-white), mientras que, para la etapa experimental 1 se usó luz blanca "Daylight". La influencia de la composición espectral de la luz en el crecimiento celular, ha sido reportada también para otras especies de fitoplancton (Wallen y Geen, 1971a y b; Brown y Geen, 1974; Sanchez-Saavedra, 1994).

El pH inicial (Día 0), en todos los tratamientos fue  $7.6 \pm 0.1$ . El pH diario de los cultivos, no presentó diferencias entre tratamientos (Anexo C, Tabla XX). Sin embargo, respecto al tiempo de cultivo, presentó cambios significativos (Anexo A, Fig. 19). Estos cambios, estuvieron asociados al crecimiento poblacional y a la actividad fotosintética (Figs. 1, 8). En todos los tratamientos, la variación del pH se correlacionó directamente con la tasa de crecimiento ( $\mu$ )

y de fijación de carbono, ya que, durante el crecimiento exponencial ( $F_{exp}$ , Día 2-4), conforme la biomasa se incrementa, existe un mayor consumo de carbono. Lo que ocasiona que la concentración de  $CO_2$  en el medio disminuya, y se origine un incremento del pH, hasta valores de 10 (Anexo A, Fig. 19). En este trabajo, bajo la condición inicial promedio de pH, la mayor parte ( $> 95\%$ ) del carbono inorgánico, que esta disponible para el crecimiento microalgal, se encuentra en forma de bicarbonato (Falkowski y Raven, 1997). Cuando el carbono del  $HCO_3^-$  es utilizado 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, de nuevo equilibra al medio, donde debido a la liberación de iones  $OH^-$ , el pH se incrementa, mientras la concentración de carbono inorgánico disminuye (Uusitalo, 1996).

En las doce condiciones experimentales, el crecimiento y la tasa de fijación de carbono disminuyen significativamente (Figs. 1, 8), después del máximo valor de pH alcanzando (Día 4). La presencia de la  $F_{est}$  y la disminución en el consumo de carbono, pueden estar asociadas con el efecto del pH sobre la disponibilidad del carbono. Ya que, las concentraciones relativas de las especies químicas de carbono, están en función del pH (DeBoer, 1994; Falkowski y Raven, 1997). A pH mayor a 9, el sistema del  $CO_2$ , se desplaza hacia la formación de carbonatos ( $CO_3^{2-}$ ), por lo cual, el carbono remanente no esta disponible para el crecimiento microalgal. Esta respuesta en el crecimiento, ha sido reportada por Kaplan *et al.* (1986) y Fogg y Thake (1987), quienes señalan que el crecimiento microalgal es afectado a valores de pH entre 10 y 11.

### 6.1.2. Crecimiento microalgal

En cultivos estáticos, el incremento en el número de células sigue un patrón característico, en el cual se observan diferentes fases en relación al tiempo y las condiciones de cultivo. En este estudio, las curvas de crecimiento obtenidas para los 12 tratamientos (Fig. 1), presentan la fase de crecimiento exponencial ( $F_{exp}$ ) y estacionario ( $F_{est}$ ), y sólo los tratamientos que inician con menor concentración de nutrientes presentan la fase de muerte ( $F_{dec}$ ). Aunque existen diferencias en densidad celular diaria entre los tratamientos (Anexo C, Tabla XX), las fases de crecimiento coinciden en el tiempo (Anexo A, Fig. 18).

Al inicio de los cultivos (Día 0-2), la densidad celular entre tratamientos no fue significativa (Anexo C, Tabla XX), debido a que, las células de *Rhodomonas* sp usadas como inoculo, fueron cultivadas en las mismas condiciones ( $92 \mu E m^{-2} s^{-1}$  y medio f/2). En la condición “madre”, la división celular no fue significativa ( $F_{est}$ ), pero las células presentaban crecimiento intracelular y al reestablecerles nuevas condiciones de cultivo, su ciclo de crecimiento y la división celular en todas las condiciones experimentales continúa (Tablas I-IV). Observaciones similares en el ciclo de crecimiento, han sido reportadas por Puiseux-Dao (1981), quien menciona que cuando las condiciones de vida se vuelven inadecuadas para la célula, el metabolismo celular disminuye y las células entran en un estado de aletargamiento. Sin embargo, tan pronto como las condiciones ambientales son favorables, las células se recuperan y toman su curso normal en su ciclo celular (interfase y mitosis) de crecimiento.

Durante la  $F_{exp}$  (Día 0-4), se observó un incremento en la tasa de crecimiento para todos los tratamientos (Tabla I-IV), encontrándose diferencias debidas al efecto sinérgico de la irradiancia y la concentración de nutrientes. Al relacionar la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) con el nivel de irradiancia de cultivo (curvas  $\mu$ -I), se observó un comportamiento similar a la cinética de Michaelis-Menten (Anexo A, Fig. 22). La tasa de crecimiento ( $\mu$ ), aumenta en función de

la irradiancia hasta alcanzar un valor asintótico ( $\mu_{\text{máx}}$ ), donde el sistema se satura ( $I_k$ ), y  $\mu$  es independiente del nivel de irradiancia. Sin embargo, el comportamiento característico de las curvas obtenidas difiere como respuesta a las diferentes condiciones de nutrientes evaluadas (Anexo A, Fig. 22-B). Para cultivos con menor nutriente, se obtuvo un valor de  $I_k$  mayor y  $\mu_{\text{máx}}$  menor, en relación al medido en la condición control y de mayor nutriente, respectivamente. Lo que indica que, un alga cultivada en un medio con bajo nivel de luz o de nitrógeno, podría incrementar su tasa de crecimiento como respuesta a un aumento en el nivel de irradiancia o en la tasa de suministro de nutrientes. Brand y Guillard (1981), evalúan el crecimiento de 22 especies respecto al nivel de irradiancia de cultivo, encontraron que, las curvas  $\mu$ - $I$  reflejan una respuesta específica determinada por la clase taxonómica, el hábitat y la historia de luz. Reportan además, que para una misma especie, la respuesta intraespecífica microalgal está principalmente asociada a su historia de luz. Por otra parte, Maddux y Jones (1964), en cultivos de *Nitzschia closterium* y *Tetraselmis* sp, muestran que la diferencia en la concentración de nutrientes produce cambios en el requerimiento de luz para alcanzar  $\mu_{\text{máx}}$ . En su trabajo, la relación entre  $I_k$  y la concentración de nutrientes fue directa (menor  $I_k$  a menor nutriente), y contraria a la reportada aquí. Sin embargo, Rhee y Gotham (1981) y Healey (1985), en otras especies, encuentran un comportamiento similar al observado en este estudio, y lo atribuyen a una relación compensatoria entre la disponibilidad de luz y/o nutriente.

Cuando la población de *Rhodomonas* sp entra a la  $F_{\text{est}}$  (Día 4), las diferencias en el crecimiento entre tratamientos, son evidentes y significativas (Fig. 1). El crecimiento, en  $F_{\text{est}}$ , es resultado directo de la concentración residual de nutrientes y su disponibilidad para el desarrollo microalgal, durante este período de tiempo. Para los cultivos con mayor concentración de  $\text{NO}_3^-$ , el remanente en el medio al cuarto día ( $\sim 660 \mu\text{M}$ ), permitió mantener tasas de crecimiento superiores a las obtenidas en los tratamientos control y de menor

nutriente respectivamente. Lo cual, afectó la densidad celular final (rendimiento), producto de la concentración inicial de nutriente (Anexo A, Fig. 20). Siendo las diferencias entre tratamientos significativas (Anexo C, Tabla XX). Estos resultados son similares a los reportados por Lewitus y Caron (1990), quienes evaluaron el crecimiento de *Pyrenomonas salina* en cultivos con diferentes concentraciones de nitrógeno y fósforo, establecen una correlación directa entre el rendimiento final obtenido en la  $F_{est}$  y la concentración inicial de nutriente. Por su parte, Fogg y Thake (1987), señalan que el rendimiento final alcanzado en la fase estacionaria, depende de la naturaleza del factor limitante. Si un nutriente es limitante, se espera que la biomasa sea proporcional a la cantidad de nutriente suministrado inicialmente.

En  $F_{est}$ , la relación entre el crecimiento y el nivel de irradiancia, no tuvo una tendencia definida (Fig. 1). Probablemente, por que la condición de nutrientes influyó en mayor medida en la tasa de crecimiento. Sin embargo, otros procesos fisiológicos, como la tasa fotosintética (Figs. 8,9) y el contenido celular de clorofila *a* (Fig. 4), si reflejan claramente el efecto de la irradiancia durante esta etapa del ciclo de crecimiento. Cuando un alga pasa del crecimiento exponencial al crecimiento estacionario, se presentan cambios significativos en su patrón metabólico y en su composición celular. Morris (1981), puntualiza que estos cambios fisiológicos, están determinados directamente por las condiciones del medio circundante.

La presencia de la  $F_{dec}$ , en los tratamientos con menor nutriente (Fig. 1), se relacionó con la disminución en la tasa de fijación de carbono y del contenido de clorofilas, ocasionada tanto por el nivel de irradiancia, como por la disponibilidad de  $NO_3^-$  (Tabla V-B) y  $PO_4^{3-}$  (Tabla VI-A) para las células cultivadas en estas condiciones.

### 6.1.3. Consumo de Nitrato y Fosfato

En las distintas condiciones de luz y nutrientes, durante las primeras 24 horas (Día 0-1) de cultivo, se midió el mayor consumo por célula de nutrientes

(Tablas V, VI). Además, en este período de tiempo, se tuvo una mínima tasa de crecimiento de  $0.32 \text{ día}^{-1}$  y una máxima de  $0.88 \text{ día}^{-1}$  (Tablas I-IV). Tomando en consideración que las células “madre” provienen de una condición en  $F_{\text{est}}$ , es de suponerse que se den ajustes en la fisiológica celular para que la fase de crecimiento activo se presente (Puisseux-Dao, 1981). Esta respuesta inmediata a las condiciones de nutrientes, coincide con el aumento en la actividad de las enzimas involucradas en el consumo y asimilación de nitrógeno, que ha sido observado también en otros organismos fitoplanctónicos (McCarthy, 1981; Syrett, 1981; Dortch *et al.*, 1984). Aunado a esto, observaciones realizadas por Dortch *et al.* (1984), señalan que el tiempo requerido para que se dé un incremento en la biomasa celular es de 0 a 9 horas, cuando la condición de nitrógeno es reestablecida en cultivos limitados. Sin embargo, se ha visto que otras respuestas adaptativas, como la reestructuración del aparato fotosintético, requieren períodos de tiempo mayores para llevarse a cabo (Berner *et al.*, 1989; Lewitus y Caron, 1990). Por su parte, Shifrin y Chisholm (1981) reportan que una vez que la condición de  $\text{NO}_3^-$  es reestablecida en cultivos de *Oocystis polyformis* con tasa de crecimiento cercana a cero bajo condiciones severas de deficiencia de nitrógeno, la tasa de consumo de  $\text{NO}_3^-$  es 3.3 veces mayor que la obtenida en células creciendo en condiciones ricas de nitrógeno con  $\mu$  de  $0.9 \text{ día}^{-1}$ .

Para todos los tratamientos, en las primeras 96 horas de cultivo que corresponden a la  $F_{\text{exp}}$ , la concentración residual de los macronutrientes disminuyó, mientras que, la densidad celular aumentó significativamente (Figs. 1, 2 y 3). Debido a que, la población se duplica progresivamente y crece exponencialmente, el requerimiento de nutrientes para cubrir las demandas fisiológicas es mayor. En las distintas condiciones de irradiancia, la densidad celular se correlacionó directamente con el consumo total acumulado de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  durante la  $F_{\text{exp}}$ . Aunque se ha reportado que el consumo de  $\text{NO}_3^-$  es

estimulado por la luz (Cloern, 1977; Syrett, 1981), los datos reportados aquí no demuestran con claridad esta relación (Tabla V-B).

Por otra parte, las diferencias en el consumo de  $\text{NO}_3^-$ , no fueron tan marcadas como en el consumo de  $\text{PO}_4^{3-}$ . Lo cual, está relacionado con los mecanismos que regulan el consumo de cada uno de estos nutrientes. El consumo total de  $\text{NO}_3^-$ , está regulado principalmente por las necesidades celulares, determinadas a su vez por el estado fisiológico. Mientras que, las diferencias en el consumo total de  $\text{PO}_4^{3-}$ , entre condiciones de nutrientes responden directamente a su concentración en el medio (Fig. 3). Está documentado, que cuando existen altas concentraciones de fósforo inorgánico en el medio, las células consumen en exceso este nutriente, y tienen la capacidad de almacenarlo en forma de polifosfatos dentro de gránulos citoplasmáticos (Fogg y Thake, 1987; Darley, 1987).

Durante la  $F_{\text{est}}$ , el consumo total de  $\text{NO}_3^-$  entre tratamientos fue diferente, como resultado de las diferencias en su concentración residual en el medio (Tabla V-A). Además, la disponibilidad del  $\text{NO}_3^-$ , fue un factor que influyó en las tasas de crecimiento de *Rhodomonas* sp obtenidas durante este período de tiempo (Tablas I-IV) y se correlacionó directamente con el rendimiento final de cada tratamiento (Anexo A, Fig. 20).

En todas las condiciones ensayadas, al inicio de la  $F_{\text{est}}$  la concentración residual de  $\text{PO}_4^{3-}$  fue baja (0.21-4.11  $\mu\text{M}$ ), debido a que en la  $F_{\text{exp}}$  se consumió más del 95% del fosfato contenido en los cultivos (Fig. 4). Al cuarto día, la concentración residual de  $\text{PO}_4^{3-}$ , estuvo directamente relacionada con la condición de nutriente, y fue independiente de la condición de irradiancia. Durante la  $F_{\text{est}}$ , no fue posible determinar el consumo total del  $\text{PO}_4^{3-}$ , debido a que se detectó un aumento en su concentración residual (Tabla VI-A). El incremento desfasado entre tratamientos, estuvo relacionado con concentraciones de  $\text{PO}_4^{3-}$  menores a 0.5  $\mu\text{M}$  y a la actividad de las fosfatasa alcalinas. En general, se ha observado, que la inducción de la actividad de las

fosfatasas alcalinas, asociadas a la pared celular, esta relacionada con la disminución en la concentración de fósforo inorgánico en el medio (McCarthy, 1981). Esta actividad enzimática, facilita la utilización del fósforo orgánico, hidrolizándolo y produciendo fósforo inorgánico a partir de él, en la vecindad inmediata de la superficie celular (Raymont, 1980; McCarthy, 1981; Darley, 1987). En cultivos de *Dunaliella tertiolecta* en crecimiento estacionario con concentraciones de  $\text{PO}_4^{3-}$  menores a  $0.05 \mu\text{M}$ , se ha observado actividad de las enzimas fosfatasas alcalinas (Graziano *et al.*, 1996). Además, los resultados de Graziano *et al.* (1996), demuestran que la producción de  $\text{PO}_4^{3-}$  fue 2 a 3 veces mayor que la tasa máxima de consumo del nutriente. En el presente estudio, aunque no se midió la actividad de las enzimas, es posible que las diferencias entre la producción por hidrólisis y el consumo del nutriente, expliquen por que no fue posible determinar el consumo de  $\text{PO}_4^{3-}$  en los cultivos de *Rhodomonas* sp, durante la  $F_{\text{est}}$ . Además, confirman que el requerimiento de  $\text{PO}_4^{3-}$  por célula en los diferentes tratamientos, estuvo cubierto por las reservas de polifosfatos y por la producción de fósforo inorgánico a partir de la actividad de las fosfatasas alcalinas.

Las diferencias del crecimiento entre tratamientos, durante la  $F_{\text{est}}$ , se correlacionan con la disponibilidad del  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  en el medio de cultivo, y reflejaron diferentes rendimientos finales (Fig. 1). Por otro lado, la presencia de la  $F_{\text{dec}}$ , en los cultivos con menor nutriente en todas las condiciones de irradiancia, estuvo relacionada con la disminución del consumo de  $\text{NO}_3^-$  por célula (Tabla V-C).

#### 6.1.4. Contenido de Clorofilas

El contenido total de clorofilas (a y c), presentó una relación inversa con el nivel de irradiancia y una relación directa con el nivel de nutrientes (Figs. 5, 7). Sin embargo, al estandarizar el contenido de clorofila por célula, su relación con los factores de estudio cambió (Figs. 4, 6). Además, se observó una alta

correlación entre el contenido total de clorofila *a* y la densidad celular, para todos los tratamientos experimentales (Anexo A, Fig. 21). Se considera entonces, que la respuesta en el contenido total de clorofilas, estuvo determinada por el crecimiento poblacional. En las condiciones de cultivo evaluadas en este estudio, se confirma que el contenido total de clorofila es una medida de la productividad del sistema, en términos de biomasa, pero no refleja el estado fisiológico de las células que integran la población. Esto, se ha visto también cuando se consideran otros factores como la salinidad. Jiménez y Niell (1991), evaluaron el efecto de la salinidad en cultivos de *Dunaliella viridis*, y observaron que el contenido total de clorofila *a* y carotenoides disminuye conforme aumenta la salinidad. Mientras que, el sentido de esta relación cambia cuando el contenido pigmentario es expresado por célula. Estos autores, tratan de explicar esta discrepancia por las diferencias en las tasas de crecimiento entre las condiciones evaluadas.

