



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

---

---

Evaluación de la calidad nutricional de la microalga de agua dulce *Scenedesmus.*, sp (CHLOROPHYCEAE) modificando algunos parámetros ambientales (ciclo luz – oscuridad, salinidad y reducción de N y P)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

RAFAEL MARTINEZ MARTINEZ

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Luis Héctor Hernández Hernández



Tlalnepantla, Estado de México

2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIAS

A mis padres

*Juana Martínez Martínez y Rafael Martínez Cruz*

Por brindarme todo su apoyo y amor así como darme fuerzas y aliento para seguir adelante y lograr mis objetivos; por siempre velar por mí y mi bienestar y principalmente por darme la vida Gracias.....

A mis hermanos

*Pablo, Víctor, Reino, Ricardo y al más pequeño Alfredo*

Por el apoyo que cada uno de ustedes me ha brindado durante todo este tiempo, este logro también es suyo.....

A mis sobrinos

*Víctor, Alejandra, Liliana, Araceli, Mario, Jorge, Sury, Janet, Adalberto y Pablito*

Por que el tesoro más grande que un padre puede heredar a sus hijos es la educación.....

A mi sobrina,

*Zoe...*

Porque eres como mi pequeña bebe, y me has inspirado para dar todo de mi.....

Y a todos mis compañeros y amigos

*Claudia, Paty, Viridiana, Rosario (Nayo), Liliana, Marisol, Edith, Lilia, Edgar (Mi apa), Julio, Saulo, Daniel, Darío, Oswaldo, Oswaldo (Chupaldo tarzan), Cristian Chagoyan y MUY ESPECIALMENTE A TOÑO †*

*Zaida, Mónica, Topacio, Carlitos, Alberto y Ricardo*

Por haber estado conmigo en las buenas y en las malas dándome su apoyo incondicional en mí largo (realmente largo) andar por la carrera.....

## AGRADECIMENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma De México Campus Iztacala por permitirme ser parte de ella.

Al Dr. Luis Héctor Hernández Hernández por la oportunidad de realizar mi tesis bajo su tutela, por su paciencia, apoyo y por todos los dolores de cabeza que voluntaria e involuntariamente le cause y principalmente por brindarme su amistad.....Gracias jefazo.

Al M en C Mario Alfredo Fernández Araiza por su valiosa participación apoyando y dedicando su tiempo en este trabajo, dando acertados consejos para que este trabajo fuera mejor.....

Al Dr. Sarma por el apoyo y observaciones que realizo en el desarrollo de este trabajo.....

Al Biólogo Omar Ángeles López por toda su disposición y apoyo brindados durante mi estancia en el laboratorio, por todos los buenos consejos y por compartir momentos tan agradables con todos los que formamos parte del acuario.....

Al Biólogo Ángel Duran por su valiosa participación en la parte estadística de este trabajo.

Al Biólogo Antonio Edmundo Cisneros por todos sus valiosos consejos y sugerencias hechas para este trabajo.....

Y un agradecimiento muy muy especial a la M en C Teresa Ramírez Pérez por todo su apoyo, enseñanzas, sus consejos, el tiempo brindado y por su valiosa amistad

## INDICE

RESUMEN .....	2
INTRODUCCION .....	3
ANTECEDENTES .....	10
JUSTIFICACION .....	12
HIPOTESIS .....	12
OBJETIVOS .....	13
MATERIALES Y METODOS .....	14
1. Diseño experimental .....	14
2. Tratamientos .....	14
2.1. Nitrógeno .....	14
2.2. Fósforo .....	15
2.3. Salinidad .....	15
2.4. Fotoperiodo .....	15
3. Determinación del crecimiento poblacional .....	16
4. Análisis proximal .....	16
5. Análisis estadístico .....	17
RESULTADOS .....	18
1. Crecimiento poblacional .....	18
1.1. Nitrógeno .....	18
1.2. Fósforo .....	19
1.3. Salinidad .....	19
1.4. Fotoperiodo .....	20
2. Analisis proximal .....	20
2.1. Nitrógeno .....	20
2.2. Fósforo .....	22
2.3. Salinidad .....	22
2.4. Fotoperiodo .....	23
DISCUSION .....	30
CONCLUSIONES .....	45
REFERENCIAS .....	46
ANEXOS .....	55
I. Medio Bold basal .....	55
II. Preparación del medio para los diferentes tratamientos .....	56
III. Cultivo de la microalga .....	57
IV. Cuantificación de clorofila total .....	57
V. Cuantificación de Proteína total .....	58
VI. Cuantificación de Lípidos totales .....	59
VII. Cuantificación de Humedad y Cenizas .....	60
VIII. Tabla de formulas .....	61

## RESUMEN

Se evaluó el crecimiento poblacional y el contenido proximal de *Scenedesmus* sp., cultivada en diferentes salinidades (10 ‰, 20 ‰, 30 ‰), con disminución de nitrógeno (N) y fósforo (P) en el medio (25, 50, 75%) y exposición a un fotoperiodo (12 horas luz, 12 horas oscuridad). Los cultivos se realizaron por triplicado con medio Bold basal, aireación constante y temperatura de  $27 \pm 1$  °C. Para los cultivos con las diferentes concentraciones de salinidad, nitrógeno y fósforo, la iluminación fue de 24 horas (57  $\mu\text{mol/s/m}$ ). El crecimiento poblacional se determinó con concentración de clorofila total. La disminución de N en el medio y la salinidad, afectaron significativamente el crecimiento poblacional y la composición proximal de *Scenedesmus* sp., particularmente cuando la microalga se cultivó en la concentración de N más baja (11 mg/l) y en 20‰ y 30‰ de salinidad. No se observaron cambios significativos cuando se disminuyó la fuente de fósforo en el medio. El fotoperiodo causó una baja en el crecimiento, pero se observó un aumento en el contenido de proteína y lípidos. Los datos obtenidos indican que los parámetros ambientales pueden utilizarse para la producción de biomasa con características bioquímicas específicas para utilizarse como alimento vivo en acuicultura.

## INTRODUCCION

Las microalgas pertenecen a un grupo de organismos muy heterogéneo, predominantemente acuáticos, microscópicos unicelulares que pueden formar colonias y que filogenéticamente están compuestas de especies procariotas y eucariotas. Se caracterizan por la presencia de pigmentos responsables de su coloración así como de los mecanismos fotoautotróficos (Darley, 1987).

Actualmente existe un creciente interés en el estudio de las microalgas, ya que tienen una importancia primordial dentro de diversas cadenas tróficas y una amplia posibilidad de aplicación comercial en distintas áreas como la nutrición, salud humana y animal, en tratamientos de aguas residuales, en la producción de energía, en la obtención de compuestos de interés en la industria alimenticia, química y farmacéutica, en la agricultura y acuicultura, además, pueden ser usadas en contra del efecto invernadero al asimilar CO<sub>2</sub>, resultado del proceso de la quema de combustibles fósiles y de las prácticas agrícolas impropias. (Morales, 1991; Borowitzka, 1993; Certik y Shimizu, 1999; Kirk y Behrens, 1999; Leman, 1997; Bruno, 2001; Grobbelaar, 2004; Richmond, 2004).

Estos organismos pueden ser cultivados en diversos sistemas de producción con volúmenes variados. Los sistemas comúnmente utilizados son muy poco sofisticados, muchas empresas desarrollan cultivos en sistemas abiertos con condiciones naturales de iluminación y temperatura sin ningún control de estos parámetros ambientales. Los tanques son generalmente rasos, construidos en concreto, fibra de vidrio, policarbonato, con fondo de tierra o revestido con material plástico. Recientemente algunos cultivos han sido desarrollados con equipo más específico, denominado fotobiorreactor, esperando alcanzar grandes producciones, ya que en este tipo de sistemas es posible controlar las condiciones de cultivo; cantidad de nutrientes, temperatura, iluminación, pH etc (Tredici, 2004).

En ambiente natural, así como en cultivos estáticos, el crecimiento de una población microalgal es el resultado de la interacción entre factores físicos, químicos y biológicos (Raven, 1988). Entre los factores físico - químicos que afectan el crecimiento de las microalgas destacan la luz, temperatura, salinidad, pH, CO<sub>2</sub> y disponibilidad de nutrientes (Coutteau, 1996; Sánchez et al., 2000; Leonardo y Lucas, 2000; Tzovenis et al., 2003). Dentro de estos últimos son relevantes los macronutrientes, que son utilizados para sintetizar compuestos orgánicos, y los micronutrientes, usados como catalizadores (Coutteau, 1996; Hidalgo et al., 1998; Sipauva-Tavares y Rocha, 2003).



La aplicación más común de las microalgas se ha dado en la acuicultura. En esta área, el principal uso de las microalgas se da en la nutrición ya que al ser la base de la cadena trófica y 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 o indirecta del fitoplancton; por lo tanto constituyen la principal fuente de alimento en el cultivo de todos los estadios de moluscos bivalvos, de los estadios larvales de un gran número de peces marinos y camarones peneidos y del zooplancton (Renuad et al., 2002; Brown, 2002; Aloysio, 2003).

Sin embargo los mayores costos en ambiente controlado de la producción de algunos organismos acuáticos como los pectínidos se los lleva la alimentación, la cuál es principalmente en base a microalgas (Coutteau y Sorgeloos, 1992; Uriarte et al., 2002). Por esta razón, las investigaciones de la última década se han centrado en hacer más eficiente y costo/efectiva el cultivo de las microalgas en las diferentes fases del cultivo controlado, utilizando tecnologías de manipulación de las microalgas o de formulación de sustitutos de estas. Ello ha fomentado el desarrollo de los estudios nutricionales no solo de los moluscos bivalvos, sino también, de otros organismos acuáticos de interés comercial.

Así las altas concentraciones de proteínas, carbohidratos, ácidos grasos y vitaminas presentes en las microalgas las hace fundamentales para la alimentación de estos organismos (Brown et al., 1997; D'Souza y Nelly, 2000; Renaud et al., 2002; Aloysio, 2003).

Las microalgas representan una fuente proteínica con posibles aplicaciones en la nutrición acuícola, debido principalmente a sus elevados contenidos proteínicos, potenciados por poseer un buen balance de aminoácidos. El alto contenido de proteína de varias especies de microalgas es una de las mayores razones para considerarlas como una inusual fuente de proteína, se conoce que las microalgas pueden contener hasta un 70 % del contenido total de materia seca. El patrón de aminoácidos de casi todas microalgas se compara favorablemente con las de otras fuentes de proteína. A si las células son capaces de sintetizar todos los aminoácidos y pueden proveer de algunos esenciales para algunas especies acuícolas tales como leucina fenilalanina o treonina.

El contenido de lípidos de las microalgas puede variar entre 1% y 70% de peso seco y en ciertas condiciones de cultivo, pueden alcanzar hasta un 90% (Borowitzca y Borowitzca 1988). Los lípidos de las microalgas son típicamente compuestos por glicerol, azucres o bases esterificadas y ácidos grasos estos últimos pueden contener entre 12 y 22 carbonos pudiendo ser saturados, mono o poliinsaturados y corresponden a la mayor fracción de lípidos.

De estos los de mayor importancia son los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga principalmente los de la familia omega 3 y omega 6 (Langdon y Waldock, 1981; Sergeant et al., 1997) además, en algunas especies los ácidos grasos poliinsaturados representan entre 25 y 60% de lípidos totales (Becker, 1988; Brown, 1991; Becker, 2004).

Una gran cantidad de especies de microalgas han sido aisladas en diferentes partes del mundo y son sometidas a cultivos intensivos; sin embargo, en las últimas cuatro décadas solo algunas centenas han sido probadas como alimento en acuicultura, pero muy pocas han ganado un uso general (Jeffrey et al., 1992; Kawamura et al., 1998) ya que alrededor de 40 especies de microalgas se utilizan en acuicultura en todo el mundo, la mayoría de ellas de origen marino. Se han empleado especies de Bacillariophyceae (*Chaetoceros* spp., *Thalassiosira* spp. *Phaeodactylum tricornutum*, *Skeletonema costatum*), Haptophyceae (*Isochrysis* spp.), Cryptophyceae (*Rhodomonas* spp.), Chrysophyceae (*Monochrysis* spp.), Prasinophyceae (*Tetraselmis* spp.), Cyanophyceae (*Arthrospira* spp. y *Spirulina* spp.) y Chlorophyceae (*Chlorella* spp., *Dunaliella* spp. y *Scenedesmus* spp.) y otras clases y diversas especies.

