

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS



CRECIMIENTO Y GAMETOGENESIS DEL ALGA
Chlamydomonas reinhardtii DANGEARD

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

PRESENTA

TEODORO REYNOSO GRANADOS

México, D F.

1979

6418

107

639

201101
52



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

I N D I C E

	Página
I. OBJETIVOS	1
II. INTRODUCCION	3
III. MATERIALES Y METODOS	11
1) Cepas utilizadas	11
2) Equipo	11
3) Reactivos	11
4) Esterilización de material	11
5) Medios utilizados	11
6) Cuantificación del crecimiento	12
7) Condiciones de crecimiento	19
8) Mantenimiento de cepas	19
9) Gametogénesis	19
10) Inducción al ciclo sexual	20
IV RESULTADOS Y DISCUSION	22
Cuantificación de células	22
Concentración de Iones Hidrógeno	25
Fuente de Carbono	28
Condiciones de cultivo	32
Metabolismo de compuestos nitrogenados	37
Compuestos fenólicos	50
Gametogénesis	55
V. CONCLUSIONES	62
VI. BIBLIOGRAFIA	
VII. APENDICE	

I. O B J E T I V O S

Siempre que se hace una investigación en la cual se utilizan organismos vivos es necesario establecer los parámetros más adecuados para lograr su crecimiento y mantenimiento en el laboratorio. Debido a que dependiendo del material y equipo de cada lugar el estudio del comportamiento de un organismo varía, es necesario hacer una serie de pruebas para encontrar condiciones óptimas y reproducibles para que los resultados obtenidos en experimentos posteriores sean confiables.

Los métodos para el estudio de los organismos dependen enteramente de su grado de organización; las algas uni y pluricelulares pueden ser crecidas de manera más o menos simple en el laboratorio, utilizando medios de cultivo inorgánicos, bajo condiciones ambientales definidas. Estos organismos, por su bajo grado de complejidad estructural, ofrecen un buen material experimental para estudiar procesos fundamentales de bioquímica, fisiología, genética, etc., sin las complicaciones inherentes a organismos cuya organización es más compleja; un ejemplo clásico es el uso de Chlorella para el estudio de la fijación de CO_2 (20). Estos sistemas son particularmente útiles para el estudio de los efectos producidos por factores como la luz, la temperatura, los nutrientes, etc. ya que es fácil medir parámetros vitales como es el crecimiento; y es fácil administrar compuestos exógenos al organismo tales como compuestos nitrogenados, antibióticos, aminoácidos, etc.

En años recientes el alga unicelular verde Chlamydomonas ha sido utilizada frecuentemente para investigaciones genéticas, ya que posee una serie de características que la hacen un organismo excelente para estudios tanto a nivel celular como molecular.

Aunque el mantenimiento de estas algas es relativamente sencillo, es necesario conocer las condiciones adecuadas para su crecimiento y su ciclo de vida para poder estudiar diferentes aspectos de su metabolismo y genética.

Debido a lo anterior los objetivos del presente trabajo son:

- a) Determinar las condiciones óptimas para su crecimiento y reproducción sexual.
- b) Estudiar el efecto de variables físicas y químicas sobre estos procesos.

II. I N T R O D U C C I O N

Aunque el término alga ha sido abandonado como un taxón formal en la clasificación moderna (4), la palabra es usada aún para denominar a un grupo heterogeneo de organismos casi siempre - acuáticos, con clorofila, aunque poseen muchos otros pigmentos y cuyas formas varían desde las unicelulares de vida libre y coloniales, hasta los tipos masivos y complejos.

Estructura de las algas verdes.

La División Chlorophycophyta incluye una sola Clase de algas; la Chlorophyceae, que está representada por las plantas que comúnmente son llamadas algas verdes. Las células de esta Clase contienen ambas clorofilas, a y b, así como carotenos α y β y algunas xantofilas. Es sin embargo la predominancia de las clorofilas - la que da a estos organismos su color característico. En el cloro plasto, además de la clorofila, existen centros de síntesis de la enzima amilasa-sintetasa, llamados Pirenoides, esta enzima transforma las moléculas de glucosa en almidón.

El aparato de Golgi, mitocondrias y retículo endoplásmico están presentes en algas verdes al igual que en otras células y la pared celular consiste de dos capas; la capa interna que es firme y está compuesta por celulosa en su mayor parte y la capa externa que es más gelatinosa y consiste en sustancias pécticas. Estos compuestos se producen continuamente durante toda la vida de la célula,

filtrándose a través de las micelas de la capa celulósica. La vaina gelatinosa así formada tiende a disolverse en el agua circundante quedando balanceada la pérdida por solución, con la producción de nuevo material, en algunas algas verdes la parte externa de la capa péctica se impregna con una sustancia insoluble, probablemente quitina, por lo que no hay pérdida de solución (13).

Es de importancia la presencia de una gran vacuola y pequeñas vacuolas contráctiles que expelen al medio el exceso de líquido de las células manteniendo constante la concentración osmótica del citoplasma.

Las Cloroficofitas tienen un amplio rango de estructuras y reproducción. Los niveles de organización son:

- 1) Células móviles y organismos coloniales.
- 2) Células no móviles y organismos coloniales.
- 3) Organismos Filamentosos.
- 4) Organismos Membranosos.
- 5) Coanocitos y organismos Tubulares.

Habitat

Se pueden encontrar en aguas con un amplio rango de salinidad, desde agua dulce hasta salada. En suelos húmedos, y en nieves perennes. Algunas investigaciones recientes han revelado que el polvo atmosférico contiene una gran cantidad de algas, existen algunas evidencias de que las algas y otros microorganismos pueden reproducirse en las nubes (49).