En los diferentes tratamientos, el contenido de clorofila *a* por célula varió respecto al tiempo de cultivo (Fig. 4). En los primeros días (Día 1-3), el contenido celular de clorofila *a* aumenta y las diferencias entre tratamientos responden a las condiciones de nutrientes (Anexo C, Tabla XXI). La relación entre el contenido celular de clorofila *a* y el nivel de nutrientes fue inversa (Fig. 4). Cultivos con menor concentración inicial de nutriente, producen mayor concentración celular de clorofila *a* (Tabla VII-A). Esta respuesta, se debe a que en los tratamientos con menor nutriente, las tasas de crecimiento fueron menores (Tablas I-IV) y los consumos por célula de  $\text{NO}_3^-$  fueron mayores (Tabla V-C) que los medidos en los tratamientos control y de mayor nutriente respectivamente. El nitrógeno, es un elemento formador de las clorofilas y de las proteínas asociadas a ellas, y se ha reportado que su disponibilidad influye en la concentración de los pigmentos celulares (Herzig y Falkowski, 1989; Turpin, 1991; Geider *et al.*, 1993).

Del tercero al séptimo día de cultivo, el contenido de clorofila *a* por célula disminuye y las diferencias entre tratamientos, responden a las condiciones de irradiancia (Anexo C, Tabla XXI). La tendencia a disminuir el contenido celular de clorofila *a*, estuvo directamente asociada con la división celular. Mientras que, la tasa de crecimiento disminuye, el crecimiento intracelular continúa, lo que origina que la célula ajuste a largo plazo su contenido pigmentario de acuerdo a las condiciones de irradiancia que prevalecen en el cultivo. La relación inversa entre el contenido de clorofila *a* por célula y el nivel de irradiancia (Anexo A, Fig. 24), puede deberse a una disminución en el número y/o el tamaño de las unidades cosechadoras de luz como respuesta de la microalga al aumento en la disponibilidad de energía luminosa. La reducción del contenido de pigmentos celulares, se considera un proceso de autoregulación del aparato fotosintético para alcanzar un balance entre la ganancia de luz y la demanda de energía necesaria para el mantenimiento y crecimiento microalgal. Este comportamiento, ha sido también observado en otras especies de fitoplancton marino (Durbin, 1974; Jeffrey y Vesk, 1977; Chan, 1978; Claustre y Gostan, 1987; López-Muñoz *et al.*, 1992).

#### **6.1.5. Fijación de Carbono**

Para todos los tratamientos, al inicio de los cultivos (Día 1-2), la tasa de fijación de carbono por célula por hora se mantuvo constante (Fig. 8), mientras que, expresada por unidad de clorofila *a* disminuyó ligeramente (Fig. 9). Durante las primeras 48 horas, las células están en crecimiento activo y la población se duplica en 24 horas (Tablas I-IV). Por otra parte, se observa un consumo significativo de  $\text{NO}_3^-$  por unidad celular (Tabla V-C). La ruta de asimilación de nitrógeno inorgánico esta íntimamente ligada con el metabolismo del carbono, ya que depende de sustratos de carbono orgánicos, reductantes y ATP que son suministrados por los procesos fotosintéticos y respiratorios (Turpin, 1991). Por ello, el comportamiento observado en las tasas de fijación

de carbono por *Rhodomonas* sp, esta determinado en cierta medida, por el consumo y asimilación de  $\text{NO}_3^-$  (Falkowski y Raven, 1997). Además, por el estado fisiológico de las células (composición bioquímica), que influye en los procesos celulares a seguir (Morris, 1981). Quizás en este periodo de tiempo, las células no requieren aumentar su consumo de carbono, por que presentan concentraciones suficientes de carbohidratos de reserva, que vía glicólisis pueden ser destinados a la síntesis proteica. Por otra parte, para poder sintetizar las proteínas necesarias, el  $\text{NO}_3^-$  consumido debe ser reducido a  $\text{NH}_4^+$ , antes de ser incorporado a los aminoácidos (Syrett, 1981), y para llevar a cabo este proceso celular, se requiere un alto gasto energético y de poder reductor (Thompson *et al.*, 1989). En cultivos de *Chlamydomonas*, en condiciones de baja irradiancia, más del 40% del reductante producido fotosintéticamente es usado en la reducción del  $\text{NO}_3^-$  (Falkowski y Raven, 1997). Por lo que, temporalmente, existe una competencia directa por los electrones generados fotoquímicamente entre los sistemas de asimilación de  $\text{CO}_2$  y  $\text{NO}_3^-$ , que puede reducir e inclusive suprimir la fijación de  $\text{CO}_2$  (Shifrin y Chisholm, 1981; Syrett, 1981; Falkowski y Raven, 1997).

A partir del segundo día de cultivo, en todos los tratamientos evaluados, se observó una correlación directa entre la tasa de crecimiento y la tasa de fijación de carbono, expresada por célula o por unidad de clorofila *a* (Figs. 8, 9). En la  $F_{\text{exp}}$ , ambas aumentan, mientras en la  $F_{\text{est}}$  disminuyen. Asimismo, el consumo de nutrientes por célula, disminuye conforme aumenta el tiempo de cultivo (Tablas V, VI). El comportamiento en las tasas de fijación de carbono respecto a la fase de crecimiento, puede estar relacionado con la actividad de las enzimas involucradas en el proceso de fijación de  $\text{CO}_2$  y/o a la disponibilidad de  $\text{CO}_2$ . Falkowski y Raven (1997), señalan que la respuesta en el contenido de RubisCO (Ribulosa Bifosfato Carboxilasa-Oxigenasa), puede variar en función de la tasa de crecimiento y del estado de nutrientes. Para cultivos de *Dunaliella tertiolecta*, Graziano *et al.* (1996), reportan que la

abundancia relativa de RubisCO, en base al total de proteínas, disminuye un 30% conforme la tasa de crecimiento disminuye y el grado de limitación por fósforo aumenta. Sus resultados demuestran que las células en  $F_{est}$  presentan menor actividad de la Rubisco que las células en  $F_{exp}$ , y concuerdan con los reportados por Geider *et al.* (1993), para células de *Phaeodactylum tricornutum* cultivadas en diferentes condiciones de N y Fe.

Para las distintas condiciones de cultivo, la tasa de fijación de carbono presentó una correlación directa con el nivel de irradiancia durante la  $F_{exp}$ . Notándose, un incremento con la irradiancia, en las tres condiciones de nutrientes (Anexo A, Fig. 23). En la  $F_{est}$ , la relación entre la tasa de fijación de carbono y la irradiancia fue inversa. Esto quiere decir, que células en crecimiento estacionario, disminuyen su capacidad fotosintética conforme aumenta la disponibilidad de luz (fotoinhibición). El efecto de la irradiancia sobre la tasa de fijación de carbono por unidad celular, es determinado por el estado fisiológico de las células. Durante la  $F_{exp}$ , el aumento en el nivel de irradiancia, ocasiona una mayor captación de energía luminosa y un incremento en la eficiencia de utilización de la luz, que se vio reflejado en una mayor tasa de fijación de carbono. Mientras que, en  $F_{est}$ , las condiciones del medio influyen en la fisiología, disminuye la tasa de división celular (Fig. 1) y el contenido de clorofilas (Figs. 4, 6), por lo cual, el aumento en la irradiancia tuvo un efecto negativo en las distintas condiciones de nutrientes.

La tasa de fijación de carbono se relacionó inversamente con la condición de nutrientes (Figs. 8, 9). En los tratamientos con menor nutriente, la tasa de fijación de carbono y el consumo celular de  $\text{NO}_3^-$  fue mayor que las obtenidas en los tratamientos control y de mayor nutriente, respectivamente. Sin embargo, las tasas de crecimiento se correlacionan directamente con el nivel de nutrientes (Fig. 1). Estas diferencias entre los tratamientos, posiblemente se deban a diferencias en las rutas metabólicas seguidas por las microalgas bajo las distintas condiciones de cultivo. Morris (1981), señala que

en células cultivadas bajo condiciones que promueven la síntesis de productos de reserva (carbohidratos), se obtienen altas tasas de fijación de carbono que pueden ocasionar sobre-estimaciones de las tasas de crecimiento. Por otra parte, Raymont (1980), puntualiza que aún cuando el crecimiento (división celular) y la actividad fotosintética están íntimamente relacionadas, la respuesta de estos procesos metabólicos a condiciones fisico-químicas variantes, no siempre son iguales, los requerimientos de luz difieren, y el crecimiento máximo es alcanzado a intensidades de luz menores que las necesarias para alcanzar la fotosíntesis máxima (Raymont, 1980; Morris, 1981).

## 6.2. Etapa 2: Efecto de la calidad de luz en la producción de *Rhodomonas* sp.

### 6.2.1. Generalidades

Durante esta etapa de estudio, la concentración de nutrientes fue 1323  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaNO}_3$  y 58.5  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , mientras que, la temperatura se mantuvo en  $19 \pm 1^\circ\text{C}$ , la salinidad en 32‰, la aireación en  $4.5 \text{ L min}^{-1}$  y la irradiancia en  $52 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Como el nivel de irradiancia fue el mismo para las diferentes condiciones de calidad de luz, entonces el flujo de fotones por unidad de área (PPFD) fue igual. Sin embargo, al convertir la irradiancia ( $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) a unidades de energía ( $\text{W m}^{-2}$ ), dividiendo los valores de irradiancia por un factor de 4.6 para LB y 3.8 para LA (Lüning, 1981), se observa una variación entre condiciones de calidad de luz. El contenido energético, calculado de esta manera, fue 11.30 y 13.68  $\text{W m}^{-2}$  para LB y LA respectivamente, obteniéndose una diferencia de 2.38  $\text{W m}^{-2}$ . Lo que significa que, la LA contiene un 20% más de energía que la LB. La diferencia en el contenido energético entre condiciones de calidad de luz, es explicada por la teoría cuántica de Plank, donde se establece que la energía de un fotón, conocida como cuanto, es inversamente proporcional a su longitud de onda. Es decir, los fotones de luz azul, que son emitidos en longitudes de onda entre 425-490 nm, contienen más energía que los fotones que integran la luz roja de longitudes de onda de 640 a 740 nm.

En este trabajo, se hace referencia a la calidad de luz experimental como luz azul (LA), debido a que la composición espectral de ella, esta representada principalmente por longitudes de onda de este color (Anexo B, Fig. 25). Sin embargo, hay que considerar que longitudes de onda en la banda del color violeta (400-425 nm) y verde (490-560 nm), contribuyen también en la composición espectral de lo que llamaremos LA. Por otra parte, la composición espectral de la luz blanca tipo Daylight (LB) esta compuesta por un intervalo de

longitudes de onda entre los 400 y 740 nm. Mientras que, en el espectro de emisión de LA, la contribución de la luz con longitudes de onda mayores a 560 nm no se considera significativa, en LB la contribución de las bandas del amarillo, anaranjado y rojo resulta importante (Anexo B, Fig. 25).

### **6.2.2. Crecimiento microalgal**

Para los tres niveles de cultivo, la densidad celular inicial fue igual y las fases de crecimiento coincidieron en el tiempo, entre condiciones de LA y LB. Sin embargo, los cultivos en LB presentaron mayor tasa de crecimiento y alcanzaron una densidad celular final superior que los cultivos con LA (Fig. 10). Una respuesta similar, ha sido observada, en microalgas como *Thalassiosira pseudonana* (Flaak y Epifanio, 1978) y *Chaetoceros* sp (Correa-Reyes, 1993; Sanchez-Saavedra, 1994). Mientras que, en otros trabajos que evalúan el efecto de la calidad de luz en el crecimiento, se reporta un mayor crecimiento en condiciones de LA (Wallen y Geen, 1971a; Brown y Geen, 1974; Humprey, 1983). O bien, especies como *Stephanopyxis turris*, no presentan cambios en las tasas de crecimiento respecto a la calidad de luz de cultivo (Jeffrey y Vesk, 1977). Las diferencias en el crecimiento, pueden estar relacionadas con características propias de la especie, como su composición pigmentaria. Ya que, el contenido y composición de los pigmentos accesorios a la clorofila *a*, influye en la capacidad de captación de la energía luminosa en un determinado intervalo de longitudes de onda (Correa-Reyes, 1993). Sin embargo, al comparar resultados sobre la influencia de la calidad de luz en la fisiología microalgal, se debe tomar en cuenta que la distribución espectral de un mismo "color de luz" puede no ser idéntica entre trabajos. Por lo cual, la radiación fotosintéticamente utilizable (PUR) no sería igual entre las diferentes distribuciones espectrales (Rivkin, 1989).

### **6.2.3. Consumo de Nitrato y Fosfato**

Los resultados de consumo total de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ , para el nivel Erlenmeyer y Fernbach, no reflejan diferencias entre condiciones de luz (Anexo C, Tablas XXIII, XXIV). Mientras que, a nivel Garrafón, el consumo total de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  fue mayor en LB respecto al determinado en LA (Anexo C, Tabla XXV). Estas diferencias se deben principalmente, a la densidad celular alcanzada en cada condición de luz (Fig. 10).

Al estandarizar el consumo de  $\text{NO}_3^-$  por unidad celular, se presentaron diferencias entre condiciones de luz, solo durante las primeras 48 horas de cultivo a nivel Garrafón (Tabla XIII-C). A partir del segundo día, las células cultivadas con LB consumieron la misma cantidad de  $\text{NO}_3^-$  que aquellas cultivadas en LA. Por lo cual, podemos concluir que el consumo celular de  $\text{NO}_3^-$  no estuvo influenciado por la calidad de luz.

El consumo de  $\text{PO}_4^{3-}$  por célula, entre condiciones de luz a nivel Garrafón, presentó diferencias a partir del quinto día de cultivo (Tabla XIV-C). Estos resultados, muestran que en LB, el consumo de  $\text{PO}_4^{3-}$  por célula fue mayor que el obtenido en LA. Estas diferencias, quizá están determinadas por el estado fisiológico de las células más que por el efecto de la calidad de luz. En los cultivos con LB, la tasa de crecimiento durante este tiempo (Día 5-7) fue mayor que en los cultivos con LA (Tabla VII). Por lo cual, el requerimiento del nutriente fue mayor en las células cultivadas con LB creciendo en  $F_{\text{est}}$ . El requerimiento de fósforo depende de su utilización en las funciones metabólicas celulares.

#### **6.2.4. Contenido de Clorofilas**

Aunque, a nivel Erlenmeyer y Garrafón, el contenido total de clorofila *a* y *c*, presentó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre condiciones de luz, al observar los valores estandarizados por célula, no se presentaron diferencias diarias significativas en ninguno de los niveles de cultivo (Anexo C, Tablas XXIII-XXV). Las diferencias en el contenido total de clorofila entre las

condiciones de luz, fueron determinadas por las diferencias en el crecimiento, y se correlacionan directamente con la densidad celular (Anexo B, Fig. 28). En este trabajo, la concentración de clorofila por célula resultó similar entre condiciones de luz, debido a que la contribución de la luz verde-azul en la composición espectral de la LB es mayor que la de luz roja (Anexo B, Fig. 25-B). Autores como Hase (1980), Brinkmann y Senger (1980) y Senger *et al.* (1980), evalúan el efecto de la calidad de luz sobre la formación de ácido 5-aminolevulinico (ALA) en relación a la biosíntesis de clorofila, y encuentran que en células que crecen con luz azul ambos procesos son estimulados, en comparación con células cultivadas en luz roja (LR). Asimismo, Kamiya y Miyachi (1980), reportan que el contenido de clorofila (*a* y *c*) de células de *Ochromonas* sp en  $F_{est}$  fue mayor en LA e igual en LR, respecto a LB ( $LA > LR = LB$ ). En su caso, existió una mayor contribución de la LR en la composición espectral de la LB, lo que originó un comportamiento similar entre estas condiciones de luz. Por su parte, Rivkin (1989) cultivó *Dunaliella tertiolecta* y *Thalassiosira rotula*, en un intervalo amplio de irradiancias ( $12-200 \mu E m^{-2} s^{-1}$ ) y encontró una mayor concentración de clorofila *a* en condiciones de LB, seguidas por LA y LR, respectivamente. Sin embargo, otros autores han reportado una respuesta diferente para *D. tertiolecta* y *T. rotula* respecto a la calidad de luz (Wallen y Geen, 1971b; Veski y Jeffrey, 1977). Por lo cual, se debe tener en cuenta que además de las diferencias entre especies, la respuesta fisiológica de una misma especie puede ser modificada debido a condiciones de cultivo como la composición química del medio, el nivel de irradiancia y la composición espectral de la luz empleada.

A nivel Erlenmeyer y Fernbach, se observó un aumento en el contenido de clorofila *a* y *c* por célula, el cual coincide con la  $F_{exp}$ , y disminuye en la  $F_{est}$  (Figs. 13, 14A y B). Mientras que, la razón clorofila *a/c*, en ambos niveles de cultivo, fue similar en el tiempo y entre condiciones de luz (Tabla XV-A y B).

