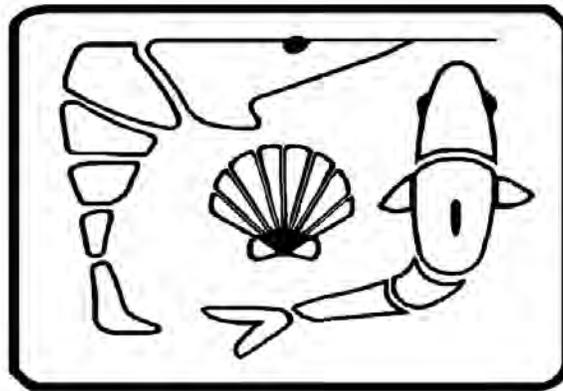


# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y  
TECNOLÓGICAS

PROGRAMA DE POSGRADO EN ACUACULTURA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ACUACULTURA



## EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO Y CAROTENOGÉNESIS DE CUATRO CEPAS DE MICROALGAS MARINAS BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS POR ILUMINACIÓN A TEMPERATURA Y SALINIDAD CONSTANTES

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

**JESÚS PEDRO MORENO BAYÓN**

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



“El saber de mis hijos  
hará mi grandeza”



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## CONTENIDO

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| RESUMEN   | i             |
| ABSTRACT  | ii            |
| ÍNDICE DE FIGURAS                                 | iii           |
| ÍNDICE DE TABLAS                                  | v             |
| I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES                    |               |
| I.1 Generalidades de las microalgas               | 1             |
| I.2 Microalgas utilizadas en esta investigación   | 3             |
| I.2.1 <i>Isochrysis</i> sp.                       | 3             |
| I.2.2 <i>Tetraselmis</i> sp.                      | 3             |
| I.2.3 <i>Chaetoceros</i> sp.                      | 4             |
| I.2.4 <i>Dunaliella</i> sp.                       | 4             |
| I.3 Pigmentos carotenoides                        | 5             |
| I.4 Importancia comercial                         | 7             |
| II. OBJETIVO GENERAL                              | 9             |
| II.1 Objetivos particulares                       | 9             |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS                         | 10            |
| III.1 Intensidades Luminosas Experimentales       | 10            |
| III.2 Temperatura                                 | 11            |
| III.3 Salinidad                                   | 11            |
| III.4 Preparación del medio de cultivo            | 11            |
| III.5 Diseño Experimental                         | 13            |
| III.6 Determinación de las curvas de crecimiento  | 13            |
| III.7 Cuantificación de clorofilas y carotenoides | 14            |
| III.8 Análisis Estadístico                        | 15            |
| IV. RESULTADOS                                    | 16            |
| IV.1 Crecimiento de los cultivos                  | 16            |
| IV.1.1 Crecimiento en alta intensidad luminosa    | 16            |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| IV.1.2 | Crecimiento en mediana intensidad luminosa        | 17 |
| IV.1.3 | Crecimiento en baja intensidad luminosa           | 18 |
| IV.1.4 | Análisis estadístico para el crecimiento celular  | 20 |
| IV.2   | Clorofilas  | 21 |
| IV.2.1 | Producción de clorofilas en alta iluminación      | 21 |
| IV.2.2 | Producción de clorofilas en mediana iluminación   | 22 |
| IV.2.3 | Producción de clorofilas en baja iluminación      | 23 |
| IV.2.4 | Análisis estadístico para clorofilas              | 24 |
| IV.3   | Carotenoides                                      | 25 |
| IV.3.1 | Producción de carotenoides en alta iluminación    | 25 |
| IV.3.2 | Producción de carotenoides en mediana iluminación | 26 |
| IV.3.3 | Producción de carotenoides en baja iluminación    | 27 |
| IV.3.4 | Análisis estadístico de carotenoides              | 28 |
| IV.4   | Carotenoides por célula                           | 29 |
| IV.4.1 | Carotenoides por célula en alta iluminación       | 29 |
| IV.4.2 | Carotenoides por célula en mediana iluminación    | 30 |
| IV.4.3 | Carotenoides por célula en baja iluminación       | 31 |
| V.     | DISCUSIONES                                       | 32 |
| V.1    | Crecimiento celular                               | 32 |
| V.2    | Clorofilas  | 34 |
| V.3    | Carotenoides                                      | 35 |
| VI.    | CONCLUSIONES                                      | 37 |
| VII.   | RECOMENDACIONES                                   | 38 |
| VIII.  | LITERATURA CITADA                                 | 39 |
|        | ANEXO 1   | 45 |
|        | ANEXO 2   | 48 |
|        | ANEXO 3   | 51 |

## RESUMEN

Se llevaron a cabo tres experimentos en el laboratorio de acuicultura del Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora, utilizando cuatro cepas de microalgas marinas de uso común en acuicultura de la región. Las microalgas estudiadas fueron *Isochrysis* sp., *Tetraselmis* sp., *Chaetoceros* sp. y *Dunaliella* sp., se sometieron a tres diferentes intensidades luminosas (400 alta, 210 media y 65 baja expresadas en  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Se utilizó el medio “f/2”, a T°C y Salinidad constantes, los experimentos duraron 12 días, y se muestreo cada 24 h. El crecimiento y densidad celular de los cultivos se hicieron por conteos directos, utilizando una cámara de Neubauer, la producción de clorofilas y carotenoides totales se determino por espectrofotometría. Se realizó un análisis estadístico ANOVA de dos vías y la prueba de Scheffé con un nivel de significancia  $\alpha=0.05$  para las variables de interés, los días 4<sup>to.</sup>, 8<sup>vo.</sup> y 12<sup>vo.</sup> de los experimentos. *Isochrysis* sp. fue la cepa con mayor crecimiento y densidades celulares, presentando en mediana iluminación su máximo crecimiento que fue de  $19.17 \pm 2.90 \times 10^6$  cel·mL<sup>-1</sup>. *Dunaliella* sp. fue el género con mayor producción de clorofilas y carotenoides y se presentaron en baja intensidad luminosa, en el 4<sup>to.</sup> día de experimento las clorofilas alcanzaron  $127 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3} \pm 13.48$  y para los carotenoides totales  $210.77 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3} \pm 19.13$  hacia el 8<sup>vo.</sup> día del experimento. *Tetraselmis* sp. fue la microalga que mostró mayor concentración de carotenoides por célula, y alcanzó 50.6 pg/cel en el experimento en alta iluminación.

## ABSTRACT

Three experiments were carried out in the facilities of the Center for Scientific and Technological Research of the University of Sonora, utilizing four different strains of marine microalgae of common use in the aquaculture systems of the region. The microalgae *Isochrysis* sp., *Tetraselmis* sp., *Chaetoceros* sp. and *Dunaliella* sp., were studied under different luminous intensities, which were:  $400 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (high),  $210 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (medium) and  $65 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (low). The experiment lasted 12 days, the culture media used was “f/2”, at constant T°C and Salinity, sampling was done every 24 hours. Growth and cellular density was determined by direct count using a Neubauer chamber, chlorophyll and carotenoid production was determined by means of spectrophotometry. A two way Anova statistical analysis was done and a Scheffé test was carried out afterwards, for the variables of interest of the 4<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> days of the experiments. *Isochrysis* sp. was found to have the best growth, which was  $19.17 \pm 2.90 \times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$  and the best cellular density at medium illumination. *Dunaliella* sp. was the gender whit the highest production of chlorophylls and carotenoids that were presented in low light intensity. On the 4th day of the experiment the chlorophyll reached  $127 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3} \pm 13.48$  and  $210.77 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3} \pm 19.13$  total carotenoids to the 8th. day of the experiment. *Tetraselmis* sp. was the microalgae that showed the greatest concentration of carotenoids per cell, and reached  $50.60 \text{ pg / cell}$  in the experiment at high

## ÍNDICE DE FIGURAS

| <b>Figura</b>   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| 1. Crecimiento celular (cel./mL) de las cuatro cepas de microalgas en alta iluminación ( $400\mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ )                          | 16            |
| 2. Crecimiento celular (cel./mL) de las cuatro cepas de microalgas en mediana iluminación ( $210\mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ )                       | 17            |
| 3. Crecimiento celular (cel./mL) de las cuatro cepas de microalgas en baja iluminación ( $65\mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ )                           | 19            |
| 4. Producción de Clorofilas ( $\text{mg}/\text{m}^3$ ) de las cuatro cepas de microalgas en alta iluminación ( $400\mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ )    | 20            |
| 5. Producción de Clorofilas ( $\text{mg}/\text{m}^3$ ) de las cuatro cepas de microalgas en mediana iluminación ( $210\mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ ) | 22            |
| 6. Producción de Clorofilas ( $\text{mg}/\text{m}^3$ ) de las cuatro cepas de microalgas baja iluminación ( $65\mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ )        | 23            |
| 7. Carotenoides ( $\text{mg}/\text{m}^3$ ) producidos por las cuatro cepas de microalgas en alta iluminación ( $400\mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ )    | 25            |
| 8. Carotenoides ( $\text{mg}/\text{m}^3$ ) producidos por las cuatro cepas de microalgas en mediana iluminación ( $210\mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ ) | 26            |
| 9. Carotenoides ( $\text{mg}/\text{m}^3$ ) producidos por las cuatro cepas de microalgas en baja iluminación ( $65\mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ )     | 27            |

10. Carotenoides por célula (pg/cel.) producidos por las cuatro cepas de microalgas en alta iluminación a ( $400 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) 29
11. Carotenoides por célula (pg/cel.) producidos por las cuatro cepas de microalgas en mediana iluminación a ( $210 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) 30
12. Carotenoides por célula (pg/cel.) producidos por las cuatro cepas de microalgas en baja iluminación a ( $65 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) 31

## ÍNDICE DE TABLAS

| <b>Tabla</b> |  | <b>Página</b> |
|--------------|--|---------------|
| I.           | Soluciones madre para preparar el medio f/2.   | 12            |
| II.          | Resultados de la prueba de Scheffé para la variable crecimiento celular para los días 4, 8 y 12 de los experimentos en alta, media y baja iluminación, expresada en (cél·mL <sup>-1</sup> ). | 20            |
| III.         | Resultados de la prueba de Scheffé para la variable Clorofilas, los días 4, 8 y 12 de los experimentos en alta, media y baja iluminación, expresada (mg/m <sup>3</sup> ).                    | 24            |
| IV.          | Resultados de la prueba de Scheffé para Carotenoides, los días 4, 8 y 12 de los experimentos en alta, media y baja iluminación, expresada (mg/m <sup>3</sup> ).                              | 28            |

## I.- INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

### I.1.- Generalidades de las microalgas

Las microalgas son organismos unicelulares eucariotas fotosintéticos capaces de transformar la energía luminosa en energía química con una eficiencia cuatro veces superior a la de las plantas. Su importancia radica en su papel como productores primarios de la cadena trófica, que las constituyen en las primeras formadoras de materia orgánica. Por su tamaño reducido y variado (5–50  $\mu\text{m}$  en promedio) son de fácil captura y digestión por multitud de organismos que se alimentan en forma directa del fitoplancton (Abalde, 2004).

Las condiciones óptimas de temperatura, intensidad luminosa, salinidad, nutrientes y pH para el cultivo de microalgas, varían ampliamente de una especie a otra, estos parámetros fisicoquímicos, han sido determinados en laboratorio y nos ayudan a comprender las condiciones óptimas para el desarrollo de las diferentes especies en cultivo. Actualmente a nivel comercial, los cultivos masivos de microalgas al exterior y los fotobiorreactores cobran mayor importancia para la producción de compuestos químicos de alta pureza, como: biocombustibles, biofertilizantes, intercambiadores iónicos y carotenos; así mismo, para el tratamiento de aguas residuales, obtención de compuestos terapéuticos y como alimento de consumo humano y animal (Contreras-Flores y col., 2003).

En condiciones normales todas las clases de microalgas poseen invariablemente la clorofila-*a* que confiere el color verde a las algas y al menos un pigmento accesorio, que puede enmascarar en ocasiones a la clorofila-*a*. La clorofila-*b* se encuentra en las plantas verdes, la clorofila *c* en diatomeas, dinoflagelados y algas pardas y la clorofila *d* en las algas rojas. Cultivadas bajo condiciones adecuadas de iluminación, temperatura, salinidad y concentración de nutrientes, las microalgas representan una excelente fuente de pigmentos carotenoides. Diversos estudios han demostrado que la producción de carotenoides en microalgas, como *Dunaliella salina*, puede optimizarse mediante variaciones en las condiciones de cultivo tales como: altas salinidades; incremento en la irradiancia y en la temperatura (Ben-Amotz, 1987); ó estrés por limitación de nutrientes (Borowitzka y Borowitzka, 1988).

Las microalgas como organismos autótrofos fotosintetisadores, dependen de la luz para su desarrollo y producción de materia orgánica. La respuesta fotosintética a la energía luminosa se caracteriza por una respuesta lineal baja al incremento en la irradiancia, hasta llegar a su máxima capacidad fotosintética, donde las células son independientes de la irradiación (Abalde, 2004). Bajo condiciones estables (no movimiento) las células se aclimatan a un nivel de irradiancia, obteniendo bajo esas condiciones tasas de crecimiento y fotosintéticas no necesariamente óptimas mediante un ajuste en sus procesos fisiológicos. En células aclimatadas a bajas irradiancias, la concentración de clorofila se incrementa para poder obtener la energía luminosa necesaria para continuar con el proceso fotosintético. Por otro lado, células aclimatadas a altas irradiancia, decrece la concentración celular de clorofila-*a* e incrementan la concentración de pigmentos accesorios fotoprotectores (carotenos) para evitar la oxidación de los fotosistemas. MacIntyre y col., (2002), reportan que células aclimatadas a alta iluminación no mostraron una tasa de crecimiento mayor que células en baja iluminación, porque a saturación de luz, las concentraciones de clorofilas serán proporcionalmente mucho menores de la masa total de los pigmentos celulares en alta iluminación.

Se ha observado que la salinidad alta tiene influencia en la capacidad de la microalgas para adquirir los nutrientes necesarios para su crecimiento y productividad. Algunos autores han documentado una disminución en las densidades celulares finales cuando se aumenta la salinidad del medio de cultivo (Serpa-Ibáñez, 2006; Barbarena y Montoya, 1990; Ben Amotz y Avron, 1989; Borowitzka y Borowitzka 1988; y Cifuentes y col., 1992). Estas condiciones no favorecen la producción de clorofilas, y si la de pigmentos accesorios, ya que a limitación de nutrientes (nitrógeno) las clorofilas son precursoras de otros pigmentos, razón por la cual puede haber una producción de carotenos celulares bajo estas condiciones (Cullen y Eppley, 1981).

Entre los compuestos de más interés obtenidos de las microalgas, destacan los carotenoides, biodiesel, ficobiliproteínas, lípidos, polisacáridos, y compuestos con actividad biológica provenientes de las especies más utilizadas tales como *Dunaliella*, *Spirulina* y *Porphyridium*. (Abalde y col., 1995) además de *Chlorella*, y *Hematococcus*. Se han identificado más de 600 carotenoides producidos naturalmente en plantas, animales y hongos, de los cuales 400 han sido aislados y caracterizados; de éstos sólo un número reducido se

utiliza comercialmente destacando entre ellos el  $\beta$ -caroteno y la astaxantina y solo 50 poseen actividad provitamina A. Los carotenoides hidrocarbonados se denominan colectivamente como carotenos y aquellos que contienen oxígeno se denominan xantofilas (Ong & Choo, 1997; Rodríguez-Amaya, 1999; Che Man y Tan, 2003).

La mayoría de los carotenoides se obtienen mediante síntesis química. Solo dos microalgas unicelulares clorofíceas son fuentes comerciales reconocidas de carotenoides: la microalga flagelada *Dunaliella salina*, que acumula  $\beta$ -caroteno y el alga verde de agua dulce *Haematococcus pluvialis* que produce astaxantina. Existen además otras especies de microalgas y cianobacterias cultivadas comercialmente como son: *Chlorella*, *Spirullina*, *Dunaliella*, *Nannochloris*, *Nitzschia*, *Cryptocodinium*, *Schizochytrium*, *Skeletonema*, *Isochrysis* y *Chaetoceros* (Sánchez-Varo, 2000).

## **I.2.- Microalgas utilizadas en esta investigación**

### **I.2.1. *Isochrysis* sp**

Pertenece a la clase Haptophyceae, es una célula flagelada de color amarillo con dos flagelos móviles, sin pared celular, que tiene un tamaño de entre 6 y 8 micras. Es un alga que crece a temperaturas entre 16 y 35°C, salinidades entre 25 a 28 e iluminación intermedia (4000 lux). Esta especie es muy importante como alimento para las larvas de moluscos bivalvos y larvas de camarón (Fabregas y col., 1985). *Isochrysis*.aff *galbana* (clon T-ISO) constituyen especies de enorme interés dentro de la acuicultura, que por sus altos contenidos de ácidos grasos poli-insaturados, ácido ecosapentanoico (EPA) y ácido docosahexanoico (DHA) respectivamente, desempeñan un papel fundamental en el área de la alimentación larvaria. (Salas-Leiton y col., 2003) (Anexo 1. Figura i, ii).

### **I.2.2. *Tetraselmis* sp**

Esta microalga pertenece a la clase Prasinophyceae. Es una célula comprimida elipsoidal que mide entre 10 y 16 micras de largo, de color verde brillante y posee 4 flagelos. Es un alga eurihalina que crece a temperaturas entre 18 y 30 °C, pH entre 7.5 y 8.0 y

salinidades de 25 a 40 e iluminación constante con fotoperiodo natural. Esta especie ha sido empleada regularmente como alimento para moluscos bivalvos (larvas, semillas y adultos), así como en los estadios larvarios de peces y crustáceos. *Tetraselmis* sp. muestra un alto potencial como probiótico (Irianto y Austin, 2002), y por su alto contenido de vitamina E ha sido propuesta como fuente de vitaminas para consumo humano y animal (Carballo-Cárdenas y col., 2003) (Anexo 1, figura iii y iv).