*Scenedesmus* es un género que pertenece a la Clase de las clorofíceas, que está ampliamente distribuido en el mundo y que se encuentra en diferentes ambientes en las aguas continentales mexicanas.

Son células de forma elipsoidal o fusiforme que se agrupan en cenobios de 2, 4, 8 o 16 células, las cuales suelen estar ornamentadas con espinas o prolongaciones más o menos largas que en su medio natural son utilizadas como mecanismo de defensa contra sus depredadores.

En acuicultura algunas especies de este género han sido utilizadas para alimentar carpa herbívora y tilapia, además se han utilizado en la producción de algunas especies de rotíferos, como *Brachionus rubens* y *Brachionus calyciflorus*, y cladóceros, que a su vez son utilizados en el cultivo de peces de ornato.

El aporte de elementos como N, P y de compuestos lipídicos de alto valor nutricional (principalmente HUFA) de *Scenedesmus* hacia rotíferos y cladóceros es un factor crítico en la tasa de crecimiento y fecundidad de estos últimos además tiene una influencia en la tasa de sobrevivencia de las larvas de los peces. Así un aporte nutricional inadecuado se traduce en una producción más lenta y reducida tanto de rotíferos y cladóceros como de peces, lo que implica pérdidas económicas.

A pesar de ser utilizadas en la producción de organismos zooplanctónicos se considera que las clorofitas de agua dulce como *Scenedesmus* y *Chlorella* poseen un valor nutricional muy reducido, ya que en general estas microalgas raramente producen lípidos en exceso principalmente ácidos grasos insaturados (Yongmanitchai y Ward, 1991; Ahlgren et al., 1992).

Sin embargo las microalgas que crecen bajo limitación de recursos exhiben variación considerable en su composición bioquímica dependiendo del nutriente y del grado de limitación. Algunos estudios sugieren que algunas microalgas verdes bajo limitación de P pueden incrementar su contenido de lípidos y carbohidratos mientras que a bajas concentraciones de N el contenido de lípidos es variable además de una reducción en el contenido de proteínas (Healey y Hendzel, 1979; Shifrin y Chisholm, 1981).

## ANTECEDENTES

Las microalgas pueden ser manipuladas en su composición bioquímica generalmente por estrés ambiental (cambios en algunos factores físico-químicos como iluminación, temperatura, salinidad, pH y CO<sub>2</sub>) o por manipulación en la disponibilidad de nutrientes como concentración de N y P en el medio de cultivo.

Wright et al., (1980) reportan que *Scenedesmus quadricauda* mostro un porcentaje de lípidos de 15.5%, creciendo bajo luz continua y con KNO<sub>3</sub> como fuente de N y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> como fuente de P, mientras que Ahlgren et al., (1992), en un análisis del contenido de proteínas, aminoácidos y lípidos totales de 24 especies de microalgas dulceacuícolas, reportaron un contenido bajo de lípidos (entre 10.2% Y 10.4%) y un contenido relativamente elevado de proteínas (entre 22.6% y 32%) en 4 cepas de *Scenedesmus* y una deficiencias en los niveles de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en algunas algas verdes incluidas entre estas, las 4 cepas de *Scenedesmus*. Piorreck y Pohl, (1984) en cultivos de *Scenedesmus obliquus* bajo luz continua y con KNO<sub>3</sub> y con K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> como fuente de N y P respectivamente, analizaron el comportamiento en la producción de biomasa, contenido de lípidos, clorofila y proteínas en una fase del cultivo; encontrando que a medida que transcurría el cultivo y la concentración de N en el medio se reducía el contenido de proteína y clorofila total disminuía; mientras que el de lípidos y la producción de biomasa se incrementaba.

Por su parte Piorreck et al., (1984) bajo las mismas condiciones de luz y concentraciones de las fuentes de N y P observo que al reducir la concentración de N en cultivos de *Scenedesmus obliquus* la producción de biomasa, el contenido de proteína y clorofila total eran menores mientras que el porcentaje de lípidos se incrementaba. Alhgren y Hyenstrand, (2003) en un estudio para determinar el efecto de diferentes concentraciones de nitrato y amonio, como fuente de nitrógeno; sobre la composición bioquímica de *Scenedesmus quadricauda* encontraron un incremento en la composición de lípidos y una disminución en el contenido de proteínas a bajas concentraciones de las diferentes fuentes de nitrógeno. Yepes et al., (2004), evaluaron el efecto de seis concentraciones de nitrógeno en forma de nitrato, sobre el crecimiento y la composición bioquímica de la microalga *Scenedesmus* sp., encontraron que en la razón de 3,5:1 de N: P, se obtiene el mejor rendimiento celular, con una tasa de crecimiento neta alta (2,9) a los siete días. La concentración de lípidos y carbohidratos se incrementó significativamente en los tratamientos con baja concentración de nitrógeno, mientras que en el contenido de proteínas y clorofila no se observaron cambios significativos. Sánchez et al., (2008) reportan tasas de crecimiento elevadas en cultivos continuos de *Scenedesmus almeriensis* expuestos a luz continua y con una proporción de 5 g/l de NaCl en el medio; bajo estas condiciones encontraron altos porcentajes en el contenido de proteínas, sin embargo el contenido de lípidos fue bajo. Yongmanitcha y Ward, (1991), reportan haber obtenido altas proporciones de ácidos grasos poliinsaturados cuando la concentración de la fuente de nitrógeno era alta en cultivos de *Scenedesmus*, *Chlorella* y *Phaeodactylum tricornerutum*.

## **JUSTIFICACION**

La producción de microalgas es una parte integral de diferentes operaciones acuaculturales y existe poca información respecto al mejoramiento nutricional de especies de agua dulce y su uso en la acuicultura en México. Por ello es importante generar el conocimiento para el mejoramiento de la calidad nutricional de especies mexicanas.

## **HIPOTESIS**

Los parámetros ambientales influyen directamente en el desarrollo, crecimiento poblacional y composición bioquímica de los organismos, por lo que al modificar algunos de estos parámetros (ciclo luz-oscuridad, salinidad y reducción de N y P en el medio de cultivo) durante el cultivo de la microalga *Scenedesmus* sp., se observaran cambios en el crecimiento poblacional y la composición bioquímica de la biomasa, factores que puedan ser aprovechados en la Acuicultura.



## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Evaluar la calidad nutricional de la microalga de agua dulce *Scenedesmus* sp., mediante la modificación de algunos parámetros ambientales (ciclo luz-oscuridad, salinidad y reducción de N y P en el medio de cultivo).

### **Objetivo Particular**

- ❖ Determinar el crecimiento poblacional bajo diferentes concentraciones de N, P, NaCl y un ciclo luz-oscuridad.
- ❖ Determinar la composición proximal de lípidos, proteínas, cenizas y humedad en las diferentes condiciones de cultivo (distintas concentraciones de N, P, NaCl y un ciclo luz-oscuridad).

## **MATERIALES Y METODOS**

### **1. Diseño experimental**

El presente trabajo se elaboro en el Laboratorio de Producción Acuícola de la UNAM FES Iztacala, con la cepa de *Scenedesmus* sp., que se mantiene en este laboratorio. Las microalgas se expusieron a diferentes variables ambientales: salinidad, disminución en las concentraciones de nitrógeno (N) y fósforo (P) en el medio de cultivo y exposición a un periodo de 12 horas luz- 12 horas oscuridad; para los cuales se emplearon reactores de plástico de 2 l con medio de cultivo Bold basal (1.85 l por reactor) (Hernández, 1998), aireación continua, temperatura ambiental de aproximadamente  $27 \pm 1$  °C y luz suministrada por lámparas fluorescentes de 30 watts con una intensidad luminosa de  $57 \text{ mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Todas las pruebas se realizaron por triplicado para cada uno de los grupos experimentales y controles. En cada caso se determino el crecimiento poblacional y la composición proximal (porcentaje de proteína, lípidos, humedad y cenizas).

### **2. Tratamientos**

#### **2.1 Nitrógeno**

Para esta prueba se utilizo  $\text{NaNO}_3$  como fuente de N en el medio a una concentración de 250 mg/l de cultivo para el grupo control; 187.5 mg/l, 125 mg/l y de 62.5 mg/l para los experimentales; equivalentes a 41 mg/l, 30 mg/l, 22 mg/l y 11mg/l de N en el medio respectivamente.

## **2.2 Fósforo**

En estos cultivos se utilizaron dos fuentes de P en el medio  $K_2HPO_4$  Y  $KH_2PO_4$ . Para  $K_2HPO_4$ , las concentraciones fueron de 75 mg/l para el control y 56.25 mg/l, 37.5mg/l y 18.75mg/l para los experimentales; que corresponden a 13.3 mg/l, 10 mg/l, 6.6 mg/l y 3.3 mg/l de P en el medio respectivamente. Mientras que para  $KH_2PO_4$  se utilizaron las siguientes concentraciones; 175mg/l para el control; 131.25 mg/l, 87.5 mg/l y 43.75 mg/l para los experimentales; equivalentes a 39.8 mg/l, 29.9 mg/l, 19.9 mg/l y 9.9 mg/l respectivamente.

## **2.3 Salinidad**

Para la prueba con diferentes salinidades, se disolvió NaCl (sal de grano para acuarios) en agua destilada para obtener salinidades de 10, 20 y 30 ‰, así mismo, se mantuvo un grupo control con salinidad de 0 ‰.

## **2.4 Fotoperiodo**

Se realizaron cultivos bajo un periodo luz - oscuridad 12-12 (experimental) y bajo un régimen de luz continua (control) con una concentración de las fuentes de N y P al 100% en el medio (250mg/l de  $NaNO_3$ , 175 mg/l de  $KH_2PO_4$  y 75 mg/l de  $K_2HPO_4$  respectivamente).

### **3. Determinación del crecimiento poblacional bajo las diferentes condiciones medioambientales.**

El crecimiento poblacional se obtuvo diariamente para cada uno de los grupos experimentales, mediante el método de extracción de clorofila, de acuerdo a Becker (1994). Con ayuda de un espectrofotómetro se determinó la absorbancia de cada muestra a 650 y 665 nm. El contenido de clorofila se determinó con la fórmula:

$$\text{Clorofila } a + \text{Clorofila } b = (4.0 \times \text{abs}_{665}) + (25.5 \times \text{abs}_{650}) = \text{Clorofila total mg/l}$$

### **4. Análisis proximal**

La determinación del contenido de proteína se realizó con el método de Lowry (Becker, 1994); para lípidos totales se utilizó el método de Bligh y Dyer (1954), mientras que para cenizas y humedad se utilizaron las técnicas reportadas por AOAC (1993).

## **5. Análisis estadístico**

### **Crecimiento poblacional**

Para el análisis de crecimiento se llevaron a cabo regresiones no lineales (regresión cuadrática) para los casos de N, P y salinidad; se obtuvieron las tasas de crecimiento en cada regresión y mediante un análisis de varianza de una vía, se compararon las pendientes de las diferentes concentraciones. Para el caso de fotoperiodo dado el comportamiento de los datos se utilizó análisis de regresión logística se calcularon las pendientes de grupo control y experimental y mediante la prueba de t (para pendientes) se determinó si existían o no diferencias estadísticas significativas.

### **Análisis proximal**

Para la comparación del análisis proximal a diferentes concentraciones de N, P, salinidad y luz-oscuridad se aplicaron análisis de varianza para determinar si existían o no diferencias significativas en el contenido de proteínas, lípidos humedad y cenizas entre las diferentes concentraciones de cada tratamiento y entre los cultivos expuestos a luz continua y los expuestos a fotoperiodo.

## RESULTADOS

### 1. Crecimiento poblacional

En el presente trabajo se determinó la curva de crecimiento promedio (concentración de clorofila total) para los cultivos de *Scenedesmus* sp., bajo 4 tratamientos.