La concentración de clorofila *a* y *c* por célula, en el nivel Garrafón, mostró un aumento respecto al tiempo de cultivo, independientemente de la calidad de luz (Figs. 13, 14-C). Además, la razón de clorofila *a/c* disminuyó durante los siete días de cultivo. Esta razón, varió de 3.8 a 3.2, tanto en LA como en LB (Tabla XV-C). Los cambios en el contenido pigmentario, reflejaron una respuesta de fotoaclimatación de las células asociada con la edad del cultivo, que fue producto del efecto del autosombreado debido al crecimiento poblacional. Brown *et al.* (1996), reportan que el aumento en la densidad celular, ocasiona una reducción del 20-25% en la irradiancia que penetra hacia el interior de cultivos de *Thalassiosira pseudonana* al culminar la  $F_{exp}$  mientras que, en  $F_{est}$  la disminución en la disponibilidad de luz fue 30-40%.

#### **6.2.5. Composición proximal a nivel Garrafón (18 L)**

##### **6.2.5.1. Diferencias en el tiempo de cultivo (fases de crecimiento)**

El mayor contenido de constituyentes bioquímicos se presentó al inicio de los cultivos (Día 0), en ambas condiciones de luz (Figs. 15, 16). Esto se debió a la condición de las células provenientes del nivel Fernbach, usadas como inóculo para el nivel de 18 L, las cuales se encontraban en  $F_{est}$  (Fig. 10). El incremento del tamaño celular durante la  $F_{est}$ , en cultivos estáticos, es comúnmente observado en especies fitoplanctónicas (Fogg y Thake, 1987). Incrementar el tamaño celular (biovolumen), durante el crecimiento estacionario, puede resultar de una disminución en la tasa de división celular relativa a la producción de biomasa, o bien, a un cambio en el metabolismo celular, de la síntesis proteica a la de carbohidratos o lípidos de reserva (Lewitus y Caron, 1990). En nuestro caso, los cultivos provenientes del nivel Fernbach contenían concentraciones altas de nitrato (~480  $\mu$ M) y fósforo (~8  $\mu$ M) al ser transferidos al nivel Garrafón, además las células tenían sólo 24 horas en  $F_{est}$  y presentan un alto contenido proteico (Día 0; 27.8 y 31.0 pg célula en LA y LB, respectivamente). Estos datos nos sugieren, que las células

de *Rhodomonas* sp. continúan sintetizando proteínas a expensas de los carbohidratos y/o lípidos de reserva.

Durante el cultivo en 18 L, la  $F_{exp}$  se presentó del inicio al tercer día de cultivo, y coincide con el período de disminución en la concentración celular de los constituyentes bioquímicos (Figs. 15, 16). A excepción de los carbohidratos, que presentaron un máximo en concentración por célula a las 24 horas en LA y LB (Fig. 15-B; Tabla XVI). En las primeras 24 horas de cultivo, la disminución de los constituyentes bioquímicos, expresada en pg célula<sup>-1</sup> tanto en LA como en LB, pudiera estar asociada al aumento en las tasas de crecimiento (Tabla VII) y resultar de la división del material celular. Mientras que, el máximo de carbohidratos, parece ser una respuesta fisiológica de aclimatación, que ha sido observada con anterioridad para esta misma cepa de microalga (Lafarga-De la Cruz, 1997). El aumento en la concentración y porcentaje de carbohidratos, en células recién transferidas de nivel Fernbach a Garrafón, se debe a la recuperación de la capacidad fotosintética y se relaciona con un alto consumo de nutrientes (Figs. 11, 12-C) y un incremento en la tasa de crecimiento (Fig. 10; Tabla VII). Sin embargo, el contenido proteico continua disminuyendo del primer al tercer día, y coincide con la disminución significativa de los carbohidratos. Este comportamiento, no concuerda con la concepción de lo que pasa en el metabolismo microalgal, donde se esperaría que se diera durante la  $F_{exp}$ . Varios autores han demostrado que la concentración de proteínas aumenta, mientras que la concentración de carbohidratos (productos intermediarios) o lípidos disminuye (Flaak y Epifanio, 1978; Whyte, 1987; Fernández-Reiriz *et al.*, 1989). En cultivos de 18 L de *Isochrysis* aff. *galbana* (clone T-iso), Valenzuela-Espinoza (1997) reporta que el aumento en la concentración celular de proteínas, tanto en pg célula como en porcentaje respecto al peso orgánico coincide con la  $F_{exp}$  y la disminución de los carbohidratos. Sin embargo, los inoculos que él utiliza para el nivel garrafón provienen de cultivos limitados en nutrientes. Por otra parte, el hecho de que

encontremos una disminución en el contenido orgánico celular (Fig. 16B), podría indicarnos de manera indirecta una disminución en el tamaño celular (biovolumen) durante la  $F_{exp}$ , y este hecho podría explicar la disminución tanto de proteínas como carbohidratos, lípidos y cenizas.

En ambas condiciones de luz, a partir del tercer día inicia la  $F_{est}$  y se observa que disminuye la frecuencia de división celular (Fig.1; Tabla VII). Sin embargo, el contenido de proteínas, carbohidratos, cenizas y peso orgánico por unidad celular se mantuvo casi constante (Figs. 15, 16; Tabla XVI). Mientras que, el contenido de lípidos aumentó (Fig. 15-C). La relación inversa entre la tasa de crecimiento y la concentración de lípidos, indica que las células acumulan lípidos como compuestos de reserva. Además, aún cuando no se observó un cambio significativo en la concentración celular de proteínas y carbohidratos ( $pg\ célula^{-1}$ ), en términos del porcentaje respecto al peso orgánico, ambos constituyentes disminuyen durante la  $F_{est}$  (Fig. 17). Esto confirma que, durante el crecimiento estacionario, hubo un cambio en la fisiología microalgal, donde, las células de *Rhodomonas* sp que se encuentran en  $F_{exp}$ , cuya ruta principal es la síntesis de proteínas, durante la  $F_{est}$  cambian su metabolismo hacia la síntesis de lípidos, aunque en diferente medida respecto a la calidad de luz. Esto coincide con otros trabajos, donde se reportan resultados similares en el porcentaje de proteínas en  $F_{est}$  respecto a la  $F_{exp}$ , en cambio, el porcentaje de carbohidratos y/o lípidos aumenta, dependiendo de la especie y las condiciones de cultivo (Flaak y Epifanio, 1978; Whyte, 1987; Fernández-Reiriz *et al.*, 1989; Brown *et al.*, 1996). Lafarga-De la Cruz (1997), en cultivos de *Rhodomonas* sp en medio f/2, observó un comportamiento similar entre fases de crecimiento, encontró una disminución de todos los constituyentes durante la  $F_{exp}$ . Mientras que, en la  $F_{est}$  el comportamiento de las proteínas y los lípidos coincide con lo reportado aquí, y el de los carbohidratos difiere, ya que se encontró un aumento en el contenido celular de estos. Esta diferencia, probablemente se debe a la condición específica de cultivo, menor

concentración de nutrientes en el medio (el 75%) y el doble de la irradiancia utilizada en este trabajo. Lo que pudo haber creado diferencias en el grado de limitación por nutrientes y la capacidad fotosintética celular.

Otro aspecto, que quizá este relacionado con el incremento de lípidos durante la  $F_{est}$ , es el aumento en el contenido celular de pigmentos. Como se mencionó con anterioridad, el efecto de autosombreado, ocasionó una disminución de la irradiancia hacia el interior del cultivo. Esto, originó un aumento en el contenido de clorofila (Fig. 13, 14-C). Como, las clorofilas se encuentran embebidas en los tilacoides, y éstos están constituidos de membranas lipídicas, es probable que, el aumento en el contenido de lípidos este asociado en cierta medida a la formación de membranas tilacoidales dentro del aparato fotosintético (Jeffrey y Vesk, 1977).

Para las dos condiciones de luz estudiadas, la composición proximal por unidad celular, varió de 16-31 pg de proteínas, 8-29 pg de carbohidratos y 9-21 pg de lípidos, durante los siete días de cultivo (Tabla XVI). Valores similares de carbohidratos (10-38 pg célula<sup>-1</sup>) y lípidos (6-27 pg célula<sup>-1</sup>), han sido reportados por Lafarga-De la Cruz (1997) en cultivos de *Rhodomonas* sp. Sin embargo, el contenido de proteínas fue menor al encontrado aquí (7-19 pg célula<sup>-1</sup>), debido a la diferencia en la técnica de extracción empleada. En el trabajo citado, se realizó sólo una extracción por 10 minutos a 100°C con 5 ml de NaOH 1N (Raush, 1981), mientras que, en este estudio las muestras fueron sometidas a doble extracción bajo las mismas condiciones descritas. La tabla XIX (Anexo B), muestra los resultados de diversos autores que han determinado la composición proximal del género *Rhodomonas*, bajo diferentes condiciones de cultivo y fases del ciclo de crecimiento. De estos trabajos, se resume que la concentración de los constituyentes bioquímicos por célula fluctúa en un intervalo similar al reportado aquí, en el caso de carbohidratos (3-20 pg) y lípidos (2-22 pg). Mientras que, en el caso de las proteínas, el intervalo reportado por estos autores, es mayor (13-65 pg célula<sup>-1</sup>). Las discrepancias

entre trabajos, quizá estén asociadas a las distintas condiciones de cultivo y/o métodos químicos empleados para la determinación de los constituyentes.

### 6.2.5.2. Diferencias entre condiciones de luz

La composición proximal de *Rhodomonas* sp presentó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), respecto a la calidad de luz. Durante el tiempo de cultivo, las células cultivadas en LA, tuvieron mayor contenido de proteínas y lípidos, y menor de carbohidratos, que aquellas células cultivadas en LB (Figs. 15, 17). El aumento del contenido proteico en diversas especies fitoplanctónicas, ha sido reportado en un amplio intervalo de intensidades luminosas, y en cultivos que difieren en la concentración y especiación de los nutrientes empleados (Wallen y Geen, 1971b; Brown y Geen, 1974; Flaak y Epifanio, 1978; Rivkin, 1989; Correa-Reyes, 1993; Sanchez-Saavedra, 1994).

Miyachi *et al.* (1980), han encontrado que la calidad de LA promueve una mayor incorporación de  $^{14}\text{CO}_2$ , mediante la vía de fijación oscura. Este incremento en la carboxilación, en condiciones de LA, se atribuye a una mayor actividad y producción *de novo* de las enzimas relacionadas con la utilización del fosfoenol piruvato (PEP; Ruyters, 1980; Kulandaivelu y Sarojini, 1980). Como resultado de la carboxilación del PEP se promueve la formación el oxaloacetato (OAA), directamente por la actividad de la enzima fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC) e indirectamente por la enzima piruvato kinasa (PK). El incremento en OAA y otros aminoácidos (glutamato, malato y aspartato) y compuestos (fumarato, citrato) involucrados en el ciclo de Krebs, explican el aumento en las tasas de respiración en células expuestas a LA y resultan en una mayor síntesis de proteínas (Voskresenskaya, 1972; Miyachi *et al.*, 1980; Kowallik, 1982).

Además, del piruvato generado vía glucólisis, la calidad de LA promueve también, la síntesis de alanina y la conversión a Acetil Co-A. A partir de los cuales, se producen ácidos grasos y lípidos (Jeffrey y Vesk, 1997).

Como el efecto de la luz azul, aumenta el aspartato como precursor de proteínas, la predominancia de esta ruta sobre la síntesis de azúcares, tiene como consecuencia un mayor gasto energético para poder formar

carbohidratos de reserva (Kowallik, 1970; Voskresenskaya, 1972). Por otra parte, Kulandaivelu y Sarojini (1980), demuestran que la calidad de LA, inhibe preferencialmente el ciclo de Calvin y activa la carboxilación oscura a partir de la degradación de la glucosa. Lo anterior, podría explicar por que en las células con LA el contenido de carbohidratos fue menor que en células con LB (Fig. 15-B).

Aunque las células expuestas a condición de LA presentan un mayor contenido de proteínas, al determinar la concentración de proteína por unidad de volumen de cultivo, esta resulta similar entre condiciones de LA y LB (Anexo B, Fig 29-A). Este comportamiento, se atribuye a las diferencias en las tasas de crecimiento entre condiciones de luz (Fig. 10-C; Tabla VII). Debido a que, en los cultivos expuestos a LB la densidad celular fue mayor que la obtenida en LA, aún cuando las células contienen menor concentración de proteínas (Fig. 15-A), al multiplicar el contenido de proteína por célula por el número de células en un litro de cultivo se obtienen valores similares que los calculados en LA, donde hay menor densidad celular pero mayor concentración de proteínas por célula.

En la concentración de carbohidratos, lípidos y material orgánico, por volumen ( $\text{mg L}^{-1}$ ), se observan diferencias entre condiciones de luz, para algunos de los días de cultivo (Anexo B, Fig. 29B y C). Los cultivos en LB, presentan una mayor concentración de carbohidratos y material orgánico que los cultivos en LA. Mientras que, en el caso del contenido de lípidos sucede lo contrario, entre condiciones de luz. Esto, ocasiona que la calidad nutricional en un determinado volumen de cultivo de *Rhodomonas* sp difiera entre condiciones de calidad de luz. Sin embargo, la eficiencia de su uso en la alimentación de invertebrados marinos, dependerá directamente de los requerimientos propios del organismo, al cual se le suministre como dieta. En el trabajo realizado por Epifanio y Flaak (1978), se obtienen 6 dietas de *Thalassiosira pseudonana* que difieren en su contenido de proteínas y carbohidratos, como resultado de diferentes calidades de luz de cultivo y fases

de crecimiento cosechadas. Estos autores, encuentran que el valor nutricional de esta diatomea, usada como alimento de ostiones juveniles de *Crassostrea gigas*, está directamente relacionado con su razón C:N. Por lo que, la dieta con mayor razón C:N, resultó en un incremento significativo de la tasa de crecimiento (concha y tejido) y el contenido de glicógeno, debido a que, el requerimiento proteico total de los ostiones es relativamente bajo (menor al 20% de la ración en base seca).

## 7. CONCLUSIONES

La mejor condición de irradiancia y concentración de nutrientes para la producción de *Rhodomonas* sp, en términos de mayor tasa de crecimiento promedio y máxima densidad celular final, fue el tratamiento con irradiancia de  $52 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y  $1323 \mu\text{M}$  de  $\text{NaNO}_3$  y  $58.5 \mu\text{M}$  de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .

Durante la fase de crecimiento exponencial no se presentaron diferencias en la densidad celular en los cultivos con luz azul y luz blanca, pero en la fase de crecimiento estacionario, la densidad celular fue significativamente mayor en los cultivos con luz blanca. La densidad celular final en cultivos de *Rhodomonas* sp expuestos a luz blanca fue 15% mayor que la encontrada en luz azul.

En los cultivos con luz azul, el contenido de proteínas por célula fue 14% mayor, y el contenido de lípidos por célula fue 6.2 a 30.9% mayor que en cultivos con luz blanca. Sin embargo, a pesar de las diferencias por célula, la concentración de proteínas y lípidos por volumen de cultivo no varió entre condiciones de luz.

En los cultivos con luz blanca, el contenido de carbohidratos fue mayor tanto por célula (5.9 a 26.5%) como por volumen de cultivo (13-27%).

## 8.- LITERATURA CITADA

- Aldana-Aranda, D. y V. Patiño-Suárez. 1998. Overview of diets used in larviculture of three Caribbean conchs: Queen conch *Strombus gigas*, Milk conch *Strombus costatus* and fighting conch *Strombus pugilis*. *Aquaculture*, 167: 163-178.
- Alvarez-Borrego, S. 1986. Luz y productividad del fitoplancton. En: González-Farías, F. y J. de la Rosa Veléz (Eds.) *Temas de Oceanografía biológica en México*. Vol. II. Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, B.C., México.
- Berner, T., Z. Dubinsky, K. Wyman y P.G. Falkowski. 1989. Photoadaptation and the "package" effect in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae). *J. Phycol.*, 25:70-78.
- Bligh, E.G. y W.J. Dyer. 1959. A rapid method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-254.
- Borowitzka, M. A. y L. J. Borowitzka. (Eds.) 1988. *Micro-algal Biotechnology*. Cambridge University Press. Cambridge. 477 pp.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method of total lipid extraction and purification. *Can. Biochem. Physiol.*, 37:911-917.
- Brand, L. E. y R. R. L. Guillard. 1981. The effects of continuous light and light intensity on the reproduction rates of twenty-two species of marine phytoplankton. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 50:119-132.
- Brinkmann, G. y H. Senger. 1980. Blue light regulation of chloroplast development in *Scenedesmus* mutant C-2A'. 526-539. En: Senger, H. (ed.). *The Blue Light Syndrome*. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, New York. 665 pp.
- Brown, M. R., G. A. Dunstan, S. J. Norwood y K. A. Miller. 1996. Effects of harvest stage and light on the biochemical composition of the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *J. Phycol.*, 32:64-73.
- Brown, M. R., M. A. McCausland y K. Kowalski. 1998. The nutritional value of four Australian microalgae strains fed to Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat. *Aquaculture*, 165:281-293.
- Brown, M. R., S. W. Jeffrey, J. K. Volkman y G. A. Dunstan. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151: 315-331.
- Brown, T. J. y G. H. Geen. 1974. The effect of light quality on the carbon metabolism and extracellular release of *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard. *J. Phycol.*, 10:213-220.
- Cabrera, S.S. y B.V. Montecino. 1987. Fotosíntesis y cultivo masivo de microalgas. *Invest. Pesq. (Chile)*, 34:155-163.
- Chan, A. T. 1980. Comparative physiological studies of marine diatoms and dinoflagellates in relation to irradiance and cell size. I. Relationship between photosynthesis, growth and carbon/chlorophyll a ratio. *J. Phycol.*, 16:428-432.
- Claustre, H. y J. Gostan. 1987. Adaptation of biochemical composition and cell size to irradiance in two microalgae: possible ecological implications. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 40:167-174.
- Cloern, J.E. 1977. Effects of light intensity and temperature on *Cryptomonas ovata* (Cryptophyceae) growth and nutrient uptake rates. *J. Phycol.*, 13:389-395.
- 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.