Chlamydomonas.

Las algas verdes incluyen formas unicelulares que se desplazan en el agua por medio de flagelos; el número de flagelos varía, aunque generalmente hay más de uno. Una alga verde considerada de las más primitivas es Chlamydomonas, y representa un papel importante en las consideraciones evolucionistas sobre estos organismos (16). Es unicelular, de forma redonda ligeramente ovoida. Las células de la mayoría de las especies de Chlamydomonas no exceden de 25 μ de diámetro.

Estos organismos están rodeados de una pared celular compuesta de celulosa y una pared mucilaginosa de pectina, a través de las cuales salen dos flagelos en la parte anterior, el movimiento que efectúan para la movilidad es comparable a los brazos de un hombre nadando. Cada célula posee un sólo cloroplasto en forma de copa, que ocupa aproximadamente el 70% del volumen celular; el cloroplasto puede contener uno o más pirenoides y un pigmento rojo llamado mancha ocular o estigma.

El núcleo se localiza en la concavidad del cloroplasto y en células vivas a veces no es visible por estar cubierto por este. La célula presenta dos o más vacuolas contráctiles cerca del polo anterior, que juegan un papel muy importante en la eliminación del exceso de agua de la célula (Fig. 1).

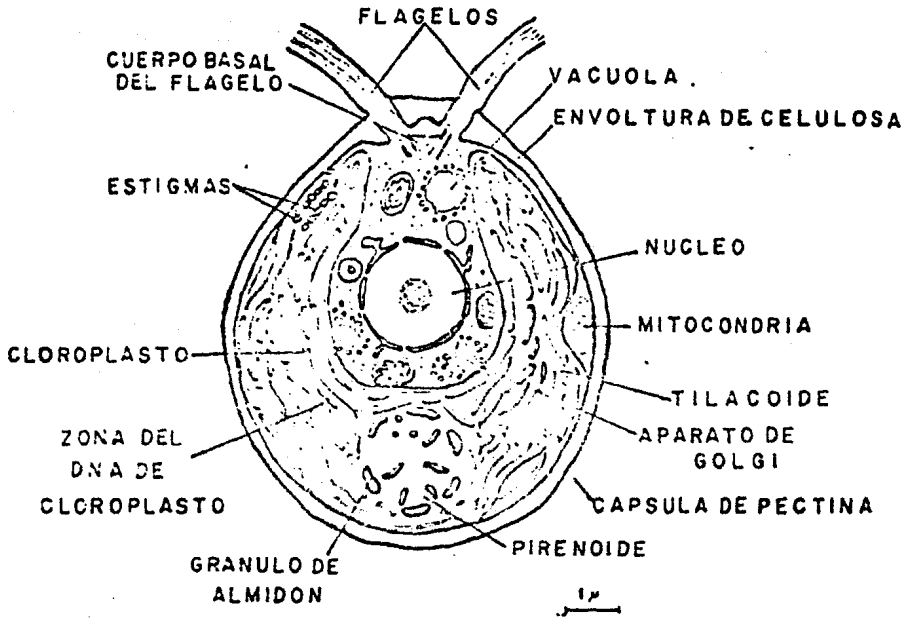


Fig. 1. REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL ALGA VERDE
CHLAMYDOMONAS. (Adaptado de diversas fuentes)

Ciclo de Vida.

La reproducción en Chlamydomonas es de dos tipos:

a) Reproducción Asexual.

b) Reproducción Sexual.

a) La reproducción asexual se lleva a cabo por fisión longitudinal. Los flagelos son reabsorbidos, el cloroplasto y el núcleo se dividen una, dos o más veces para producir de dos a ocho células hijas, las cuales no poseen flagelos y pueden permanecer dentro de la pared de celulosa de los padres por algún tiempo - antes de desarrollar su propia pared y flagelos. Sin embargo, bajo ciertas condiciones, no se forman flagelos y la multiplicación y el crecimiento se llevan a cabo dentro de la envoltura de los padres; a ésta fase inmóvil y reproductiva se le ha dado el nombre de estado de palmella o palmelloide (13). Fig. 2.

b) La reproducción sexual en la mayoría de las especies de Chlamydomonas es isogámica, es decir, los gametos o células sexuales son morfológicamente iguales, y son designados convencionalmente como cepas (mating type) femenina (mt^+) y masculina (mt^-) (22). Es de especial importancia el hecho de que tanto los gametos, anisogámicos como los isogámicos muestran una diferencia fisiológica que consiste en la secreción de dos sustancias sexuales diferentes, cuya presencia es necesaria para el agrupamiento y fusión de los gametos. Se ha demostrado que las sustancias sexuales llamadas gamonas específicas para Chlamydomonas son mezclas de distin

tos isómeros de un carotenoide. La sustancia femenina (+) consta de tres partes de cis-crocetindimetil éster y una parte de trans-crocetindimetil éster; la masculina (-), por el contrario consta de una parte de Cis y tres partes de trans-crocetindimetil éster y solamente son activas en la proporción mencionada, 3 cis-1trans (+) y 1 cis-3 trans (-), (22).

La reproducción sexual se incia cuando hay una deficiencia de nutrientes en el medio, lo que induce la formación de gametos. El siguiente paso es la agrupación de estos; células de opuestos mating types se agrupan orientando sus flagelos hacia el centro del agregado. Posteriormente el agrupamiento se disipa y dos células de mating types opuestos forman un par, unidos mediante sus flagelos. Gradualmente las células se van acercando y se forma un túbulo de fertilización que sale del gameto mt^- (σ) hacia el gameto mt^+ (ρ), (74); mediante una rápida fusión celular seguida por la fusión los núcleos y los cloroplastos, se produce el cigoto, el cual desarrolla una pared gruesa. La cigospora así formada se divide meioticamente para germinar por ruptura o disolución de la pared celular dando lugar a cuatro células hijas móviles. Estas células son haploides (16 cromosomas en el caso de C. reinhardii) siendo la única fase diploide la del cigoto (65), (Fig. 3).