Para los tratamientos con diferentes concentraciones de N, P y salinidad se estableció que las curvas de crecimiento se ajustaron a un modelo de crecimiento de tipo polinomial cuadrática (Fig. 1-3) que están representadas por las formulas mostradas en el anexo VIII, mientras que para los cultivos expuestos a un ciclo de luz-oscuridad la curva de crecimiento se ajustó a un modelo de tipo logístico (Fig. 4) que es representada por la ecuación  $C = A/(1+be^{-kt})$  en donde k corresponde a la tasa de crecimiento.

#### 1.1. Nitrógeno

Para *Scenedesmus* sp., reducir la concentración inicial de N de 41 mg/l a 30 mg/l no tuvo un efecto significativo en su crecimiento; ya que de acuerdo con el análisis estadístico no se encontró diferencia significativa entre sus tasas de crecimiento (21.81 y 24.52 respectivamente) así como en su densidad máxima. Sin embargo a la concentración de 22 mg/l se observó una densidad máxima de 83.43 mg/l (Clorofila total), alcanzada a los 6 días con una tasa de crecimiento de 19.88 significativamente ( $p < 0.05$ ) más baja que las encontradas a la concentración control. El efecto más drástico observado sobre el crecimiento se dio a una concentración de 11mg/l (Fig. 1) registrándose una tasa de crecimiento (11.72) y una densidad máxima (56.10 mg/l) 50% menor que los cultivos que crecieron a 41 mg/l de N inicial (Tabla 1).

## 1.2 Fósforo

La reducción en la concentración de fósforo en el medio de cultivo no mostró ser una limitante en el crecimiento de *Scenedesmus* sp., incluso cuando este elemento se redujo hasta un 75% (13.3 mg/l), debido a que el análisis estadístico corroboró que no hubo diferencias significativas en las tasas de crecimiento (Tabla 2) de los cultivos expuestos a las diferentes concentraciones de fósforo inicial (Fig. 2).

## 1.3 Salinidad

*Scenedesmus* sp., parece tolerar salinidades hasta 10‰, ya que no se registró diferencia significativa entre este tratamiento y el control; aun cuando, también se observa una disminución de su crecimiento (Fig. 3). Sin embargo a concentraciones de 20‰ y 30‰ se produjo una disminución significativa en el crecimiento (Tabla 3) a partir del segundo y tercer día respectivamente (Fig. 3). El análisis estadístico demostró que hubo diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en la tasa de crecimiento de los cultivos que crecieron a salinidades de 20‰ y 30‰ comparados con los cultivos que crecieron a 0‰. *Scenedesmus* sp., manifestó sensibilidad a concentraciones elevadas ya que a la concentración de 30‰ se registro un descenso en el crecimiento de hasta el 50%.

#### **1.4 Ciclo luz-oscuridad.**

El crecimiento de *Scenedesmus* sp., registro densidades máximas de 104.98 y 105.21 mg/l de clorofila total bajo luz continua y fotoperiodo respectivamente (Tabla 4); sin embargo bajo fotoperiodo la densidad máxima se alcanzo a los 18 días (Fig.4) con una tasa de crecimiento de .3996 (Tabla 4), por el contrario, los cultivos a luz continua alcanzaron la densidad máxima a los 9 días (Fig. 4) con una tasa de crecimiento de .6926 (Tabla 4), que de acuerdo con el análisis estadístico es significativamente ( $P<0.01$ ) más elevada que la obtenida en los cultivos bajo periodo luz - oscuridad (Tabla 4).

## **2 ANALISIS PROXIMAL**

Se realizo el análisis de la composición porcentual de proteínas, lípidos, cenizas y humedad de los cultivos a diferentes concentraciones de N, P, NaCl y expuestas a un periodo de luz-oscuridad; los resultados se exponen en las tablas 5-8.

### **2.1 Nitrógeno.**

La concentración porcentual de proteínas resulto tener una relación directamente proporcional con respecto a la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo; a si los máximos valores de proteína de 48.41% y 45.07%, se obtuvieron cuando la microalga creció a una concentración de 41mg/l y 30 mg/l de N en el medio respectivamente, sin diferencia significativa entre ambos valores; sin embargo en los cultivos que crecieron a una concentración de 11 mg/l el porcentaje de proteínas disminuyo significativamente ( $P<0.05$ ) hasta un valor de 11.76%. Estos resultados indican que *Scenedesmus* sp., es



dependiente de concentraciones adecuadas de nitrógeno para producir proteínas, ya que cuando se reduce la concentración en el medio de cultivo, el porcentaje de proteínas disminuye significativamente. (Tabla. 5)

Por otra parte, cuando los cultivos se expusieron a concentraciones iniciales de N de 22 mg/l y 11 mg/l, se observaron los mayores porcentajes de lípidos totales, de 33.94% y 59.33% respectivamente, significativamente mayores ( $P < 0.05$ ) que los registrados en los cultivos que crecieron a concentraciones de 41 mg/l (control) y 30 mg/l con porcentajes de 14.33% y 15.66% respectivamente, este último sin diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) con el control pero sí con los porcentajes obtenidos a 22 mg/l y 11 mg/l de N. Por lo tanto estos resultados sugieren que a bajas concentraciones de N en el medio de cultivo se produce un mayor porcentaje de lípidos totales en *Scenedesmus* sp. (Tabla 5).

Bajo las diferentes concentraciones de N en el medio de cultivo no se observaron cambios significativos en el porcentaje de humedad, el análisis estadístico determinó que no hubo diferencias significativas entre los porcentajes de humedad de los cultivos control y experimentales. Por el contrario en los cultivos que crecieron a bajas concentraciones de N la proporción de cenizas se redujo significativamente ( $P < 0.05$ ), registrándose porcentajes de 2.5%, 3.1% y 4.1% significativamente menores que los obtenidos a la concentración de N control. (Tabla 5).

## **2.2 Fósforo**

El análisis estadístico indicó que no hubo ningún efecto en el porcentaje de cenizas y humedad a ninguna de las concentraciones de fósforo en el medio de cultivo, sin embargo se observó una reducción en el porcentaje de proteínas y lípidos cuando los cultivos crecieron a concentraciones de 26.5 mg/l y 13.2 mg/l, obteniéndose porcentajes de proteína 42.86% y 40.32% mientras que para lípidos se alcanzaron porcentajes de 11.33% y 10.66% respectivamente; (Tabla 6).

## **2.3 Salinidad**

El incremento de la salinidad inhibió la síntesis de proteínas por efecto de estrés salino, de tal forma que el contenido de proteínas disminuyó marcadamente en cultivos expuestos a un medio salino, presentándose la mayor cantidad por volumen de cultivo a 10‰; de 18.43% (Tabla 7). Mientras que a salinidades de 20‰ y 30‰ el porcentaje fue de 16.56% y 15.36% ligeramente menores ( $P < .05$ ). Sin embargo, el aumento de la salinidad significó un aumento de la producción de lípidos, de tal manera que a salinidades de 20‰ y 30‰ se obtuvieron los porcentajes más elevados de lípidos totales de 20.66% y 34.64% respectivamente, significativamente mayores ( $P < .05$ ) que los obtenidos en cultivos a 10‰ y sin concentración de sal en el medio (control).

Un efecto similar ocurrió con el contenido de humedad registrándose un descenso significativo ( $P < 0.05$ ) en el porcentaje a medida que la concentración de sal en el medio de cultivo era mayor. Los porcentajes más bajos se obtuvieron cuando los cultivos crecieron a salinidades de 20‰ y 30‰ con proporciones de 76.16% y 76% respectivamente. Por el contrario el análisis estadístico demostró que a medida que se incrementa la salinidad en el medio el porcentaje de cenizas era mayor, es decir, que se registro un cambio significativo ( $P < 0,05$ ) en el contenido de cenizas de los diferentes tratamientos con respecto al control (Tabla 7).

#### **2.4 Ciclo Luz-Oscuridad**

En relación al efecto de la luz sobre el contenido de proteínas, se encontró que el porcentaje fue significativamente ( $P < 0.05$ ) menor cuando los cultivos se expusieron a luz continua, mientras que los valores más elevados por volumen de cultivo se registraron cuando la microalga creció bajo un periodo de luz oscuridad (58.9%).

En cuanto al contenido de lípidos, se registró un porcentaje de 14.11% a luz continua incrementándose significativamente ( $P < .05$ ) hasta un porcentaje de 25.5% en cultivos expuestos a fotoperiodo. Sin embargo, no hubo diferencias en el porcentaje de humedad y cenizas entre ambos tratamientos registrándose valores de 85.96% y 85.3% de humedad y 6.54% y 6.3% de cenizas respectivamente (tabla 8).

Tabla 1 Cinética poblacional de *Scenedesmus* sp., bajo diferentes concentraciones de N en el medio de cultivo.

TRATAMIENTO mg/l de N	INOCULO INICIAL mg/l de clorofila total	DENSIDAD MAXIMA mg/l de clorofila total	TASA DE CRECIMIENTO k	TIEMPO DE CRECIMIENTO días
41 mg/l (control)	2.52 ± 0.45	104.08 ± 4.24	21.81 a	12
30 mg/l	2.65 ± 0.53	105.23 ± 1.06	24.52 a	12
22 mg/l	2.58 ± 0.30	83.43 ± 1.21	19.88 b	12
11 mg/l	2.38 ± 0.10	56.10 ± 2.14	11.72 c	12

Tabla 2 Cinética poblacional de *Scenedesmus* sp., bajo diferentes concentraciones de P en el medio de cultivo.

TRATAMIENTO mg/l de P	INOCULO INICIAL mg/l de clorofila total	DENSIDAD MAXIMA mg/l de clorofila total	TASA DE CRECIMIENTO k	TIEMPO DE CRECIMIENTO días
53.1 mg/l (control)	2.97 ± 0.10	103.37 ± 3.88	16.84	13
39.9 mg/l	2.93 ± 0.40	103.81 ± 2.37	17.09	13
26.5 mg/l	2.71 ± 0.38	102.89 ± 0.48	17.03	13
13.2 mg/l	2.99 ± 0.02	104.32 ± 2.18	17.09	13

Tabla 3 Cinética poblacional de *Scenedesmus* sp., bajo diferentes concentraciones de NaCl en el medio de cultivo.

TRATAMIENTO g/l de NaCl	INOCULO INICIAL mg/l de clorofila total	DENSIDAD MAXIMA mg/l de clorofila total	TASA DE CRECIMIENTO k	TIEMPO DE CRECIMIENTO días
Sin NaCl (control)	2.81 ± 0.28	105.27 ± 2.14	15.61 a	12
10 ‰	2.97 ± 0.44	97.89 ± 6.26	15.77 a	12
20 ‰	2.81 ± 0.28	68.43 ± 1.10	9.85 b	12
30 ‰	2.98 ± 0.04	51.41 ± 1.90	5.22 c	12

Tabla 4 Cinética poblacional de *Scenedesmus* sp., bajo un periodo de luz continua y un periodo de 12 hrs luz – 12 hrs osc.

TRATAMIENTO	INOCULO INICIAL mg/l de clorofila total	DENSIDAD MAXIMA mg/l de clorofila total	TASA DE CRECIMIENTO k	TIEMPO DE CRECIMIENTO días
Luz continua (control)	2.63 ± 0.17	104.98 ± 1.86	0.6926 a	13
Fotoperiodo 12- 12	2.68 ± 0.08	105.21 ± 1.47	0.3996 b	21

5 Datos obtenidos en el análisis proximal en % de materia seca de *Scenedesmus* sp., creciendo a diferentes concentraciones de N en el medio.

TRATAMIENTO mg/l de N	% PROTEINA	% LIPIDOS	% HUMEDAD	% CENIZAS
41 mg/l (control)	48.41 ± 0.14 a	14.33 ± 1.54 a	85.96	6.54 ± 0.70 a
30 mg/l	45.07 ± 2.26 a	15.66 ± 3.95 a	84.06	4.10 ± 0.57 b
22 mg/l	34.30 ± 0.73 c	33.94 ± 1.71 b	83.43	3.10 ± 0.28 c
11 mg/l	11.76 ± 0.06 d	59.33 ± 0.00 c	86	2.50 ± 0.01 d

Tabla 6 Datos obtenidos en el análisis proximal en % de materia seca de *Scenedesmus* sp., creciendo a diferentes concentraciones de P en el medio.