- Coutteau, P. y P. Sorgeloos. 1992. The use of algal substitutes and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve mollusk: an international survey. *J. Shellf. Res.*, 11:467-476.
- Darley, W. M. 1987. *Biología de las algas: Enfoque fisiológico*. Editorial LIMUSA, México, D. F. 236 pp.
- De la Cruz, A. y Alfonso, E. 1975. Cultivo masivo de algas planctónicas marinas mediante fertilización. *Ciencias, Universidad de La Habana*, VIII(17):1-25.
- 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.
- DeBoer, J. A. Nutrients. pp. 357-392. In: Lobban (ed.). *Seaweed ecology and physiology*.
- Dortch, Q., J. R. Clayton, S. S. Thoresen y S. I. Ahmed. 1984. Species differences in accumulation of nitrogen pools in phytoplankton. *Mar. Biol.*, 81:237-250.
- Durbin, E. G. 1974. Studies on the autoecology of the marine diatom *Thalassiosira nordenskioldii* cleve. 1. The influence of daylength, light intensity and temperature on growth. *J. Phycol.*, 10:220-225.
- Fabregas, J., L. Toribio, J. Albalde, B. Cabezas y C. Herrero. 1989. Biochemical composition and growth of the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with different ammonium nitrogen concentration as chloride, sulfate, nitrate and carbonate. *Aquaculture*, 83:289-304.
- Falkowski P. G. y J. A. Raven. 1997. *Aquatic photosynthesis*. Blackwell Science, Inc. Malden, Massachusetts. 375 pp.
- Falkowski, P. G. y J. La Roche. 1991. Acclimation to spectral irradiance in algae. *J. Phycol.*, 27:8-14.
- Falkowski, P. G. y T. G. Owens. 1978. Effects of light intensity on photosynthesis and dark respiration in six species of marine phytoplankton. *Mar. Biol.*, 45:289-295.
- Falkowski, P. G. y T. G. Owens. 1980. Light-shade adaptation: Two strategies in marine phytoplankton. *Plant Physiol.*, 66:592-595.
- Falkowski, P.G., A. Sukenik y R. Herzig. 1989. Nitrogen limitation in *Isochrysis galbana* (Haptophyceae). II. Relative abundance of chloroplast proteins. *J. Phycol.*, 25:471-478.
- Faust, M. A. y E. Gantt. 1973. Effect of light intensity and glycerol on the growth, pigment composition and ultrastructure of *Chroomonas* sp. *J. Phycol.*, 9: 489-495.
- Fernández-Reiriz, M.J., A. Pérez-Camacho., M.J. Ferreiro., J. Blanco., M. Planas., M.J. Campos y U. Labarta. 1989. Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture*, 83: 17-37.
- Ferreiro, M. J., A. Pérez-Camacho, U. Labarta, R. Beiras, M. Planas y M. J. Fernández-Reiriz. 1990. Changes in the biochemical composition of *Ostrea edulis* larvae fed on different food regimes. *Mar. Biol.*, 106: 395-401.
- Flaak, A. R. y C. E. Epifanio. 1978. Dietary protein levels and growth of the oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol.*, 45:157-163.

- Fogg, G. E. y B. Thake. 1987. Algal cultures and phytoplankton ecology. The University of Wisconsin Press. 259 pp.
- Geider, R. J., J. La Roche, R. M. Greene y M. Olaizola. 1993. Response of the photosynthetic apparatus of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) to nitrate, phosphate, or iron starvation. J. Phycol., 29:755-766.
- Graziano, L. M., J. La Roche y R. J. Geider. 1996. Physiological responses to phosphorus limitation in batch and steady-state cultures of *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyta): A unique stress protein as an indicator of phosphate deficiency. J. Phycol., 32:825-838.
- Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates animals. p. 29-60. En: Culture of Marine Invertebrates Animals. Smith, W.L. and M.H. Chanley (Eds). Plenum Publishing Corp., New York, 338 pp.
- Hase, E. 1980. Effects of blue light on greening in microalgae. 512-525. En: Senger, H. (ed.). The Blue Light Syndrome. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, New York. 665 pp.
- Healey, F. P. 1985. Interacting effects of light and nutrient limitation on the growth rate of *Synechococcus linearis* (Cyanophyceae). J. Phycol., 21:134-146.
- Herzig, R. y P. G. Falkowski. 1989. Nitrogen limitation in *Isochrysis galbana* (Haptophyceae). I. Photosynthetic energy conversion and growth efficiencies. J. Phycol., 25:462-471.
- Hinegardner, R.T. 1969. Growth and development of the laboratory cultured sea urchin. Biol. Bull., 137: 465-475.
- Humprey, G.F. 1983. The effect of spectral composition of light on the growth, pigments and photosynthetic rate of unicellular marine algae. J. Exp. Mar. Biol., 60:49-67.
- Jeffrey, S. W. y M. Vesk. 1977a. Effect of blue-green light on photosynthetic pigments and chloroplast structure in the marine diatom *Stephanopyxis turris*. J. Phycol., 13:271-279.
- Jeffrey, S. W., R. F. C. Mantoura y S. W. Wright (Eds.). 1997. Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. SCOR, UNESCO. 639 pp.
- Jiménez, C. y F. X. Niell. 1991. Growth of *Dunaliella viridis* Teodoresco: effect of salinity, temperature and nitrogen concentration. J. Appl. Phycol., 3:319-327.
- Jiménez, C., F. X. Niell y J. A. Fernández. 1990. The photosynthesis of *Dunaliella parva* Lerche as a function of temperature, light and salinity. Hydrobiologia, 197:165-172.
- Jónasdóttir, S. H. 1994. Effects of food quality on the reproductive success of *Acartia tonsa* and *Acartia hudsonica*: laboratory observations. Mar. Biol., 121:67-81.
- Jones, D., J. Munfor y P. Gabbott 1974. Microcapsules as artificial food particles for aquatic filter feeders. Nature, 247:233-235.
- Kamiya, A. y S. Miyachi. 1980. Blue light effects on some algae collected from subsurface chlorophyll layer in the Western Pacific Ocean. 605-613. En: Senger, H. (ed.). The Blue Light Syndrome. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, New York. 665 pp.

- Kaplan, D., E. Richmond, Z. Dubinsky y S. Aaronson. 1986. Nutricional modes. pp. 147-175. In: Richmond, A (ed.), Handbook of microalgal mass culture. CRC Press, Florida.
- Kochert, G. 1978. Carbohydrate determination by phenol-sulfuric acid method. In: Handbook of Physiological and Biochemical Methods, Hellebust and Craigie (Ed.), Cambridge Univ. press, Cambridge, p. 96-97.
- Kowallik, W. 1970. Light effects on carbohydrate and protein metabolism in algae. 165-181. En Halldal, P. (ed.). Photobiology of Microorganisms. Wiley-Interscience, London and New York. 479 pp.
- Kowallik, W. 1982. Blue light effects on respiration. Ann. Rev. Plant. Physiol., 33:51-72.
- Kremer, B. P. 1981. Dark reactions of photosynthesis. 44-54. In: Platt, T. (ed.). Bases of Phytoplankton Ecology. Canadian Bulletin of fisheries and Aquatic Sciences, No. 210.
- Kulandaivelu, G. G. y G. Sarojini. 1980. Blue light-induced enhancement in activity of certain enzymes in heterotrophically grown cultures of *Scenedesmus obliquus*. 372-380. En: Senger, H. (ed.). The Blue Light Syndrome. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, New York. 665 pp.
- 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 de Licenciatura, FCM, UABC. Ensenada, Baja California. 50 pp.
- Lewitus, A.J., D. A. Caron y K. R. Miller. 1991. Effect of light and glycerol on the photosynthetic apparatus in the facultative heterotroph *Pyrenomonas salina* (Cryptophyceae). J. Phycol., 27: 578-587.
- Lewitus, J. A. y D. A. Caron. 1990. Relative effects of nitrogen or phosphorus depletion and light intensity on the pigmentation, chemical composition and volume of *Pyrenomonas salina* (Cryptophyceae). Mar. Ecol. Prog. Ser., 61: 171-181.
- López-Muñoz, I., J. Abalde y C. Herrero. 1992. Crecimiento y contenido en pigmentos de cuatro especies de microalgas marinas cultivadas con diferentes temperaturas e intensidades de luz. Nova Acta Científica Compostelana (Biología), 3:59-65.
- Lüning, K. 1981. Light. En: Lobban, C. S. y M. J. Wynne (ed.). The Biology of Seaweeds. Botanical Monographs Oxford, Blackwell Sci. Publ. 17:326-330.
- Maddux, W. S. y R. F. Jones. 1964. Some interactions of temperature, light intensity and nutrient concentration during the continuous culture of *Nitzschia closterium* and *Tetraselmis* sp. Limnol. Oceanogr., 9:79-86.
- Martínez-López, R. E. 1994. Descripción del desarrollo larvario en el erizo *Strongylocentrotus franciscanus* (Echinoidea:Echinodermata), y efectos de la densidad, ración alimenticia y cambios de agua. Tesis de Licenciatura, FCM, UABC. Ensenada, Baja California. 50 pp.
- McCausland, M. A., M. R. Brown, S. M. Barrett, J. A. Diemar y M. P. Heasman. 1999. Evaluation of live microalgae and microalgal pastes as supplementary food for juvenile Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Aquaculture, 174: 323-342.

- Meya, G. y W. Kowallik. 1996. Alterations in the ratio of two forms of glutamine synthetase in *Chlorella kessleri*: effects of blue and red light and of exogenous nitrogen supply. *Sci. Mar.*, 60(1):171-177.
- Millan-Núñez, R. y S. Alvarez-Borrego. 1978. Ecuaciones espectrofotométricas tricomáticas para la determinación de clorofilas *a*, *b*, y *c* y sus feofitinas. *Ciencias Marinas*, 5(1): 47-55.
- Miyachi, S. y S. Miyachi. 1980. Effects of ammonia on carbon metabolism in photosynthesizing *Chlorella vulgaris* 11 h: the replacement of blue light by ammonium ion. 429-434. En: Senger, H. (ed.). *The Blue Light Syndrome*. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, New York. 665 pp.
- Miyachi, S. y S. Miyachi. 1987. Some biochemical changes related to starch breakdown induced by blue light illumination and by addition of ammonia to *Chlorella* cells. *Plant Cell Physiol.*, 28(2):309-314.
- Morgan, K.C. y J. Kalff. 1979. Effect of light and temperature interactions on growth of *Cryptomonas erosa* (Cryptophyceae). *J. Phycol.*, 15:127-134.
- Morris, I. 1981. Photosynthetic products, physiological state and phytoplankton growth. 83-102. In: Platt, T. (ed.). *Bases of Phytoplankton Ecology*. Canadian Bulletin of fisheries and Aquatic Sciences, No. 210.
- Ostroff, C.R., E.P. Karlander y S.D. Van Valkenburg. 1980. Growth rates of *Pseudopedinella pyriforme* (Chrysophyceae) in response to 75 combinations of light, temperature and salinity. *J. Phycol.*, 16:421-423.
- Pande, S.V., R. Parvin y T. Venkitasubramanian. 1963. Microdetermination of lipids and serum total fatty acids. *Anal. Biochem.*, 6:415-425.
- Parsons, T.R., Y. Maita y C.M. Lalli. 1985. *A Manual of Chemical and biological methods for seawater analysis*. First Edition. Ed. Pergamon press. 173 pp.
- Prezélín, B. B. 1981. Light reactions in photosynthesis. 1-43. In: Platt, T. (ed.). *Bases of Phytoplankton Ecology*. Canadian Bulletin of fisheries and Aquatic Sciences, No. 210.
- Pruder, G.D. y E.T. Bolton. 1978. System configuration and performance: Bivalve Molluscan Mariculture. *Proceeding of the Ninth Annual Meeting World Mariculture Society*, pp 747-759.
- Puiseux-Dao, S. 1981. Cell-Cycle Events in Unicellular Algae. 130-149. In: Platt, T. (ed.). *Bases of Phytoplankton Ecology*. Canadian Bulletin of fisheries and Aquatic Sciences, No. 210.
- Raush, T. 1981. The estimation of micro-algal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomass I. *Hidrobiología*, 78:237-251.
- Raymont, J. E. 1980. *Plankton and productivity in the oceans*. Volume 1: Phytoplankton. Pergamon International Library, 489 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.
- Renaud, S. M., L. V. Thinh y D. L. Parry. 1999. The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. *Aquaculture*, 170: 147-159.
- Rhee, G. Y. y I. J. Gotham. 1981. The effect of environmental factors on phytoplankton growth: Light and the interactions of light with nitrate limitation. *Limnol. Oceanogr.*, 26(4):649-659.

- Richmond, A. 1986. Cell response to environmental factors. 69-99. In: Richmond, A (ed.), Handbook of microalgal mass culture. CRC Press, Florida.
- Rivkin, R. B. 1989. Influence of irradiance and spectral quality on the carbon metabolism of phytoplankton. I. Photosynthesis, chemical composition and growth. Mar. Ecol. Prog. Ser., 55:291-304.
- Ruyters, G. 1980. Blue light-effects on enzymes of the carbohydrate metabolism in *Chlorella*: 1. Pyruvate kinase. 361-367. En: Senger, H. (ed.). The Blue Light Syndrome. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, New York. 665 pp.
- Ryther, J. H. 1965. Photosynthesis in the oceans as a function of light intensity. Limnol. Oceanogr., 1:61-70.
- Sánchez-Saavedra, M. C. Jiménez y D. Voltolina. 1996. Variable fluorescence of chlorophyll *a* in *Dunaliella bardawil* with different  $\beta$ -carotene content. Sci. Mar., 60(1):227-231.
- 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.
- Sánchez-Saavedra, M. y D. Voltolina. 1994. The chemical composition of *Chaetoceros* sp. (Bacillariophyceae) under different light conditions. Comp. Biochem. Physiol., 107B(1):39-44.
- Senger, H., O. Klein, D. Dornemann y R. J. Porra. 1980. The action of blue light on 5-aminolevulinic acid formation. 541-551. En: Senger, H. (ed.). The Blue Light Syndrome. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, New York. 665 pp.
- Shifrin, N. S. y S. W. Chisholm. 1981. Phytoplankton lipids: interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles. J. Phycol., 17:374-384.
- Sommer, T., W. Potts y N. Morrissy. 1990. Recent progress in the use of processed microalgae in aquaculture. Hydrobiología, 204:435-443.
- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed cells volume and optical density: a method for the production of unicellular algal food. pp 322-343. In: J.R. Stein (Ed). Handbook of Phycological Methods: Culture methods and growth measurements. Cambridge University Press, Cambridge, 448 pp.
- Stein, J.R. (Ed). 1973. Handbook of Phycological Methods: Culture methods and growth measurements. Cambridge University Press, Cambridge, 448 pp.
- Thompson, P. A., M. E. Levasseur y P. J. Harrison. 1989. Light-limited growth on ammonium vs nitrate: What is the advantage for marine phytoplankton?. Limnol. Oceanogr., 34(6):1014-1024.
- Thompson, P. A., M. Guo y P. J. Harrison. 1993. The influence of irradiance on the biochemical composition of three phytoplankton species and their nutritional value for larvae of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Mar. Biol., 117:259-268.
- Turpin, D. H. 1991. Effects of inorganic N availability on algal photosynthesis and carbon metabolism. J. Phycol., 27:14-20.
- Uusitalo, J. 1996. Algal carbon uptake and the difference between alkalinity and high pH ("alkalization"), exemplified with a pH drift experiment. Sci. Mar., 60(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 de Maestría, FCM, IIO, UABC. Ensenada, Baja California. 51 pp.

- Vesk M. y S. W. Jeffrey. 1977. Effect of blue-green light on photosynthetic pigments and chloroplast structure in unicellular marine algae from six classes. J. Phycol., 13:280-288.
- Voskrenskenskaya, N. P. 1972. Blue-light and carbon metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol. 23:219-234.
- Wallen, D.G. y G. H. Geen. 1971a. Light quality in relation to growth, photosynthetic rates and carbon metabolism in two species of marine plankton algae. Mar. Biol., 10:34-43.
- Wallen, D.G. y G. H. Geen. 1971b. Light quality and concentration of proteins, RNA, DNA and photosynthetic pigments in two species of marine plankton algae. Mar. Biol., 10:44-51.
- Whyte, J. N. C. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. Aquaculture, 60:231-241.
- Wikfors, G. H. 1986. Altering growth and gross chemical composition of two microalgal molluscan food species by varying nitrate and phosphate. Aquaculture, 59: 1-14.
- Zuñiga-Cortes, A. 1994. Desove, fertilización y desarrollo larval del erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus*. Dentro del proyecto "Métodos alternativos para la producción de semilla de abulón". Memorias del servicio social. FCM, UABC. Ensenada, Baja California. 52 pp.