### **I.2.3. *Chaetoceros* sp.**

*Chaetoceros* sp pertenece a la clase Bacillariophyceae, es una diatomea céntrica planctónica cosmopolita, son unicelulares y no forman cadenas, mide entre 6 - 8 micras en su eje apical, tiene 4 setas o espinas. Las condiciones de cultivo son: temperatura entre 16 y 40°C, salinidades entre 28 y 40, con iluminación constante y fotoperiodo natural. Esta especie es ampliamente utilizada como alimento en los primeros estadios larvarios de camarones peneidos y durante todo el ciclo de vida de moluscos bivalvos. (López-Elías y col., 2004). *Chaetoceros* sp presenta los niveles más altos de producción de carotenoides en cultivos batch, con alta iluminación ( $400 \mu\text{E m}^2 \text{s}^{-1}$ ) durante la etapa exponencial de su curva de crecimiento, siendo su mayor eficiencia de crecimiento relativo a  $210 \mu\text{E m}^2 \text{s}^{-1}$  y la luz blanca la más eficiente para promover su crecimiento. La concentración de clorofila es más alta durante el crecimiento exponencial que en el estacionario y en todos los casos los carotenoides mantienen una tendencia inversa a las clorofilas. (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2002) (Anexo 1, Figura v y vi).

### **I.2.4. *Dunaliella* sp.**

Pertenece a clase Chlorophyceae, es una célula verde-amarillo, posee 2 flagelos móviles, de forma ovoide con el extremo anterior agudo y el posterior redondo. Miden entre 9 y 11 micras de largo y 6 micras de diámetro. Es un alga eurihalina que crece a temperaturas de 16 a 28°C, aunque se adapta a salinidades altas e iluminación constante. *Dunaliella* tolera pH's de entre 5.5-10, siendo 7 el óptimo (López-Elías y col., 2004), sin embargo el pH óptimo para la producción de  $\beta$ -caroteno por *Dunaliella salina* es pH=9 y presenta una amplia tolerancia a la

temperatura, siendo la óptima entre 20 y 40° C. (Sánchez-Varo, 2002). Esta especie se considera como un alimento adecuado para moluscos, algunos peces de agua dulce y crustáceos, es la especie más utilizada en la producción industrial de  $\beta$ -caroteno.

*Dunaliella salina* se ha reportado como la mayor fuente natural de  $\beta$ -caroteno, posee la habilidad de acumular grandes cantidades de este tetraterpeno (10 al 14% de su masa seca) cuando se somete a condiciones de cultivo estresantes (Ben-Amotz y Avron, 1982), seguida por *Dunaliella parva* y *Dunaliella tertiolecta*, con 9% de su masa seca y *Dunaliella viridis*, con 7% de  $\beta$ -caroteno y carotenoides mixtos (Moulton y Burford, 1990) (Anexo 1, Figura vii y viii).

### **I.3.- Pigmentos Carotenoides**

Los carotenoides son un grupo de pigmentos que le proporciona sus colores característicos a los vegetales, desempeñan su función principal en la fotosíntesis, dado que poseen capacidad para extinguir moléculas en estado tripe y regresarlas a su estado basal. Para extinguir la energía de excitación del oxígeno en estado simple (altamente destructivo) y regresarlas a su estado triple normal (el oxígeno es una molécula inusual dado que es más estable en estado triple que en estado simple), también presentan extinción de los centros de reacción de los fotosistemas cuando son sobreexcitados por la luz muy intensa. Con su capacidad antioxidante neutralizan o bloquean la recepción de radicales libres del oxígeno que puedan causar daño a las estructuras y funciones de la membrana celular y al ADN de las proteínas. (Ramos-Carrión, 2007; Capelli y Cysewski, 2007).

Los carotenos son componentes del metabolismo secundario de las plantas, tanto los carotenoides como la astaxantina son un producto de la vía mevalónica a través del acetato proveniente de la fotosíntesis y de la respiración, conocida también como vía de los terpenos. El ácido mevalónico da origen a un polímero isopentil difosfato de 5 carbonos (C5) formando: Geranildifosfato (C10) monoterpenos, esteroides y triterpenos (C30), el farnesildifosfato (C15), da origen a sesquiterpenos (C15) y escualeno; al Geranilgeranildifosfato (C20), diterpenos, fitoles y la clorofilas, así como al fitoeno, este por desaturación produce el Licopeno principal (pigmento del tomate y compuesto acíclico) que por una doble ciclización da origen al  $\beta$ -

caroteno (que da la coloración amarillo naranja a la zanahoria) y dos núcleos de  $\beta$ -ionona. La oxigenación de  $\beta$ -caroteno, confiere la coloración naranja de la cantaxantina, posteriormente la hidroxilación produce las xantofilas y diversos compuestos carotenoides: luteína, zeaxantina, equinenona, cantaxantina (originada de la oxigenación del  $\beta$ -caroteno) y finalmente astaxantina (anexo 1, Fig. i.) (Goodwin, 1980; Goodwin, 1984; Young y Britton, 1993; Margalith, 1999; Salas-González 2000).

Los carotenoides se encuentran como tetraterpenos en los pigmentos fotosintéticos o en complejos proteicos en plantas superiores y bacterias fototróficas, incluyendo cianobacterias. La función de la astaxantina en las microalgas es la fotoprotección del aparato fotosintético bajo diferentes condiciones de estrés (Borowitzka y col., 1991; Boussiba y Vonshak, 1991; Kobayashi y col., 1997) Se trata de un cetocarotenoide derivado del  $\beta$ -caroteno y que se caracteriza por poseer un grupo ceto (=O) y un grupo hidroxilo (-OH) en los extremos cíclicos de la molécula, que le confieren un gran poder reactivo, por lo que se clasifican dentro de las xantofilas mientras la luteína posee un grupo (-OH) que la ubica como un caroteno al igual que el  $\beta$ -caroteno (Higuere-Ciapara y col., 2006).

La producción de carotenoides a niveles masivos a partir del cultivo de microalgas se postuló en los años 50's, como una alternativa para obtener alimento para el hombre (Becker, 1994). En los años 60's y 70's se buscó desarrollar el rendimiento de biomasa en los cultivos de estos organismos. Con el transcurso de los años se diversificaron las áreas para las microalgas eucariotas (Vílchez y col., 1997) y cianobacterias (Morales y col., 2002; Prosperi y col., 2000). El  $\beta$ -caroteno fue el primer carotenoide purificado en 1831 por Wackenroder quien lo aisló en forma cristalina partir de la zanahoria, dándole el nombre que lleva, derivado de la denominación latina de este vegetal (*Daucus carota*). También fue el primer carotenoide natural producido a nivel industrial a partir de microalgas. Otros de igual importancia son el licopeno, el cual confiere su color característico a los tomates, así como la luteína que se encuentra presente en todos los vegetales de hojas verdes (Chung y col., 2004).

Shpigel y col (2006) concluyen que el  $\beta$ -caroteno es un precursor de la echinenona en las gónadas del erizo *Paracentrotus lividus*, encontrando una correlación directa entre la concentración y la coloración comercialmente deseable de las gónadas (Fig. iii, Anexo 2). La astaxantina influye en la reproducción en animales: en salmónidos es movilizada desde el

músculo a los ovarios antes de la puesta (Nakano y col., 1999; Bell y col., 2000), la carencia de este pigmento en la dieta de las larvas de peces puede llevar a problemas en el desarrollo larvario como sucede en las larvas de “halibut” o mejor conocido como “lenguado” produciéndose una producción anormal del ojo y una mala pigmentación (Ronnestad y col., 1998). La astaxantina es usada para la pigmentación de la piel y la carne de peces, sobre todo en salmónidos, aunque también en cultivo de crustáceos, dorada rodaballo y peces ornamentales (Lorenz y col., 2000). También se cree que la astaxantina es importante en la reproducción de estas especies (Higuera-Ciapara y col., 2006).

El licopeno, el  $\beta$ -caroteno, la luteína así como las xantofilas (astaxantina y cantaxantina) son los principales carotenoides de interés comercial. Al licopeno como a otros carotenoides, se le atribuyen no solo funciones antioxidantes sino también otras propiedades, como favorecer la disminución del colesterol en la sangre, prevenir la inflamación de próstata, reducir la posibilidad de padecer distintos tipos de cáncer, aterosclerosis e infartos cerebrales. (Torresani, 2009).

Se ha encontrado que la astaxantina es 550 veces más potente que la vitamina E y 11 veces más que el  $\beta$ -caroteno como antioxidante, la astaxantina protege del daño de los rayos de luz ultra violeta, previene la degeneración macular y pérdida de visión, lo mismo que la luteína. La astaxantina tiene un elevado potencial como antioxidante, inmunoregulador, anti-inflamatorio y agente anticarcinogénico, y en los últimos años el interés por este pigmento se ha ido incrementando a medida que nuevos estudios le confieren nuevas propiedades y no solo la capacidad de pigmentación (Guerin y col., 2003; Capelli y Cysewski 2007)

#### **I.4.- Importancia comercial.**

La demanda de carotenoides de origen natural ha crecido de manera continua desde la década de los 70's. Sanchez-Varo 2002 reportó que el precio aproximado para una presentación en polvo que contenga entre un 5 y un 10% de carotenoides activo era de 600 USD por Kg. para el  $\beta$ -caroteno, 900 USD para los apocarotenoides, 1300 USD para la cantaxantina y 2500 USD para la astaxantina. Que en ese momento eran los carotenoides más utilizados como suplementos alimenticios y en la industria de alimentos funcionales.

En el 2004 se estimó en 887 millones de dólares el valor total del mercado de todos los carotenoides comercialmente usados a nivel mundial, y con una tasa de aumento promedio anual del 2.2% aproximadamente (BCC Reseach 2004). Sin embargo el éxito más grande del mercado de carotenoides durante el año 2004 fue la luteína, cuando impuso un valor de mercado de \$139 millones de dólares en ese año (BCC Reseach 2004).

Se ha estimado que las ventas anuales de carotenoides sintéticos ascienden a 500 millones de dólares, y a pesar de que las estimaciones de crecimiento del mercado mundial de carotenoides no fue lo que se esperaba, para el 2007 alcanzó los \$ 766 millones de dólares. De esta forma se espera que aumente a \$ 919 millones de dólares para el 2015, a una tasa de crecimiento anual compuesto de 2.3%. El  $\beta$ -caroteno posee la mayor cuota de mercado con un valor de 247 millones en el 2007, y se espera que este segmento alcance un valor de 285 millones de dólares en 2015 (BCC Reseach 2007).

Se han establecido plantas de producción de  $\beta$ -caroteno utilizando la microalga *Dunaliella* sp. en Australia, Estados Unidos e Israel. En los cultivos se utilizan tanto sistemas extensivos como intensivos, las cifras conocidas colocan a Australia como el principal productor con 640 ha. y una producción entre 16-20 ton/año. Israel con 5 ha. 3-4 ton/año (Del Campo y col., 2007). Otras microalgas acumulan carotenoides de interés comercial, constituyendo fuentes potenciales de estos pigmentos que poseen un alto valor en el mercado.

Por lo anterior, la finalidad de esta investigación es explorar la capacidad de carotenogénesis de cuatro de los géneros de microalgas endémicas, utilizadas en la acuicultura de la región y evaluar su potencial de producción de estos pigmentos. Los cuales por sus propiedades como antioxidantes y por sus usos tanto en la alimentación animal como humana, poseen un alto interés científico y valor comercial añadidos.

## **II.- OBJETIVO GENERAL**

Evaluación del crecimiento y carotenogénesis de cuatro cepas de microalgas marinas *Isochrysis* sp., *Tetraselmis* sp., *Chaetoceros* sp. y *Dunaliella* sp. bajo condiciones de estrés por iluminación a temperatura y salinidad constantes.

### **II.1- Objetivos particulares**

- 1.- Evaluar el crecimiento y carotenogénesis de las cuatro microalgas en condiciones de laboratorio a tres intensidades luminosas.
- 2.- Cuantificar la producción de clorofila y carotenoides de las cuatro microalgas, por espectrofotometría.
- 3.- Determinar que intensidad luminosa favorece la producción de carotenoides de las cuatro cepas de microalgas utilizadas.
- 4.- Comparar la producción de pigmentos carotenoides por célula de las cuatro microalgas en las tres intensidades luminosas

### III.- MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron tres experimentos consistentes en cultivos estáticos con cuatro cepas de microalgas del cepario del Laboratorio de Acuicultura, del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS).

Los géneros utilizados en este experimento fueron: *Isochrysis* sp. *Tetraselmis* sp. *Chaetoceros* sp. y *Dunaliella* sp. Las microalgas fueron aclimatadas a tres diferentes intensidades luminosas (65, 210 y 400  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Los experimentos se llevaron a cabo bajo condiciones controladas en una cámara ambiental, manteniendo la temperatura en  $25 \pm 1.0$  °C y salinidad de 30. constantes.

#### III.1-Intensidades Luminosas Experimentales.

Para lograr una distribución uniforme de la luz, las paredes de la cámara fueron cubiertas con papel aluminio, lo cual permitió obtener mediciones mas uniformes de las intensidades luminosas deseadas. La iluminación fue medida en Kluxes con un fotómetro marca Fisher, para determinar la iluminación se tomaron al menos 30 lecturas dentro de la cámara y se promediaron. Las lecturas fueron obtenidas en kluxes y transformadas a  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  según la ecuación de Thimijan, 1982. La fórmula utilizada fue la siguiente:

$$\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1} = (0.0135) \text{ Lux}$$

Donde:  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  es la radiación fotosintéticamente activa (PAR), Lux es la medida de la intensidad luminosa medida con el fotómetro y 0.0135 es la constante que relaciona ambos mediciones.

Se ajustaron tres diferentes intensidades luminosas dentro de la cámara de crecimiento, 65  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  para una Baja Iluminación (BI), 210  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  Mediana iluminación (MI) y 400  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  para Alta iluminación (AI). Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y a diferentes tiempos, modificando únicamente la iluminación requerida en cada caso. Cada experimento tuvo una duración de 12 días.

### **III. 2. Temperatura.**

La cámara de crecimiento se mantuvo a una temperatura constante de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  durante los experimentos, mediante un aparato de refrigeración y un ventilador de para mantener el flujo de aire dentro de la cámara, las mediciones de temperatura se realizaron cada 12 horas durante los 12 días de duración de los mismos con un termómetro de mercurio marca Brannan con un rango de  $-20$  a  $110^\circ\text{C}$ .

### **III. 3. Salinidad.**

La salinidad a la que se mantienen las cepas de microalgas en el cepario del laboratorio de acuicultura es de 30, tomando en cuenta ésto y para evitar que las microalgas sufrieran estrés por salinidad, fue necesario hacer un ajuste de la misma. El agua de mar disponible para los experimentos tuvo una salinidad de 40, así que para lograr la salinidad buscada se aplicó la ecuación:

$$C_1V_1=C_2V_2$$

Y se hicieron los ajusten necesarios con agua desionizada. La salinidad se midió con un Refractómetro marca Westover modelo RHS10ATC (rango: 0-100, 1,000-1,070 nD índice refractivo).

### **III. 4. Preparación del medio de cultivo**

Se utilizó agua de mar, primeramente filtrada con filtro de papel de 10 micras y después con filtros de fibra de vidrio GF/F de 2.4 mm de diámetro y retención de  $0.7 \mu\text{m}$ , buscando con ésto disminuir el exceso de detritus y organismos que interfirieran posteriormente con los conteos celulares. Las cuatro especies se trabajaron por triplicado, por lo que se prepararon doce matraces Erlenmeyer de 250 ml por experimento, cada uno con un volumen de 150 mL del medio “f/2”, derivado del medio “f” de Guillard (1962), en una concentración de 1.0 ml/L de cada una de las soluciones: constituyentes mayores (nitratos  $\text{NO}_3$ , fosfatos  $\text{PO}_4$ , silicatos  $\text{SiO}_2$ ), metales traza + EDTA y vitaminas (tabla 1) Posteriormente fueron esterilizados en

autoclave a (120°C/15 min/15psi). Se midió el pH de los medios ya preparados, el pH inicial de los tres experimentos fue 8.0 y fue determinado con un potenciómetro (marca Hanna instruments modelo HI98108) rango de 4-9.

Tabla I. Soluciones madre para preparar el medio f/2. Para preparar un litro de medio, se agregó un mL de c/u de las soluciones 1, 2.2 y 3.2 a un litro de agua de mar filtrada.

|  |   |
|--|---|
| <b>1. Nutrientes mayores</b>                 | <b>g/L de Agua de mar</b>                   |
| 1.1 Nitrato de sodio, granulado y refinado   | 75  |
| 1.2 Fosfato de sodio monobásico              | 5   |
| 1.3 Silicato de sodio metasoluble            | 30  |
| <b>2.1 Metales traza</b>                     | <b>g/100 mL de agua destilada</b>           |
| 2.1. Sulfato cúprico, cristales finos        | 0.98  |
| 2.1.1. Sulfato de zinc, cristales finos      | 2.20  |
| 2.1.2. Cloruro de cobalto, cristales finos   | 1.00  |
| 2.1.3. Cloruro de Manganeso, cristales finos | 18.00                                       |
| 2.1.4. Molibdato de sodio, cristales finos   | 0.63  |
| <b>2.2. Solución secundaria</b>              | <b>g/100 mL de agua destilada</b>           |
| 2.2.1. Cloruro férrico                       | 3.15  |
| 2.2.2. EDTA disódico                         | 4.36  |
| 2.2.3. Metales traza o alternativamente      | 1 mL de c/u de las soluciones               |
| 2.2.1. EDTA férrico                          | 5.00  |
| 2.2.2. Metales traza                         | 1 mL de c/u de las soluciones               |
| <b>3. Vitaminas</b>                          | <b>g/1000 mL de agua destilada</b>          |
| 3.1. Biotina cristalizada                    | 0.10  |
| 3.2. Cianocobalamina                         | 1.00  |
| <b>3.2. Solución secundaria</b>              | <b>Cantidad en 100 ml de agua destilada</b> |
| 3.2.1. Biotina                               | 1ml de la solución                          |
| 3.2.2. Cianocobalamian (B12)                 | 1ml de la solución                          |
| 3.2.3. Tiamina Clorhidrica (B1)              | 20.00 mg                                    |

Voltolina et.al, 1989.