La formación del cigoto además de ser el mecanismo para la recombinación sexual, es el único estado de latencia y resistencia a ambientes adversos dentro del ciclo de vida de Chlamydomonas (74).

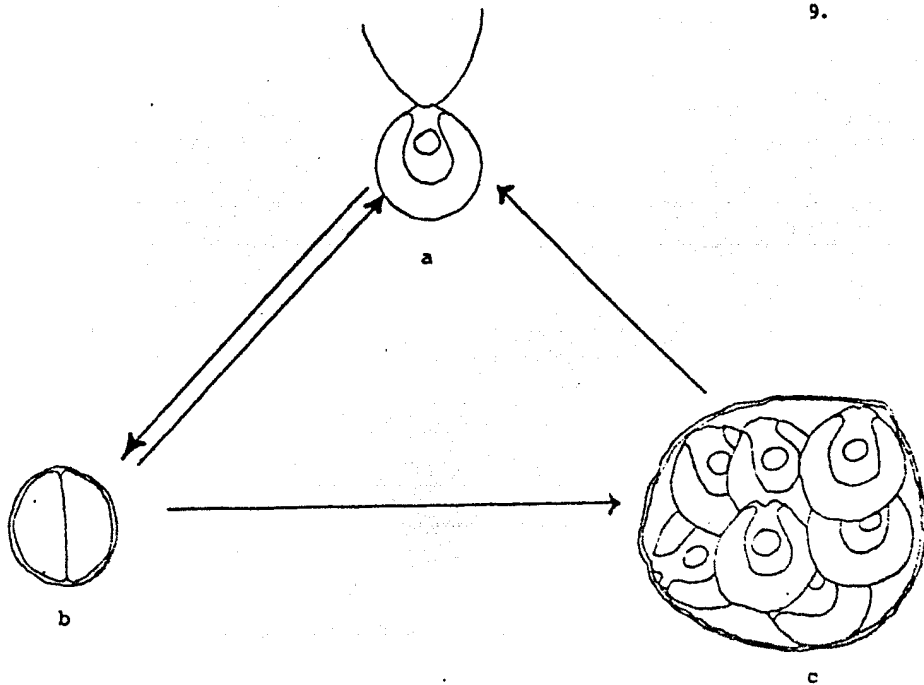


Fig. 2. CICLO DE VIDA DE CHLAMYDOMONAS. (Adaptado de diversas fuentes). REPRODUCCION ASEJUAL. a) CELULA VEGETATIVA b) DIVISION MITOTICA c) ESTADO DE PALMELLA.

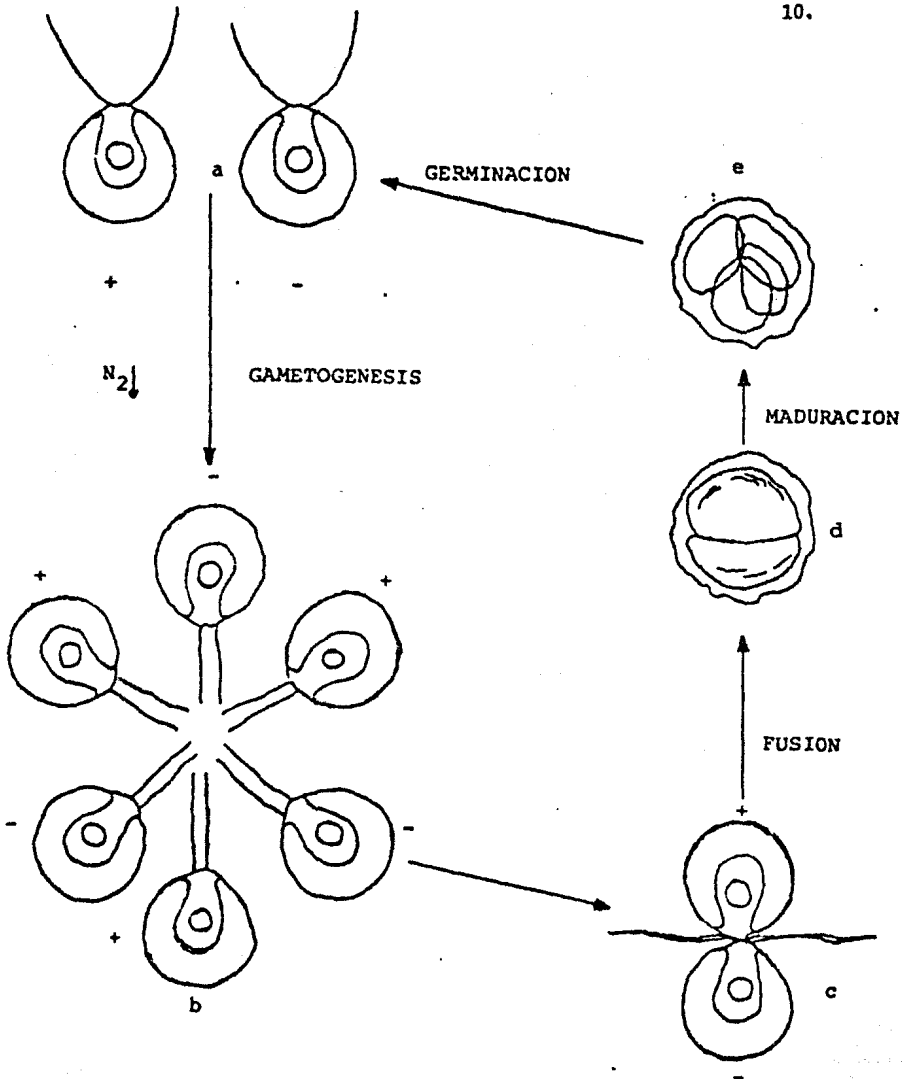


Fig. 3. CICLO DE VIDA DE CHLAMYDOMONAS. REPRODUCCION SEXUAL.