TRATAMIENTO mg/l de N	% PROTEINA	% LIPIDOS	% HUMEDAD	% CENIZAS
53.1 mg/l (control)	48.41 ± 0.14 a	14.33 ± 0.50 a	85.96 ± 2.50	6.54 ± 0.70
39.9 mg/l	46.09 ± 0.72 a	15.00 ± 1.73 a	88.00 ± 0.50	7.08 ± 0.68
26.5 mg/l	42.86 ± 1.17 b	12.33 ± 0.57 b	88.50 ± 0.50	6.79 ± 0.61
13.2 mg/l	40.58 ± 0.60 b	10.66 ± 0.57 b	87.40 ± 1.65	6.66 ± 0.86

Tabla 7 Datos obtenidos en el análisis proximal en % de materia seca de *Scenedesmus* sp., creciendo a diferentes concentraciones de NaCl en el medio de cultivo.

TRATAMIENTO g/l de NaCl	% PROTEINA	% LIPIDOS	% HUMEDAD	% CENIZAS
Sin NaCl (control)	48.41 ± 0.14 a	14.33 ± 0.57 a	85.96 ± 2.50 a	6.54 ± 0.70 a
10 ‰	18.43 ± 0.12 b	15.94 ± 0.09 a	82.33 ± 1.25 b	3.10 ± 0.28 b
20 ‰	16.56 ± 0.85 c	20.66 ± 0.57 b	76.16 ± 1.52 c	5.00 ± 0.50 c
30 ‰	15.36 ± 0.63 c	34.64 ± 0.64 c	76.00 ± 0.00 c	9.00 ± 1.00 d

Tabla 8 Datos obtenidos en el análisis proximal en % de material seca de *Scenedesmus* sp., creciendo bajo un periodo de luz continua y un periodo de 12 hrs luz – 12 hrs osc.

TRATAMIENTO	% PROTEINA	% LIPIDOS	% HUMEDAD	% CENIZAS
Luz continua (control)	48.41 ± 0.14 a	14.33 ± 0.57 a	85.96 ± 2.50 a	6.54 ± 0.70 a
Fotoperiodo 12- 12	58.9 ± 0.03 b	25.5 ± 1.50 b	85.3 ± 2.30 a	6.3 ± 0.75 a

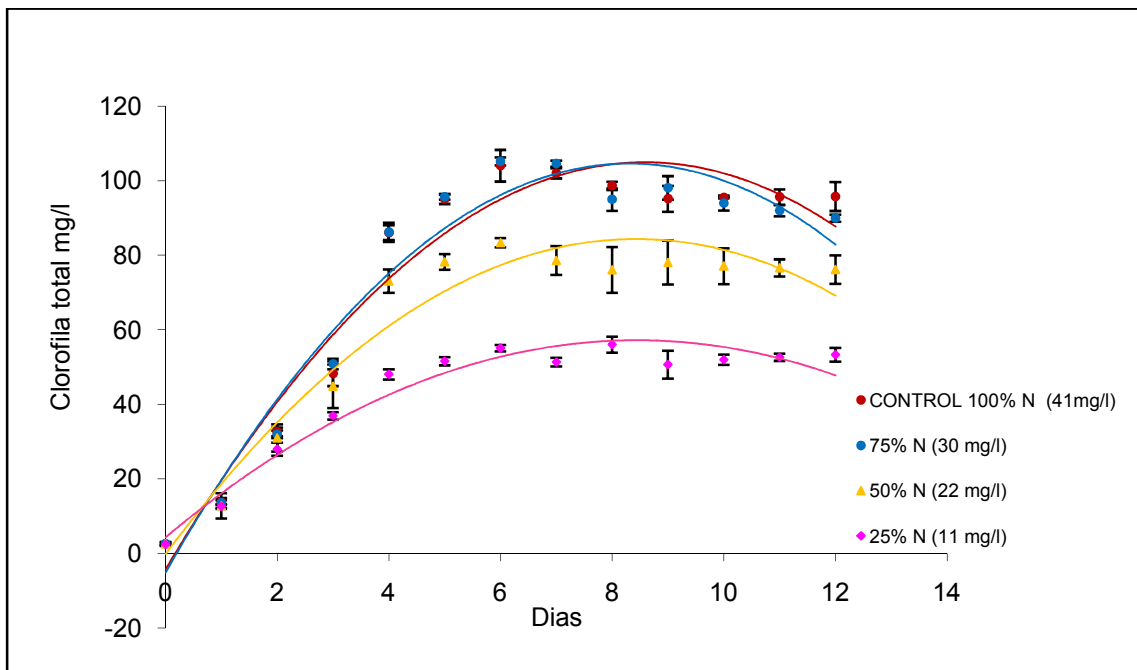


Fig. 1 Crecimiento poblacional de los cultivos de *Scenedesmus* sp., expuestos a diferentes concentraciones de N: 41 mg/l (control), 30 mg/l, 22 mg/l y 11 mg/l (experimentales).

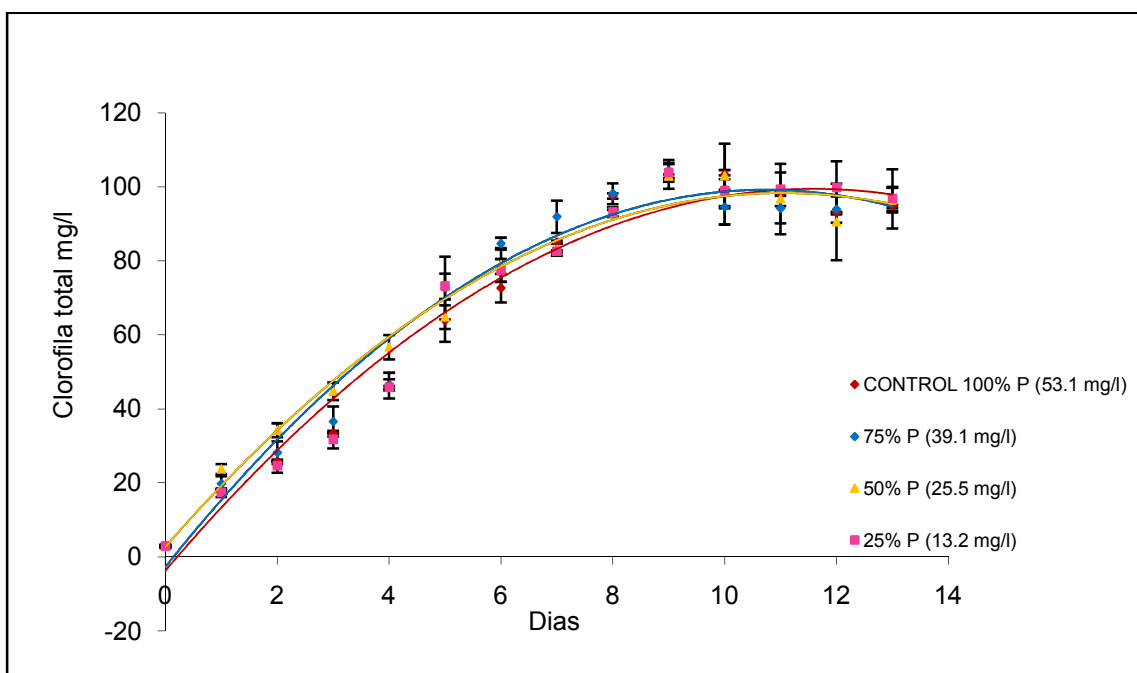


Fig. 2 Crecimiento poblacional de los cultivos de *Scenedesmus* sp., expuestos a diferentes concentraciones de P: 53.1 mg/l (control), 39.1 mg/l, 25.5 mg/l y 13.2 mg/l (experimentales).



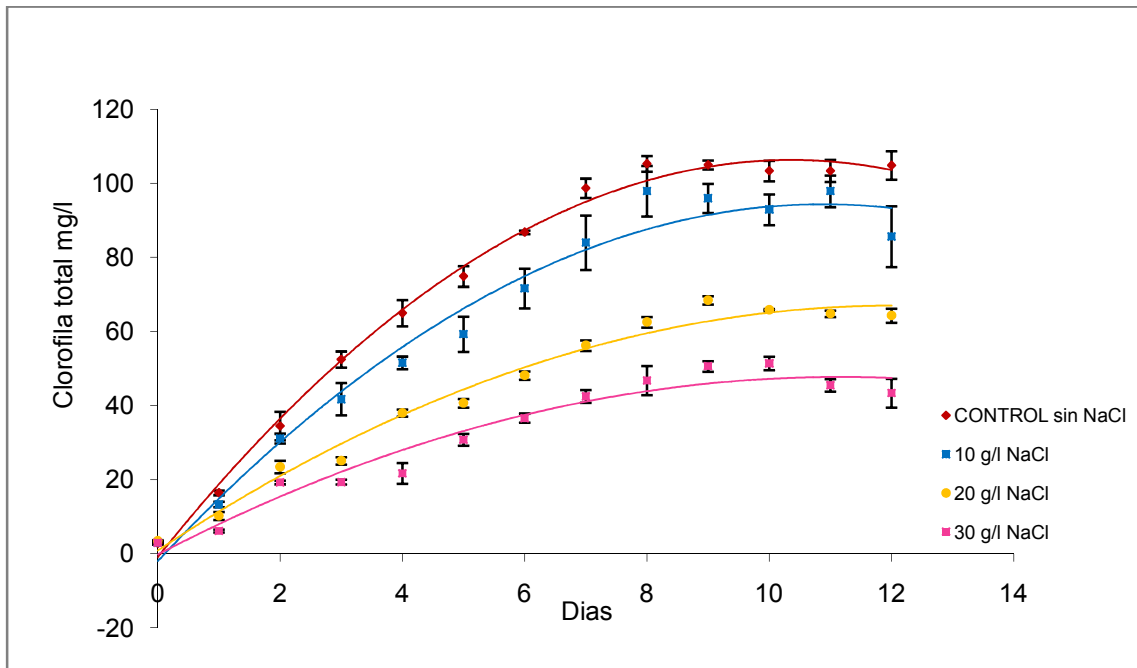


Fig. 3 Crecimiento poblacional de los cultivos de *Scenedesmus* sp., bajo diferentes concentraciones de NaCl en el medio: Sin NaCl (Control), 10 g/l, 20 g/l y 30 g/l (experimentales).

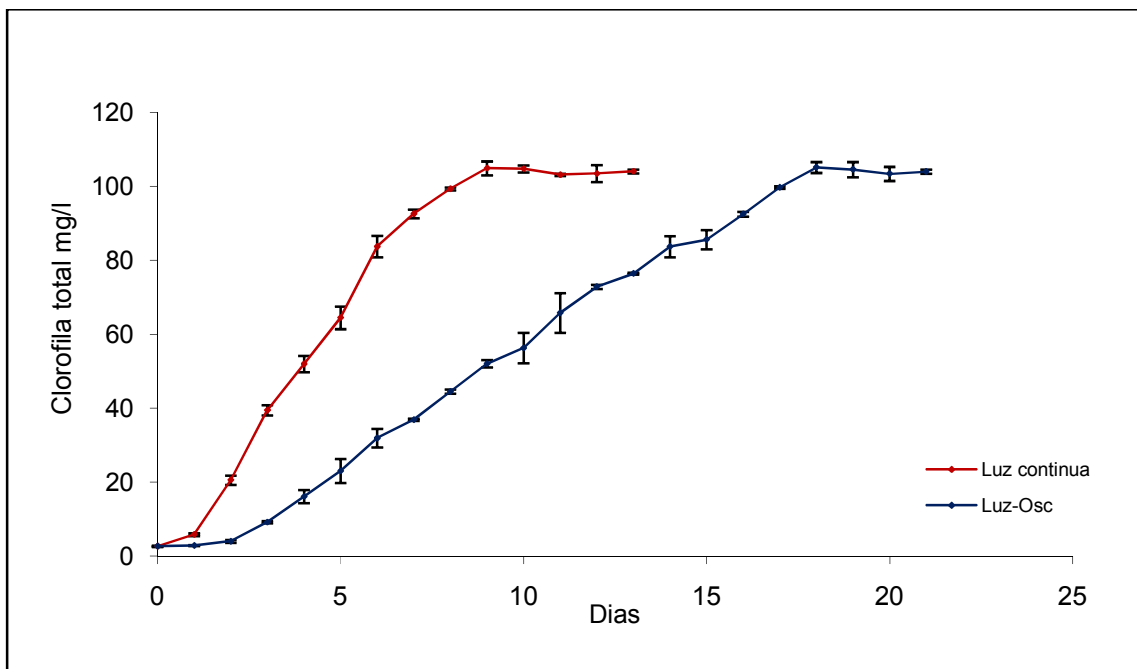


Fig. 4 Crecimiento poblacional de los cultivos de *Scenedesmus* sp., bajo un periodo de luz continua y un periodo de 12 hrs luz – 12 hrs osc.