### **III.5. Diseño Experimental**

Para aclimatar las microalgas, se inoculó 1.0 mL del cultivo madre en tubos de ensaye de 20 mL de capacidad con 15 mL de medio de cultivo, y se mantuvieron en las condiciones normales del cepario: iluminación de  $65\mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ , temperatura de 23 a 25°C y salinidad de 30‰. Cada dos días durante una semana se hicieron recambios de todas las preparaciones, en una cabina de flujo laminar y bioseguridad (Marca LABCONCO modelo DELTA Clase II, Tipo B2).

Posteriormente, las cuatro cepas fueron escaladas a matraces erlenmeyer de 250 mL y aclimatadas durante una semana a las diferentes intensidades luminosas, con recambio cada dos días. Al momento de realizar los cultivos definitivos las cepas se encontraban en la fase exponencial, los experimentos se iniciaron con un inóculo de  $0.01 \times 10^6$  cél·mL<sup>-1</sup>, ya que para determinar fielmente las curvas de crecimiento en volúmenes de cultivo pequeños, se requiere iniciar los cultivos con concentraciones celulares bajas por ejemplo  $1.0 \times 10^6$  Becerra-Dórame (com. pers.<sup>1</sup>). Para mantener constantes los parámetros; iluminación de cada experimento, temperatura y salinidad, los experimentos se llevaron a cabo en una cámara ambiental (Environmental Chamber Lab-Line Modelo Biotronette MarkIII).

### **III.6. Determinación de las curvas de crecimiento**

Cada uno de los experimentos tuvo una duración de 12 días. Para determinar la densidad celular y las curvas de crecimiento de las microalgas, se tomó una muestra de 1.0 mL cada 24 hr de cada una de las réplicas, las muestras fueron fijadas con lugol (solución de I<sub>2</sub> (1%) KI (2%) en agua destilada) y almacenadas en oscuridad y refrigeración para el posterior conteo celular.

Al mismo tiempo, de cada muestra se tomaron dos alícuotas de 5.0 mL y fueron filtradas en filtros GF/F de 4.7 mm, empacadas con papel aluminio y almacenadas a -20°C, para el posterior análisis de clorofilas y carotenoides.

**1. Becerra-Dórame, M. de J. Alumno del Doctorado en Biociencias D.I.C.T.U.S. Universidad de Sonora.**

Los conteos celulares se realizaron utilizando una cámara de Neubauer de 0.1mm de profundidad, en un microscopio compuesto (Marca Carl Zeiss, modelo Axiostar Plus. El número de células/mililitro se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Cel./mL} = \frac{\text{No. de células totales}}{\text{No. de cuadros contados}} \times 10,000$$

Con los datos obtenidos de los conteos celulares se calcularon: las tasas de crecimiento  $\mu$  (numero de divisiones por día), se determinó la tasa máxima de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ) y la tasa de crecimiento acumulada que es igual a la sumatoria de  $\mu$  ( $\Sigma\mu$ ). Adicionalmente se calculó la desviación estándar de las tasas de crecimiento y se elaboraron las tablas correspondientes (Anexo 1). El tiempo de duplicación para cada una de los géneros se calculó utilizando la formula:

$$\mu = (\text{Log}2B_n - \text{Log}2B_o) / (t_n - t_o)$$

### III.7. Cuantificación de clorofilas y carotenoides

Las muestras se analizaron por espectrofotometría, en un Espectrofotómetro PERKIN ELMER modelo Lambda 2S UV-Visible Rango de Longitud de Onda: 190 nm a 1100 nm. Velocidad de Barrido desde 7.5 nm/min hasta 2880 nm/min. La cantidad de pigmentos en las muestras se calcularon usando las ecuaciones tricromáticas para clorofilas y carotenoides de acuerdo a Jeffrey (1975).

Los picogramos por célula se calcularon con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Concentración de carotenoides totales (mg/m}^3\text{)}}{\text{Densidad celular (cel/mL)}} \times 1000 = (\text{pg.cel}^{-1})$$

### **III.8.-Análisis Estadístico**

Se calcularon promedios y desviación estándar de las tasas de crecimiento y los datos se utilizaron para la elaboración de gráficas de curvas de crecimiento, producción de clorofilas y carotenoides. Se realizó una prueba ANOVA de dos vías de los datos sin transformar utilizando el programa SigmaStat para determinar si los datos eran normales y homocedásticos. Todos los análisis y pruebas estadísticas se hicieron para las variables dependientes de crecimiento celular, clorofilas y carotenoides, teniendo como variables independientes los cuatro géneros de microalgas motivo de estudio y las tres diferentes intensidades luminosas (alta, media y baja). Se procesaron los datos por separado para el 4<sup>to</sup>, 8<sup>vo</sup> y 12<sup>vo</sup> día del experimento.

La prueba de normalidad falló por lo que se realizó un análisis *a posteriori* para estadística no paramétrica y se aplicó la prueba de Scheffe de comparación múltiple de medias con un nivel de significancia  $\alpha=0.05$  utilizando el paquete estadístico Statistica versión 1984-2000.

## IV. RESULTADOS

### IV.1. Crecimiento de los cultivos.

#### IV.1.1. Crecimiento en alta intensidad luminosa.

En el experimento con Alta iluminación ( $400 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) el cultivo de *Dunaliella* sp. presentó una densidad celular mayor a las 24 horas con respecto a las otras tres microalgas, con un valor promedio de  $3.26 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ , seguida de *Chaetoceros* sp. con una densidad de  $3.16 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ , luego *Isochrysis* sp, con  $2.98 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$  y finalmente *Tetraselmis* sp. con un valor promedio de  $1.74 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ . *Dunaliella* sp. presentó mayores densidades hasta el noveno día del experimento, alcanzando los  $4.97 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ , siendo superada por *Isochrysis* sp. a partir del décimo día, alcanzando  $6.0 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Figura 1). Al final del experimento la densidad celular más alta registrada fue en los cultivos de *Isochrysis* sp. y fue de  $8.8 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ , seguida de *Dunaliella* sp. con  $5.8 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ . La cepa de *Chaetoceros* sp. también presentó un incremento en su concentración celular, pasando de los  $2.8 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$  en el décimo día a los  $4.1 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$  al final del experimento en alta iluminación. *Tetraselmis* sp. alcanzó  $2.2 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$  en ese mismo tiempo (Figura 1).

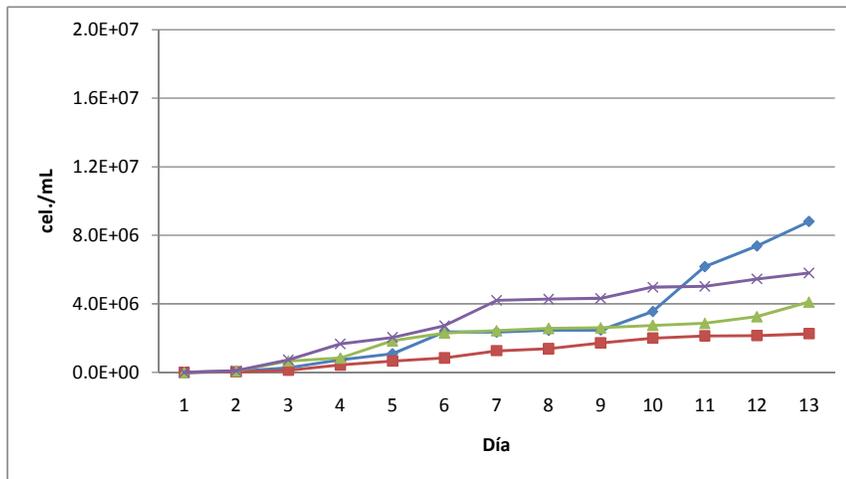


Figura 1. Crecimiento celular (cél/mL) de las cuatro cepas de microalgas en alta iluminación ( $400 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

◆ *Isochrysis* sp., ■ *Tetraselmis* sp., ▲ *Chaetoceros* sp., ✕ *Dunaliella* sp.

La tasa de crecimiento más alta estimada las 24 horas de iniciado del experimento fue para los cultivos de *Dunaliella* sp. con 3.2 divisiones·día<sup>-1</sup>, luego *Chaetoceros* sp. con 3.16 divisiones·día<sup>-1</sup> e *Isochrysis* sp. con 2.98 divisiones·día<sup>-1</sup>. *Tetraselmis* sp. presentó una tasa de crecimiento de 2.04 divisiones·día<sup>-1</sup> a las 48 h. Siendo la menor durante todo el experimento.

*Isochrysis* tuvo las tasas de crecimiento acumulado promedio más altas y fue de 9.78 divisiones, *Dunaliella* sp. 9.18 divisiones, *Chaetoceros* sp. 8.68 divisiones y *Tetraselmis* sp. 7.82 divisiones (Anexo 3, Tablas I, II, III, IV).

#### IV. 1.2 Crecimiento en mediana intensidad luminosa

En mediana iluminación (210  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) la densidad celular de las microalgas fue muy parecida hasta el cuarto día del experimento, después del quinto día el cultivo de *Isochrysis* sp. comienza un marcado incremento en la densidad celular, de tal forma que al octavo día alcanzó  $11.03 \times 10^6$  cél·mL<sup>-1</sup>, *Dunaliella* sp.  $6.08 \times 10^6$  cél·mL<sup>-1</sup>, *Chaetoceros* sp. a  $3.62 \times 10^6$  cél·mL<sup>-1</sup> y *Tetraselmis* sp. únicamente  $1.42 \times 10^6$  cél· mL<sup>-1</sup>. Al final del experimento *Isochrysis* sp. alcanzó  $19.1 \times 10^6$  cél·mL<sup>-1</sup> muy superior a las densidades registradas en los cultivos de *Chaetoceros* sp. que fue  $7.39 \times 10^6$  cél·mL<sup>-1</sup>, *Dunaliella* sp.  $6.46 \times 10^6$  cél·mL<sup>-1</sup> y *Tetraselmis* sp. con  $2.1 \times 10^6$  cél·mL<sup>-1</sup> fue la especie con menor conteo celular al final de este experimento (Figura 2).

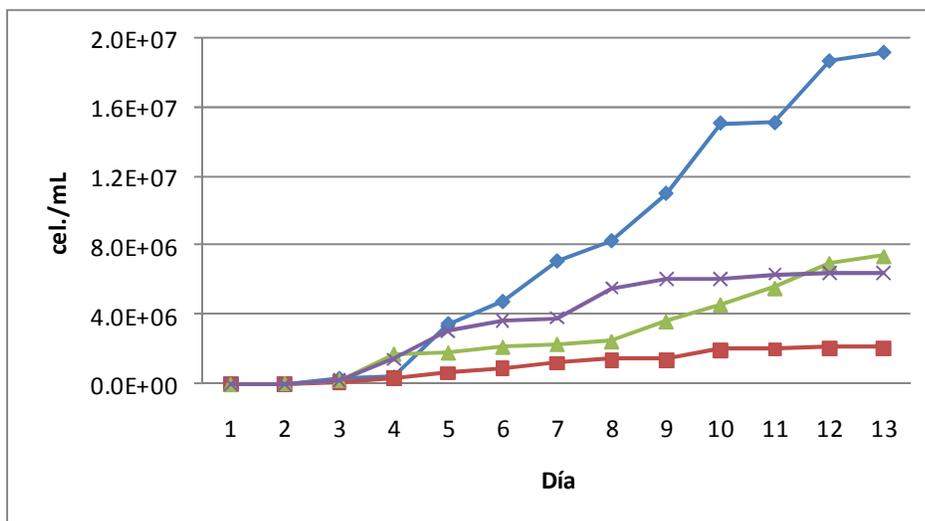


Figura 2. Crecimiento celular (cél./mL) de las cuatro cepas de microalgas en mediana iluminación (210  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )

◆ *Isochrysis* sp., ■ *Tetraselmis* sp., ▲ *Chaetoceros* sp., ✕ *Dunaliella* sp.

Con respecto a las tasas de crecimiento máximas en mediana iluminación, a la 72 horas *Chaetoceros* sp. registró una tasa de crecimiento de 2.81 divisiones·día<sup>-1</sup> y *Dunaliella* sp. de 2.59 divisiones·día<sup>-1</sup>. *Isochrysis* sp. con 3.02 divisiones·día<sup>-1</sup> a las 96 horas, mostró la tasa de crecimiento más alta de este experimento. Por otra parte, en el cultivo de *Tetraselmis* sp. se detectó una tasa de crecimiento de 1.95 divisiones·día<sup>-1</sup> a las 24 horas de iniciado el experimento, presentando la tasa de crecimiento más baja de las cuatro cepas a 210  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . El género con la mayor tasa de crecimiento acumulado fue *Isochrysis* sp. con 10.91 divisiones, después *Chaetoceros* sp. con 9.53 divisiones, *Dunaliella* sp. con 9.34 divisiones y al final *Tetraselmis* sp. 7.72 divisiones (Anexo 3. Tablas V, VI, VII, VIII).

#### **IV. 1.3 Crecimiento en baja intensidad luminosa**

Durante el experimento en baja iluminación (65  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) se mantuvieron crecimientos semejantes para los cultivos de *Isochrysis* sp., *Chaetoceros* sp. y *Dunaliella* sp. hasta el quinto día de este experimento. *Isochrysis* sp. fue la microalgas que presentó mayor densidad celular para este día y fue de  $2.92 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ , *Chaetoceros* sp.  $2.58 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$  y *Dunaliella* sp.  $2.41 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ . *Tetraselmis* sp. con  $0.77 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$  fue la microalga con menor densidad. Después del quinto día *Isochrysis* sp. presentó un aumento constante llegando el octavo día a  $8.44 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ , para este mismo día *Dunaliella* sp. alcanzó  $5.06 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ , *Chaetoceros* sp.  $4.31 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$  y *Tetraselmis* sp.  $1.55 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Al final del experimento, *Isochrysis* sp. terminó con una densidad celular de  $15.45 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ , *Chaetoceros* sp.  $8.14 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$  y *Dunaliella* sp.  $5.79 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ . *Tetraselmis* sp. sólo alcanzó una densidad de  $1.91 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Figura 3).

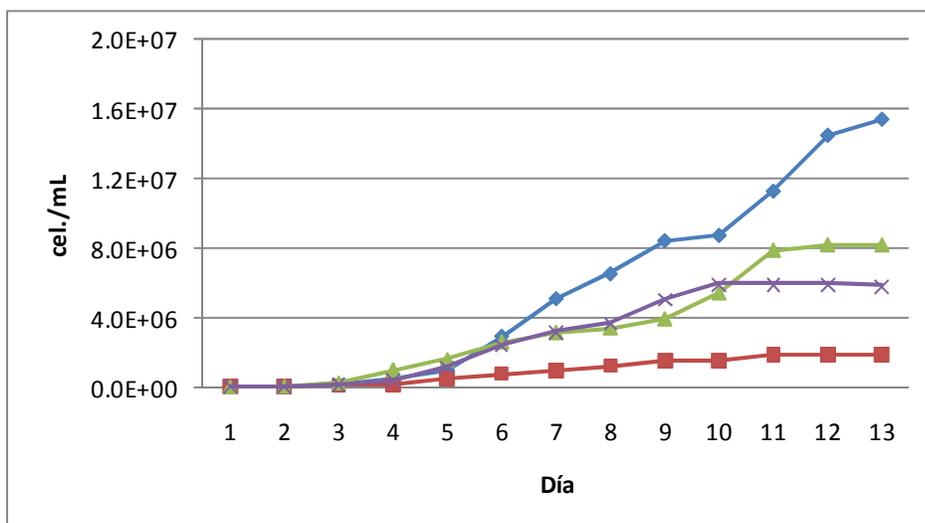


Figura 3. Crecimiento celular (cel./mL) de las cuatro cepas de microalgas en baja iluminación ( $65 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

◆ *Isochrysis* sp., ■ *Tetraselmis* sp., ▲ *Chaetoceros* sp., ✕ *Dunaliella* sp.

Tres de los cuatro géneros presentaron su máxima tasa de crecimiento en baja iluminación ( $65 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) a las 48 horas de iniciado el experimento, *Isochrysis* sp. mostró un promedio de  $2.27 \text{ divisiones}\cdot\text{día}^{-1}$ , *Tetraselmis* sp.  $2.13 \text{ divisiones}\cdot\text{día}^{-1}$  y *Chaetoceros* sp.  $2.40 \text{ divisiones}\cdot\text{día}^{-1}$ . *Dunaliella* sp. por otra parte tuvo una tasa de crecimiento máxima de  $1.97 \text{ divisiones}\cdot\text{día}^{-1}$  a las 24 h. de iniciado el experimento. Nuevamente el género *Isochrysis* sp. tuvo la mayor tasa de crecimiento acumulado de las cuatro microalgas y ésta fue de 10.59 divisiones; después *Chaetoceros* sp. con 9.67 divisiones y *Dunaliella* sp. 9.22 divisiones, al final la menor tasa de crecimiento acumulado fue para *Tetraselmis* sp. con 7.58 divisiones (Anexo 3. Tablas IX, X, XI y XII).

#### IV. 1.4. Análisis estadístico para el crecimiento celular.

En el análisis estadístico se observó, que en alta iluminación ( $400 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) ninguna microalgas tuvo diferencias significativas respecto a los otros géneros. En mediana iluminación ( $210 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) *Isochrysis* sp. con un promedio y desviación estándar  $3.50 \times 10^6 \pm 0.26 \times 10^6$  cél.mL<sup>-1</sup> y *Dunaliella* sp.  $3.07 \times 10^6 \pm 0.27 \times 10^6$  cél.mL<sup>-1</sup> en el 4<sup>to</sup> día, mostraron diferencias significativas con *Tetraselmis* sp. y *Chaetoceros* sp. Mientras en el 8<sup>vo</sup> día *Isochrysis* sp. con  $11.03 \times 10^6 \pm 1.06 \times 10^6$  cél.mL<sup>-1</sup> y *Dunaliella*  $6.08 \times 10^6 \pm 1.02 \times 10^6$  cél.mL<sup>-1</sup> fueron diferentes entre sí y estas respecto a las cepas de *Tetraselmis* sp. y *Chaetoceros* sp. En el 12<sup>vo</sup> día del experimento, *Isochrysis* sp. con  $19.17 \times 10^6 \pm 2.77 \times 10^6$  cél.mL<sup>-1</sup> tuvo diferencias significativas respecto a *Tetraselmis* sp., *Chaetoceros* sp. y *Dunaliella* sp. En baja intensidad luminosa ( $65 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) *Isochrysis* sp. mostró diferencias significativas con los otros tres géneros únicamente en el 8vo día del experimento, con un promedio y desviación estándar de  $8.44 \times 10^6 \pm 0.35 \times 10^6$  cél.mL<sup>-1</sup> (Tabla 2).