(Adaptado de diversas fuentes). a) GAMETOS;

b) AGRUPAMIENTO; c) APAREAMIENTO d) CIGOTO ;

e) CELULAS HIJAS.

III. MATERIALES Y METODOS

1) Para llevar a cabo este trabajo se utilizaron cepas de Chlamydomonas reinhardtii 11/32 C (mt⁺) y 11/32 D (mt⁻) tipo silvestre, obtenidas del Centro de Cultivo de Algas y Protozoarios de Cambridge, Inglaterra . (CCAP).

2) Equipo:

- a) Campana de flujo laminar Hitachi.
- b) Microscopio Olympus BH.
- c) Espectrofotómetro UNICAM SP 1800.
- d) Espectrofotómetro Zeiss PM Q II
- e) Incubadora FREAS con luz y temperatura constantes.
- f) Potenciómetro Metrohm E-3000
- g) Centrifuga IEC HN-5

3) Reactivos:

Todos los reactivos utilizados fueron Merck y Baker grado analítico.

4) Esterilización de material:

Todo el material de vidrio, así como los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave durante 15 min. a 120°C, a una presión de 1.5 Kg/cm² .

5) Medios utilizados para crecimiento y gametogénesis en Chlamydomonas (64). MI (Medio Basal); MIA (Medio Basal + Acetato); MBN (Medio Bajo en Nitrógeno); MSN (medio sin Nitrógeno).

	MI (g/l)	MIA (g/l)	MBN (g/l)	MSN (g/l)
KH_2PO_4	0.1	0.1	0.1	0.1
K_2HPO_4	0.1	0.1	0.1	0.1
NH_4NO_3	0.3	0.3	0.03	---
MgSO_4	0.3	0.3	0.3	0.3
CaCl_2	0.04	0.04	0.04	0.04
FeCl_3	0.01	0.01	0.01	0.01
Citrato de Sodio	0.5	0.5	0.5	0.5
CH_3COONa	---	2.0	---	---
Sol. de trazas de metal	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml

Stock de Solución de Metales Traza (mg/l)

H_3BO_3	100
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	100
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	40
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	20
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	20
CuSO_4	4

6) Cuantificación del crecimiento.

Para medir el crecimiento de los cultivos se emplearon 3 diferentes métodos:

a) Conteo en hemocitómetro (Cámara de Neubauer). Este instrumento es usado para hacer determinaciones cuantitativas del número de células existentes en una muestra líquida, y consiste en un

portaobjetos el cual tiene una sección cuadrículada hecha directamente sobre la superficie de éste y un cubreobjetos de una área y un peso determinados. En la figura 4b, se muestra una sección transversal del hemocitómetro y en la figura 4a los cuadrantes en los cuales está dividido el portaobjetos. Si el área de conteo del portaobjetos es 1 mm^2 y la profundidad de la cámara es 0.1 mm el volumen total de conteo es de 0.1 mm^3 , y si 0.1 mm^3 es igual a 0.0001 ml entonces el número real de células por ml es igual al número de células contado $\times 10^4$ (45).

b) Espectrofotometría. El espectrofotómetro es ampliamente utilizado para hacer conteos de células determinando la absorbancia a una cierta longitud de onda (35), este método permite una mayor exactitud, facilidad de manipulación y mayor rapidez que otros aparatos para contar células, sólo es superado por el Coulter Counter. El primer paso para poder utilizar el espectrofotómetro es hacer un espectro de absorbancia de la muestra. Las células de Chlamydomonas, las cuales poseen clorofila, muestran un pico de máxima absorbancia a 680 nm (gráfica I).

c) Determinación de Proteína Total. Con objeto de tener una relación lo más completa posible del crecimiento celular, se determinó la proteína total por el método de Lowry (39). Las células se rompen primero de la siguiente manera (79):

Tomar 1 ml de cultivo de Chlamydomonas

Agregar 1 ml de una solución de Sacarosa al

50% en buffer SSC (0.15 M NaCl , 0.015 M de Cl

trato de Sodio pH 7).

Agregar SDS (Dodecil Sulfato de Sodio) al 25% para obtener una concentración final de SDS al 2.5%.

Incubar a 60°C, 10 minutos.

Tomar una alícuota de 0.4 ml y seguir la técnica de Lowry.

Técnica de Lowry:

Soluciones:

A- Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1 N

B- Tartrato de Sodio Potasio al 2%

C- $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ al 1%

D- Reactivo de Folin diluido 1:1 con H_2O destilada. Se prepara exactamente antes de usar

E- Solución patrón de albúmina que contenga 250 ug/ml Para 100ml de mezcla reactivo.

98 ml de Sol. A

1 ml de Sol. B.

1 ml de Sol. C. Mezclar en ese orden.

A 0.4 ml de la muestra se le añaden 2 ml de la mezcla reactivo. Agitar vigorosamente en Vortex.

Dejar reposar 10 min. exactos.