## DISCUSION

### Efecto de la concentración de N en el crecimiento poblacional

A concentraciones bajas de nitrógeno se produce un efecto negativo muy marcado en el crecimiento poblacional y una disminución general en las tasa de crecimiento, así como en la producción de biomasa; además, cuando el nitrógeno del medio se agota se observa una disminución significativa de su población inicial y una importante decoloración de los cultivos (clorosis). El mismo efecto ocurre con otras cepas de *Scenedesmus* y otras algas verdes (Yepes et al., 2004; Piorreck et al., 1984; Alhgren y Hyenstrand 2003) además de algunas cianobacterias (Foy, 1993; Hu et al., 2000).

Es difícil determinar si existen diferencias en las tasas de crecimiento entre este y los trabajos ya mencionados debido a que el crecimiento poblacional se midió por densidad celular, producción de biomasa y particularmente en este trabajo por contenido de clorofila total.

No obstante en este trabajo a concentraciones de 41 mg/l de N inicial en el medio se obtuvo la máxima tasa de crecimiento y un alto rendimiento; un resultado similar es reportado por Piorreck et al., (1984) para *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella vulgaris* a la misma concentración de N. En el presente trabajo, a la concentración inicial de 30 mg/l de N el crecimiento poblacional y la tasa de crecimiento fueron similares a las obtenidas a la concentración de 41 mg/l de N; además, la densidad máxima se obtuvo a los 6 días de iniciado el cultivo que representa un tiempo menor que el reportado por Yepes et al; (2004) para *Scenedesmus* sp., (7 días).

Por el contrario bajo concentraciones iniciales de 22 mg/l de N en el medio (50% de N) el crecimiento poblacional y la tasa de crecimiento se ven afectados reduciéndose un 16% que es relativamente bajo comparado con otras microalgas verdes como *Chlorella minutissima* que al reducir su concentración de N inicial en un 50% (6 mg/l de N en el medio) el crecimiento poblacional disminuyó en la misma proporción (50%) a diferencia de los cultivos que crecieron bajo un 100% (12 mg/ de N) de N inicial en el medio (Illman et al., 2000). Estos resultados sugieren que *Scenedesmus* sp., es más sensible a concentraciones de N iniciales reducidas, que *Chlorella minutissima*, ya que *Scenedesmus* a una concentración de 11mg/l mostró una reducción del 50% de su crecimiento poblacional y de la tasa de crecimiento.

### **Efecto de la concentración de N en el contenido de proteínas y lípidos**

El comportamiento en la composición porcentual de proteínas de *Scenedesmus* sp., bajo deficiencia de nitrato como fuente de nitrógeno en el medio ha sido descrito previamente por otros autores para *Scenedesmus* y otras algas verdes y verde- azules (Piorreck et al., 1984., Alhgren y Hyenstrand 2003; Zhila et al., 2005 a y b; Kalacheva et al., 2001; Rosales et al., 2006). En estos trabajos se hace referencia a una disminución en el contenido de clorofila total y proteína, a medida que se reduce las concentraciones de nitrógeno en el medio.

El contenido porcentual de proteínas de 48.41% obtenido a una concentración inicial de 41mg/l de N registrado en este trabajo es relativamente más alta que lo reportado por Piorreck et al., (1985) a la misma concentración de N en cultivos de *Scenedesmus obliquus* (32%). Además, en nuestro trabajo a concentraciones de 30 mg/l se registra un porcentaje igualmente elevado (45.07%); mientras que a una concentración de 22mg/l el contenido porcentual es semejante (34.30%) que el obtenido por este autor a concentración 41.5 mg/l. Sin embargo este autor reporta que a una concentración inicial de 13.8 mg/ de N en el medio obtiene un contenido de proteína de 34%. En nuestro trabajo a una concentración muy cercana (11mg/l) el porcentaje de proteínas se vio altamente afectado ya que se obtuvo el porcentaje más bajo (11.76%), mientras que en el trabajo realizado por Piorreck et al., (1984) se observó una disminución en el contenido de proteínas partir de concentraciones de 4.15 mg/l de nitrógeno en el medio. Estos resultados proponen que *Scenedesmus* sp., puede producir porcentajes de proteína relativamente alto a partir de concentraciones iniciales de 22mg/l de N en el medio.

El efecto de bajas concentraciones de N en el medio sobre el contenido de lípidos es variable en las diferentes especies de microalgas; en general se observa un incremento en el contenido de lípidos cuando la concentración de N en el medio es reducida; por ejemplo *Chlorella* sp., mostró un aumento en el contenido de lípidos del 70% al 80% cuando la fuente de nitrógeno aumento de 0.04mmol/l a 0.70 mmol /l (Utting, 1985). Aunque en otras microalgas el efecto es el opuesto, es decir el contenido de lípidos disminuye o se incrementa paralelamente a la concentración de nitrógeno en el medio; Xu et al., (2001) reportan que *Ellipsoidion* sp., aumento el contenido de lípidos hasta un máximo de 32.8% de materia seca cuando se incremento la concentración de N en el medio de 0.16mmol/l a

1.92mmol/l. Mientras que el contenido de lípidos de *Isochrysis galbana* decreció marcadamente de 30% a 19% de materia seca cuando el contenido de nitrógeno se redujo de 2 mmol/l a 0.5 mmol/l (Molina y Sánchez, 1992).

En este trabajo a concentraciones de 41 mg/l de N la concentración de lípidos es baja de 14.33% mientras que a una concentración de 30 mg/l de N el contenido es de 15.66%, este contenido porcentual coincide con lo reportado por Wrigth, (1980), para *Scenedesmus quadricauda* que exhibió un contenido de lípidos totales de 15.5% bajo una concentración de 118mg/l de N inicial en el cultivo. Por su parte Piorreck et al., (1984) reporta que a concentraciones iniciales de entre 41.5 mg/l y 13.8 mg/l se registraron contenidos porcentuales entre 29.8 % y 26.9% de lípidos totales alcanzando un contenido máximo de lípidos a concentraciones iniciales de 4.15 mg/l en cultivos de *Scenedesmus obliquus*. Sin embargo en este trabajo a 22 mg/l de N inicial en el medio se obtuvo un porcentaje de 33.9% mayor que el reportado por Piorreck et al., (1984). Además a concentraciones iniciales de 11mg/l el contenido de lípidos se incremento hasta cuatro veces. Shifrin y Chisholm, (1981) constatan que el contenido de lípidos se incrementa de dos a tres veces en diferentes especies de microalgas después de 4 a 9 días de cultivo bajo concentraciones reducidas de N en el medio. Otros autores reportan incrementos de dos a tres veces en el contenido de lípidos bajo diferentes concentraciones de N inicial para algunas microalgas verdes como *Botriococcus brauni*, *Chlorella emersonii*, *Chlorella vulgaris* y *Chlorella minutissima* (Zhila et al., 2005 a y b; Illman et al., 2000).

El mayor efecto de la limitación de nitrógeno es la reducción del contenido de N y proteína en las células (Falkowsky et al., 1989; Geider et al., 1998). Esto se debe principalmente a que el primer paso en la incorporación de la fuente de nitrógeno en las células es la formación de aminoácidos que ocurre en los cloroplastos, los aminoácidos son la unidad básica de las proteínas y de acuerdo con Alhgren y Hyenstrand, (2003) con la limitación de nitrógeno se inhibe indiferentemente la síntesis de estos y por consiguiente la formación de proteínas. La terminación de la síntesis de proteínas causada por la limitación de nitrógeno en el medio afecta la integridad celular y por consiguiente la capacidad de duplicarse.

La pérdida de color puede estar influenciada por un incremento en la relación carotenoides/clorofila, ya que bajo deficiencia de nitrógeno se tiene una disminución del contenido de clorofila a y b de al menos 2.5 veces comparado con el contenido de carotenoides el cual se incrementa. Este incremento puede estar relacionado con una parcial degradación de las membranas de los cloroplastos (Piorreck et al., 1984) que es causada por una disminución en el contenido de lípidos polares durante este periodo. Esta avería en la estructura de la membrana de los cloroplastos causa la finalización de la síntesis de los galactolípidos, el lípido polar más abundante en las membranas fotosintéticas (Harwood y Jones, 1989; Constantopoulos, 1970).

En algunas microalgas verdes los ácidos grasos de los lípidos polares son redirigidos a la síntesis de lípidos neutrales principalmente triacilgliceroles, que son componentes de reserva de un buen número de algas unicelulares, además, el contenido de estos lípidos se puede incrementar varias veces, bajo limitación de nitrógeno dependiendo de la especie (Thompson, 1996; Piorreck et al., 1984; Tornabene et al., 1983).

### **Efecto de la concentración de P en el crecimiento poblacional**

La reducción en las concentraciones de fosfatos no tuvo un efecto negativo sobre el crecimiento de la microalga, el contenido de clorofila total se comportó de manera similar bajo las tres concentraciones utilizadas.

Las concentraciones de P utilizadas en este trabajo posiblemente no fueron inhibitorias ni limitantes ya que se utilizaron 2 fuentes de P en el medio con lo que se compensaron las necesidades de este nutriente para la microalga; además, para *Scenedesmus* y otras microalgas verdes estas formas de fósforo inorgánico son las más fácilmente asimilables y cuando se encuentran en concentraciones elevadas estas son altamente consumidas y almacenadas en gránulos en forma de polifosfatos y metafosfatos (principales reservas de fósforo en las algas) y son utilizados posteriormente cuando los niveles de fósforo son limitados (Martínez et al., 1997).

De esta forma se puede proveer de P necesario para las reacciones asociadas con la división celular (Darley, 1987; Fogg y Thake, 1987; Valenzuela-espinoza et al., 2005). Por lo tanto *Scenedesmus* sp., puede crecer a expensas de sus reservas de P interno como fue reportado por Rhee, (1973) y confirmado por Martínez et al., (1997) además el uso de estas reservas se hace más eficiente debido a una mayor producción de fosfatasa (Martínez et al., 1999 a).

### **Efecto de la concentración de P en el contenido de Proteínas y Lípidos**

A concentraciones iniciales de 52 mg/l de P se obtuvo una concentración de 48.41%, mientras que a concentraciones más bajas se registro un contenido de proteínas ligeramente menor. Estos resultados son consistentes con lo reportado por Kilham et al., (1997) y Healey y Hendzel (1979). Mientras que Steiner y Robinson no encontraron diferencias en el contenido de proteínas cuando *Scenedesmus* sp., creció a una concentración severamente reducida de P comparados con los cultivos que crecieron a concentraciones optimas de P. Estos resultados sugieren que bajas concentraciones de P en el medio no tienen un efecto muy drástico en la producción de proteínas ya que a pesar de disminuir la producción, el porcentaje se mantiene relativamente alto comparado con otras especies de *Scenedesmus* (Piorreck et al., 1984; Alhgren et al., 1992)



El porcentaje de lípidos totales no varió significativamente a concentraciones iniciales de P en el medio de 52 mg/l y 39mg/l. Sin embargo a concentraciones de 26 mg/l y 13 mg/l se obtuvo un porcentaje más bajo ( 12.33% y 10.16%). Algunos autores como Rhee., (1978), Kilham et al., (1997) y Lynn (2000) indican que el contenido de lípidos en cultivos de diferentes especies de *Scenedesmus* a bajas concentraciones de P en el medio tienden a incrementarse. Estos resultados muestran que *Scenedesmus* sp., es sensible en la producción de metabolitos a exposiciones prolongadas de luz bajo concentraciones reducidas de P en el medio como lo reporta Martínez et al., (1999b).