## ANEXO A

Tabla XVII. Valores poblacionales promedio durante los siete días de cultivo de *Rhodomonas* sp en volumen de 200 ml con diferentes condiciones de irradiancia y nutrientes (nitrato y fosfato).

| T                | Condición de Cultivo                       |                                                                      | Densidad<br>final<br>(cél ml <sup>-1</sup> ) | $\mu_{prom}$<br>(día <sup>-1</sup> ) | $D_{prom}$<br>(div día <sup>-1</sup> ) | $TD_{prom}$<br>(días) | $PD_{prom}$<br>(cél ml <sup>-1</sup> ) |
|------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------|----------------------------------------|
|                  | Irradiancia<br>( $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$ ) | NaNO <sub>3</sub><br>NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>( $\mu M$ ) |                                              |                                      |                                        |                       |                                        |
| T1 <sup>a</sup>  | 52                                         | 661-29.3                                                             | 826666                                       | 0.44                                 | 0.63                                   | 7.05                  | 132407                                 |
| T2               |                                            | 882-39                                                               | 1195556                                      | 0.40                                 | 0.59                                   | 17.6                  | 182130                                 |
| T3               |                                            | <b>1323-58.5</b>                                                     | <b>1612222</b>                               | <b>0.47</b>                          | <b>0.68</b>                            | <b>2.10</b>           | <b>252778</b>                          |
| T4 <sup>a</sup>  | 68                                         | <b>661.8-29.3</b>                                                    | <b>773333</b>                                | <b>0.48</b>                          | <b>0.69</b>                            | <b>1.89</b>           | <b>149537</b>                          |
| T5               |                                            | 882-39                                                               | 1180000                                      | 0.40                                 | 0.57                                   | 4.13                  | 178889                                 |
| T6               |                                            | 1323-58.5                                                            | 1447778                                      | 0.45                                 | 0.65                                   | 3.05                  | 225741                                 |
| T7 <sup>a</sup>  | 103                                        | 661-29.3                                                             | 803333                                       | 0.45                                 | 0.64                                   | 4.42                  | 131667                                 |
| T8               |                                            | 882-39                                                               | 1185556                                      | 0.41                                 | 0.59                                   | 15.3                  | 142000                                 |
| T9               |                                            | 1323-58.5                                                            | 1530000                                      | 0.44                                 | 0.64                                   | 2.50                  | 237593                                 |
| T10 <sup>a</sup> | 142                                        | <b>661.8-29.3</b>                                                    | <b>847775</b>                                | <b>0.46</b>                          | <b>0.67</b>                            | <b>2.92</b>           | <b>136666</b>                          |
| T11              |                                            | 882-39                                                               | 1110000                                      | 0.40                                 | 0.57                                   | 3.90                  | 168148                                 |
| T12              |                                            | 1323-58.5                                                            | 1513333                                      | 0.44                                 | 0.64                                   | 4.39                  | 235000                                 |

<sup>a</sup> El promedio para estos tratamientos es sólo para seis días de cultivo, debido a que a partir de este se presenta el decaimiento de la población microalgal.

$\mu_{prom}$  = tasa de crecimiento promedio en siete días de cultivo

$D_{prom}$  = Divisiones por día promedio en siete días de cultivo

$TD_{prom}$  = Tiempo de duplicación promedio en siete días de cultivo

$PD_{prom}$  = Producción diaria promedio en siete días de cultivo

T = número de tratamiento

Tabla XVIII. Valores poblacionales máximos alcanzados en los cultivos de *Rhodomonas* sp en volumen de 200 ml con diferentes condiciones de irradiancia y nutrientes (nitrato y fosfato). En la columna de tratamiento (T) se indica el día en el cual se alcanzó la máxima tasa de crecimiento.

| T                 | Condición de Cultivo                                  |                                                                            | Densidad<br>final<br>(cél ml <sup>-1</sup> ) | $\mu_{\text{máx}}$<br>(día <sup>-1</sup> ) | D <sub>máx</sub><br>(div día <sup>-1</sup> ) | TD <sub>máx</sub><br>(días) | P <sub>máx</sub><br>(cél ml <sup>-1</sup> ) |
|-------------------|-------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------------|
|                   | Irradiancia<br>( $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) | NaNO <sub>3</sub><br>NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>( $\mu\text{M}$ ) |                                              |                                            |                                              |                             |                                             |
| T1-3 <sup>a</sup> | 52                                                    | 661-29.3                                                                   | 826666                                       | 0.82                                       | 1.18                                         | 0.84                        | 406111                                      |
| T2-3 <sup>a</sup> |                                                       | 882-39                                                                     | 1195556                                      | 0.76                                       | 1.10                                         | 0.90                        | 421111                                      |
| T3-3 <sup>a</sup> |                                                       | <b>1323-58.5</b>                                                           | <b>1612222</b>                               | <b>0.96</b>                                | <b>1.39</b>                                  | <b>0.71</b>                 | <b>329445</b>                               |
| T4-4              | 68                                                    | 661.8-29.3                                                                 | 773333                                       | 0.68                                       | 0.99                                         | 1.00                        | 307222                                      |
| T5-3 <sup>a</sup> |                                                       | 882-39                                                                     | 1180000                                      | 0.76                                       | 1.10                                         | 0.90                        | 411112                                      |
| T6-3 <sup>a</sup> |                                                       | 1323-58.5                                                                  | 1447778                                      | 0.80                                       | 1.15                                         | 0.86                        | 387778                                      |
| T7-4              | 103                                                   | <b>661-29.3</b>                                                            | <b>803333</b>                                | <b>0.97</b>                                | <b>1.40</b>                                  | <b>0.71</b>                 | <b>456111</b>                               |
| T8-4              |                                                       | 882-39                                                                     | 1185556                                      | 0.86                                       | 1.25                                         | 0.79                        | 451666                                      |
| T9-3 <sup>a</sup> |                                                       | 1323-58.5                                                                  | 1530000                                      | 0.86                                       | 1.24                                         | 0.80                        | 377778                                      |
| T10-4             | 142                                                   | <b>661.8-29.3</b>                                                          | <b>847775</b>                                | <b>0.96</b>                                | <b>1.39</b>                                  | <b>0.71</b>                 | <b>433888</b>                               |
| T11-4             |                                                       | 882-39                                                                     | 1110000                                      | 0.83                                       | 1.19                                         | 0.83                        | 418889                                      |
| T12-1             |                                                       | 1323-58.5                                                                  | 1513333                                      | 0.88                                       | 1.27                                         | 0.78                        | 414445                                      |

<sup>a</sup> Para estos tratamientos el día de máxima producción fue el cuarto.

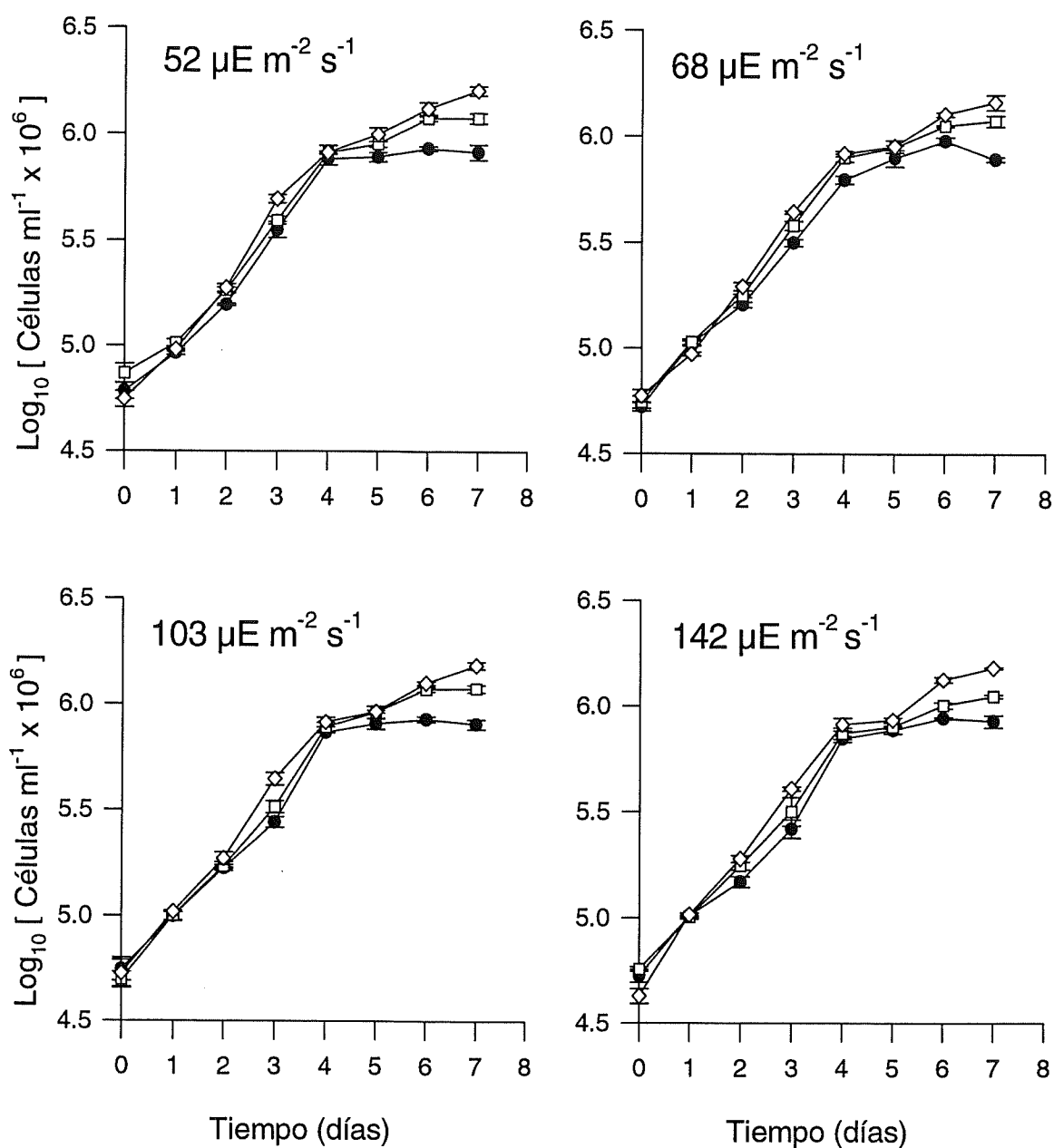
$\mu_{\text{máx}}$  = tasa de crecimiento máxima alcanzada durante los siete días de cultivo

D<sub>máx</sub> = Divisiones por día correspondiente a  $\mu_{\text{máx}}$

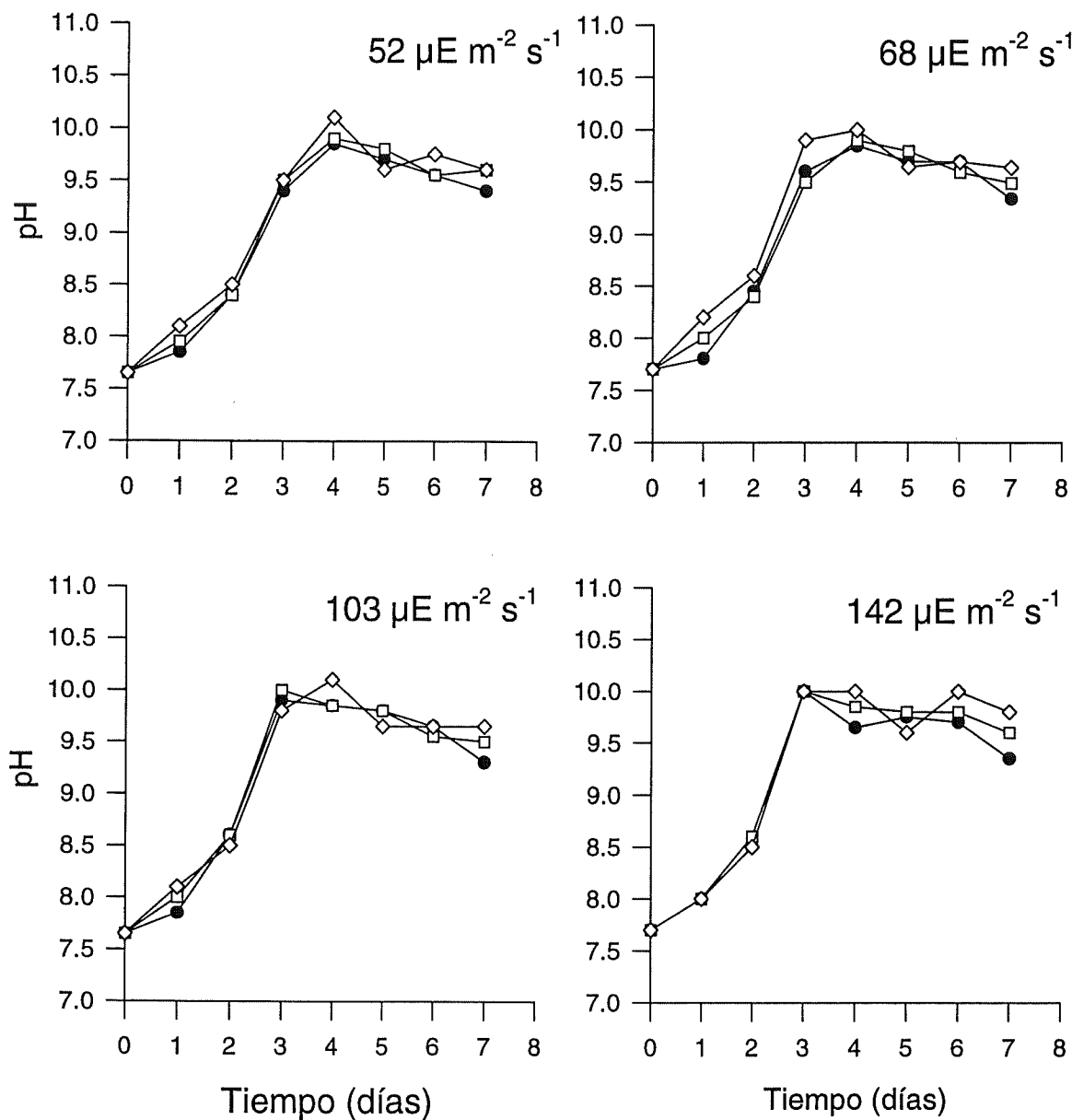
TD<sub>máx</sub> = Tiempo de duplicación correspondiente a  $\mu_{\text{máx}}$