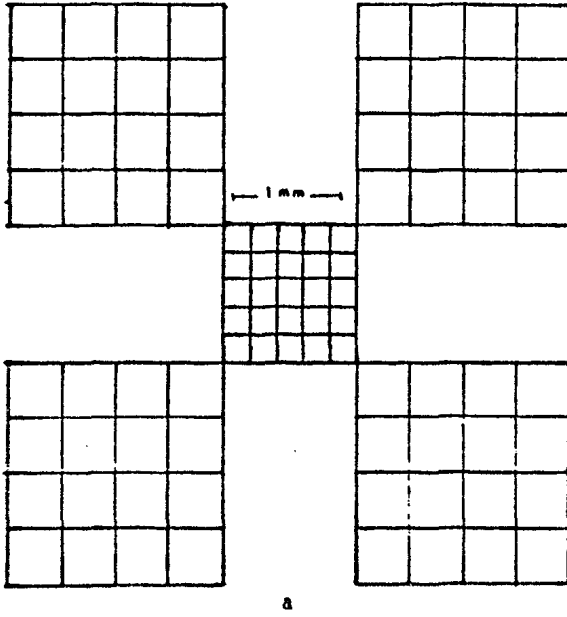
Añadir 0.2 ml de la Sol. D, agitar vigorosamente en Vortex.

Dejar reposar a temperatura ambiente 30 min.

Leer en espectro a A_{590} nm.

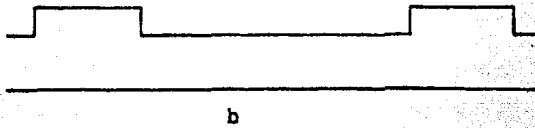
Curva patrón de Proteína, ver gráfica II.

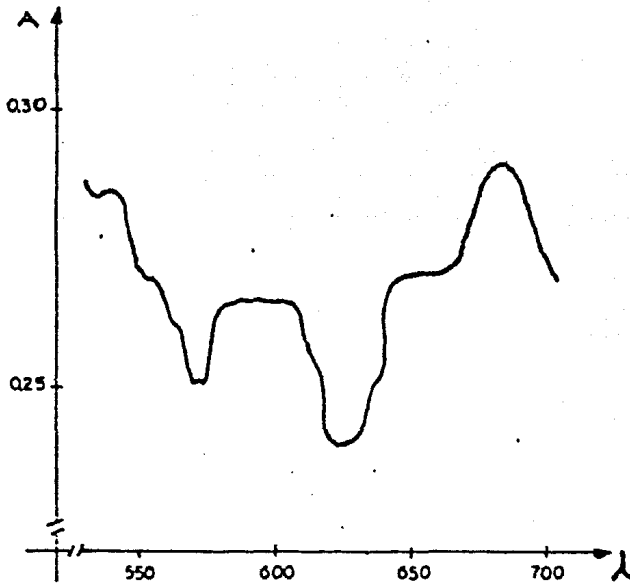
HEMOCITOMETRO. (CAMARA DE NEUBAWER).