#### **Efecto de diferentes niveles de salinidad sobre el crecimiento poblacional.**

Algunos autores han reportado una reducción de 98% en la densidad celular a salinidades de 25 ‰ y 35 ‰; obteniéndose una densidad elevada a salinidades menores de 15 ‰ (Mora et al., 2006). El mismo efecto es reportado para algunas cianobacterias en las que se obtienen las mayores tasas de crecimiento a salinidades de 15 ‰ (Jonte et al., 2006; Mora et al; 2006). En este trabajo a concentraciones de 10 ‰ se obtuvo una tasa de crecimiento similar a la obtenida en los cultivos sin salinidad; sin embargo el crecimiento se vio ligeramente disminuido, por su parte en los cultivos a 30 ‰ el contenido de clorofila total se redujo hasta un 63% con una tasa de crecimiento 3 veces menor que los cultivos no salinos.

Estos resultados sugieren que a concentraciones por debajo de 10 ‰ de NaCl se obtiene un crecimiento más adecuado con tasa relativamente altas, lo anterior es confirmado por Sánchez et al., (2008) que encontró un crecimiento óptimo para *Scenedesmus almeriensis* a concentraciones salinas de 5 g/l con tasas de crecimiento incluso más altas que los cultivos sin salinidad; además encontró un crecimiento menor a 10 ‰ y a 30 ‰ con una disminución en las tasas de crecimiento del 50%. Ranga Rao (2006) por su parte reporta que *Botriococcus braunii* creció satisfactoriamente a concentraciones de NaCl de 1mM a 85mM (58 mg/l a 4.9 g/l) obteniendo un crecimiento elevado a 85 mM (4.9 g/l).

Es importante destacar que la sensibilidad a la salinidad difiere entre especies como lo sugiere Goncalves et al (2006); que reporta alta sensibilidad de 3 diferentes microalgas verdes de agua dulce con una inhibición del crecimiento alrededor de los 5 g/l de NaCl o menos.

Esta disminución de los procesos metabólicos y la replicación celular se debe a que el estrés salino influye la capacidad de la microalga para adquirir las fuentes necesarias para su crecimiento y productividad. Desde el punto de vista energético y de acuerdo con Oren, (1999), el costo de producir solutos osmóticos orgánicos en organismos halófilos es enorme y dado que la cantidad de energía necesaria para la producción de solutos osmóticos quizás exceda grandemente los requerimientos energéticos para la biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos, paredes celulares y otros compuestos, por lo que la energía disponible para el crecimiento se ve disminuida cuando se incrementa la salinidad del cultivo (Serpa y Calderón, 2005).

### **Efecto de diferentes niveles de salinidad sobre el contenido de clorofila total, proteínas y lípidos.**

La cantidad de clorofila es un indicador del proceso de fotosíntesis, así, el hecho de que el contenido de clorofila en mg/l disminuya al aumentar la salinidad demuestra que la fotosíntesis es inhibida por incremento de la salinidad del cultivo (Cowan et al., 1992). La variación en el pH por el incremento en la salinidad (estrés iónico) altera el flujo lineal del fotosistema I contribuye a la disminución de la proporción NADPH/NADP y a su vez indica una disminución de las actividades biosintéticas (incluidas la síntesis de clorofila). El incremento de la salinidad también influye en la asimilación del CO<sub>2</sub> a pesar de la aparición de la anhidrasa carbónica (Fisher et al., 1992). Así, la acumulación de fotosistemas II inactivos podría ser debido a la fotoinhibición causada por la fotosíntesis en condiciones de limitada fijación de CO<sub>2</sub> (Serpa y Calderón 2005).

Hay pocos reportes sobre el efecto de la salinidad sobre la composición bioquímica de las microalgas. La literatura sugiere que diferentes niveles de salinidad son asociados con pequeños cambios en la composición química de las microalgas. Dependiendo de la especie en estudio puede haber un incremento en el contenido de cenizas y de lípidos totales (Bent-Amotz et al., 1985) y un incremento o decremento en el total de proteínas (Bent-Amotz et al., 1985; Fábregas et al., 1985).

La positiva correlación del contenido de cenizas con la salinidad de este trabajo coincide con los resultados de trabajos previos hechos por Renaud y Parry, (1994). Este incremento en la materia inorgánica es conocido como un ajuste para el estrés celular causado por altos contenidos de sal en la solución del cultivo (Richmond, 1986). Además se encontró un incremento en el contenido total de lípidos y un decremento en el de proteínas, a salinidades elevadas, este resultado concuerda con lo reportado por Vazquez-Duhalt, (1991), Sarada et al., (2002) y Ranga Rao, (2006) con otras microalgas verdes.

Nuestros resultados muestran una disminución muy marcada en el contenido de proteínas a partir de concentraciones salinas de 10 ‰ en el medio de cultivo; mientras que para el contenido de lípidos se encontró que el mayor porcentaje se obtuvo a una concentración de 30 ‰, sin embargo a pesar de haberse obtenido un porcentaje elevado de lípidos; esta concentración resulta no ser adecuada para fines acuaculturales debido a que se obtiene un rendimiento muy bajo en el crecimiento poblacional. Por lo tanto estos resultados sugieren que la concentración adecuada para una composición bioquímicas aceptable desde el punto de vista acuacultural; se encuentra por debajo de los 10g/l de NaCl. Lo anterior es confirmado por Sánchez et al; (2008) que encontró una concentración optima de 5 g/l de cloruro de sodio para cultivos de *Scenedesmus almeriensis*.

### **Efecto del fotoperiodo en el crecimiento poblacional.**

Diferentes trabajos reportan que bajo régimen de luz continua las células presentan tasas de reproducción reducidas, la tasa de reproducción se incrementa si se les somete a un periodo de luz oscuridad como lo reporta Brown, (1991). Sin embargo en este trabajo los resultados muestran una tasa de crecimiento mayor bajo régimen de luz continua, con un tiempo de 9 días para alcanzar la máxima densidad; mientras que los cultivos bajo fotoperiodo 12- 12 hrs luz-oscuridad la densidad máxima se alcanzo en un periodo de tiempo de 18 días.

Espacios de tiempo prolongados para alcanzar un máximo crecimiento son reportados para *Botryococcus* sp. (Zhila et al., 2005 a) de 20 días bajo un fotoperiodo de 14 horas luz- 10 horas oscuridad. Por su parte Vega, (2006) reporta un tiempo de 15 días para alcanzar su máxima producción de biomasa en cultivos de *Scenedesmus incrassatulus* bajo el mismo fotoperiodo que *Botriococcus* sp. Mientras que Ortega, (2006) reporta una densidad máxima a los 33 días para *Chlorella* sp., bajo un fotoperiodo 12-12 hrs luz-osc. Sin embargo para otras microalgas verdes como *Chlorella vulgaris* la tasa de crecimiento es alta registrándose su densidad máxima a los 12 días, mientras que *Chlorella minutissima* alcanzo su mayor crecimiento a los 9 días pero con una tasa de crecimiento menor; ambas especies, creciendo bajo un fotoperiodo 16-8 hrs. luz-oscuridad.

Las baja tasa de crecimiento y producción de biomasa así como el periodo que duro el cultivo de *Scenedesmus* sp., en este trabajo se debe posiblemente al pobre suministro de aire en el sistema de cultivo, lo que provoca una débil agitación y bajo condiciones de luz limitada no se promueve el crecimiento ni un aumento en la producción de biomasa como lo reporta Vega (2006). Además, el régimen lumínico tiene un efecto directo sobre la tasa de crecimiento, debido a que bajo iluminación continua la tasa de crecimiento es afectada debido a que la mayor parte de las células en cultivo continuo se dividen durante el periodo de obscuridad, además de que bajo estas condiciones se tiene una mejor actividad fotosintética.

### **Producción de proteína y lípidos**

Los cultivos bajo periodo luz - oscuridad mostraron una composición de proteínas relativamente superior (58.9%) comparada con aquellos que se llevaron a cabo bajo luz continua (48.41%). Renaud et al., (1994) encontraron contenidos similares de proteína total en cultivos de *Scenedesmus dimorphus* y *Scenedesmus quadricauda* cuando fueron expuestas a un periodo luz-oscuridad. Estos resultados sugieren que el régimen de luz continua afecta la asimilación de N y por consiguiente la síntesis de proteínas como lo reporta Jeanfils et al., (1993) y que es reforzado con los trabajos realizados por Shifrin y Chisholm, (1981); Piorreck et al., (1984) y Alhgren et al., (1992) quienes reportan bajas concentraciones en el contenido de proteínas de *Scenedesmus obliquus* creciendo bajo condiciones de luz continua.

Por otra parte, es importante reconocer que la luz es un factor importante en la asimilación de nitrógeno, debido a que en estas condiciones; a través de la fotosíntesis se obtiene la energía necesaria (ATP) para el transporte activo de nitrato, el cual es utilizada más eficientemente en la fase oscura de la fotosíntesis ya que en este periodo se lleva a cabo la síntesis de metabolitos como proteínas y carbohidratos (Rajasekaran et al., 1981).

Bajo fotoperiodo el contenido de lípidos se incremento alrededor de un 40% (25.5%) comparado con los cultivos que crecieron en un régimen de luz continua (14.33%). Renaud et al., (1994) reportan contenidos porcentuales de lípidos totales similares a los de este trabajo para *Scenedesmus dimorphus* (23.1%); mientras que para *Scenedesmus quadricauda* el contenido porcentual fue ligeramente menor (19%). En general bajo fotoperiodo el contenido lipídico de algunas microalgas verdes es registrado entre 18% y 29%. Un porcentaje de hasta 63% de lípidos es reportado para *Chlorella emersonni* creciendo bajo fotoperiodo, sin embargo este porcentaje tan elevado está relacionado con una concentración reducida de la fuente de nitrógeno.

### **Utilización en acuicultura**

Algunas especies de *Scenedesmus* son utilizadas como alimento de organismos zooplanctónicos como cladóceros y rotíferos, los cuales son capaces de degradar gruesa pared celular que poseen estas microalgas (Pérez, 2003; Caviedes 2007).

Diversos estudios sugieren que las algas verdes (clorofitas) poseen una adecuada calidad nutricional para los cladóceros y a pesar de que en alguno de ellos se reportan bajos niveles en el contenido de lípidos y proteínas el crecimiento ha sido adecuado (Hardy y Castro, 2000; Caviedes, 2007). La calidad nutricional de estas microalgas, para estos organismos zooplactonicos, ha sido relacionada con altos contenidos de P (Sternner, 1993) y de PUFA, particularmente los del tipo omega 3 (Ahlgren et al., 2000; Muller-Navarra 2000). Diferentes trabajos demuestran un incremento en los niveles de P a rigurosas limitaciones de N (Ahlgren, 1985). Por otra parte el N es un elemento importante en la síntesis de ácidos grasos, por lo que a niveles bajos de N se esperaría una baja producción de ácidos grasos, sin embargo, la reducción de nitrógeno tiene efectos muy variables sobre la producción de PUFA (Piorreck et al., 1984; Xu et al., 2001).

Así la producción de esta microalga bajo condiciones particulares de cultivo puede ofrecer los elementos nutricionales necesarios para un adecuado desarrollo de los organismos zooplanctónicos y estos a su vez servir de apoyo en las producción de algunos peces de ornato o bien de peces comestibles como la carpa.



## CONCLUSIONES

- ❖ Los datos obtenidos a diferentes concentraciones de salinidad demuestran que a concentraciones reducidas; menores a 10 ‰, se puede tener un resultado más favorable en la producción de biomasa como en su composición proximal, las cuales pueden ser utilizadas con fines acuaculturales.
  
- ❖ La respuesta de *Scenedesmus* sp., ante cambios como en la concentración de N o P en el medio es diversa, y al igual que la luz y la salinidad, van a depender de la interrelación de estos parámetros, del tipo de especie y de las condiciones existente en su hábitat natural.
  
- ❖ Se observó que el régimen lumínico es un factor importante en el desarrollo de los cultivos estáticos por lo que una forma práctica de utilizar estos resultados sería combinar el fotoperiodo 12-12 en cultivos con concentraciones reducidas de nitrógeno o salinidad.
  