Tabla II. Resultados de la prueba de Scheffe para la variable cél.mL<sup>-1</sup>

|                  | <i>Isochrysis</i> sp. | <i>Tetraselmis</i> sp. | <i>Chaetoceros</i> sp. | <i>Dunaliella</i> sp. |
|------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|
| <b>ALTA</b>      |                       |                        |                        |                       |
| 4 <sup>TO</sup>  | 1093750 ± 794783 abc  | 666667 ± 34422 ab      | 1852083 ± 215813 bcd   | 2041667 ± 118804 cd   |
| 8 <sup>VO</sup>  | 2479167 ± 96082 ab    | 1729167 ± 177805 a     | 2608333 ± 71078 abc    | 4320834 ± 1162858 bcd |
| 12 <sup>VO</sup> | 8804167 ± 5558785 ab  | 2258333 ± 88683 a      | 4108333 ± 1428359 a    | 5795834 ± 1304460 a   |
| <b>MEDIA</b>     |                       |                        |                        |                       |
| 4 <sup>TO</sup>  | 3508333 ± 267025 e    | 650000 ± 151554 ab     | 1829167 ± 146487 bc    | 3079167 ± 278482 de   |
| 8 <sup>VO</sup>  | 11038095 ± 1061029 f  | 1442262 ± 218561 a     | 3620833 ± 788822 abcd  | 6083334 ± 1020595 de  |
| 12 <sup>VO</sup> | 19175000 ± 2774240 c  | 2108333 ± 468764 a     | 7391667 ± 871989 ab    | 6466667 ± 509168 a    |
| <b>BAJA</b>      |                       |                        |                        |                       |
| 4 <sup>TO</sup>  | 970833 ± 339193 abc   | 487500 ± 144157 a      | 1562500 ± 181573 abc   | 1145833 ± 295892 abc  |
| 8 <sup>VO</sup>  | 8441667 ± 350520 e    | 1554167 ± 159263 a     | 4316667 ± 1442262 bcd  | 5066667 ± 163140 cd   |
| 12 <sup>VO</sup> | 15450000 ± 2901293 bc | 1916667 ± 176924 a     | 8150000 ± 316968 ab    | 5945834 ± 138256 a    |

Letras diferentes indican diferencias significativas con  $\alpha=0.05$

## IV.2. Clorofilas

### IV.2.1. Producción de clorofilas en alta iluminación.

Las concentraciones de clorofilas en los cultivos en alta iluminación ( $400 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) se mantuvieron constantes hasta el cuarto día, en el cultivo de *Dunaliella* sp. se incrementó la concentración hasta  $58.7 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$  en promedio, en el de *Chaetoceros* sp. se observó una concentración de  $33.10 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$  y en *Tetraselmis* sp.  $9.60 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ , en *Isochrysis* sp. con  $2.70 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$  se determinó la menor concentración hasta este día. Los tres cultivos que alcanzaron las máximas concentraciones al octavo día fueron, *Dunaliella* sp. con  $160.10 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ , *Chaetoceros* sp.  $98.86 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$  y *Tetraselmis* sp.  $57.89 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ . *Isochrysis* sp. fue el cultivo con menor concentración a los doce días y finalizó con una concentración de  $23.43 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ .

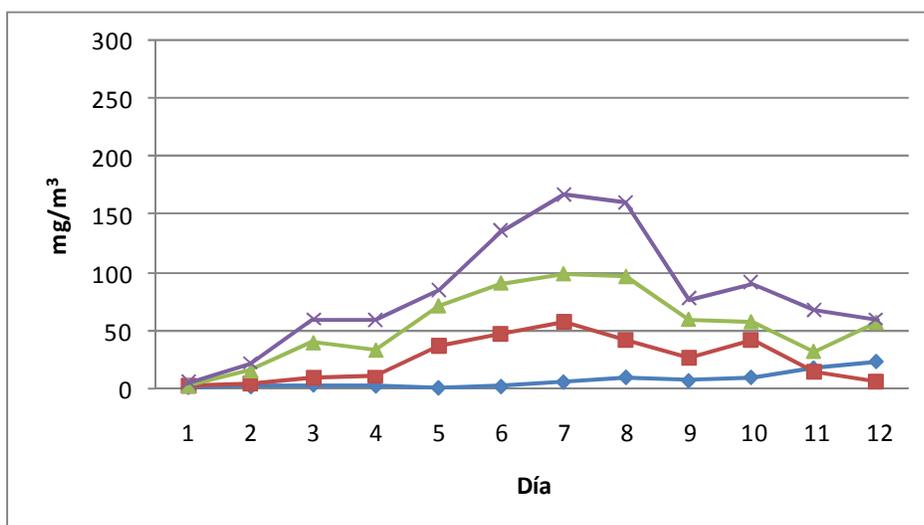


Figura 4. Producción de Clorofilas ( $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$ ) de las cuatro cepas de microalgas en alta iluminación ( $400 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

◆ *Isochrysis* sp., ■ *Tetraselmis* sp., ▲ *Chaetoceros* sp. ✕ *Dunaliella* sp.

#### IV.2.2. Producción de clorofilas en mediana iluminación.

Hacia el cuarto día del experimento el cultivo de *Dunaliella* sp. incrementó la concentración de clorofila hasta  $105 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ , *Chaetoceros* sp. a  $39.1 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ , *Tetraselmis* sp. hasta  $25.9 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$  y el menor incrementó hasta este día lo presentó *Isochrysis* sp. con  $12.50 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ . *Dunaliella* sp., *Tetraselmis* sp. y *Chaetoceros* sp. mantuvieron un incremento constante hasta el séptimo día del experimento, donde *Dunaliella* sp. alcanzó un máximo de  $126.56 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ , *Chaetoceros* sp. de  $66.49 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ , *Isochrysis* sp.  $33.09 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$  y *Tetraselmis* sp.  $26.7 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ . Todos los cultivos mantuvieron una tendencia a la baja en las concentraciones de clorofilas hacia el final del experimental, terminando *Dunaliella* sp. con la mayor concentración  $53.04 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ , *Chaetoceros* sp con  $42.55 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ , *Tetraselmis* sp con  $20.21 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ . *Isochrysis* sp. alcanzó su máxima concentración ( $33.86 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ ) en el último día del experimental.

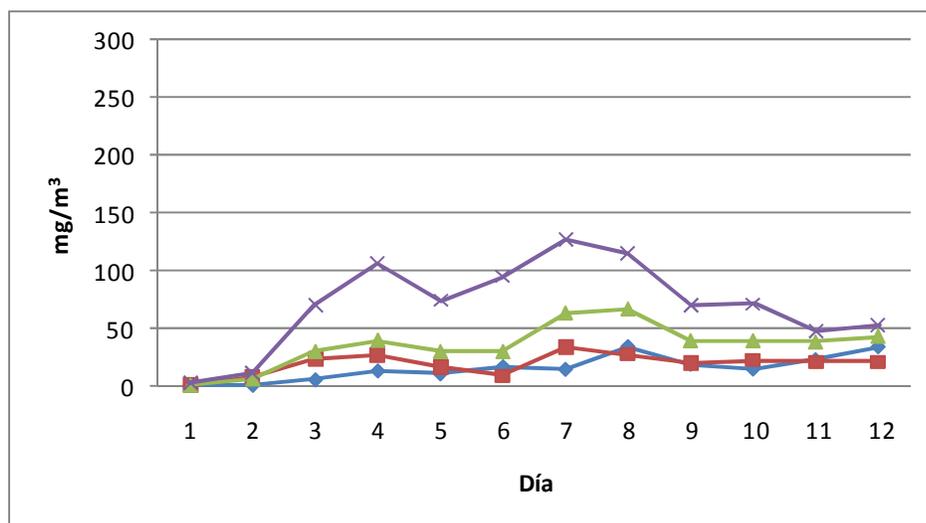


Figura 5.- Producción de Clorofilas ( $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$ ) de las cuatro cepas de microalgas en mediana iluminación ( $210 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ).

◆ *Isochrysis* sp., ■ *Tetraselmis* sp., ▲ *Chaetoceros* sp., ✕ *Dunaliella* sp.

### IV.2.3. Producción de clorofilas en baja iluminación

Las concentraciones encontradas hasta el cuarto día del experimento muestran el cultivo de *Dunaliella* sp. con la mayor concentración ( $127.00 \text{ mg m}^{-3}$ ), luego *Chaetoceros* sp. con  $56.1 \text{ mg m}^{-3}$ , *Tetraselmis* sp. con  $16.4 \text{ mg m}^{-3}$ , *Isochrysis* sp. con  $11.80 \text{ mg m}^{-3}$  (Figura 6).

En el octavo día *Dunaliella* sp. fue la microalgas con la mayor producción de clorofilas con  $274.53 \text{ mg m}^{-3}$ , el cultivo de *Chaetoceros* sp. alcanzó  $110.0 \text{ mg m}^{-3}$  y *Tetraselmis* sp.  $61.12 \text{ mg m}^{-3}$ . En *Chaetoceros* sp. se observó su máxima concentración en el noveno día con  $135.07 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ . Al final del experimento en el cultivo de *Dunaliella* sp se observó la concentración más alta en el onceavo día y fue de  $287.49 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ . Todos los cultivos mostraron una tendencia a la alza desde el inicio hasta el final del experimento. El cultivo de *Dunaliella* sp. finalizó con la mayor concentración de las cuatro microalgas y fue de  $162.83 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ , *Chaetoceros* sp. tuvo una concentración de  $90.76 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ . *Isochrysis* sp. de  $88.29 \text{ mg m}^{-3}$  fue su mayor concentración en todo el experimento, sin embargo el valor más bajo al final del experimento fue para *Tetraselmis* sp con  $66.47 \text{ mg m}^{-3}$  (Figura 6).

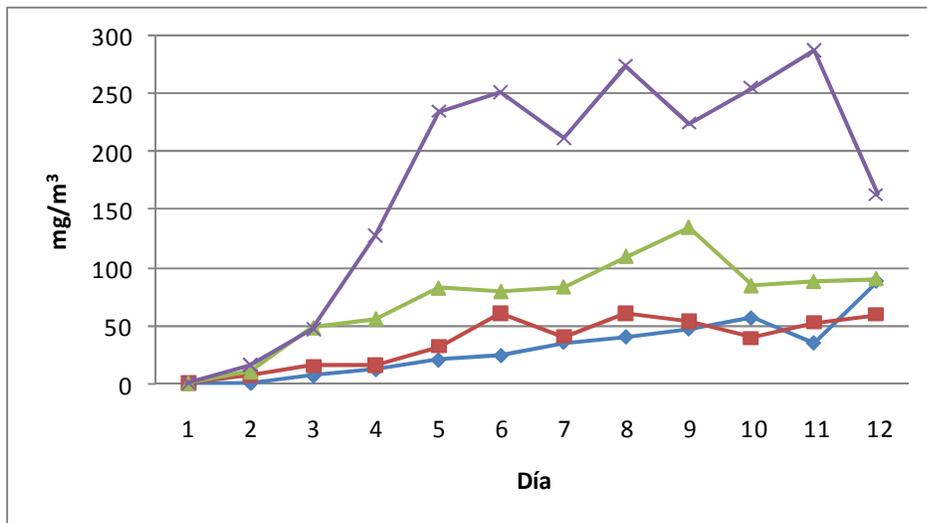


Figura 6. Producción de Clorofilas ( $\text{mg} \cdot \text{m}^{-3}$ ) de las cuatro cepas de microalgas en baja iluminación ( $65 \mu\text{E m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ).

◆ *Isochrysis* sp., ■ *Tetraselmis* sp., ▲ *Chaetoceros* sp. ✕ *Dunaliella* sp.

#### IV.2.4. Análisis estadístico para clorofilas.

El análisis estadístico para clorofilas en alta iluminación no mostró diferencias significativas entre los cuatro géneros, ni para los tres días que se hizo el análisis estadístico. La concentración de clorofila en mediana iluminación ( $210 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) muestran diferencias significativas ( $p < 0.001$ ) en los cultivos del género *Dunaliella* sp. respecto a los otros tres géneros en el cuarto día del experimento con un promedio y desviación estándar de  $105.44 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3} \pm 16.42^c$ .

En baja iluminación ( $65 \mu\text{E m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) el cultivo de *Dunaliella* sp. mantuvo diferencias significativas respecto a los otros tres géneros, el 4<sup>to</sup> día con un promedio y desviación estándar de  $127.05 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3} \pm 13.48 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ , y el 8<sup>vo</sup> día  $274.53 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3} \pm 82.86 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$  (c) (Tabla III).

Tabla III. Resultados de la prueba de Scheffe para la variable Clorofilas expresada  $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$

| Alta  | <i>Isochrysis</i>    | <i>Tetraselmis</i>   | <i>Chaetoceros</i>    | <i>Dunaliella</i>    |
|-------|----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| 4     | $2.68 \pm 3.82$ a    | $9.64 \pm 3.31$ a    | $33.1 \pm 7.99$ ab    | $58.68 \pm 11.88$ b  |
| 8     | $10.00 \pm 6.74$ a   | $42.35 \pm 12.19$ a  | $96.51 \pm 15.27$ ab  | $160.06 \pm 13.42$ b |
| 12    | $23.43 \pm 23.09$ a  | $5.21 \pm 3.20$ a    | $57.06 \pm 8.66$ a    | $59.13 \pm 17.28$ a  |
| Media |                      |                      |                       |                      |
| 4     | $12.53 \pm 2.64$ a   | $25.88 \pm 3.15$ ab  | $39.11 \pm 0.18$ ab   | $105.44 \pm 16.42$ c |
| 8     | $33.9 \pm 10.83$ a   | $26.67 \pm 5.91$ a   | $66.49 \pm 10.55$ ab  | $113.98 \pm 1.3$ ab  |
| 12    | $33.86 \pm 12.38$ a  | $20.21 \pm 4.26$ a   | $42.55 \pm 19.90$ a   | $53.04 \pm 29.34$ a  |
| Baja  |                      |                      |                       |                      |
| 4     | $11.84 \pm 2.36$ a   | $16.45 \pm 10.86$ a  | $56.05 \pm 13.96$ b   | $127.05 \pm 13.48$ c |
| 8     | $40.22 \pm 11.44$ a  | $61.19 \pm 30.81$ ab | $110.02 \pm 26.04$ ab | $274.53 \pm 82.86$ c |
| 12    | $88.29 \pm 10.26$ ab | $60.47 \pm 24.91$ a  | $90.76 \pm 30.53$ ab  | $162.83 \pm 49.92$ b |

Letras diferentes indican diferencias significativas con  $\alpha=0.05$

### IV.3. Carotenoides

#### IV.3.1. Producción de carotenoides en alta iluminación.

En el experimento con alta iluminación ( $400 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) los cultivos presentaron un incremento constante en la concentración de carotenoides hasta el cuarto día, observándose en el de *Dunaliella* sp. una concentración de carotenoides de  $41.55 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ , en el de *Chaetoceros* sp.  $21.79 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ , para el de *Tetraselmis* sp.  $9.12 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ , y la menor concentración hasta este día se observó en el cultivo de *Isochrysis* sp con  $4.10 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ . Después de este día se presentó un crecimiento pronunciado en la concentración hasta llegar a la máxima el octavo día, donde el cultivo de *Dunaliella* sp. tuvo a una concentración de  $160.23 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ , *Chaetoceros* sp. a  $100.70 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$  y *Tetraselmis* sp.  $72.83 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ .

Al final del experimento la producción de carotenoides decrecieron y el cultivo de *Dunaliella* sp. terminó con la mayor concentración que fue de  $93.73 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ , seguido de *Chaetoceros* sp. con  $59.53 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ . La máxima para *Isochrysis* sp. en alta iluminación fue de  $27.23 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$  en el último día del experimento. Por otra parte *Tetraselmis* sp. finalizó con una concentración de  $17.10 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ .

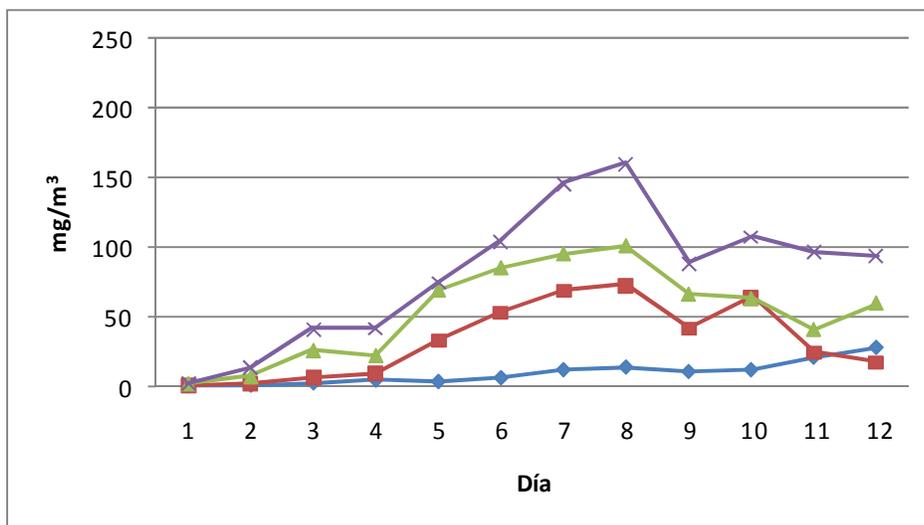


Figura 7. Carotenoides ( $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$ ) producidos por las cuatro cepas de microalgas en alta iluminación ( $400 \mu\text{E m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )

◆ *Isochrysis* sp., ■ *Tetraselmis* sp., ▲ *Chaetoceros* sp., ✕ *Dunaliella* sp.

### IV.3.2. Producción de carotenoides en mediana iluminación.

En mediana iluminación ( $210 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) los cultivos presentaron sus máximos en diferentes días del experimento. En el cuarto día podemos distinguir al de *Dunaliella* sp. con una concentración de carotenoides de  $73.47 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ , después *Chaetoceros* sp. con  $42.05 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ , *Tetraselmis* sp. con  $33.44 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ , hasta este día la menor concentración fue en el cultivo de *Isochrysis* sp con  $10.64 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ .

*Dunaliella* sp. alcanzó la mayor concentración observada del experimento el séptimo día  $137.81 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ , *Chaetoceros* sp. al octavo día con  $82.08 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$  y *Tetraselmis* sp. el noveno día con  $49.82 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ . El cultivo de *Isochrysis* sp presentó su máxima concentración el día doce y fue de  $77.69 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$  (Figura 8).

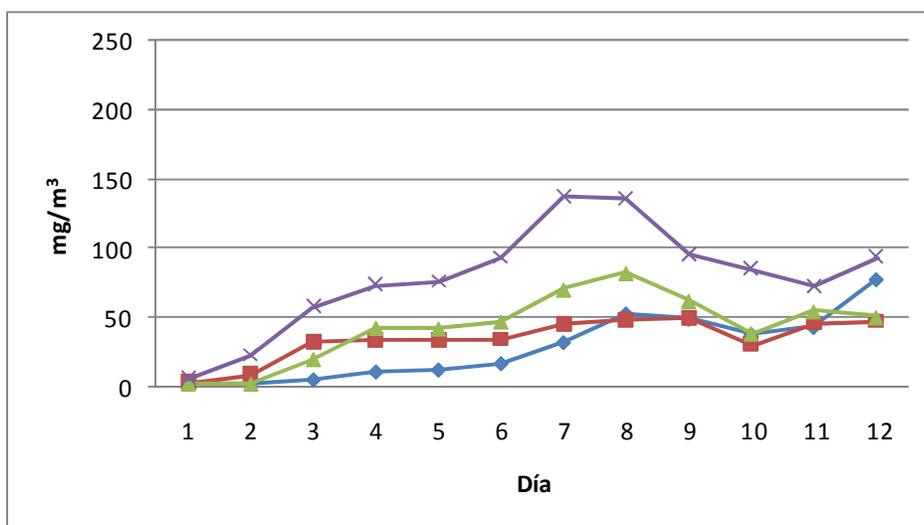


Figura 8. Carotenoides ( $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$ ) producidos por las cuatro cepas de microalgas en mediana iluminación ( $210 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

◆ *Isochrysis* sp., ■ *Tetraselmis* sp., ▲ *Chaetoceros* sp. ✕ *Dunaliella* sp.

### IV.3.3. Producción de carotenoides en baja iluminación.

En baja iluminación ( $65\mu\text{E m}^2\text{s}^{-1}$ ) hasta el día 4to del experimento *Dunaliella* sp. fue el cultivo con mayor concentración de carotenoides con  $63.84\text{ mg}\cdot\text{m}^3$ , *Chaetoceros* sp.  $42.05\text{ mg}\cdot\text{m}^3$ , *Isochrysis* sp.  $28.88\text{ mg}\cdot\text{m}^3$ , y *Tetraselmis* sp.  $27.36\text{ mg}\cdot\text{m}^3$ . *Dunaliella* sp. mantuvo un crecimiento constante hasta el 8<sup>vo</sup> día donde presentó un máximo de  $210.77\text{ mg}\cdot\text{m}^3$ , después con menor concentración el cultivo de *Chaetoceros* sp. con  $100.83\text{ mg}\cdot\text{m}^3$ , *Tetraselmis* sp.  $82.59\text{ mg}\cdot\text{m}^3$  y con la menor concentración para este día *Isochrysis* sp. con  $49.1\text{ mg}\cdot\text{m}^3$ . En este experimento con baja intensidad luminosa, el cultivo de *Chaetoceros* sp. llegó a su máxima concentración el noveno día con  $118.05\text{ mg}\cdot\text{m}^3$ . *Isochrysis* sp. fue el cultivo con menor concentración durante todo el experimento y la mayor concentración al final del experimento la tuvo *Dunaliella* sp. con  $171.42\text{ mg}\cdot\text{m}^3$  (Figura 9).

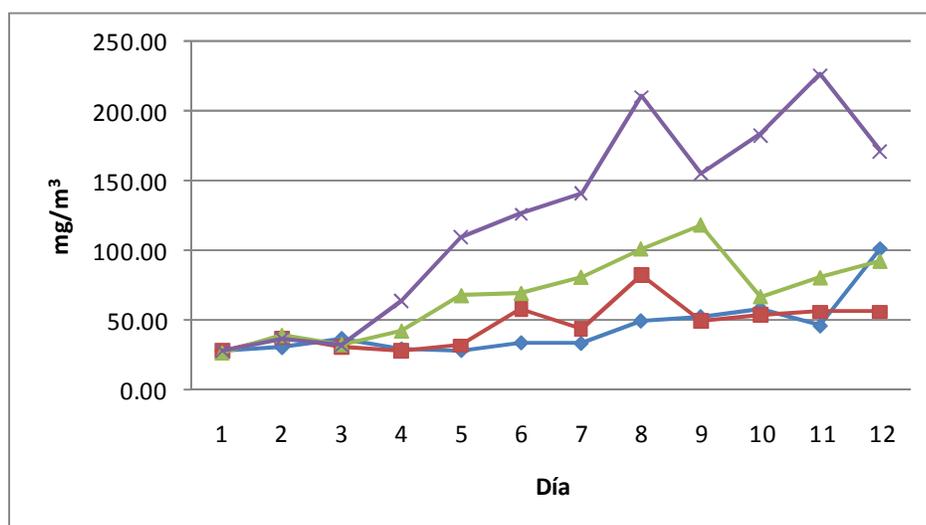


Figura 9. Carotenoides ( $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$ ) producidos por las cuatro cepas de microalgas en baja iluminación ( $65\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

◆ *Isochrysis* sp., ■ *Tetraselmis* sp., ▲ *Chaetoceros* sp., ✕ *Dunaliella* sp.

#### IV. 3.4. Análisis estadístico para carotenoides.

El análisis estadístico para carotenoides mostró que el 4<sup>to</sup> y 8<sup>vo</sup> día de los experimentos en alta y mediana intensidad luminosa el cultivo de *Dunaliella* sp. tuvo diferencias significativas respecto a *Isochrysis* sp., *Tetraselmis* sp. y *Chaetoceros* sp. En alta iluminación el 4<sup>to</sup> día con promedio y desviación estándar de  $41.55 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3} \pm 7.18$  y en el 8<sup>vo</sup> día  $160.23 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3} \pm 18.06$ . En mediana iluminación para el 4<sup>to</sup> día  $73.47 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3} \pm 7.18$  y el 8<sup>vo</sup> con  $136.29 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3} \pm 10.68$

En baja iluminación *Dunaliella* sp. igualmente mostró diferencias significativas en la concentración de carotenoides el 4<sup>to</sup> y 8<sup>vo</sup> día, pero también el último día del experimento, con una concentración para el 4<sup>to</sup> día de  $63.84 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3} \pm 5.48$ , en el 8<sup>vo</sup> *Dunaliella* sp. presentó un máximo, y fue de  $210.77 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3} \pm 19.13$ . En el 12vo día mantuvo diferencias significativas respecto a las otras tres cepas y finalizó con una concentración de  $171.42 \pm 34.02$  (Tabla 3).

Tabla IV. Resultados de la prueba de Scheff para la variable Carotenoides expresada  $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$

| Alta  | <i>Isochrysis</i>     | <i>Tetraselmis</i>   | <i>Chaetoceros</i>    | <i>Dunaliella</i>     |
|-------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 4     | $4.05 \pm 2.32$ a     | $91.12 \pm 1.52$ ab  | $27.79 \pm 4.39$ bc   | $41.55 \pm 7.18$ d    |
| 8     | $13.3 \pm 8.28$ a     | $72.83 \pm 6.11$ bc  | $100.7 \pm 7.60$ cd   | $160.23 \pm 18.06$ e  |
| 12    | $27.23 \pm 19.96$ ab  | $17.10 \pm 5.03$ a   | $59.53 \pm 3.96$ abc  | $93.73 \pm 17.03$ c   |
| Media |                       |                      |                       |                       |
| 4     | $10.64 \pm 0$ ab      | $33.44 \pm 1.52$ cd  | $42.05 \pm 0.88$ d    | $73.47 \pm 7.18$ e    |
| 8     | $52.69 \pm 8.37$ ab   | $48.13 \pm 1.76$ ab  | $82.08 \pm 15.87$ bc  | $136.29 \pm 10.68$ de |
| 12    | $77.69 \pm 21.25$ abc | $47.29 \pm 1.46$ abc | $49.82 \pm 2.93$ abc  | $93.73 \pm 4.39$ c    |
| Baja  |                       |                      |                       |                       |
| 4     | $28.88 \pm 0.0$ cd    | $27.36 \pm 0.0$ cd   | $42.05 \pm 6.14$ d    | $63.84 \pm 5.48$ e    |
| 8     | $49.15 \pm 0.88$ ab   | $82.59 \pm 5.34$ bc  | $100.83 \pm 10.12$ cd | $210.77 \pm 19.13$ f  |
| 12    | $101.33 \pm 2.53$ c   | $55.73 \pm 2.53$ abc | $92.04 \pm 28.81$ bc  | $171.42 \pm 34.02$ d  |

Letras diferentes indican diferencias significativas con  $\alpha=0.05$

## IV.4. Carotenoides por célula

### IV.4.1. Carotenoides por célula en alta iluminación.

Durante el experimento en alta intensidad luminosa ( $400 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) *Chaetoceros* sp. presentó 25.6 pg/célula, la mayor concentración a las 24 horas, seguida da *Dunaliella* sp. 16.6 pg/célula, en tercer lugar *Tetraselmis* sp. 11.6 pg/célula y 0.0 pg/célula para *Isochrysis* sp. no siendo posible detectar esta concentración. Las máximas concentraciones de todo el experimental se presentaron durante el 7<sup>mo</sup> y 8<sup>vo</sup> día, *Tetraselmis* sp. con 50.6 pg/célula al 7<sup>mo</sup> día fue el género con mayor concentración de carotenoides por célula, *Chaetoceros* sp. el 8<sup>vo</sup> día presentó un máximo de 45.5 pg /célula y *Dunaliella* sp. 39.5 pg /célula, la concentración máxima de *Isochrysis* sp. para este mismo día fue de 6.9 pg/célula.

Al final del experimento las microalgas *Dunaliella* sp. y *Chaetoceros* sp. finalizaron con una concentración de carotenoides por célula muy cercanas, estas fueron de 16.4 pg /célula y 15.7 pg/célula respectivamente, en tercer lugar *Tetraselmis* sp. 7.5 pg/célula y en último término *Isochrysis* sp. con 2.9 pg/célula (Figura 10).

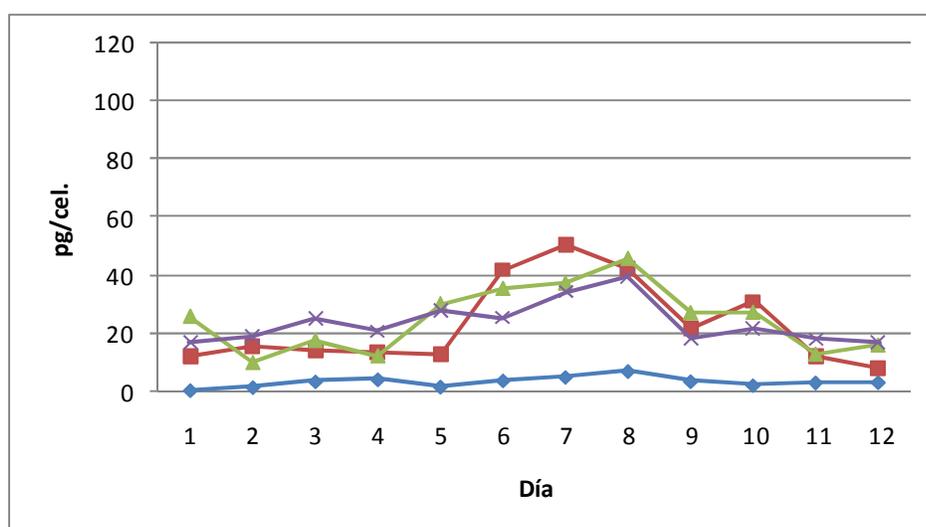


Figura 10. Carotenoides por célula (pg/cel.) producidos por las cuatro cepas de microalgas en alta iluminación ( $400 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )

◆ *Isochrysis* sp., ■ *Tetraselmis* sp., ▲ *Chaetoceros* sp., ✕ *Dunaliella* sp.

#### IV.4.2. Carotenoides por célula en mediana iluminación

En mediana iluminación ( $210 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), *Dunaliella* sp. inició con la concentración más alta 98.3 pg/célula, después *Tetraselmis* sp. con 65.4 pg/célula, *Isochrysis* sp. 43.7 pg/célula y *Chaetoceros* sp. la más baja 26.9 pg/célula. Las mayores concentraciones se presentaron al inicio del experimento, únicamente el género *Tetraselmis* sp. presentó un aumento al 2<sup>do</sup> día alcanzando un máximo de 97 pg/célula. Posteriormente la concentración de todas las cepas disminuyeron de manera constante hasta el sexto día, donde se presentó un ligero aumento en la concentración de carotenoides por célula para las microalgas *Tetraselmis* sp., *Dunaliella* sp. y *Chaetoceros* sp. Al final del experimento todos los géneros presentaron concentraciones muy bajas siendo *Tetraselmis* la de mayor concentración final 23.3 pg/célula (Figura 11).

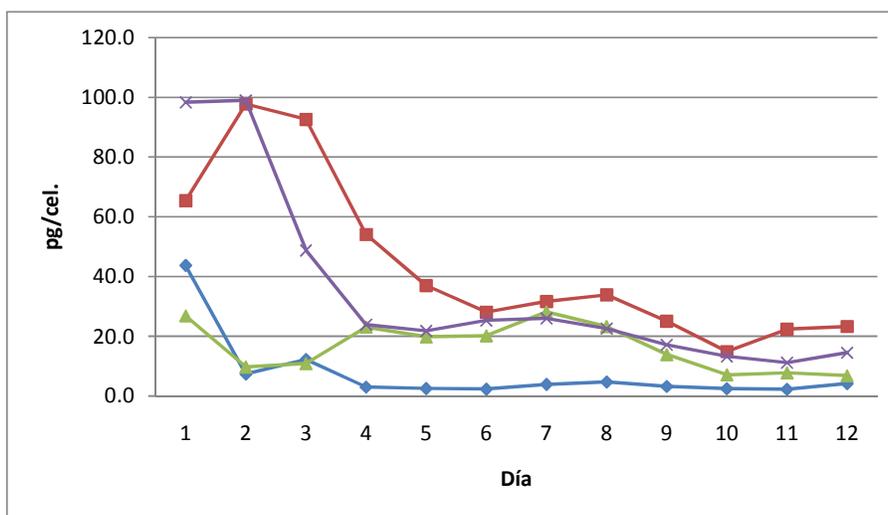


Figura 11. Carotenoides por célula (pg/cel.) producidos por las cuatro cepas de microalgas en mediana iluminación ( $210\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

◆ *Isochrysis* sp., ■ *Tetraselmis* sp., ▲ *Chaetoceros* sp., ✕ *Dunaliella* sp.

#### IV.4.3. Carotenoides por célula en baja iluminación.

En baja irradiancia luminosa ( $65\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), la cepa de *Isochrysis* sp. inicio con 91.5 pg/célula, *Tetraselmis* sp. con 86.5, *Dunaliella* sp. 72.2 pg/célula y *Chaetoceros* sp. presento la más baja concentración inicial y fue de 64.0 pg/célula. Los datos presentaron una gran variación y la tendencia fue a la disminución de las concentraciones de carotenoides por célula. *Dunaliella* sp. presentó la mayor concentración final 28.8 pg/célula, después *Tetraselmis* sp. 24.7 pg/célula, y *Chaetoceros* sp. 11.5 pg/célula. *Isochrysis* sp. tuvo la más baja concentración al final de este experimento y fue de 6.7 pg/célula (Figura 12).

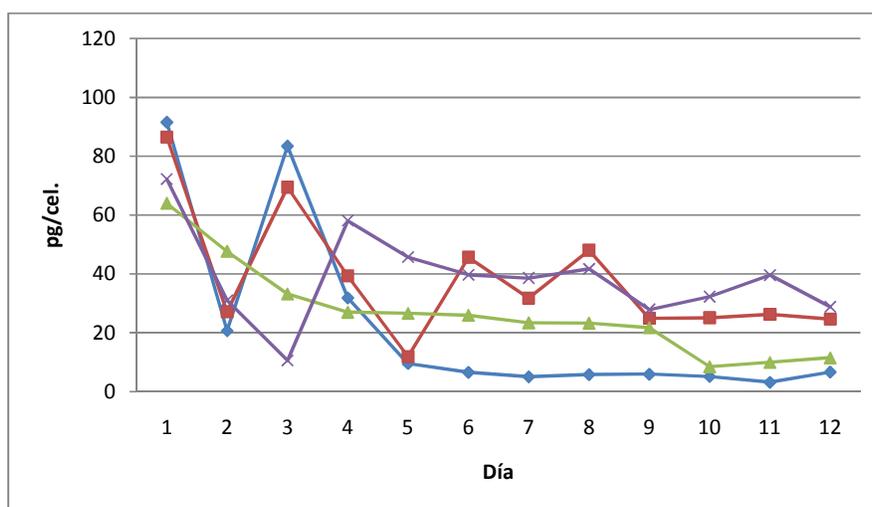


Figura 12. Carotenoides por célula (pg/cel.) producidos por las cuatro cepas de microalgas a ( $65\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )

◆ *Isochrysis* sp., ■ *Tetraselmis* sp., ▲ *Chaetoceros* sp. ✕ *Dunaliella* sp.

## V. DISCUSIONES

### V.1. Crecimiento celular.

Bolch (2004) menciona que la irradiancia de saturación del crecimiento de las microalgas, es mucho más pequeña que la cantidad de luz a la que son sometidas normalmente en los cultivos. El reporta irradiancias de saturación para *Chaetoceros* de  $39 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , para *Dunaliella*  $55\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y para *Isochrysis*  $58 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Valdez Holguín (1998) encontró irradiancias de saturación para el fitoplancton natural del Gofu de California inferiores a  $150 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , se puede considerar por lo tanto que los cultivos de todas las especies bajo las tres condiciones de iluminación de esta investigación se encontraban bajo estrés lumínico. Los resultados obtenidos en las tres diferentes iluminaciones pareció favorecer al género *Isochrysis*, el cual tuvo un mejor desarrollo, sin embargo, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas en alta iluminación entre los cuatro géneros estudiados.