P<sub>máx</sub> = Producción máxima alcanzada durante los siete días de cultivo

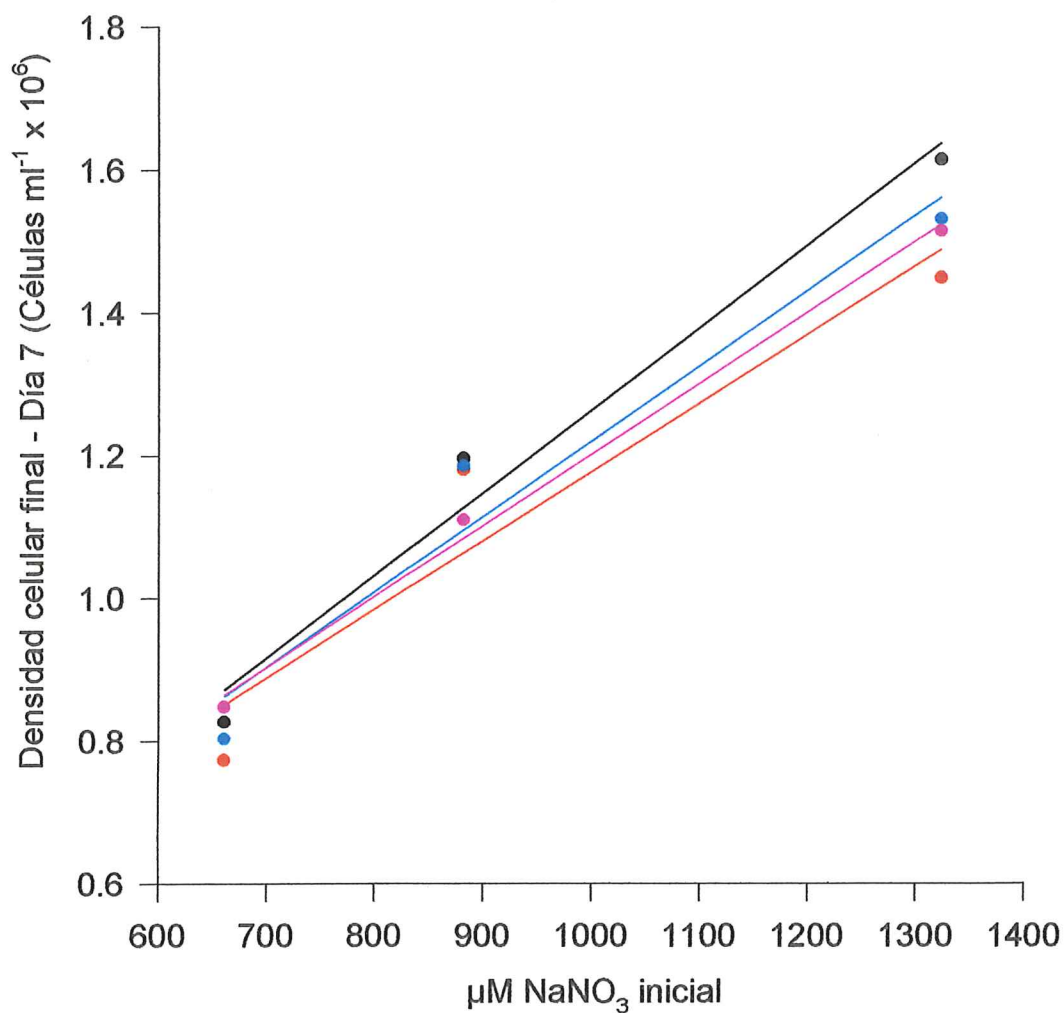
T = número de tratamiento



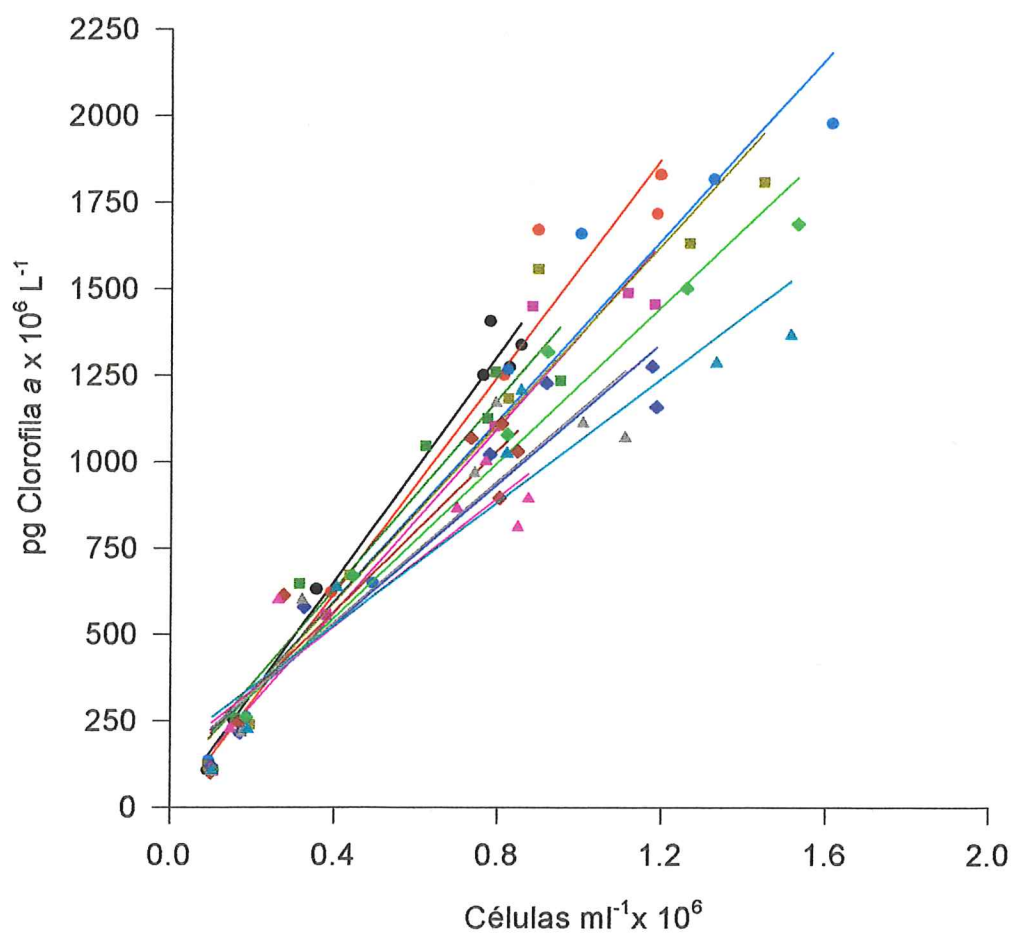
**Figura 18.** Crecimiento promedio ( $\text{Log}_{10}$ ) de *Rhodomonas* sp en volumen de 200 ml a diferentes irradiancias y concentración de nutrientes. (● 661-29.3, □ 882-39 y ◆ 1323-58.5  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaNO}_3$  y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  respectivamente). La barra vertical indica el error estándar.



**Figura 19.** Valores de pH en cultivos de *Rhodomonas* sp en volumen de 200 ml a diferentes irradiancias y concentración de nutrientes (● 661-29.3, □ 882-39 y ◆ 1323-58.5 μM de NaNO<sub>3</sub> y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> respectivamente).

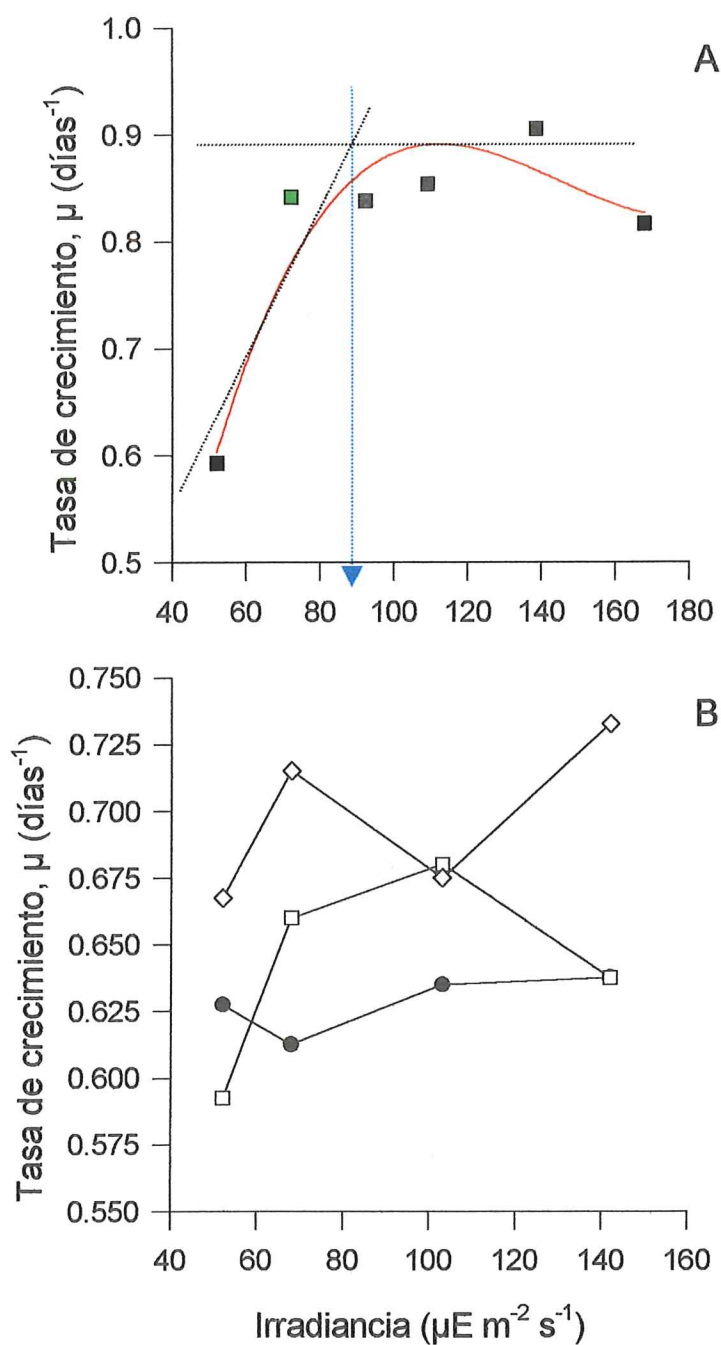


**Figura 20.** Correlación entre densidad celular final y concentración inicial de NaNO<sub>3</sub> para cultivos en etapa experimental 1.

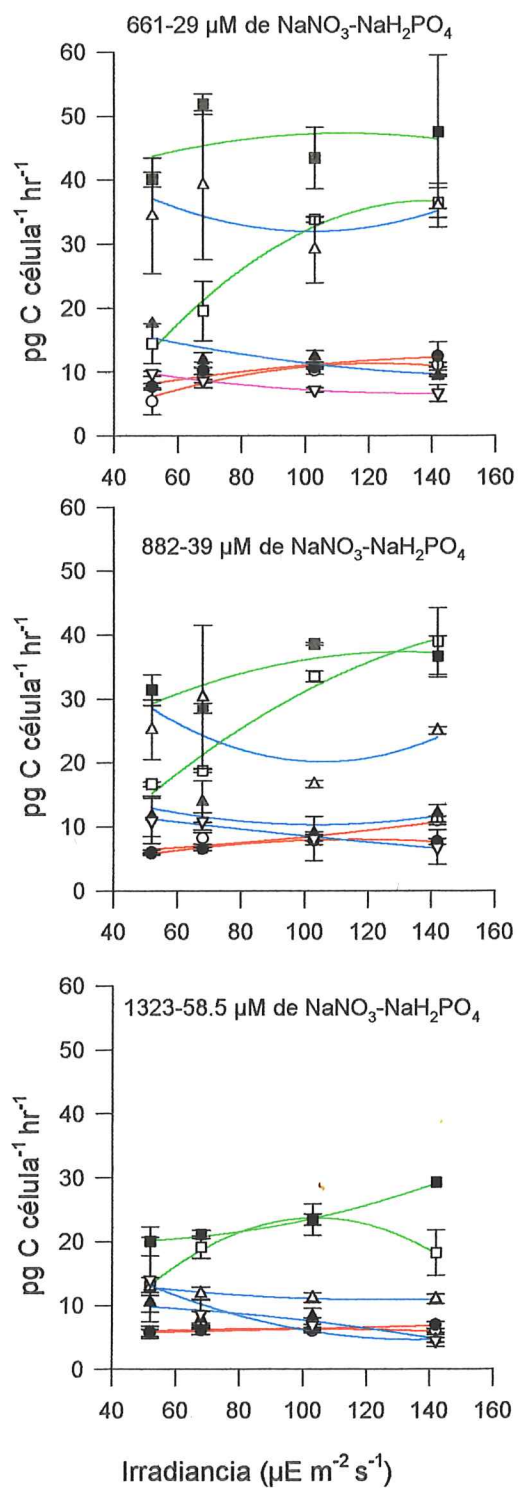


| Irradiancia<br>( $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) | $\text{NaNO}_3$<br>$\text{NaH}_2\text{PO}_4$<br>( $\mu\text{M}$ ) | Símbolo | r<br>Coeficiente de<br>correlación |
|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|---------|------------------------------------|
| 52                                                    | 661-29.3                                                          | ●       | 0.99                               |
|                                                       | 882-39.0                                                          | ●       | 0.98                               |
|                                                       | 1323-58.5                                                         | ●       | 0.97                               |
| 68                                                    | 661-29.3                                                          | ■       | 0.97                               |
|                                                       | 882-39.0                                                          | ■       | 0.97                               |
|                                                       | 1323-58.5                                                         | ■       | 0.97                               |
| 103                                                   | 661-29.3                                                          | ◆       | 0.95                               |
|                                                       | 882-39.0                                                          | ◆       | 0.96                               |
|                                                       | 1323-58.5                                                         | ◆       | 0.98                               |
| 142                                                   | 661-29.3                                                          | ▲       | 0.92                               |
|                                                       | 882-39.0                                                          | ▲       | 0.93                               |
|                                                       | 1323-58.5                                                         | ▲       | 0.94                               |

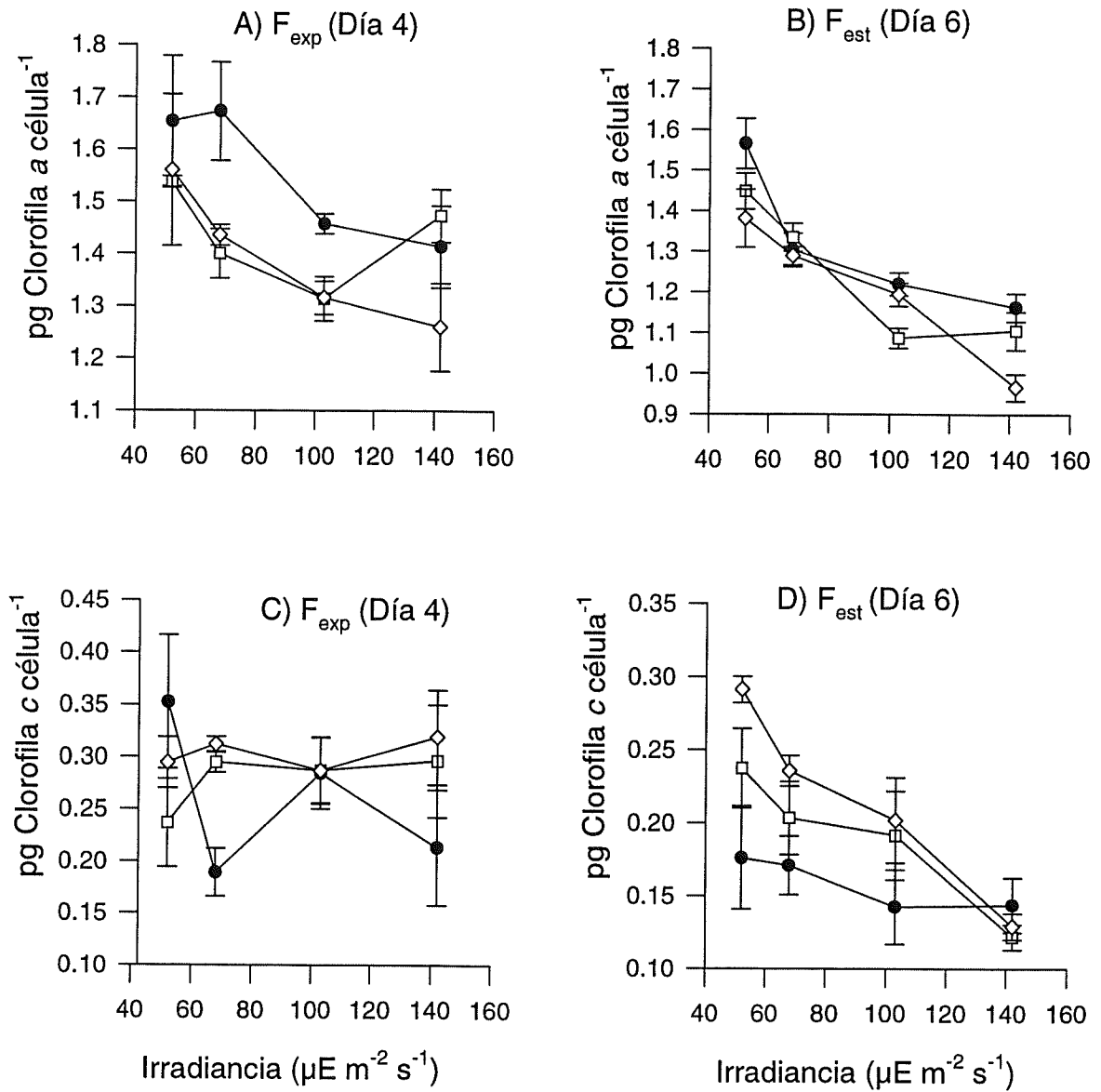
**Figura 21.** Correlación entre densidad celular y concentración de clorofila a por volumen para cultivos en etapa experimental 1.



**Figura 22.** Relación entre irradiancia y tasa de crecimiento en fase exponencial ( $\mu_{\text{exp}}$ ), (A) datos de experimento preliminar con medio f/2 y (B) datos de etapa experimental 1. En (B), los símbolos representan la concentración inicial de nutrientes (● menor, □ control y ◇ mayor). En (A), el dato con símbolo (■) fue tomado de Lafarga-De la Cruz (1997).