- ❖ Estos resultados demuestran que bajo ciertas condiciones de cultivo se puede obtener una composición bioquímica adecuada, por lo que es necesario realizar un análisis del patrón de aminoácidos y ácidos grasos a si como el comportamiento de estos a bajas concentraciones de N, P, salinidad y bajo fotoperiodo o bien una combinación de estos factores.

## REFERENCIAS

- Ahlgren, G. 1985. Growth of *Microcystis wesenbergii* in batch and chemostat cultures. *Verh. Intl. Verein. Limnol.* 22: 2813-2820
- Ahlgren, G., Gustafsson, I. B., Boberg, M. 1992. Fatty acid content and chemical composition of freshwater microalgae. *Journal of Phycology*; 28:37-50.
- Ahlgren, G., Hyenstrand, P., Vrede, T., Karlsson, E. y Zetterberg, S. 2000. Nutritional quality of *Scenedesmus quadricauda* (CHLOROPHYCEAE) grown in different N regimes and tested on *Daphnia*. *Verh. Intl. Verein. Limnol*; 27: 1234-1238
- Ahlgren, G. y Hyenstrand, P. 2003. Nitrogen limitation effects of different nitrogen sources on nutritional quality of two freshwater organism, *Scenedesmus quadricauda* (CHLOROPHYCEAE) and *Sinechococcus* sp. (CYANOPHYCEAE). *Journal of Phycology*; 39: 906-917
- Association of Official Analytical Chemist (AOAC). (1990). *Official Methods of Analysis*, 15th edn. 868 pp. AOAC, Arlington, Virginia, USA.
- Bent-Amontz, A., Tornabene, T. G. y Thomas, W. H. 1985. Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. *Journal of Phycology*; 2: 2-81
- Becker, E.W. 1988. Micro-algae for human and animal consumption. In: Borowitzka, M.A.; Borowitzka, L.J. (Eds). *Micro-algal biotechnology*. Cambridge: Cambridge University. p. 222-256.
- Becker, E. 1994. *Microalgae Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Becker, W. 2004. Microalgae in human and animal nutrition. In: Richmond, A. (Ed). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. London: Blackwell Science. p. 312-351.

Borowitzka, M.A., Borowitzca, L.J. 1988. (Eds). Microalgal biotechnology. Cambridge: Cambridge University. 477p.

Borowitzka, M.A.1993. Products from microalgae. Infofish International. 5: 21-26.

Borowitzka, M. A. 1997. Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints. *Journal of Applied Phycology*; 9:393–401.

Brown, M. R. 1991. The amino acid and sugar composition of sixteen species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 145: 79-99

Brown, M.R., Garland, C.D., Jeffrey, S.W., Jameson, I.D., Leroi, J.M., 1993. The gross and amino acid compositions of batch and semicontinuous cultures of *Isochrysis* sp. (clone T.ISO), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. *Journal of Applied Phycology*; 5: 285–296.

Brown, M. R., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K., Dunstan, G.A., 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151, 315–331.

Brown, M. R., McCausland, M.A., Kowalski, K., 1998. The nutritional value of four Australian microalgal strains fed to Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat. *Aquaculture*; 165:281–293.

Brown, M. R. 2002. Nutritional value of microalgae for aquaculture. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Cancún, Quintana Roo, México.

Bruno, J.J. 2001. Edible microalgae: a review of the health research. *Pacifica: Center for Nutritional Psychology*. V. 3, 56 p.

Certik, M., Shimisu, S. 1999. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 87(1): 1-14.

Coll, Morales., J. 1991. Acuicultura Marina Animal. 3<sup>a</sup> ed. Ediciones Mundi Prensa. Madrid. 328-358 pp.

Cowan A.K., Rose P.D. & Horne L.G. 1992. *Dunaliella salina*: a model system for studying the response of plant cell to stress. Journal of Experimental Botany. 43: 1535-1547.

Darley, W. M. 1987. Biología de las algas: Enfoque fisiológico. Ed. Limusa, Mexico, D.F., 236 pp.

Duerr, E. O., Molnar. A., Sato. V. 1998. Cultured microalgae as aquaculture feeds. Journal of Marine Biotechnology; 7: 65-70.

Duran, A., Cisneros, A y Vargas, A. 2003. Bioestadística. Universidad Nacional Autónoma de México. FES. Iztacala. Méx. 222p.

D'souza F, Kelly G. 2000. Effects of a diet of a nitrogen-limited alga (*Tetraselmis suecica*) on growth, survival and biochemical composition of tiger prawn (*Penaeus monodon*) larvae. Aquaculture; 181:311-329.

Enright, C. T., Newkirk, G. F., Craigie, J. S., Castell, J. D., 1986. Growth of juvenile *Ostrea edulis* L. fed *Chaetoceros calcitrans* Schütt of varied chemical composition. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology; 96:15–26.

Fábregas, J., Herrero, C., Abalde, J. y Cabezas, B. 1985. Growth, chlorophyll *a* and protein of the marine microalga *Isochrysis galbana* in bath cultures with different salinities and high nutrient concentrations. Aquaculture 50: 1-11

Fabregas, J., Abalde, J. Herrero, C. 1989. Biochemical composition and growth of the marine microalga *Dunalliella tertiolecta* (Butcher) wahit different ammonium nitrogen concentration as chloride, sulphate, nitrate and carbonate. Aquaculture; 83: 289-304

Falkowsky, P. G., Sukenik, A. y Herzig, R. 1989. Nitrogen limitation in *Isochrysis galbana* (HAPTOPHYCEAE). II. Relative abundance of chloroplast proteins. *Journal of Phycology*; 25: 471-478

Fisher M., Gokhman I., Pich U. & Zamir A. 1996. A salt-resistant plasma membrane carbonic anhidrase is induced by salt in *Dunaliella salina*. *J. Biol. Chem.* 271: 17718-17723.

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

Foy, R. 1993. The phycocyanin to chlorophyll *a* ratio and cell components as indicators of nutrient limitation in two planktonic cyanobacteria subjected to low-light exposure. *J. Plank. Res.* 15: 1263-1276

Geider, R. J., MacIntire, H. L., Graziano L. M. y McKay, R. M. L. 1998. Responses of the photosynthetic apparatus of *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) to nitrogen and phosphorus limitation. *Eur. J. Phycol.* 33: 315-332.

Hardy, E. y Castro, J. 2000. Qualidade nutricional de três espécies de clorofícias cultivadas em laboratório. *Acta Amazônica, Mananus*, v. 30, n. 1, p.39-47

Harwod, J. L y Jones, A. L. 1989. Lipid metabolism in algae. *Adv. Bot. Res.* 10: 1-53.

Hernández, H. H. 1998. Producción de tres microalgas bajo condiciones de laboratorio. Tesis de Lic. F.E.S. Iztacala UNAM. 49p.

Hidalgo J, Cid A, Torres E, Sukenik A, Herrero C. 1998. Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*;166: 105-116.

Hu, Q., Westerhoff, P. y Vermaas, W. 2000. Renoval of nitrate from growndwater by cyanobacteria: Quantitative assessment of factors influencing nitrate uptake. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(1): 133-139

Ishikawa M., Teshima S., Kanazawa A., Koshio S. 1997. Measurements of digestibilities of cholesterol and fatty acids using 5 alpha-cholestane as an inert marker in the tilapia, *Oreochromis niloticus*, and the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Journal of Applied Ichthyology. 13: 31-35.

Jeffrey, S. W., LeRoi, J-M., Brown, M. R., 1992. Characteristics of microalgal species for Australian mariculture. In: G. L. Allan and W. Dall (Editors), Proceedings of the National Aquaculture Workshops, Pt. Stephens, NSW Australia, April 1991, pp. 164-173.

Jonte, L., Rosales N., Briceño, B. y Morales, E. 2006. La salinidad y la irradiancia modulan el crecimiento de la cianobacteria *Synechocystis minuscula* en cultivos discontinuos. Multiciencias 3(1)

Kalacheva, G.S., Zhila, N.O. y Volova, T.G. 2001. Lipids of the green alga *Botryococcus* cultured in a bath mode. Microbiology; 70: 256-262.

Kawamura, T., Roberts, R. D., Nicholson, C. M., 1988. Factors affecting the food value of diatom strains for post-larval abalone *Haliotis iris*. Aquaculture; 160: 81-88.

Kirk, E.A.; Behrens, P.W. 1999. Commercial developments in microalgal biotechnology. Journal of Phycology, 35: 215–226.

Langdon, C.J., Waldock, M. J., 1981. The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. Journal of the Marine Biological Association, United Kingdom; 61: 431-448.

Leman, J. 1997. Oleaginous microorganisms: an assessment of the potential. Advances in Applied Microbiology. 51: 95-243.

Leonardos L, Lucas I. 2000. The nutritional value of algae grown under different culture conditions for *Mytilus edulis* L. larvae. Aquaculture; 182: 301-315.

Loreto, C. (2002). Optimización de la producción de biomasa y de metabolitos de interés económico de la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120. Tesis de Licenciatura. La Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

Martínez, M. E., Jiménez, J. M. y Farida El Yousfi. Influence of phosphorus concentration on the growth kinetics and stiochiometry of the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Process Biochemistry*; 32(8): 657-664.

Molina, G. E. y Sánchez, P. J. A. 1992. EPA from *Isichrysis galbana*. Growth conditions and productivity. *Process Biochemistry*. 27: 299-305

Mora, R., Moronta, R., Ortega J. y Morales E. 2006 .Crecimiento y producción de pigmentos de la microalga nativa *Chlorella* sp., aislada de la Represa de Tulé, Municipio Mara, Estado Zulia, Venezuela. *Ciencia completa*. 12: 23- 45

Muller-Navarra, D. 2000. A highly unsaturated fatty acid predicts carbon transfer between primary producers and consumers. *Nature* 403: 74-77

Oliveira M, Monteiro M, Robbs P. Leite S. 1999. Growth and chemical composition of Spiraling maxima and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures. *Aquacul Int*; 7:261-275.

Oren A. 1999. Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 334-348.

Rajasekaran, t.; Somasekaran, t.; Venkatamaran, l. (1981). Standardize procedures for pilot plant scale. Cultivation of *Spirulina platensis* under Indian condition. *Archives of Hidrobiologia* 22: 114-126.

Ranga Rao, A., Dayananda, C., Sarada, R., Shmala, T. R. y Ravishankar, G. A. 2007. Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresource Technology*. 98: 560-564.

Raven, J.A. 1988. Limits to growth. In: BOROWITZKA, M.A.: BOROWITZKA, L.J. (Eds). *Micro-algal biotechnology*. Cambridge: Cambridge University. p. 331-356.

Renaud, S.M., Parry, D.L., Luong-Van, T. 1994. Microalgae for use in tropical aquaculture. I. Gross chemical and fatty acid composition of twelve species of microalgae from the Northern territory, Australia. *Journal of Applied Phycology*; 6: 337–345.

Renaud, S.M., Parry, D.L., 1994. Microalgae for use in tropical aquaculture. 2. Effect of salinity on growth, gross chemical composition and fatty acid composition of three species of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*; 6: 347–356.

Renaud S, Luong-van T, Lambrinidis G, Parry, D. 2002. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*; 211:195-214.

Richmond, A. 1986. Cell response to environmental factors. In Richmond, A. (ed.) *CRC Handbook of microalgal Mass Culture*. CRC Press, Boca Raton. 69-106

Richmond, A. *Biotechnology and applied phycology*. (Ed). *Handbook of microalgal culture*: Oxford: Blackwell Science, 2004. 566p.

Rosales, N., Loreto, C., Bermúdez, J. y Morales, E. 2004. Intermediate renewal rates enhance the productivity of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. in semicontinuous cultures. *Cryptogamie: Algol*; 25(2): 207-216

Rosales, N., Jonte, L. y Morales, E. 2006. Crecimiento y composición bioquímica de *Synechococcus* sp., modulados por nitrato de sodio. *Boletín del centro de investigaciones biológicas*. 40(2): 120-132.

Sanchez S, Martinez E, Espínola F. 2006. Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Isochrysis galbana* in relation to culture medium. *Biochemical Engineering J*:13-18.