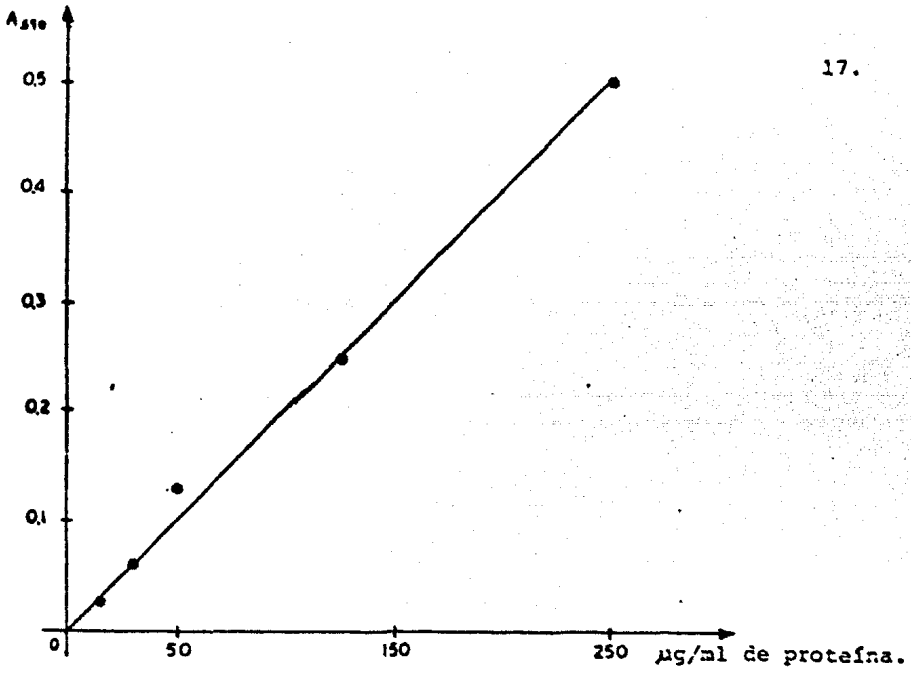
Profundidad de la cámara

0.1mm

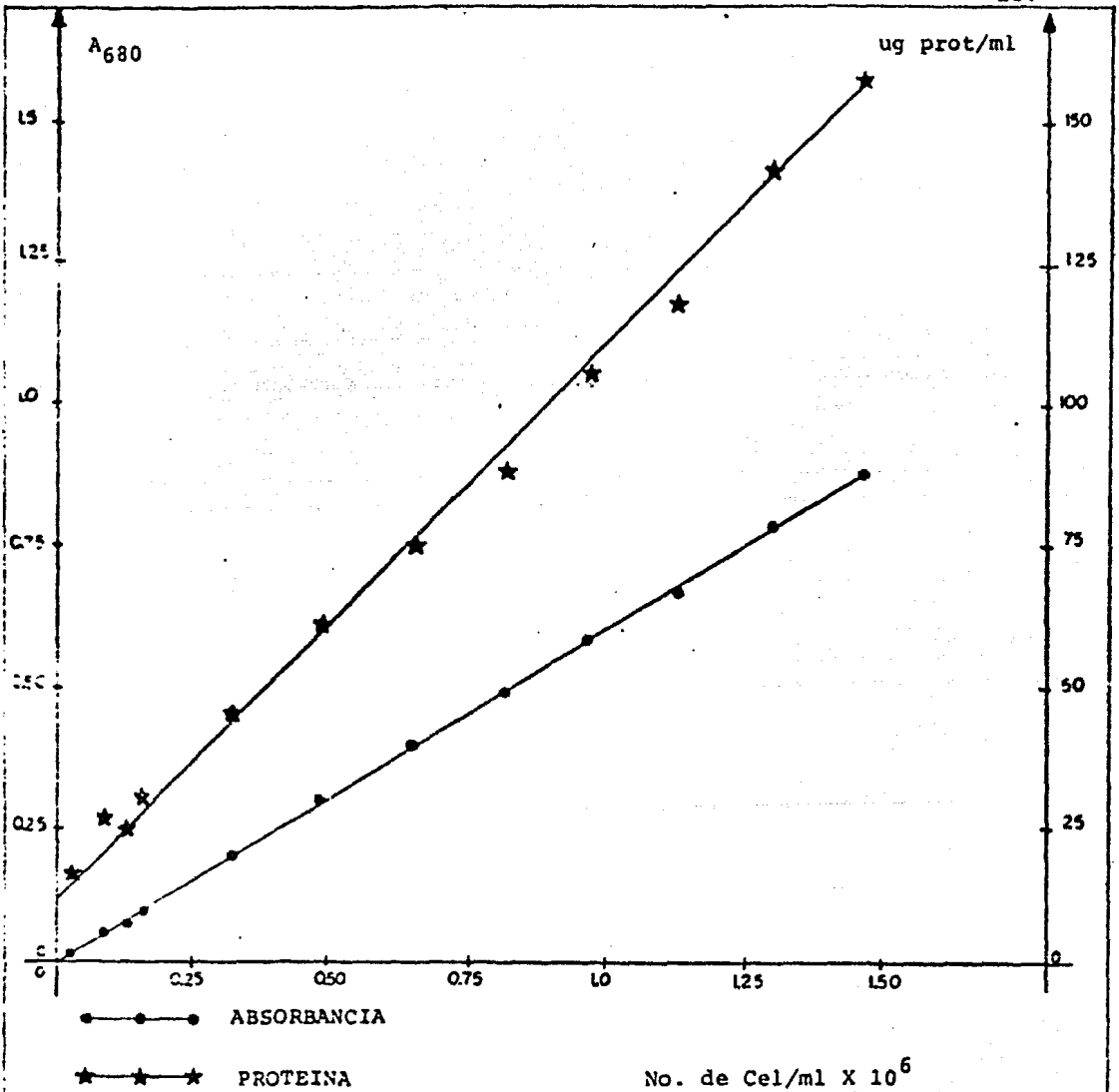




GRAFICA I. ESPECTRO DE ABSORCION DE
Chlamydomonas reinhardtii
CEPA 11/32 C.



GRAFICA II. CURVA PATRON DE PROTEINA PARA EL
METODO DE LOWRY.



GRAFICA III. CURVA STANDARD PARA RELACIONAR EL
 No. DE CELULAS CON LA ABSORBANCIA
 Y PROTEINA TOTAL.

7) Condiciones de Crecimiento.

Para obtener las condiciones óptimas de crecimiento, las células fueron cultivadas en: a) una incubadora con luz y temperatura constantes; b) un baño con luz y temperatura constantes y c) en un agitador con luz constante. Las células fueron sembradas en matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 100 ml de medio.

8) Mantenimiento de cepas en agar.

Las cepas de Chlamydomonas utilizadas, son mantenidas en tubos con medio sólido a 4°C y en obscuridad; utilizando el siguiente medio (15):

Proteasa Peptona	0.1%
KNO ₃	0.02%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.002%
Agar	1.0 %

9) Gametogénesis.

a) Inducción. Para la inducción de gametos se siguió el siguiente método:

Tomar cultivos en fase estacionaria temprana de cepas 11/32C mt⁺ y 11/32D mt⁻, crecidas en MI.

Lavar 3 veces con MBN o MSN (3000 rpm, 10 min.)

Incubar con luz a 26°C; 6, 12 y 24 horas.

b) Apareamiento.

Ajustar el número de células incubadas
en MBN o MSN.

Agitar en Vortex y tomar 0.1 ml de cada
cepa y ponerlos en un mismo tubo

Incubar en luz a 26°C, a diferentes tiem
pos (5 a 120 min.)

Fijar con formol al 5%

c) Conteo de pares. El conteo de apareamiento se hace
empleando el hemocitómetro, contando el número total de cé-
lulas y el número de células apareadas y determinando el por
centaje de estas últimas en los diferentes tiempos probados.

10) Inducción al Ciclo Sexual.

Gametogénesis	Sembrar en MI Bajar la concentración de Nitrógeno (en fase estacionaria temprana (24 h)
Apareamiento	Ajustar número de células y aparear Centrifugar a 1000 rpm, 10 min a 25°C Platear el precipitado en MI con agar al 4%
Maduración	Incubar en luz 48a 52 hrs a 25°C <u>+ 1</u> Poner las cajas 5 a 7 días en <u>obscuri</u> <u>dad</u> Recoger las células en una gasa estéril y centrifugar en MI Incubar 2 hrs., en SDS al 2% a tempera tura ambiente.