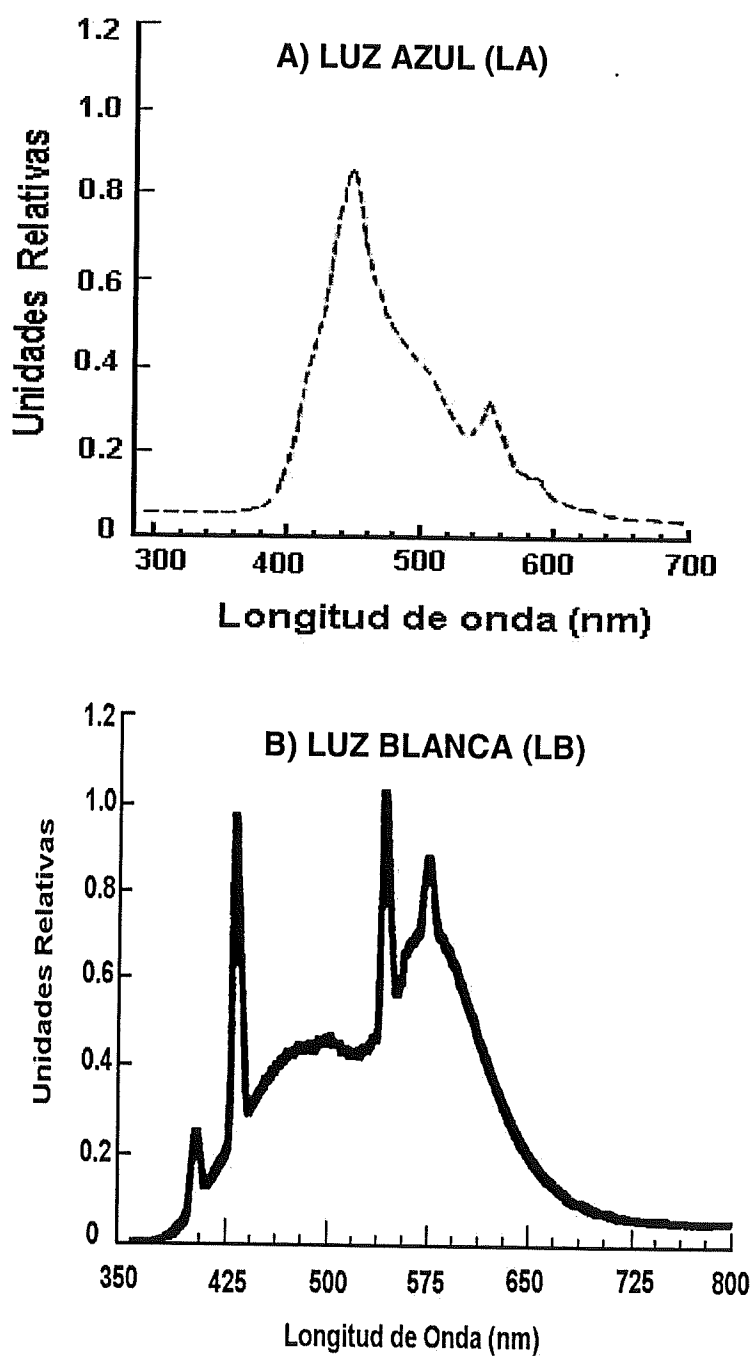


**Figura 23.** Relación entre irradiancia y tasa de asimilación de C por célula en cultivos con diferentes concentraciones de nutrientes, durante siete días (—, —, —  $F_{\text{exp}}$ , —  $F_{\text{est}}$  y —  $F_{\text{dec}}$ ). Los símbolos indican el día de cultivo: ○ día 1, ● día 2, □ día 3, ■ día 4, △ día 5, ▲ día 6 y ▽ día 7.

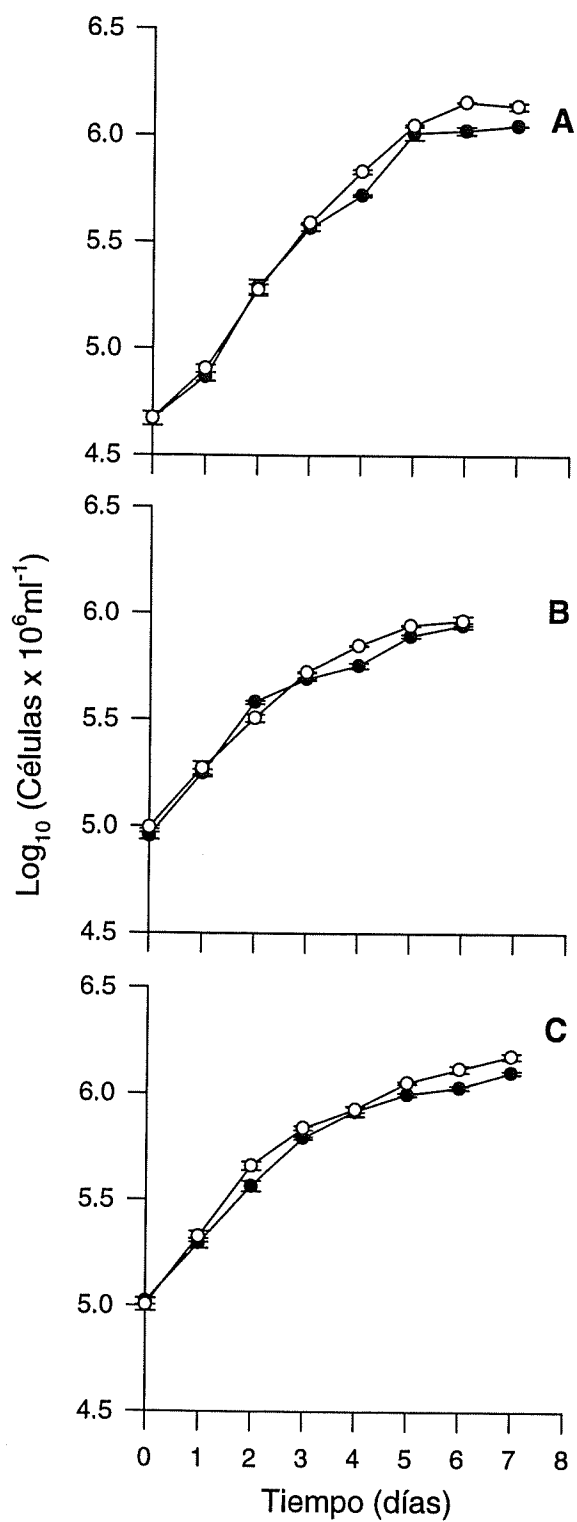


**Figura 24.** Contenido promedio de clorofila *a* (A,B) y *c* (C, D), al culminar la  $F_{exp}$  (Día 4) y la  $F_{est}$  (Día 6), respecto al nivel de irradiancia para diferentes condiciones de nutrientes en cultivos de *Rhodomonas* sp ( $\bullet$  661-29.3,  $\square$  882-39 y  $\blacklozenge$  1323-58.5  $\mu M$  de  $NaNO_3$  y  $NaH_2PO_4$  respectivamente). La barra vertical indica el error estándar.

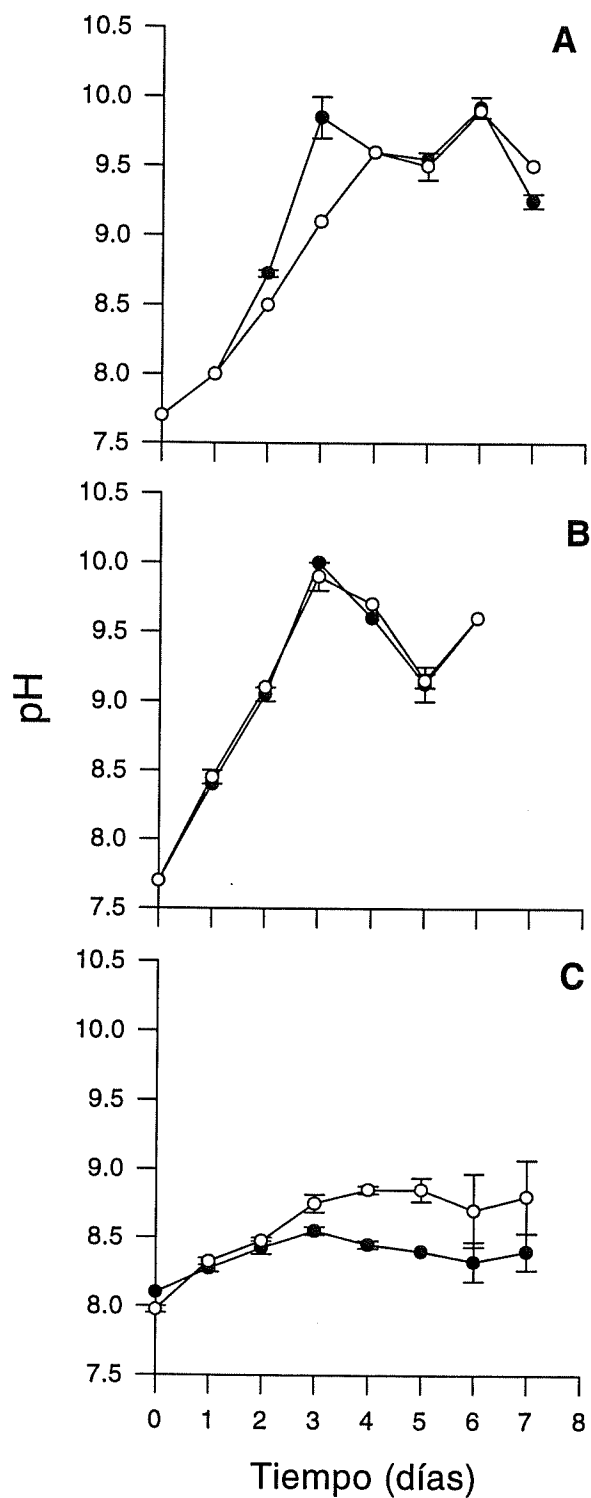
## Anexo B



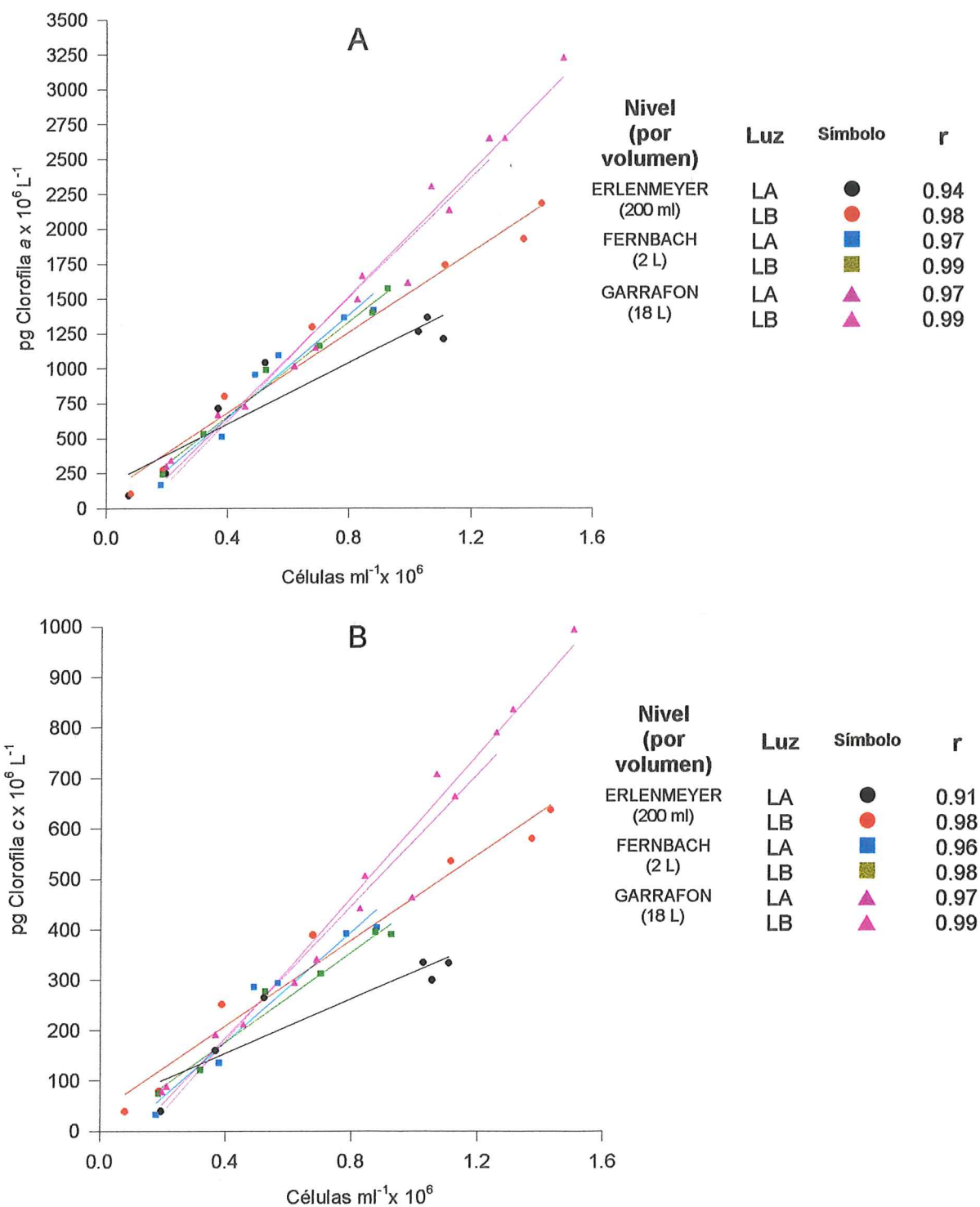
**Figura 25.** Espectros de emisión de las fuentes de luz usadas en etapa experimental 2. A) Espectro de luz azul, tomado de Sánchez-Saavedra y Voltolina (1994). B) Espectro de luz blanca tipo "Daylight" tomado de Sánchez-Saavedra *et al.* (1996).



**Figura 26.** Crecimiento promedio ( $\text{Log}_{10}$ ) de *Rhodomonas* sp en diferentes volúmenes de cultivo: A) Erlenmeyer de 200 ml, B) Fernbach de 2 L y C) Garrafón de 18 L, expuestos a condiciones de luz blanca (o) y luz azul (●). La barra indica el error estándar.



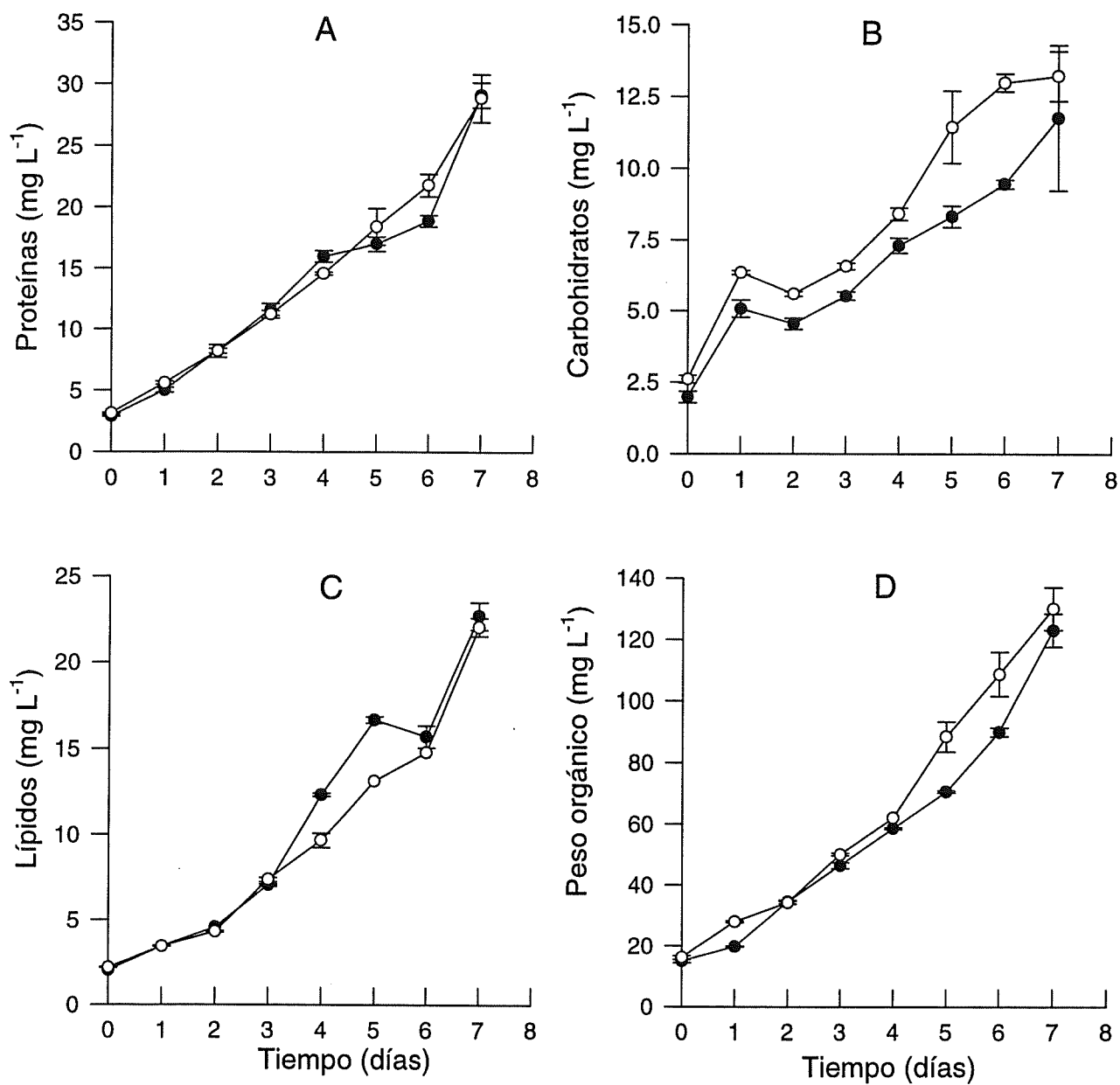
**Figura 27.** Valores de pH en diferentes niveles de cultivo de *Rhodomonas* sp: A) Erlenmeyer de 200 ml, B) Fernbach de 2 L y C) Garrafón de 18 L, expuestos a condiciones de luz blanca (○) y luz azul (●). La barra indica el error estándar.



**Figura 28.** Correlación entre densidad celular y concentración de clorofila a (A) y c (B) por volumen de cultivo en los diferentes niveles y condiciones de luz de la etapa experimental 2.