*Isochrysis* presentó la mayor tasa de crecimiento acumulada en los tres experimentos, en alta intensidad luminosa y fue de 9.78 divisiones, en mediana 10.91 divisiones y en baja 10.59 divisiones. En mediana y baja intensidad luminosa, el crecimiento celular mostro diferencias significativas de este género respecto a las otras microalgas en el 8vo día de iniciado los experimentos. El crecimiento favorable de *Isochrysis* en baja iluminación se puede atribuir a que el flujo de fotones al que estaba expuesta  $65 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  está muy cercano al reportado por McGowan (2006), quien encuentra una tasa de irradiancia de saturación para *Isochrysis* sp de  $62.5 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Los parámetros fisicoquímicos en los que se llevaron a cabo los experimentos no fueron limitantes para el crecimiento de *Isochrysis* sp, así como el medio f/2 utilizado. Renaud y Parry (1994) concluyen que salinidades de 10 a 35 ‰ no producen cambios en la tasa de crecimiento de *Isochrysis* sp. y *Nitzschia frustulum*. López Elías y col. (2004) encuentran que *Isochrysis* sp muestra una mayor densidad celular a concentraciones bajas de sal. La temperatura utilizada  $25^{\circ}\text{C}$  y  $\text{pH} = 8.0$  o mayores favorecen el crecimiento de este género (FAO 1989).

*Tetraselmis* sp. mostró tasas de crecimiento celular muy altas comparadas con las reportadas por otros autores, en alta iluminación su tasa de crecimiento fue de 2.04 divisiones·día<sup>-1</sup>, en mediana de 1.95 divisiones·día<sup>-1</sup> y en baja de 2.13 divisiones·día<sup>-1</sup>. También presento las tasas de crecimiento acumulado más bajas de todas los cuatro géneros (Anexo 3 Tablas II, V y X). En general este género no presenta tasas de crecimiento altas, Meseck y col(2007) reportan tasas de crecimiento máximas promedio en cultivos en exterior de 1.43 divisiones·día<sup>-1</sup>. Esta tasa se considera alta comparada con la reportada por Cordero y col. (2005) para *Tetraselmis chuii* cultivada en laboratorio con intensidad de luz controlada de 220  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$  estiman valores de 0.74 divisiones por día y densidad celular de  $1.50 \times 10^6$  cél·ml<sup>-1</sup> en la fase logarítmica, en experimentos con bajo volumen de cultivo y a temperatura de 25±1 °C (2000 lux) y 36 ‰ de salinidad. Esto probablemente se deba a que en un cultivo al exterior hay mayor cantidad de luz, lo que se traduce en un mayor número de divisiones al día. Lo anterior nos puede reafirmar que las intensidades luminosas experimentadas en este trabajo, en ningún momento fueron limitantes para el desarrollo de ninguna de las cepas, y las variaciones en el crecimiento se debieron a otros factores, o al metabolismo propio de cada género.

Comparando los datos obtenidos en este trabajo, las tasas de crecimiento encontradas son muy altas por que el inoculo utilizado fue más pequeño que el reportado por Cordero y col 2005. Que inician sus cultivos con  $0.04 \times 10^6$  cél·ml<sup>-1</sup>. En investigaciones realizaas por Nieves y col. (2009) se encontró que conforme disminuía la concentración celular del inóculo de los cultivos de *Chaetoceros mulleri*, aumentaba la tasa de crecimiento acumulada. El iniciar los cultivos con una concentración celular baja, ocasiona que se pueda alcanzar en algunos días concentraciones finales elevadas que con esta especie fue de  $1.50 \times 10^6$  cél·ml<sup>-1</sup> a los ocho días de iniciado el experimento.

*Chaetoceros* sp. presentó tasas de crecimiento celular menores a *Isochrysis* sp. y al final de los experimentos muy similares a *Dunaliella*, en las tres irradiancias de crecimiento. Sánchez Saavedra y col. (2002) concluyen que *Chaetoceros* sp. no tiene un crecimiento celular favorable en luz blanca, probado en diferentes tipos de luz e intensidades luminosas, su crecimiento fue óptimo con luz azul-verde a todas las tasas de flujo de fotones. El crecimiento celular del cultivo de *Chaetoceros* sp. fue mayor en baja iluminación, fue una

cepa con un rendimiento en crecimiento medio, ya que fue superado por *Isochrysis* en baja iluminación.

*Dunaliella* sp. y *Chaetoceros* sp. presentaron tasas de crecimiento más bajas comparadas con las obtenidas por los cultivos de *Isochrysis*. Las densidades celulares alcanzadas por *Dunaliella* fueron menores en alta y baja iluminación, logrando mayores densidades celulares en una irradiancia de  $210 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y llegando a  $6.45 \times 10^6 \text{cel}\cdot\text{ml}^{-1}$  en el 12<sup>vo</sup> días del experimento. Guevara y col (2005) encontraron crecimientos celulares semejantes de *Dunaliella salina* a  $195 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  alcanzando densidades celulares de  $8.0 \times 10^6 \text{cel}\cdot\text{ml}^{-1}$  y de  $2.5 \times 10^6 \text{cel}\cdot\text{ml}^{-1}$  en alta intensidad luminosa y reporta las mayores densidades celulares en las cepas expuestas a menores intensidades luminosas. Quigg y col. (2003) reportan que el crecimiento de saturación para *Dunaliella tertiolecta* es de aproximadamente  $150 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y el de fotoinhibición no se observa antes de los  $300 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Young y col 2005 encontraron que el punto de saturación de la fotosíntesis de esta especie se da en 100-200  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , en función de la tasa de crecimiento. Esto nos puede explicar porque el cultivo de *Dunaliella* alcanzo el mejor crecimiento y la máxima densidad celular a  $210 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

## V.2. Clorofilas.

La clorofila es un pigmento antena en los centros de reacción de la maquinaria fotosintética, la concentración celular varía con las especies y de acuerdo a las condiciones ambientales (irradiancia y concentración de nutrientes) (Cullen y Eppley 1981, Varela y col. 1992). En altas irradiancias las células producen más pigmentos de reacción para proteger las clorofilas en los centros de reacción, y estas decrecen ya que la cantidad de fotones es muy grande y con poca clorofila se pueden captar los necesarios para el crecimiento (Platt y col. 1995., Kirk 1983 y Jeffrey y col. 1980)

En bajas irradiancias, la clorofila se incrementa para captar los pocos fotones que llegan a los centros de reacción. En los cultivos experimentados, *Dunaliella* presentó mayores concentraciones de clorofila, y no mayores tasas de crecimiento, posiblemente debido a que las irradiancias de crecimiento no fueron las óptimas para este género y las células produjeron

más clorofila. La mayor concentración de clorofila en los cultivos se alcanzó al 8vo día del experimento, principalmente porque en ese día se alcanzaron las máximas densidades celulares en todos los cultivos, y en segundo lugar porque la producción de clorofila es un proceso que ocurre en escalas de días. *Chaetoceros* fue el género con mayor concentración de clorofila en los cultivos, considerando que sus tasas de crecimiento fueron similares a *Isochrysis*, la producción celular de clorofila debió ser mayor a *Isochrysis*, a pesar de tener mayores tasas de crecimiento.

Los cultivos de *Isochrysis* presentaron menores concentraciones de clorofila, estas células son semejantes en tamaño a *Chaetoceros* y menores a *Dunaliella*, por lo que a pesar de haber presentado las mayores densidades celulares al 8vo día, la concentración de clorofila es baja. *Tetraselmis* es un género de mayor tamaño a *Chaetoceros* e *Isochrysis*, y aunque presentó la menor densidad celular, su mayor tamaño produce una mayor concentración de clorofila en los cultivos.

### **V.3. Carotenoides.**

Los cultivos de *Dunaliella* produjeron una mayor concentración total de carotenos, seguidos de *Chaetoceros*, *Tetraselmis* e *Isochrysis* respectivamente. Las mayores concentraciones se alcanzaron al 8vo día del experimento y a bajas irradiancias. Sin embargo, la concentración de carotenos por célula es muy diferente, las máximas concentraciones celulares se registraron los primeros días del experimento a mediana iluminación y en concentraciones muy similares *Dunaliella* y *Tetraselmis*.

*Dunaliella* acumula grandes cantidades de  $\beta$ -caroteno cuando es expuesta a alta irradiancia luminosa, limitación de nutrientes y/o otras condiciones estresantes Amotz, A. B 1983. Cuando es cultivada a altas irradiancias decrece la concentración de clorofila Smith, B. M. y col. (1990). y aumenta la producción de pigmentos accesorios para proteger la célula. En forma similar a estos resultados, Guevara y col. 2005 encontraron que las mayores densidades celulares y los máximos valores de carotenos se dieron en altas intensidades luminosas, sin embargo, ellos observaron que el contenido de carotenoides por célula es mayor.

Al final de los experimentos, fue notorio el decremento en el crecimiento celular, pues las poblaciones de microalgas permanecían constantes o con un crecimiento mínimo, además el contenido de clorofila y carotenos sufrió un decremento constante a partir del octavo día del los experimentos. Después de llegar a la fase estacionaria los cultivo tienden a decrecer, por limitación de espacio, luz y nutrientes y la población decae. Así mismo, el contenido de carotenos ha sido relacionado al periodo de dilución del cultivo, a mayor período la producción de carotenos decrece debido a una limitación de nutrientes García Gonzales y col. 2003. En este trabajo, el valor máximo de carotenos se observó al 8vo día del experimento, sugiriendo que puede haber un agotamiento en los nutrientes principalmente nitrógeno.

Algunos estudios han mostrado que la carotenogénesis puede ser un proceso separado del crecimiento celular y que puede ser inducida en cualquier estado del ciclo celular (Heidari, H. 2000)

Los resultados obtenidos son ambiguos en este sentido, ya que debería esperarse una relación entre densidad celular y contenido de carotenos. Sin embargo, el contenido de caroteno por célula es mayor al inicio del experimento en el ensayo a mediana y baja irradiancia, sólo, se alcanza una alta densidad celular y alto contenido de caroteno por célula a altas irradiancia. ). Sanches S. y col. 2002, encontraron que *Chaetoceros* tiene su máxima producción de carotenoides en la fase exponencial cuando está sometido a estrés lumínico.

El género con mayor densidad celular y crecimiento fue *Isochrysis*, sin embargo su contenido de carotenos totales y carotenos por célula fue el más bajo. Considerando una producción de carotenos a gran escala es probable que *Dunaliella* pueda ofrecer mejores resultados, sin embargo, no es posible extrapolar los resultados experimentales de este trabajo a volúmenes mayores. De manera contraria a *Isochrysis*, a nivel de producción por célula, la cepa de *Tetraselmis* sp. que tuvo menores crecimientos celulares, sin embargo ofrece una mayor cantidad de carotenoides por célula, lo que haber nuevas incógnitas y hace necesario explorar el potencial de utilización de este género en nuevas investigaciones

## VI. CONCLUSIONES

1.- Las densidades celulares de las cuatro cepas, no mostraron diferencias significativas hasta después del cuarto día del experimento.

2.- *Dunaliella* sp. fue la microalga mas productora de clorofilas y carotenoides, sin embargo no tuvo el mejor crecimiento celular en ninguna de las tres intensidades luminosas.

3.- *Isochrysis* sp. fue la microalga con mayor densidad celular en las tres intensidades luminosas experimentadas y tuvo las mayores tasas de crecimiento en mediana y baja intensidad luminosa.

4. El alto flujo de fotones a  $400 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Se manifestó en densidades celulares menores, pero con las tasas de crecimiento más altas en el crecimiento exponencial.

5. No se encontró una correlación positiva entre el crecimiento celular y la concentración de clorofilas y carotenoides.

7.- *Tetraselmis* sp. fue la única microalga que presento mayor densidad en alta iluminación, respecto a su crecimiento en mediana y baja.

8.- *Tetraselmis* sp. fue la cepa con menor crecimiento celular, pero con mayor concentración de carotenoides por célula en mediana iluminación.

## VII. RECOMENDACIONES

1.- Se recomienda en próximas investigaciones, iniciar los experimentos con diferentes iluminaciones, al mismo tiempo y de la misma cepa, así nos aseguraríamos de tener las mismas concentraciones iniciarles, no solo de células, sino de clorofilas y carotenoides, minimizando el error estadístico y evitando confusión al interpretar los datos.

2.- En próximos trabajos, es necesario tomar en cuenta otros factores ya conocidos que inducen la carotenogénesis, como son la combinación de estrés por salinidad y reducción de la concentración de nutrientes (nitratos).

3.- Enfocar los esfuerzos de estudio, en las microalgas que se van conociendo como altas productoras de estos compuestos, incluir en este caso a las cepas de *Tetraselmis* sp y *Dunaliella* sp.

4.- Diseñar experimentos que permitan incrementar las densidades celulares de *Tetraselmis* sp., dado que fue la microalgas con mayor concentración de carotenoides por célula y es reconocida por su capacidad de producción de vitamina E.

5.- Realizar estudios con estas especies en cultivos al exterior para evaluar su crecimiento y capacidad carotenogénica, tomando en cuenta los antecedentes originados por este trabajo.

6.- Experimentar con diferentes intensidades luminosas a las utilizadas durante esta investigación.

7.- Buscar nuevas especies en el medio natural cuyos antecedentes las convierten en potenciales especies productoras de carotenoides, como son las diferentes especies de *Dunaliella* sp, e incluir a *Dunaliella salina*.

## VIII. LITERATURA CITADA.

- Abalde J., Cid A., Fidalgo J.P., Torres E., Herrero C. 1995. Microalgas Cultivo y Aplicaciones Servicio de publicaciones, Universidad de la Coruña. Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias. La Coruña España. 210 pp.
- Abalde, J. y Herrero, C. 2004. Microalgas en acuicultura: calidad nutricional. ALGAS 32 Diciembre de 2004. 40pp: p 16-18.
- Barbarena, C.y Montoya, H. 1990. Crecimiento, ciclo de vida y tolerancia a la salinidad de la microalga *Dunaliella viridis* Teodoresco. Revista de la Facultad de Oceanografía Pesquera y Ciencias Alimentaría. 2: 34-53
- Becker, E.W. 1994. Microalgae. Biotechnology and Microbiology. Cambridge Studies in Biotechnology. Eds.: Sir James Baddiley, N.H.Carey, I.J.Higgins y W.G.Potter. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. 293 p.
- Bell, J.G., McEvoy, J., Tocher, D.R. y Sargent, J.R. 2000. Tocopherol and astaxanthin in Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects autoxidative defense and fatty acid metabolism. Journal of Nutrition, 130(7): 1800-1808
- Ben-Amotz, A. y Avron, M. 1982. Accumulation of beta-carotene in halotolerant algae: purification characterization of oof beta-carotene rich globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae). J. Phycol. 25: pp. 175-178.
- Ben-Amotz, A. y Avron, M. 1983. On the factors which determine massive B-carotene accumulation in the halotolerant algae *Dunaliella bardawil*. Plant Physiol. 72:593-597.
- Ben-Amotz, A. 1987. Effect of irradiance and nutrient deficiency on the chemical composition of *Dunaliella bardawil* (Volvocales, Chlorophyta). J. Plant Physiol. 131:479-487.
- Ben-Amotz, A. y Avron, M. 1989. The biotechnology of mass culturing *Dunaliella* for products of commercial interest. In Algal and Cyanobacteria Biotechnology ed. R.C: Creswell, T.A. Rress
- Bolch, C. 2004.- Intensive Algal Culture. Lecture notes: KQA 201 School of Aquaculture, University of Tasmania, Launceston, Australia. p 1-4.
- Borowitzka, M.A. y Borowitzka, L.J. E. 1988. Microalgal Biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. p. 27-58.