Lavar 6-9 veces en MI

Platear en agar al 1.2% MI

Exponer las cajas 30 seg. a vapores
de cloroformo

Germinación

Incubar en luz a 25°C, 10 hrs. :

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

Cuantificación de células.

Bajo condiciones constantes de crecimiento todos los índices medidos producen resultados equivalentes, sin embargo en un cultivo en gran escala el caracter de la curva de crecimiento puede variar considerablemente, dependiendo del índice usado, ya que el incremento en la cantidad de células provoca un sombreado mutuo y la iluminación efectiva por célula decae considerablemente.

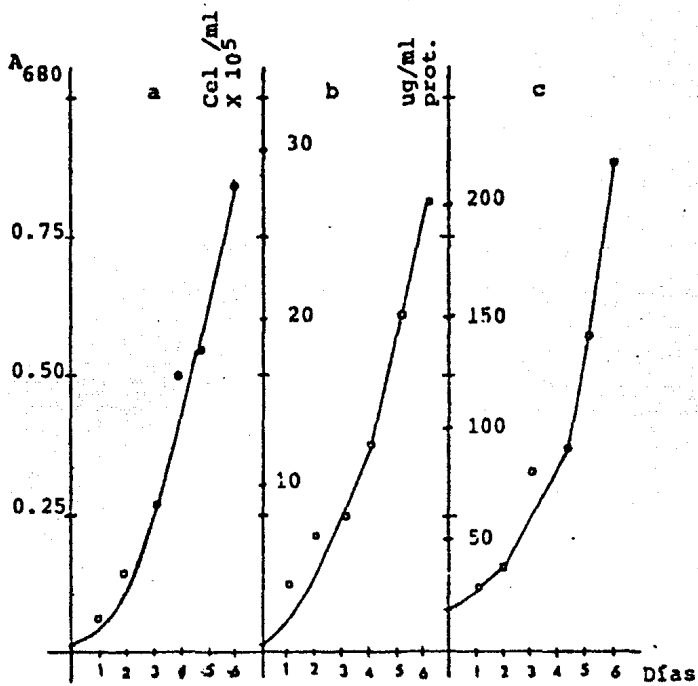
En los primeros trabajos sobre fisiología de algas el número de células era determinado por conteo en hemocitómetro y este método fue el preferido como índice de cantidad. El primer análisis de crecimiento de algas fue hecho por Bristol-Roach en 1926(6) y estuvo basado en el conteo en hemocitómetro y tamaño celular en Scenedesmus.

Posteriormente se emplearon otros índices tales como el volumen celular y el peso seco, los cuales eran menos laboriosos y de igual precisión. El índice más directo de la cantidad de células es el peso seco; este es determinado por centrifugación de una alícuota que contenga de 5 a 50 mg de células, lavandolas con agua destilada para quitar las sales del medio de cultivo, transfiriéndolas a un volumen mínimo de agua en una balanza y secandola a 100°C hasta obtener un peso constante.

Densidad Óptica.- En una suspensión de algas se puede determinar mediante cualquier colorímetro de precisión la cantidad de células; dependiendo del aparato la densidad óptica observada está determinada principalmente por la absorción o por la turbidez. Cuando la pigmentación y el tamaño de las células varían, como puede suceder en cultivos a gran escala, la densidad óptica no es una función constante, el método de peso seco o volumen celular puede ser utilizado entonces, sin embargo bajo condiciones constantes, las mediciones con densidad óptica son confiables para medir la cantidad de células (57).

Determinación de Proteína Total.- Este método para cuantificar el número de células no es comunmente empleado ya que al igual que el hemocitómetro es muy laborioso y presenta en el caso de algas algunos inconvenientes como: la interferencia de fenoles y polisacarosa (14) y la necesidad del rompimiento previo de células.

En la gráfica No. 1 se presenta una curva de crecimiento de C. reinhardii medida por hemocitometría, absorbancia y cantidad de proteína total. Si bien se puede apreciar que las tres curvas guardan similitud entre sí, en las gráficas subsecuentes solamente se utilizó la absorbancia (A_{680}) para determinar la cantidad de células, esto se debió a la mayor precisión y el menor tiempo que requiere este método.



Gráfica No. 1.- Curva de crecimiento de *C. reinhardii*, utilizando tres métodos para la determinación de número de células.

- a) Absorbancia A_{680} nm.
- b) Hemocitómetro
- c) $\mu\text{g/ml}$ de proteína .

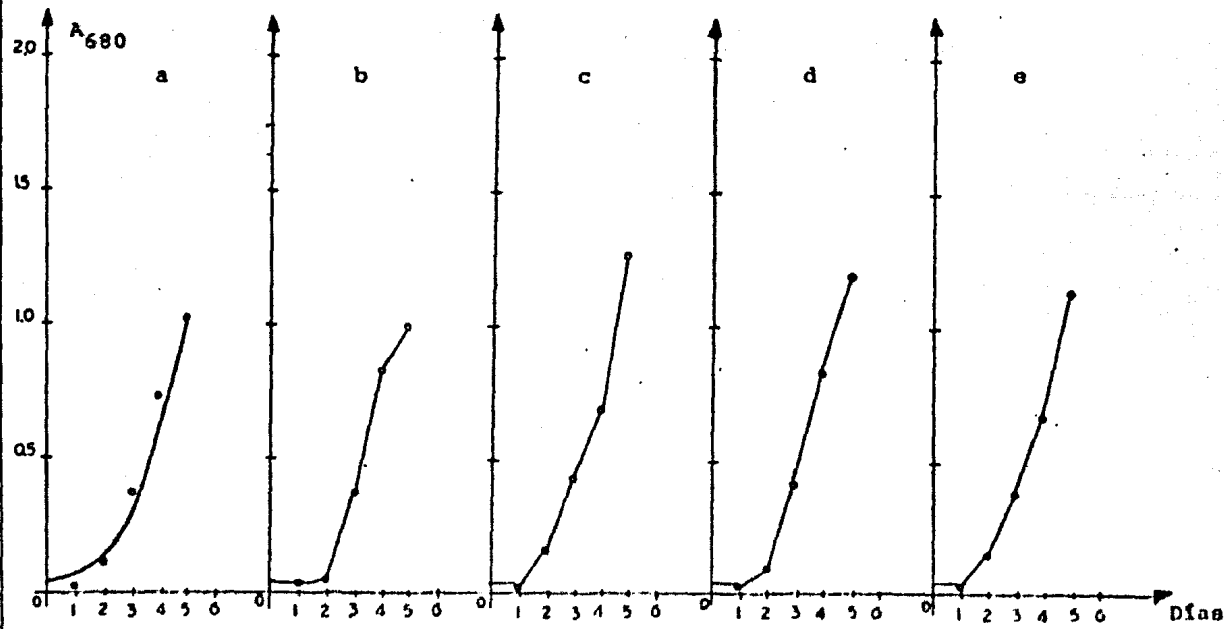
Concentración de iones Hidrógeno.