**Tabla XIX.** Composición bioquímica de especies del género *Rhodomonas* sp por diversos autores.

| Especie                  | Autor                          | Observaciones                                                                                                             | Cenizas       |                      | Proteínas      |                      | Carbohidratos |                      | Lípidos        |                      | Peso Orgánico        |
|--------------------------|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|----------------------|----------------|----------------------|---------------|----------------------|----------------|----------------------|----------------------|
|                          |                                |                                                                                                                           | % P.O         | pg cél <sup>-1</sup> | % P.O          | pg cél <sup>-1</sup> | % P.O         | pg cél <sup>-1</sup> | % P.O          | pg cél <sup>-1</sup> | pg cél <sup>-1</sup> |
| <i>Rhodomonas</i> sp     | Trabajo presente               | LB, Promedio en F <sub>exp</sub>                                                                                          | 47.8±10       | 60 ± 32              | 21±2.3         | 25.1 ± 2.8           | 18.3±3.7      | 18.9 ± 6.6           | 12.7±0.6       | 16.3 ± 3.5           | 102.3 ± 40.5         |
|                          |                                | LB, Promedio en F <sub>est</sub>                                                                                          | 33.7±5.6      | 26.6 ± 6             | 21±1.3         | 19.2 ± 2.3           | 12.3±1.3      | 8.9 ± 0.3            | 15.1±1.2       | 15.1 ± 2.5           | 82.7 ± 3.9           |
| <i>Rhodomonas</i> sp     | Trabajo presente               | LA, Promedio en F <sub>exp</sub>                                                                                          | 54±16.9       | 63 ± 35              | 22.8±3         | 25 ± 6.6             | 17.3±7.1      | 22.5 ± 9.1           | 14.6±2.3       | 15.7 ± 6             | 96.3 ± 28.7          |
|                          |                                | LA, Promedio en F <sub>est</sub>                                                                                          | 36.4±5.1      | 29.3 ± 7             | 24±2.2         | 17.1 ± 1.2           | 11.2±1.1      | 9.7 ± 0.5            | 19.1±3.2       | 11.9 ± 1.5           | 84.4 ± 13.3          |
| <i>Rhodomonas</i> sp     | Lafarga-De la Cruz (1997)      | 2 L, LB, 110 µE m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> , medio f/2, intervalo en siete días de cultivo                           | ---           | ---                  | 17-36          | 7.5-19.1             | 34-55         | 10.4-38.6            | 25-38          | 6.8-27.9             | ---                  |
| <i>Rhodomonas</i> sp     | Fernández-Reiriz et al. (1989) | LB (PAR), 60 F <sub>exp</sub>                                                                                             | ---           | ---                  | 16.75          | 13.54                | 12.6          | 10.2                 | 27.86          | 22.41                | 80.9                 |
|                          |                                | µE m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> , F <sub>est media</sub>                                                               | ---           | ---                  | 44.64          | 65.35                | 28.8          | 42.29                | 33.08          | 48.26                | 146.1                |
|                          |                                | medio Walne, F <sub>est tardía</sub>                                                                                      | ---           | ---                  | 28.49          | 43.97                | 28.9          | 40.56                | 40.24          | 56.34                | 139.9                |
| <i>Rhodomonas lens</i>   | Jónasdóttir (1994)             | 16°C, medio F <sub>exp temprana</sub>                                                                                     | ---           | ---                  | ---            | 51.58                | ---           | 3.23                 | ---            | 2.07                 | ---                  |
|                          |                                | f/2, ciclo F <sub>exp tardía</sub>                                                                                        | ---           | ---                  | ---            | 59.04                | ---           | 3.77                 | ---            | 2.26                 | ---                  |
|                          |                                | 10L:10O F <sub>est</sub>                                                                                                  | ---           | ---                  | ---            | 52.65                | ---           | 3.01                 | ---            | 2.28                 | ---                  |
| <i>Rhodomonas</i> sp     | Ferreiro et al. (1990)         |                                                                                                                           | 45.66         | ---                  | 4.15           | ---                  | 1.42          | ---                  | 11.91          | ---                  | ---                  |
| <i>Rhodomonas salina</i> | Brown et al. (1998)            | 1.4 L, 22°C, 100 µE m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> , ciclo 12L:12O, medio f <sub>E</sub> , F <sub>exp medio-tardía</sub> | 10 ± 7 % P.S. | 9.2                  | 48 ± 6 % P.S.  | 44.16                | 22±12% P.S.   | 20.24                | 22 ± 3% P.S.   | 20.24                | 92 ± 5 P.S.          |
| <i>Rhodomonas</i> sp     | Renaud et al. (1999)           | 1.5 L, 25°C, 80 µE m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> , medio f/2, F <sub>exp tardía</sub>                                   | 17.2 % P.S.   | 13.65                | 29.1% P.S.     | 23.1                 | 8.6 % P.S.    | 6.82                 | 18.7 % P.S.    | 14.84                | 79.4 P.S.            |
| <i>Rhodomonas salina</i> | McCausland et al. (1999)       | Luz continúa a 50-75 µE m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> , medio f <sub>E</sub>                                            | 10 ± 3 % P.S. | ---                  | 59 ± 20 % P.S. | ---                  | 19 ± 5 % P.S. | ---                  | 19 ± 3 % P.S.  | ---                  | ---                  |
| Cryptomonadas            | Brown et al. (1997)            | 1.2 L, 20-25°C, medio f <sub>E</sub> , 70-80 µE m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> , ciclo 12L:12O, F <sub>exp tardía</sub>  | ---           | ---                  | 29-36 % P.S.   | ---                  | 9-10 % P.S.   | ---                  | 11-12.5 % P.S. | ---                  | ---                  |



**Figura 29.** Concentración promedio de proteínas (A), carbohidratos (B), lípidos (C) y peso orgánico (D) por volumen de cultivo, a nivel Garrafón con 18 L, expuestos a condiciones de luz blanca (○) y luz azul (●). La barra indica el error estándar.

## ANEXO C

Tabla XX. Valores de probabilidad ( $p$ ) resultantes de la prueba ANOVA no paramétrica de Kruskal-Wallis para datos obtenidos durante la etapa experimental 1. Los números en rojo indican valores significativos de  $p$  con un nivel de confianza del 95% ( $p > 0.05$  no significativa,  $p < 0.05$  significativa).

| Día | Densidad Celular | pH    | Chl a celular | Chl a Total | Chl c celular | Chl c Total | Fijación de C por célula |
|-----|------------------|-------|---------------|-------------|---------------|-------------|--------------------------|
| 0   | 0.207            | 0.686 | ---           | ---         | ---           | ---         | ---                      |
| 1   | 0.087            | 0.517 | 0.025         | 0.381       | ---           | ---         | 0.051                    |
| 2   | 0.013            | 0.523 | 0.005         | 0.115       | 0.080         | 0.181       | 0.050                    |
| 3   | 0.002            | 0.493 | 0.004         | 0.044       | 0.047         | 0.031       | 0.050                    |
| 4   | 0.046            | 0.520 | 0.022         | 0.006       | 0.355         | 0.122       | 0.038                    |
| 5   | 0.133            | 0.520 | 0.008         | 0.001       | 0.003         | 0.002       | 0.060                    |
| 6   | 0.001            | 0.470 | 0.000         | 0.000       | 0.004         | 0.000       | 0.106                    |
| 7   | 0.001            | 0.466 | 0.001         | 0.001       | 0.005         | 0.001       | 0.556                    |

Tabla XXI. Valores de probabilidad ( $p$ ) resultantes de la prueba ANOVA no paramétrica de Kruskal-Wallis para datos de clorofila  $a$  por unidad celular de la etapa experimental 1. Para el análisis los datos fueron agrupados por condición inicial de nutrientes (A) y por nivel de irradiancia (B). Los números en rojo indican valores significativos de  $p$  con un nivel de confianza del 95% ( $p > 0.05$  no significativa,  $p < 0.05$  significativa).

## A

| NaNO <sub>3</sub><br>NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>(μM) | Bloqueo por<br>Tratamiento de<br>nutriente | Día 1 | Día 2 | Día 3 | Día 4 | Día 5 | Día 6 | Día 7 |
|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 661-29.3                                                      | 1                                          | 0.023 | 0.000 | 0.000 | 0.032 | 0.611 | 0.403 | 0.579 |
| 882-39                                                        | 2                                          |       |       |       |       |       |       |       |
| 1323-58.5                                                     | 3                                          |       |       |       |       |       |       |       |

## B

| Irradiancia ( $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) | Bloqueo por Tratamiento de luz | Día 1 | Día 2 | Día 3 | Día 4 | Día 5 | Día 6 | Día 7 |
|----------------------------------------------------|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 52                                                 | 1                              | 0.345 | 0.165 | 0.143 | 0.003 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 68                                                 | 2                              |       |       |       |       |       |       |       |
| 103                                                | 3                              |       |       |       |       |       |       |       |
| 142                                                | 4                              |       |       |       |       |       |       |       |

Tabla XXII. Valores de probabilidad ( $p$ ) resultantes de la prueba ANOVA no paramétrica de Kruskal-Wallis para datos de asimilación de carbono por unidad celular por hora, en etapa experimental 1. Para el análisis los datos fueron agrupados por condición inicial de nutrientes (A) y por nivel de irradiancia (B). Los números en rojo indican valores significativos de  $p$  con un nivel de confianza del 95% ( $p > 0.05$  no significativa,  $p < 0.05$  significativa).

## A

| NaNO <sub>3</sub><br>NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>( $\mu$ M) | Bloqueo por<br>Tratamiento<br>de nutriente | Día 1 | Día 2 | Día 3 | Día 4 | Día 5 | Día 6 | Día 7 |
|---------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 661-29.3                                                            | 1                                          | 0.021 | 0.001 | 0.228 | 0.000 | 0.000 | 0.012 | 0.655 |
| 882-39                                                              | 2                                          |       |       |       |       |       |       |       |
| 1323-58.5                                                           | 3                                          |       |       |       |       |       |       |       |

## B

| Irradiancia<br>( $\mu$ E m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ) | Bloqueo por<br>Tratamiento<br>de luz | Día 1 | Día 2 | Día 3 | Día 4 | Día 5 | Día 6 | Día 7 |
|------------------------------------------------------------|--------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 52                                                         | 1                                    | 0.044 | 0.312 | 0.003 | 0.723 | 0.775 | 0.407 | 0.048 |
| 68                                                         | 2                                    |       |       |       |       |       |       |       |
| 103                                                        | 3                                    |       |       |       |       |       |       |       |
| 142                                                        | 4                                    |       |       |       |       |       |       |       |

Tabla XXIII. Valores de probabilidad ( $p$ ) resultantes de la prueba ANOVA no paramétrica de Kruskal-Wallis para datos obtenidos en cultivos a nivel Erlenmeyer (200 ml) durante etapa experimental 2. Los números rojos indican valores significativos de  $p$  con un nivel de confianza del 95% ( $p > 0.05$  no significativa,  $p < 0.05$  significativa).

| Día | Conc.<br>Celular | pH   | Chl a<br>celular | Chl a<br>total | Chl c<br>celular | Chl c<br>total | [NO <sub>3</sub> ]<br>residual | Consumo<br>NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | [PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ]<br>residual | Consumo<br>PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> |
|-----|------------------|------|------------------|----------------|------------------|----------------|--------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------|
| 0   | 1.000            | 1.00 | ---              | ---            | ---              | ---            | 1.000                          | ---                                     | 1.000                                        | ---                                      |
| 1   | 0.245            | 1.00 | 0.699            | 0.699          | ---              | ---            | 0.121                          | 0.121                                   | 0.121                                        | 0.121                                    |
| 2   | 0.439            | 0.12 | 0.121            | 0.439          | 0.121            | 0.121          | 0.121                          | 1.000                                   | 0.245                                        | 0.121                                    |
| 3   | 0.121            | 0.12 | 0.439            | 0.121          | 0.121            | 0.021          | 0.121                          | 0.121                                   | 0.121                                        | 0.121                                    |
| 4   | 0.021            | 1.00 | 0.121            | 0.021          | 0.439            | 0.021          | 0.121                          | 0.121                                   | 0.439                                        | 0.121                                    |
| 5   | 0.245            | 1.00 | 0.121            | 0.021          | 0.121            | 0.021          | 0.121                          | 0.121                                   | 0.121                                        | 0.121                                    |
| 6   | 0.021            | 1.00 | 0.121            | 0.021          | 0.121            | 0.021          | 0.121                          | 0.121                                   | 1.000                                        | 0.121                                    |
| 7   | 0.021            | 0.12 | 0.121            | 0.021          | 0.121            | 0.021          | 0.121                          | 0.121                                   | 0.245                                        | 0.439                                    |

Tabla XXIV. Valores de probabilidad ( $p$ ) resultantes de la prueba ANOVA no paramétrica de Kruskal-Wallis para datos obtenidos en cultivos a nivel Fernbach (2 L) durante etapa experimental 2. Los números rojos indican valores significativos de  $p$  con un nivel de confianza del 95% ( $p>0.05$  no significativa,  $p<0.05$  significativa).

| Día | Conc. Celular | pH   | Chl a celular | Chl a total | Chl c celular | Chl c total | [NO <sub>3</sub> ] residual | Consumo NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | [PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ] residual | Consumo PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> |
|-----|---------------|------|---------------|-------------|---------------|-------------|-----------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------|
| 0   | 0.121         | 1.00 | ---           | ---         | ---           | ---         | 1.000                       | ---                                  | 1.000                                     | ---                                   |
| 1   | 0.439         | 0.43 | 0.121         | 0.121       | 0.121         | 0.121       | 0.699                       | 0.699                                | 0.245                                     | 0.245                                 |
| 2   | 0.121         | 0.43 | 0.439         | 1.000       | 1.000         | 0.439       | 0.121                       | 0.121                                | 0.121                                     | 0.121                                 |
| 3   | 0.121         | 0.43 | 0.121         | 0.439       | 0.439         | 1.000       | 1.000                       | 0.121                                | 0.121                                     | 0.121                                 |
| 4   | 0.021         | 0.12 | 0.121         | 0.439       | 0.121         | 1.000       | 0.121                       | 0.439                                | 0.121                                     | 0.121                                 |
| 5   | 0.021         | 1.00 | 0.121         | 0.439       | 0.121         | 1.000       | 1.000                       | 1.000                                | 0.121                                     | 0.121                                 |
| 6   | 0.439         | 1.00 | 0.121         | 0.121       | 0.439         | 1.000       | 0.121                       | 0.121                                | 0.439                                     | 0.121                                 |

Tabla XXV. Valores de probabilidad ( $p$ ) resultantes de la prueba ANOVA no paramétrica de Kruskal-Wallis para datos obtenidos en cultivos a nivel Garrafón (18 L) durante etapa experimental 2. Los números rojos indican valores significativos de  $p$  con un nivel de confianza del 95% ( $p>0.05$  no significativa,  $p<0.05$  significativa).

## A

| Día | Conc. Celular | pH   | Chl a celular | Chl a total | Chl c celular | Chl c total | [NO <sub>3</sub> ] residual | Consumo NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | [PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ] residual | Consumo PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> |
|-----|---------------|------|---------------|-------------|---------------|-------------|-----------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------|
| 0   | 0.665         | 0.02 | ---           | ---         | ---           | ---         | 0.773                       | ---                                  | 0.773                                     | ---                                   |
| 1   | 0.386         | 0.31 | 0.439         | 0.121       | 0.439         | 0.121       | 0.030                       | 0.030                                | 0.248                                     | 0.149                                 |
| 2   | 0.061         | 0.47 | 0.439         | 0.121       | 0.439         | 0.121       | 0.021                       | 0.043                                | 0.021                                     | 0.083                                 |
| 3   | 0.021         | 0.04 | 1.000         | 0.121       | 1.000         | 0.121       | 0.021                       | 0.083                                | 0.021                                     | 0.021                                 |
| 4   | 0.773         | 0.02 | 0.439         | 0.021       | 0.439         | 0.021       | 0.021                       | 0.564                                | 0.021                                     | 0.248                                 |
| 5   | 0.021         | 0.02 | 0.121         | 0.021       | 0.121         | 0.038       | 0.021                       | 0.248                                | 0.021                                     | 0.021                                 |
| 6   | 0.021         | 0.19 | 1.000         | 0.121       | 1.000         | 0.021       | 0.021                       | 0.149                                | 0.021                                     | 0.021                                 |
| 7   | 0.021         | 0.19 | 0.773         | 0.021       | 0.564         | 0.021       | 0.021                       | 0.149                                | 0.021                                     | 0.773                                 |

## B

| Día | Proteínas | Carbohidratos | Lípidos | Cenizas | Peso Seco | Peso Orgánico |
|-----|-----------|---------------|---------|---------|-----------|---------------|
| 0   | 0.021     | 0.021         | 0.021   | 1.000   | 1.000     | 0.248         |
| 1   | 0.386     | 0.021         | 0.021   | 0.021   | 0.021     | 0.021         |
| 2   | 0.021     | 0.773         | 0.021   | 0.021   | 0.021     | 0.021         |
| 3   | 0.021     | 0.021         | 0.021   | 1.000   | 1.000     | 0.248         |
| 4   | 0.021     | 0.021         | 0.021   | 1.000   | 1.000     | 0.248         |
| 5   | 0.773     | 0.021         | 0.021   | 1.000   | 1.000     | 0.021         |
| 6   | 0.248     | 0.021         | 0.021   | 1.000   | 0.021     | 1.000         |
| 7   | 0.016     | 0.674         | 0.003   | 0.014   | 0.208     | 0.036         |