- Borowitzka, M.A. Huisman, J. y Osborn, A. 1991. Culture of the astaxanthine producing green algae *Haematococcus pluvialis*. Effects of nutrients on growth and cell type. *J. Appl. Phycol.* 3: 295-304.
- Boussiba, S. Fan, L. and Vonshak, A. 1992. Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in green alga *Haematococcus pluvialis*. *Meth. Enzymol.* 213: 386-391.
- Business Communications Company. BCC Research 2004. The Global Market for Carotenoids ReportCode:FOD025B, Published: June2005.(<http://www.bccresearch.com>)
- Business Communications Company. BCC Research 2007. The Global Market for Carotenoids. Report Code: FOD025C, Published: March 2008. <http://www.naturalproductsinsider.com/articles/coming-to-terms-with-carotenoids.html>).
- Carballo-Cárdenas, P., Tuan, M., Janssen, M. y Wijffels, R.H. 2003. Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) production by marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation. *Biomol. Eng.* 20: 139–147.
- Capelli, B. y Cysewski, G. 2007. ASTAXANTINA Astaxantina natural:La reina de los carotenoides. por.Cyanotech Corporation. 148 pp.
- Cifuentes A.S., Gonzales M., Conejeros M., Dellarosa V. y Parra O. 1992. Growth and carotenogenesis in eight strain of *Dunaliella salina* Teod. from Chile. *J. Applied Phycol.* 4: 111-118.
- Cordero, J., Guevara, M., Morales, E. y Lodeiros, C. 2005 Efecto de metales pesados en el crecimiento de la microalga tropical *Tetraselmis chuii* (Prasinophyceae). *Rev. Biol. Trop.* 53 (3-4): 325-330.
- Cullen, J.J y Eppley, R.W. 1981. Chlorophyll maximum layers of the Southern California Bight and possible mechanisms of their formation and maintenance. *Oceanol. Acta*, 4: 23-32.
- Che Man, Y.B., y Tan, C.P. 2003. Carotenoids, in *Lipids for Functional Foods and Nutraceuticals*. Edited by Frank D. Gunstone. The Oily Press, U.K. pp 25-52.
- Chung, H., Rasmussen, H.M., y Johnson, E.J. 2004. Lutein bioavailability is higher from lutein-enriched eggs than from supplements and spinach in men. *Journal of Nutrition.* 134 (8):1887-93
- Del Campo, J.A., García-González M., Guerrero, M.G. 2007. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*, 74:1163–1174

- Domínguez, A., Fabregas, J. y Otero, A. 2006. Astaxantina, el oro rojo de la microalga *Haematococcus pluvialis*. *Algas* 35. pp 4-9
- Fábregas, J. Herrero, C., Cabezas, B. y Abalde, J. 1985. Mass culture and biochemical variability of the marine microalga *Tetraselmis suecica* Kylin (Butch) with high nutrient concentrations. *Aquaculture* Volume 49. Pp. 231-244.
- FAO 1989. Programa cooperativo gubernamental FAO-Italia. Reunión técnica de planificación en acuicultura. Caracas, Venezuela, 8-12 mayo 1989. Documento preparado para el proyecto GCP/RLA/075/ITA. Apoyo a las actividades regionales de acuicultura para América Latina y el Caribe. Documento de Campo N°16. Brasilia. Brasil: 219 p.
- García-González, M., Moreno, J., Cañavate J.P., Anguis, V., Prieto, A. Manzano, C. Florencio, F.J. y Guerrero, M.G. 2003. Conditions for open-air outdoor culture of *Dunaliella salina* in southern Spain. *Journal of Appl. Phycology* 15: 177-184.
- Goodwin, T. W. 1980. The biochemistry of the carotenoids. Vol. 1 Plants. 2nd. ed. Chapman and Hall. London and New York. 377 pp.
- Goodwin, T. W. 1984. The biochemistry of the carotenoids. Vol. 11 Animals. 2nd ed. Chapman and Hall. London and New York. 223 pp.
- Guerin, M., Huntley, M.E. y Olaizola, M. 2003. *Haematococcus* astaxanthin: application for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology* 21, 210-216
- Guevara, M., Lodeiros, C., Gómez, O., Lemus, N., Núñez, P., Romero, L., Vásquez, A. y Rosales, N. 2005. Carotenogénesis de cinco cepas del alga *Dunaliella* sp. (Chlorophyceae) aisladas de lagunas hipersalinas de Venezuela. *Rev. Biol. Trop.* 53 (3-4): 331-337.
- Heidari, R., Riahi, H. y Saadatmand, S. 2000. Effects of salt and irradiance stress on photosynthetic pigments and proteins in *Dunaliella salina* (Teodoresco) *Journal of Sciences Islamic Republic of Iran*. Spring 2000; 11(2):73-77.
- Higuere-Ciapara, I., Felix-Valenzuela, L. y Goycoolea, F.M. 2006. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 46:185-196.
- Irianto, A. y Austin, B. 2002. Probiotics in aquaculture, *J. Fish Dis.*, 25:633-642.
- Jeffrey, S.W. 1980. Algal pigment systems, In: P.G. Falkowski (ed). *Primary productivity in the sea*. Plenum Press, New York, pp 33-58.

- Kirk, J.J.G. 1983. Light and photosynthesis in aquatic ecosystems. Cambridge University Press. 509 pp.
- Kobayashi, M., Korimura, Y. y Tsuji, Y. 1997. Light independent, astaxanthin production by the green microalga *Hematococcus pluvialis* under salts stress. *Biotechnol.Lett.*19: 507-509.
- López-Elías, J. A., Voltolina, D., Nieves-Soto, M. y Figueroa-Ortiz, L. 2004. Producción y Composición de Microalgas en Laboratorios Comerciales del Noroeste de México. *Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola.*16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México.
- Lorenz, R. T., Cysewski, G. R. 2000. Commercial potential for *Hematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends Biotechnol.* 18, 160-167.
- Margalith, P.Z 1999. Production of ketocarotenoids by microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol* 51:431–438.
- MacIntyre H., Kana, L., Todd, M., Tracy, A. y Gaider, R.J. 2002. Photoacclimation of Photosynthesis irradiance response curves and Photosynthetic pigment in Microalgae and Cyanobacteria. *J. Phycol.* 38: 17-38
- McGowan, T. 2006. Growth of the marine haptophyte *Isochrysis* sp. (strain T.iso) in response to varying light Intensity. *Nexus journal of undergraduate science engineering and technology.* Tasmania University Australia. School of Aquaculture
- Morales, E., Rodríguez, M., García, D., Loreto, C. y Marco, E. 2002. Crecimiento, producción de pigmentos y exopolisacáridos de la cianobacteria *Anabaena* sp. cepa PCC 7120 en función del pH y CO<sub>2</sub>. *Interciencias* 27: 373-378.
- Moulton, T.P. and M.A. Burford, 1990. The mass culture of *Dunaliella viridis* (Volvocales, Chlorophyta) for oxygenated carotenoids: Laboratory and pilot plant studies. *Hydrobiologia*, 204-205: 401-408.
- Nakano, T., Kanmuri, T., Sato, M., y Takeuchi, M. 1999. Effect of astaxanthin rich red yeast (*Phaffia rhodozyma*) on oxidative stress in rainbow trout *Biochim. Biophys.* 1426: 119-125.
- Nieves, M., López, D.J., Medina, M.A., Piña, P., Leal, S. y López Elías, J.A. 2009. Crecimiento producción y calidad de *Chaetoceros mulleri* a diferentes concentraciones de nutrientes y densidades de inóculo. *Rev. Invest. Mar.* 30 (2): 123-133.

- Ong, A.S.H. y Choo, Y.M. 1997. Carotenoids and Tocols from Palm Oil, in Natural Antioxidants- Chemistry, Health and Applications. Shahidi, F. (ed) Champaign IL: Am.Oil Chem. Soc. Press. Pp 133-139.
- Parsons, T.R., Maita, Y. y Lalli, C.M. 1989. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. Pergamon Press U.S.A., 173: 101-107.
- Platt, T., S. Sathyendranath y A. Longhurst. 1995. Remote sensing of primary production in the oceans: promise and fulfilment. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B, 348: 191-202.
- Prosperi, C., Boluda, L., Luna, C. y Fernández, E. 1992. Environmental factors affecting in vitro nitrogenase activity of cyanobacteria isolated from ricefields. J. Appl. Phycol. 4: 197-204.
- Quigg, A. y Beardall, J. 2003. Protein turnover in relation to maintenance metabolism at low photon flux in two marine microalgae. Plant Cell and Environment, 26: 693-703.
- Ramos-Carrión, S. 2007. Los carotenoides: El licopeno y su acción en el cáncer. Toxicología Alimentaria (UAM 06/07). pp. 109-137.
- Rodríguez-Amaya, D. 1999. Latin American food sources of carotenoids. Arch. Latinoam. Nutr: 49 (3, supl. 1). 74S- 84S.
- Rønnestad, I., Helland, S., y Lie, Ø. Feeding Artemia to larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) results in lower larval vitamin A content compared with feeding copepods. Aquaculture, 165. pp. 159-164.
- Sánchez-Varo, R.M. 2000. Producción de carotenos por *Dunaliella salina*. Biotecnología de microalgas.. pp 1-36
- Sánchez-Saavedra, M.P. y Voltolina, D. 2002. Efecto de la tasa sw flujo de fotones de luz blanca y azul-verde en la eficiencia del crecimiento y contenido de pigmentos de tres especies de diatomeas en cultivos terminales. Ciencias Marinas, 28(3): 273-279.
- Salas-González, M. 2000. La axtaxantina y su biosíntesis; Contactos, 36: 61-64
- Salas-Leiton, E., Prieto, A., Van-Bergeijk, S., Gil-González, P. y Cañavate, P. 2003. Cultivo de tres microalgas marinas de interés comercial en fotobiorreactores en la Bahía de Cádiz., Sesión de Ingeniería. Comunicación Oral. Centro de Investigación y Formación Pesquera y Acuícola (C.I.F.P.A.).
- Smith, B. M., Morrissey, P.J., Guenther, J.E., Nemson, J.A. y Harris, R. 1990 Response of the photosynthetic apparatus in *Dunaliella salina* (green algae) to irradiance stress. Plant Physiol., 93, 1433-40

- Spigel, M., Schlosser, S. C., Be-Amotz, A., Addison, L. y Laurence, J. M. 2006. Effect of dietary carotenoid on the sea urchin *Paracentrocus lividus*. *Aquaculture*, 261: 1269-1280.
- Serpa-Ibáñez, R.F. y Calderón-Rodríguez, A. 2006. Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno en el contenido de carotenoides y clorofilas de cuatro cepas peruanas de *Dunaliella salina* Teodoresco. *Ecol. Apl.*, 5(1,2): 93-99.
- Thimijan, R. W. y Heins, R.D. 1982. Photometric, Radiometric, and Quantum Light Units of Measure: A Review of Procedures for Interconversion. *Hort Science* 18:818-822.
- Torresani, M.E. 2009 Asociación entre riesgo cardiovascular y consumo de licopeno en mujeres pre y postmenopáusicas *Archivos Latinoamericanos de Nutrición; Sociedad Latinoamericana de Nutricion*. 50 (2)
- Wanasundara, U.N. y Shahidi, F. 1998 Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. *Food Chemistry*, 63 (3): 335-342.
- Varela, R.A.;Cruzado, A.; Tintore, J. y García-Laona,E. 1992. Modelling the deep chlorophyll maximum: A coupled physical biological approach. *J. Mar. Res.*, 50: 441-463
- Valdez-Holguín, J.E. 1998. Variabilidad de los parámetros fotosintéticos del fitoplancton en función de la climatología de la zona eufótica. Tesis Doctoral. CICESE. pp 170.
- Vilchez, C., Garbayo, I., Lobato, M.V. y Vega, J.M. 1997. Microalgae-mediated chemicals production and wastes removal. *Enzyme Microb. Technol.* 20: 562-572.
- Voltolina, D. Buckle, F. y Morales, E. 1989. Manual de metodologías alternativas para el cultivo de microalgas. Ensenada, Baja California, México. 3pp
- Yollis, R. 2002. Efecto tóxico de cadmio sobre microalgas aisladas del noroeste de Venezuela, Laboratorio de Acuicultura. Departamento de Biología Pesquera, Instituto Oceanográfico de Venezuela (IOV-UDO). Caracas Venezuela, pp. 104-109.
- Young, A. y Britton, G. 1993. Carotenoid in photosynthesis. Chapman and Hall. London. 1st ed. 498 pp.
- Young, E., Beardall, J. y Giordano, M. 2001. Inorganic carbon acquisition by *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyta) involves external carbonic anhydrase and direct HCO<sub>3</sub>-utilization insensitive to the anion exchange inhibitor DIDS. *European Journal of Phycology*, 36, 81-88.

# **ANEXO 1**

**Imágenes de los géneros de las microalgas utilizadas en este trabajo**



Figura i.- *Isochrysis* sp. imagen obtenida de [www.Isochrysis.com](http://www.Isochrysis.com)

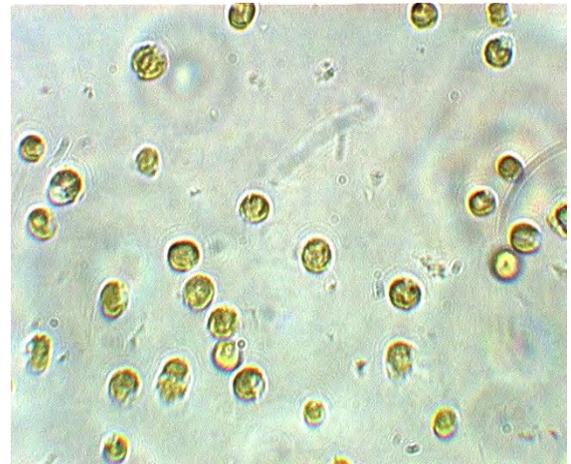


Figura ii. *Isochrysis* sp. Imagen obtenida de [comenius.susqu.edu/.../ISOCHRYISIS.htm](http://comenius.susqu.edu/.../ISOCHRYISIS.htm)



Figura iii. *Tetraselmis* sp.  
Obtenidas de [http://www.ibvf.cartuja.csic.es/Cultivos/microalgas/Tetraselmis\\_chuii.jpg](http://www.ibvf.cartuja.csic.es/Cultivos/microalgas/Tetraselmis_chuii.jpg)



Figura iv. *Tetraselmis chuii*

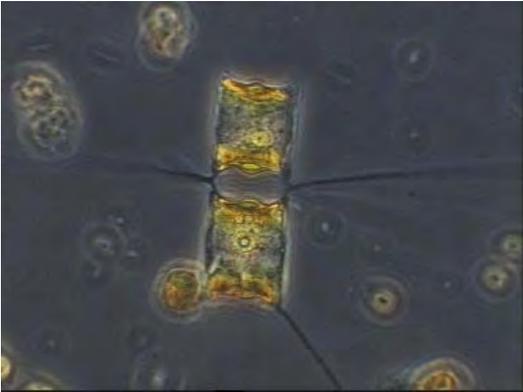


Figura v. *Chaetoceros* sp



Figura vi. *Chaetoceros* sp

Imágenes de [www.reed-mariculture.com/microalgae/chgra.htm](http://www.reed-mariculture.com/microalgae/chgra.htm)



Figura vii. *Dunaliella tertiolecta*



Figura viii. *Dunaliella tertiolecta*

Imágenes obtenidas de <http://www.eol.org/pages/901806>.

## **ANEXO 2**

**Estructuras moleculares de los carotenoides mencionados en este trabajo  
de alto valor comercial e interés científico.**

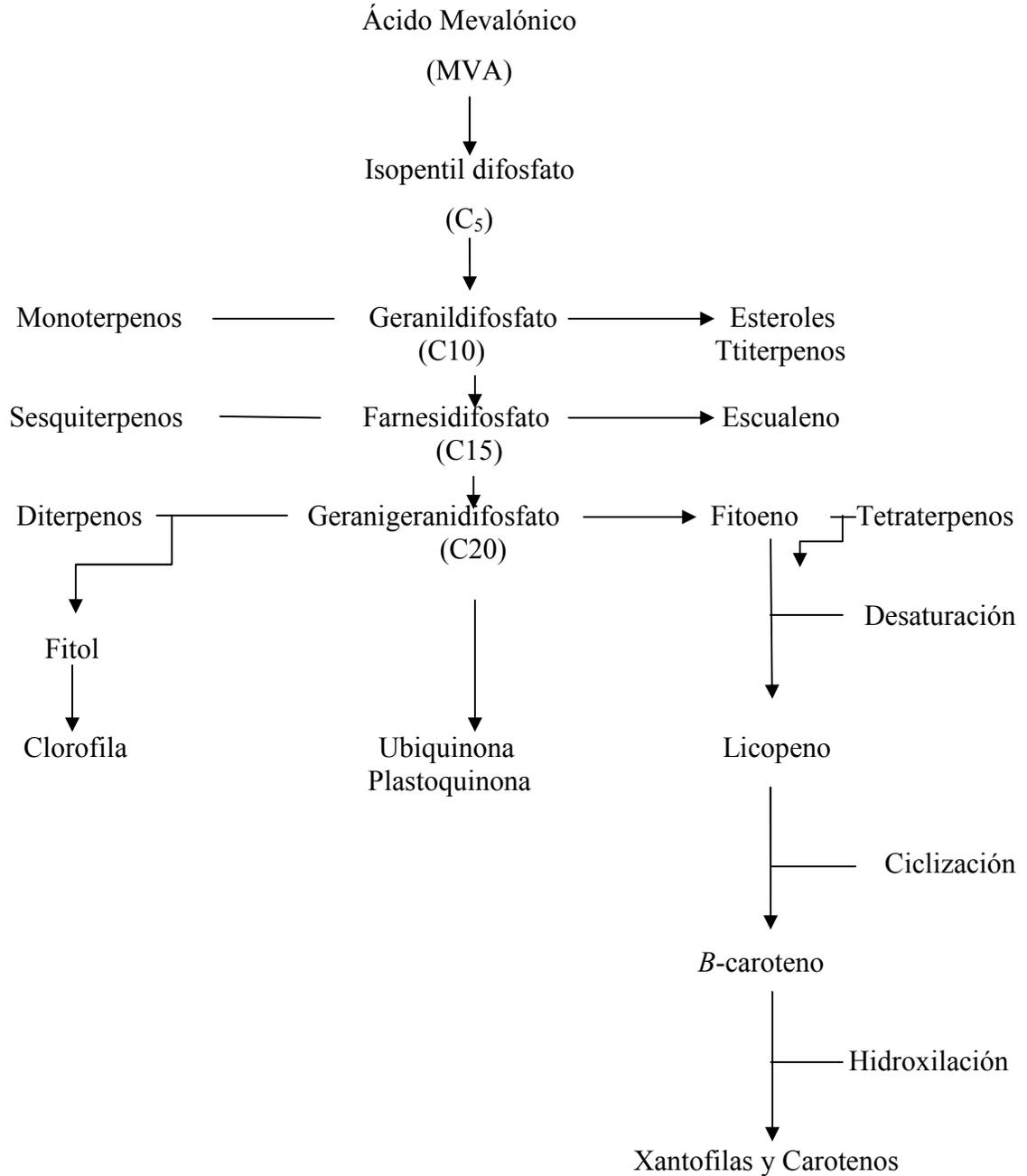


Figura ix.- Ruta de síntesis de carotenoides a partir del ácido mevalónico



## ANEXO 3

Tabla I.- *Isochrysis* Alta Iluminación (400  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ )

| Día | Promedio  | Log2<br>No.Células | Tasa de<br>Crecimiento | Tiempo de<br>Generación | Desviación<br>Estándar |
|-----|-----------|--------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| 0   | 10,000    | 13.29              |                        |                         | 0.00                   |
| 1   | 78,750    | 16.26              | <b>2.98</b>            | 8.06                    | 4.86                   |
| 2   | 277,500   | 18.08              | 1.82                   | 13.21                   | 14.05                  |
| 3   | 736,250   | 19.49              | 1.41                   | 17.05                   | 32.44                  |
| 4   | 1,093,750 | 20.06              | 0.57                   | 42.03                   | 25.28                  |
| 5   | 2,356,250 | 21.17              | 1.11                   | 21.68                   | 89.27                  |
| 6   | 2,358,333 | 21.17              | 0.00                   | 18826.11                | 0.15                   |
| 7   | 2,470,833 | 21.24              | 0.07                   | 356.98                  | 7.95                   |
| 8   | 2,479,167 | 21.24              | 0.00                   | 4940.55                 | 0.59                   |
| 9   | 3,552,083 | 21.76              | 0.52                   | 46.26                   | 75.87                  |
| 10  | 6,179,167 | 22.56              | 0.80                   | 30.05                   | 185.76                 |
| 11  | 7,375,000 | 22.81              | 0.26                   | 94.03                   | 84.56                  |
| 12  | 8,804,167 | 23.07              | 0.26                   | 93.92                   | 101.06                 |
|     |           |                    | <b>9.78</b>            |                         |                        |