Sánchez, J.F., Fernández, J.M., Acien, F.G., Rueda, A., Pérez-Parra, J. y Molina, E. 2008. Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*. *Process Biochemistry* 43: 398-405

Sargent, J. R., McEvoy, L. A., Bell., J. G., 1997. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture*; 155: 117-127.

Serpa., I. y Calderón, R., A. 2005. Efecto del estrés por salinidad en cuatro cepas de *Dualilla salina* en el Perú. *Ecol. apl.* 41(2): 127-133



- Shifrin, N. S. y Chisholm, S. W. 1981. Phytoplanktonic lipids: interespecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles. *Journal of Phycology*. 17: 374-384
- Sterner, R. W., 1993. *Daphnia* growth on varying quality of *Scenedesmus*: mineral limitation of zooplankton. *Ecology* 74: 2351-2360
- Teshima, S., Kanazawa, A., Yamashita, M., (1986). Dietary value of several proteins and supplemental amino acids for larvae of the prawn, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture* 51: 225-235.
- Thompson, G. A. Jr. 1996. Lipids and membrane function in green algae. *Biochip. Biophys. Acta* 1302: 17-45
- Tornabene, T. G., Holzer, G., Lien. S. y Burris, N. 1983. Lipid composition of the nitrogen starved green alga *Neochloris oleoabundans*. *Enzyme Microbiology Technology*. 5: 435-440
- Tredici, M.R. 2004. Mass production of microalgae: photobioreactors. In: RICHMOND, A. (Ed). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford: Blackwell Science. p. 178-214.
- Tzovenis I, De Pauw N, Sorgeloos P. 1997. Effect of different light regimes on the docosahexaenoic acid (DHA) content of (clone T-ISO). *Aquaculture International* 5: 489-507
- Tzovenis I, De Pauw N, Sorgeloos P. 2003. Optimization of T-ISO biomass production rich in essential fatty acids I. Effect of different light regimes on growth and biomass production. *Aquaculture*; 216: 203-222.
- Utting, S. D. 1985. Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicelular marine algae of commercial importance; *Aquaculture Engng*. 4: 175-190.
- Vega, O. J. 2006. Caracterización fisiológica de *Scenedesmus incrassatulus* durante la síntesis de pigmentos. Tesis de Lic. F.E.S. Iztacala UNAM. 53p.

Xu, N., Zhang. X., Fan. X., Han, L. y Zeng, C. 2001. Effects of nitrogen source and concentration on growth rate and fatty acid composition of *Ellipsoidion* sp. (Eustigmatophyta). *Journal of Applied Phycology*. 13: 463-469

Yepes, F., Guillot, G., Chaparro, M; 2004. Efecto del nitrógeno inorgánico (NO) sobre el crecimiento y la composición bioquímica de la microalga *Scenedesmus* sp. cepa laun 0001. *Acta Biologica Colombiana*; 9(2): 335-340

Yongmanitchai W, Ward OP. 1991. Growth of and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornutum* under different culture conditions. *Appl. environ. Microbiol.* 57(2): 419–425.

Zhila, O.N., Kalacheva, G. S. y Volova, T. V. 2005 a. Effect of nitrogen limitation on the growth and the lipid composition of the green alga *Botryococcus braunii* Kütz IPPAS H-252. *Russian Journal of Plant Physiology*. 52(3): 311-319

Zhila, O.N., Kalacheva, G. S. y Volova, T. V. 2005 b. Influence of nitrogen deficiency on biochemical composition of the green alga *Botryococcus*. *Journal of Applied Phycology* 17: 309-315.

## ANEXOS

### I. Medio Bold basal (Nichols, 1979; en Hernández, 1998).

Se disolvieron por separado cada uno de los siguientes reactivos en un litro de agua:

#### Macronutrientes

NaNO <sub>3</sub>	250 g
CaCl <sub>2</sub>	25 g
MgSO <sub>4</sub>	75 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	75 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	175 g
NaCl	25 g

#### Micronutrientes

<b>Solución A</b>	50 g
EDTA	31 g
KOH	

<b>Solución B</b>	
Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4.98 g
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 ml

<b>Solución C</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11.42 g

<b>Solución D</b>	
ZnSO <sub>4</sub>	8.82 g
MnCl <sub>2</sub>	1.44 g
MoO <sub>3</sub>	0.71 g
CuSO <sub>4</sub>	1.57 g
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.49 g

## II. Preparación del medio para los diferentes tratamientos

### *Cultivos control, cultivos con diferente salinidad y cultivos bajo fotoperiodo*

En un matraz de 100 ml; se agregó ordenadamente, un mililitro por litro de cultivo de cada una de las soluciones anteriormente mencionadas, hasta obtener una solución de color azul.

### *Cultivos con diferente concentración de N en el medio*

En estos casos solo se modificó la cantidad agregada de la solución de  $\text{NaNO}_3$  de la siguiente manera:

- a) Para los cultivos con el 25% de N en el medio se agregaron 0.5 ml de  $\text{NaNO}_3$
- b) Para los cultivos con el 50% de N en el medio se agregaron 1.0 ml de  $\text{NaNO}_3$
- c) Para los cultivos con el 75% de N en el medio se agregaron 1.5 ml de  $\text{NaNO}_3$

### *Cultivos con diferente concentración de P en el medio*

Para este tratamiento únicamente se alteró la cantidad agregada de las soluciones de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  como sigue:

- a) Para los cultivos con el 25% de P en el medio se agregaron 0.5 ml de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y 0.5 ml de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- b) Para los cultivos con el 50% de P en el medio se agregaron 1.0 ml de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y 1.0 ml de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- c) Para los cultivos con el 75% de P en el medio se agregaron 1.5 ml de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y 1.5 ml de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

### III. Cultivo de la microalga (Hernández, 1997)

En botellas de plástico de 2 litros de capacidad se agregaron 1.8 litros de agua destilada, después se adiciono el medio Bold basal, previamente preparado (anexo II) y finalmente se inoculo la cepa de *Scenedesmus* sp, añadiendo 30 ml de un cultivo previo.

En el caso de los cultivos con diferente concentración de NaCl, antes de agregar el medio de cultivo, se disolvió sal de grano para acuarios de la siguiente manera:

- a) Para los cultivos a 10 ‰ se disolvieron 10 g/l de NaCl
- b) Para los cultivos a 20 ‰ se disolvieron 20 g/l de NaCl
- c) Para los cultivos a 30 ‰ se disolvieron 30 g/l de NaCl

### IV. Cuantificación de clorofila total (Becker, 1994)

Para realizar la cuantificación de clorofila total se tomo una muestra de 10 ml de cultivo, esta se centrifugo a 3000 rpm durante un minuto; el sobrenadante fue eliminado; la pastilla sobrante se resuspendió con etanol al 96%: todas las muestras se calentaron a baño maría a 60 °C en una parrilla durante 10 minutos, pasado este tiempo cada muestra se diluyo con 5 ml de etanol al 96%, finalmente en un espectrofotómetro se determino la absorbancia de cada muestra a 650 y 665 nm.

Utilizando la siguiente formula se obtuvo la cantidad de clorofila total en mg/l:

$$\text{Clorofila } a + b = (4.0 \times \text{abs}_{665}) + (25.5 \times \text{abs}_{650}) = \text{Clorofila total mg/l}$$

**V. Cuantificación del contenido de Proteína total - Método de Lowry (Becker, 1994)**

Se prepararon 5 tubos con proteína estándar y un tubo extra (blanco) como lo indica la siguiente tabla:

Solución de proteína estándar	Agua	Concentración de proteína
ml	ml	µg/ml
0.125	0.875	50
0.250	0.750	100
0.500	0.500	200
0.750	0.250	300
1.000	0	400
0	1.000	-

\*Estos tubos formaron la curva patrón.

Por otra parte en tubos de centrifuga de 15 ml se tomaron 0.02 g de muestra seca y se añadió 1 ml de agua destilada a cada tubo. Enseguida, se agregó 1 ml de Reactivo de Lowry a los tubos de la curva patrón, a los tubos con muestra y al blanco; 20 minutos después se adicionó 0.5 ml de Reactivo Folin y Fenol Ciocalteu a cada tubo; pasados 30 minutos se añadió 7.5 ml de agua destilada para tener un volumen final de 10 ml. Se midió la absorbancia de todas las muestras en un espectrofotómetro de la marca Hach DR 2800 a una longitud de onda de 540 nm.

Para determinar el porcentaje de proteína se grafico la absorbancia vs el contenido de proteína total en  $\mu\text{g/l}$  y así obtener la curva patrón, a partir de la cual se extrapolaron las absorbancias de las muestras para obtener el contenido de proteína total en  $\mu\text{g}$ . Por último, con la siguiente formula se determino el porcentaje de proteína total de cada muestra:

$$\% \text{ de proteína total} = \frac{\text{Peso final de la muestra (proteína total en } \mu\text{g})}{\text{peso inicial de la muestra}} \times 100$$

#### **VI. Cuantificación de Lípidos Totales - método de Bling y Dyer (1954)**

Se agregaron muestras secas de 0.02 g en tubos de centrifuga de 15 ml. A todos los tubos con muestra se añadió 1.5 ml de cloroformo y 3 ml de metanol, la mezcla fue homogeneizada por 2 minutos a 15000 rpm. Posteriormente se agregó 1.5 ml de cloroformo y de nuevo se homogeneizó. Inmediatamente todos los tubos se centrifugaron a 13 000 rpm por 15 minutos, pasado este tiempo el sobrenadante se decanto en embudos de separación. Se añadieron 3 ml de una mezcla de cloroformo-metanol (en proporción 1:1) y 2.4 ml de agua destilada poco a poco (manteniendo siempre la proporción 1:1: 0.8, cloroformo, metanol y agua). Al formarse las fases, la capa de cloroformo fue colectada en tubos de ensaye y evaporada por un rotavapor. Las muestras sobrantes fueron resuspendidos con 1 ml de la mezcla cloroformo: metanol 1:1 y vaciada en frascos de vidrio en donde los solventes fueron eliminados, para después pesar los frascos con las muestra obtenida. Con la siguiente formula se obtuvo el porcentaje de lípidos totales:

$$\% \text{ de lípidos totales} = \frac{\text{peso de muestra final}}{\text{peso de la muestra inicial}} \times 100$$

## VII. Cuantificación de Humedad y Cenizas – AOAC, (1993)

Para el porcentaje de humedad se tomaron muestras de la microalga de 0.2 g añadidos en crisoles de porcelana (previamente secados y pesados) los cuales se colocaron en una estufa a 60°C por 24 horas; transcurrido este tiempo los crisoles con las muestras secas se pesaron. Finalmente con la siguiente formula se obtuvo el porcentaje de humedad:

$$\% \text{ de humedad} = [1 - (\text{peso de la muestra final} / \text{peso de la muestra inicial})] \times 100$$

Para determinar cenizas se tomaron muestras de 0.2 g de microalga seca, en crisoles de porcelana (previamente secados y pesados). Todas las muestras se colocaron en una mufla a 500°C por 24 horas, transcurrido este tiempo las muestras se pesaron y con la siguiente formula se obtuvo el porcentaje de cenizas:

$$\% \text{ de cenizas} = (\text{peso de la muestra final (cenizas)} / \text{peso de la muestra inicial}) \times 100$$



### VIII. Cuadro de Ecuaciones

NITRÓGENO	ECUACIÓN	R <sup>2</sup>
Control	$Y = -1.213x^2 + 21.81x - .128$	0.93
25%	$Y = -.646x^2 + 11.72x + 5.409$	0.94
50%	$Y = -1.176x^2 + 19.88x + .38$	0.95
75%	$Y = -1.440x^2 + 24.52x - 2.979$	0.95
FOSFATOS		
Control	$Y = -.762x^2 + 16.84x - 1.757$	0.98
25%	$Y = -.732x^2 + 17.09x - .674$	0.98
50%	$Y = -.810x^2 + 17.03x + 2.982$	0.96
75%	$Y = -.732x^2 + 17.09x - .674$	0.98
SALINIDAD		
Control	$Y = -.279x^2 + 15.61x + 4.01$	0.98
10 ‰	$Y = -.685x^2 + 15.77x + .803$	0.98
20 ‰	$Y = -.372x^2 + 9.857x - 2.428$	0.99
30 ‰	$Y = -.124x^2 + 5.224x + 4.017$	0.96