Tabla II.- *Tetraselmis* en Alta Iluminación ((400  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ )

| Día | Promedio  | Log2<br>No.Células | Tasa de<br>Crecimiento | Tiempo de<br>Generación | Desviación<br>Estándar |
|-----|-----------|--------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| 0   | 10,000    | 13.29              |                        |                         | 0.00                   |
| 1   | 33,333    | 15.02              | 1.74                   | 13.82                   | 1.65                   |
| 2   | 137,083   | 17.06              | <b>2.04</b>            | 11.76                   | 7.34                   |
| 3   | 439,167   | 18.74              | 1.68                   | 14.29                   | 21.36                  |
| 4   | 666,667   | 19.35              | 0.60                   | 39.85                   | 16.09                  |
| 5   | 845,833   | 19.69              | 0.34                   | 69.89                   | 12.67                  |
| 6   | 1,272,917 | 20.28              | 0.59                   | 40.70                   | 30.20                  |
| 7   | 1,387,500 | 20.40              | 0.12                   | 193.00                  | 8.10                   |
| 8   | 1,729,167 | 20.72              | 0.32                   | 75.57                   | 24.16                  |
| 9   | 2,008,333 | 20.94              | 0.22                   | 111.15                  | 19.74                  |
| 10  | 2,137,500 | 21.03              | 0.09                   | 266.89                  | 9.13                   |
| 11  | 2,150,000 | 21.04              | 0.01                   | 2852.99                 | 0.88                   |
| 12  | 2,258,333 | 21.11              | 0.07                   | 338.40                  | 7.66                   |
|     |           |                    | <b>7.82</b>            |                         |                        |

| Día | Promedio  | Log2<br>No.Células | Tasa de<br>Crecimiento | Tiempo de<br>Generación | Desviación<br>Estándar |
|-----|-----------|--------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| 0   | 10,000    | 13.29              |                        |                         | 0.00                   |
| 1   | 89,583    | 16.45              | <b>3.16</b>            | 0.01                    | 5.63                   |
| 2   | 671,250   | 19.36              | 2.91                   | 0.01                    | 41.13                  |
| 3   | 848,333   | 19.69              | 0.34                   | 0.12                    | 12.52                  |
| 4   | 1,852,083 | 20.82              | 1.13                   | 0.04                    | 70.98                  |
| 5   | 2,304,167 | 21.14              | 0.32                   | 0.13                    | 31.97                  |
| 6   | 2,435,417 | 21.22              | 0.08                   | 0.52                    | 9.28                   |
| 7   | 2,570,833 | 21.29              | 0.08                   | 0.53                    | 9.58                   |
| 8   | 2,608,333 | 21.31              | 0.02                   | 1.99                    | 2.65                   |
| 9   | 2,754,167 | 21.39              | 0.08                   | 0.53                    | 10.31                  |
| 10  | 2,866,667 | 21.45              | 0.06                   | 0.72                    | 7.95                   |
| 11  | 3,250,000 | 21.63              | 0.18                   | 0.23                    | 27.11                  |
| 12  | 4,108,333 | 21.97              | 0.34                   | 0.12                    | 60.69                  |
|     |           |                    | <b>8.68</b>            |                         |                        |

Tabla IV.- *Dunaliella* Alta Iluminación (400  $\mu$ E·m<sup>2</sup>·s<sup>-1</sup>)

| Día   | Promedio  | Log2<br>No.Células | Tasa de<br>Crecimiento | Tiempo de<br>Generación | Desviación<br>Estándar |
|-------|-----------|--------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| 0.00  | 10,000    | 13.29              |                        |                         | 0.00                   |
| 1.00  | 95,833    | 16.55              | <b>3.26</b>            | 7.36                    | 6.07                   |
| 2.00  | 734,167   | 19.49              | 2.94                   | 8.17                    | 45.14                  |
| 3.00  | 1,662,500 | 20.66              | 1.18                   | 20.35                   | 65.64                  |
| 4.00  | 2,041,667 | 20.96              | 0.30                   | 80.97                   | 26.81                  |
| 5.00  | 2,727,083 | 21.38              | 0.42                   | 57.47                   | 48.47                  |
| 6.00  | 4,208,333 | 22.00              | 0.63                   | 38.35                   | 104.74                 |
| 7.00  | 4,279,167 | 22.03              | 0.02                   | 996.64                  | 5.01                   |
| 8.00  | 4,320,833 | 22.04              | 0.01                   | 1716.77                 | 2.95                   |
| 9.00  | 4,970,833 | 22.25              | 0.20                   | 118.71                  | 45.96                  |
| 10.00 | 5,020,833 | 22.26              | 0.01                   | 1662.15                 | 3.54                   |
| 11.00 | 5,458,333 | 22.38              | 0.12                   | 199.11                  | 30.94                  |
| 12.00 | 5,795,833 | 22.47              | 0.09                   | 277.28                  | 23.86                  |
|       |           |                    | <b>9.18</b>            |                         |                        |

Tabla V.- *Isochrysis* Mediana Iluminación (210  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ )

| Día | Promedio   | Log2<br>No.Células | Tasa de<br>Crecimiento | Tiempo de<br>Generación | Desviación<br>Estándar |
|-----|------------|--------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| 0   | 10,000     | 13.29              |                        |                         | 0.00                   |
| 1   | 47,083     | 15.52              | 2.24                   | 10.74                   | 2.62                   |
| 2   | 350,417    | 18.42              | <b>2.90</b>            | 8.29                    | 21.45                  |
| 3   | 433,333    | 18.73              | 0.31                   | 78.33                   | 5.86                   |
| 4   | 3,508,333  | 21.74              | 3.02                   | 7.95                    | 217.44                 |
| 5   | 4,791,667  | 22.19              | 0.45                   | 53.36                   | 90.75                  |
| 6   | 7,137,500  | 22.77              | 0.57                   | 41.75                   | 165.88                 |
| 7   | 8,300,000  | 22.98              | 0.22                   | 110.25                  | 82.20                  |
| 8   | 11,038,095 | 23.40              | 0.41                   | 58.35                   | 193.61                 |
| 9   | 15,100,000 | 23.85              | 0.45                   | 53.09                   | 287.22                 |
| 10  | 15,108,333 | 23.85              | 0.00                   | 30151.90                | 0.59                   |
| 11  | 18,679,167 | 24.15              | 0.31                   | 78.41                   | 252.50                 |
| 12  | 19,175,000 | 24.19              | 0.04                   | 634.98                  | 35.06                  |
|     |            |                    | <b>10.91</b>           |                         |                        |

Tabla VI.- *Tetraselmis* Mediana Iluminación (210  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ )

| Día   | Promedio  | Log2<br>No.Células | Tasa de<br>Crecimiento | Tiempo de<br>Generación | Desviación<br>Estándar |
|-------|-----------|--------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| 0.00  | 10,000    | 13.29              |                        |                         | 0.00                   |
| 1.00  | 38,750    | 15.24              | <b>1.95</b>            | 12.28                   | 2.03                   |
| 2.00  | 124,583   | 16.93              | 1.68                   | 14.24                   | 6.07                   |
| 3.00  | 345,000   | 18.40              | 1.47                   | 16.33                   | 15.59                  |
| 4.00  | 650,000   | 19.31              | 0.91                   | 26.26                   | 21.57                  |
| 5.00  | 908,333   | 19.79              | 0.48                   | 49.71                   | 18.27                  |
| 6.00  | 1,225,000 | 20.22              | 0.43                   | 55.62                   | 22.39                  |
| 7.00  | 1,441,667 | 20.46              | 0.23                   | 102.15                  | 15.32                  |
| 8.00  | 1,442,262 | 20.46              | 0.00                   | 40299.58                | 0.04                   |
| 9.00  | 1,991,667 | 20.93              | 0.47                   | 51.54                   | 38.85                  |
| 10.00 | 2,045,833 | 20.96              | 0.04                   | 619.96                  | 3.83                   |
| 11.00 | 2,070,833 | 20.98              | 0.02                   | 1369.66                 | 1.77                   |
| 12.00 | 2,108,333 | 21.01              | 0.03                   | 926.94                  | 2.65                   |
|       |           |                    | <b>7.72</b>            |                         |                        |

Tabla VII.- *Chaetoceros* Mediana Iluminación (210  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ )

| Día | Promedio  | Log2<br>No.Células | Tasa de<br>Crecimiento | Tiempo de<br>Generación | Desviación<br>Estándar |
|-----|-----------|--------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| 0   | 10,000    | 13.29              |                        |                         | 0.00                   |
| 1   | 60,000    | 15.87              | <b>2.58</b>            | 9.28                    | 3.54                   |
| 2   | 250,833   | 17.94              | 2.06                   | 11.63                   | 13.49                  |
| 3   | 1,762,500 | 20.75              | 2.81                   | 8.53                    | 106.89                 |
| 4   | 1,829,167 | 20.80              | 0.05                   | 448.07                  | 4.71                   |
| 5   | 2,162,500 | 21.04              | 0.24                   | 99.37                   | 23.57                  |
| 6   | 2,320,833 | 21.15              | 0.10                   | 235.43                  | 11.20                  |
| 7   | 2,479,167 | 21.24              | 0.10                   | 252.07                  | 11.20                  |
| 8   | 3,620,833 | 21.79              | 0.55                   | 43.92                   | 80.73                  |
| 9   | 4,600,000 | 22.13              | 0.35                   | 69.50                   | 69.24                  |
| 10  | 5,550,000 | 22.40              | 0.27                   | 88.61                   | 67.18                  |
| 11  | 6,983,333 | 22.74              | 0.33                   | 72.41                   | 101.35                 |
| 12  | 7,391,667 | 22.82              | 0.08                   | 292.74                  | 28.87                  |
|     |           |                    | <b>9.53</b>            |                         |                        |

Tabla VIII.- *Dunaliella* Mediana Iluminación (210  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ )

| Día | Promedio  | Log2<br>No.Células | Tasa de<br>Crecimiento | Tiempo de<br>Generación | Desviación<br>Estándar |
|-----|-----------|--------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| 0   | 10,000    | 13.29              |                        |                         | 0.00                   |
| 1   | 55,833    | 15.77              | <b>2.48</b>            | 9.67                    | 3.24                   |
| 2   | 243,333   | 17.89              | 2.12                   | 11.30                   | 13.26                  |
| 3   | 1,466,667 | 20.48              | 2.59                   | 9.26                    | 86.50                  |
| 4   | 3,079,167 | 21.55              | 1.07                   | 22.43                   | 114.02                 |
| 5   | 3,679,167 | 21.81              | 0.26                   | 93.44                   | 42.43                  |
| 6   | 3,854,167 | 21.88              | 0.07                   | 358.00                  | 12.37                  |
| 7   | 5,572,024 | 22.41              | 0.53                   | 45.13                   | 121.47                 |
| 8   | 6,083,333 | 22.54              | 0.13                   | 189.48                  | 36.16                  |
| 9   | 6,086,905 | 22.54              | 0.00                   | 28344.17                | 0.25                   |
| 10  | 6,404,167 | 22.61              | 0.07                   | 327.41                  | 22.43                  |
| 11  | 6,434,524 | 22.62              | 0.01                   | 3517.76                 | 2.15                   |
| 12  | 6,466,667 | 22.62              | 0.01                   | 3338.50                 | 2.27                   |
|     |           |                    | <b>9.34</b>            |                         |                        |

Tabla IX.- *Isochrysis* Baja Iluminación (65  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ )

| Día | Promedio   | Log2<br>No.Células | Tasa de<br>Crecimiento | Tiempo de<br>Generación | Desviación<br>Estándar |
|-----|------------|--------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| 0   | 10,000     | 13.29              |                        |                         | 0.00                   |
| 1   | 30,000     | 14.87              | 1.58                   | 15.14                   | 1.41                   |
| 2   | 144,583    | 17.14              | <b>2.27</b>            | 10.58                   | 8.10                   |
| 3   | 440,000    | 18.75              | 1.61                   | 14.95                   | 20.89                  |
| 4   | 970,833    | 19.89              | 1.14                   | 21.02                   | 37.54                  |
| 5   | 2,929,167  | 21.48              | 1.59                   | 15.06                   | 138.48                 |
| 6   | 5,100,000  | 22.28              | 0.80                   | 30.00                   | 153.50                 |
| 7   | 6,529,167  | 22.64              | 0.36                   | 67.34                   | 101.06                 |
| 8   | 8,441,667  | 23.01              | 0.37                   | 64.75                   | 135.23                 |
| 9   | 8,741,667  | 23.06              | 0.05                   | 476.37                  | 21.21                  |
| 10  | 11,291,667 | 23.43              | 0.37                   | 64.99                   | 180.31                 |
| 11  | 14,520,833 | 23.79              | 0.36                   | 66.14                   | 228.34                 |
| 12  | 15,450,000 | 23.88              | 0.09                   | 268.21                  | 65.70                  |
|     |            |                    | <b>10.59</b>           |                         |                        |

Tabla X.- *Tetraselmis* Baja Iluminación (65  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ )

| Día | Promedio  | Log2<br>No.Células | Tasa de<br>Crecimiento | Tiempo de<br>Generación | Desviación<br>Estándar |
|-----|-----------|--------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| 0   | 10,000    | 13.29              |                        |                         | 0.00                   |
| 1   | 18,333    | 14.16              | 0.87                   | 27.45                   | 0.59                   |
| 2   | 80,417    | 16.30              | <b>2.13</b>            | 11.25                   | 4.39                   |
| 3   | 157,083   | 17.26              | 0.97                   | 24.85                   | 5.42                   |
| 4   | 487,500   | 18.90              | 1.63                   | 14.69                   | 23.36                  |
| 5   | 779,167   | 19.57              | 0.68                   | 35.48                   | 20.62                  |
| 6   | 933,333   | 19.83              | 0.26                   | 92.14                   | 10.90                  |
| 7   | 1,241,667 | 20.24              | 0.41                   | 58.28                   | 21.80                  |
| 8   | 1,554,167 | 20.57              | 0.32                   | 74.11                   | 22.10                  |
| 9   | 1,558,333 | 20.57              | 0.00                   | 6213.37                 | 0.29                   |
| 10  | 1,687,500 | 20.69              | 0.11                   | 208.91                  | 9.13                   |
| 11  | 1,900,000 | 20.86              | 0.17                   | 140.26                  | 15.03                  |
| 12  | 1,916,667 | 20.87              | 0.01                   | 1904.76                 | 1.18                   |
|     |           |                    | <b>7.58</b>            |                         |                        |

Tabla XI.- *Chaetoceros* Baja Iluminación (65  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ )

| Día | Promedio  | Log2<br>No.Células | Tasa de<br>Crecimiento | Tiempo de<br>Generación | Desviación<br>Estándar |
|-----|-----------|--------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| 0   | 10,000    | 13.29              |                        |                         | 0.00                   |
| 1   | 42,083    | 15.36              | 2.07                   | 11.58                   | 2.27                   |
| 2   | 222,083   | 17.76              | <b>2.40</b>            | 10.00                   | 12.73                  |
| 3   | 979,167   | 19.90              | 2.14                   | 11.21                   | 53.53                  |
| 4   | 1,562,500 | 20.58              | 0.67                   | 35.60                   | 41.25                  |
| 5   | 2,583,333 | 21.30              | 0.73                   | 33.09                   | 72.18                  |
| 6   | 2,712,500 | 21.37              | 0.07                   | 340.96                  | 9.13                   |
| 7   | 3,525,000 | 21.75              | 0.38                   | 63.49                   | 57.45                  |
| 8   | 4,316,667 | 22.04              | 0.29                   | 82.11                   | 55.98                  |
| 9   | 5,383,333 | 22.36              | 0.32                   | 75.33                   | 75.42                  |
| 10  | 7,833,333 | 22.90              | 0.54                   | 44.35                   | 173.24                 |
| 11  | 8,141,667 | 22.96              | 0.06                   | 430.90                  | 21.80                  |
| 12  | 8,150,000 | 22.96              | 0.00                   | 16261.23                | 0.59                   |
|     |           |                    | <b>9.67</b>            |                         |                        |

Tabla XII.- *Dunaliella* Baja Iluminación (65  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ )

| Día | Promedio  | Log2<br>No.Células | Tasa de<br>Crecimiento | Tiempo de<br>Generación | Desviación<br>Estándar |
|-----|-----------|--------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| 0   | 10,000    | 13.29              |                        |                         | 0.00                   |
| 1   | 39,167    | 15.26              | <b>1.97</b>            | 12.19                   | 2.06                   |
| 2   | 122,083   | 16.90              | 1.64                   | 14.63                   | 5.86                   |
| 3   | 391,667   | 18.58              | 1.68                   | 14.27                   | 19.06                  |
| 4   | 1,145,833 | 20.13              | 1.55                   | 15.50                   | 53.33                  |
| 5   | 2,412,500 | 21.20              | 1.07                   | 22.34                   | 89.57                  |
| 6   | 3,170,833 | 21.60              | 0.39                   | 60.86                   | 53.62                  |
| 7   | 3,662,500 | 21.80              | 0.21                   | 115.40                  | 34.77                  |
| 8   | 5,066,667 | 22.27              | 0.47                   | 51.26                   | 99.29                  |
| 9   | 5,566,667 | 22.41              | 0.14                   | 176.76                  | 35.36                  |
| 10  | 5,725,000 | 22.45              | 0.04                   | 593.15                  | 11.20                  |
| 11  | 5,916,667 | 22.50              | 0.05                   | 505.17                  | 13.55                  |
| 12  | 5,945,833 | 22.50              | 0.01                   | 3382.95                 | 2.06                   |
|     |           |                    | <b>9.22</b>            |                         |                        |