El efecto del pH sobre la disociación y estados iónicos de compuestos polares inorgánicos y orgánicos afecta el aprovechamiento de algunos nutrientes en cultivo de algas como el $\text{CO}_2 \cdot \text{Fe}^{++}$ (77) y ácidos orgánicos (10), el pH también ejerce un efecto sobre la carga eléctrica de la superficie de la pared celular (23), sobre el sistema del transporte de iones en el plasmolema y sobre los potenciales de membrana (2). Los cambios en estas propiedades pueden causar alteraciones importantes en el metabolismo.

Efecto del pH en varios procesos metabólicos.- Cuando hay variaciones de pH en el medio puede haber cambios en la pigmentación, Starosta (76) estudió el alga Ankistrodesmus controlando cuidadosamente el pH y encontró una transformación de violaxantina a zeaxantina debida a la acidez del pH externo. Se ha demostrado también un incremento en la síntesis de carotenoides en Chlorella zofigiensis expuesta a pH's bajos debida tal vez, a una inhibición ácida de las enzimas nitrato reductasa y nitrito reductasa, lo cual provoca una deficiencia de Nitrógeno (31). Los rangos en los cuales los fosfatos y algunos compuestos fosfatados son sintetizados, la fijación de Nitrógeno en algas azul-verdes (19) y la movilidad de metales pesados están marcadamente influenciados por el pH (84). Kanazawa (28) encontró una toxicidad en Chlorella debida a Cu^{2+} , provocada por un descenso de pH.

Tolerancia al pH.- El pH en el cual se pueden encontrar las algas es muy amplio, algunas especies termofílicas pueden prosperar a pH extremadamente bajos (7), por ejemplo, el rango óptimo de pH para Zygogonium sp. es de 1.0 (42) y para Chlamydomonas acidophila que ha sido aislada de agua de pantano es de 1.0 aunque no pueden ser cultivadas en el laboratorio a valores menores de 2.0 (20). Algunas algas de aguas alcalinas tienen pH óptimos demasiado altos, por ejemplo el rango óptimo para Spirulina platensis varía entre 8.5 y 11.0 (9) y esta alga es capaz de tolerar un pH de 13.5 (87). Otras algas exhiben una amplia tolerancia a los cambios de pH.

En la serie de curvas de la gráfica No. 2 se observa que el pH óptimo para el crecimiento de Chlamydomonas reinhardii es de 6.8. El rango de pH probado (6.0-7.5) se hizo en base a lo reportado en la literatura (64) donde se indica que el pH óptimo para el desarrollo de un cultivo puro de C. reinhardii es de 6.8.



Gráfica No. 2. Curvas de crecimiento de *C. reinhardtii* (cepa 11/32 C) a diferentes pH.

- a) pH 6.0
- b) pH 6.5
- c) pH 6.8
- d) pH 7.0
- e) pH 7.5

Fuente de Carbono.

La limitación de CO_2 en un cultivo de algas no es siempre importante pero el burbujeo de aire y CO_2 es generalmente muy ventajoso pues provee a los cultivos de una fuente de carbono aprovechable. La producción de 1 mg peso seco de algas requiere de aproximadamente 0.5 mg de carbono, lo cual equivale a 1.8 mg de CO_2 en condiciones de laboratorio. En cultivos de algas para el estudio de la fotosíntesis el burbujeo con CO_2 al 5% es una práctica mundial, aunque para otro tipo de estudios el CO_2 al 0.5% puede resultar igualmente satisfactorio. En los laboratorios que estudian las condiciones ecológicas de los organismos, los investigadores se enfrentan al dilema de utilizar o no el CO_2 ya que podrían variar la concentración natural de este compuesto, y por otra parte el desarrollo de los organismos es lento. Aunque el CO_2 es muy utilizado el carbono puede agregarse a los medios de cultivo en forma de compuestos orgánicos solubles.

Acetato y Glucosa.- Se ha acostumbrado a distinguir a las algas como las que utilizan acetato o las que utilizan glucosa. Esta distinción fue hecha primero por Pringsheim (54) para contrastar la nutrición de los flagelados Polytoma con la de las algas Chlorococoides que crecen en la obscuridad utilizando glucosa como fuente de carbono. Más tarde se encontró que muchos de los llamados flagelados del acetato pueden utilizar ácidos simples como el pirúvico y el láctico, Lwoff (40) propuso el término oxitrofo para los flagelados del acetato y haplotrofos para los

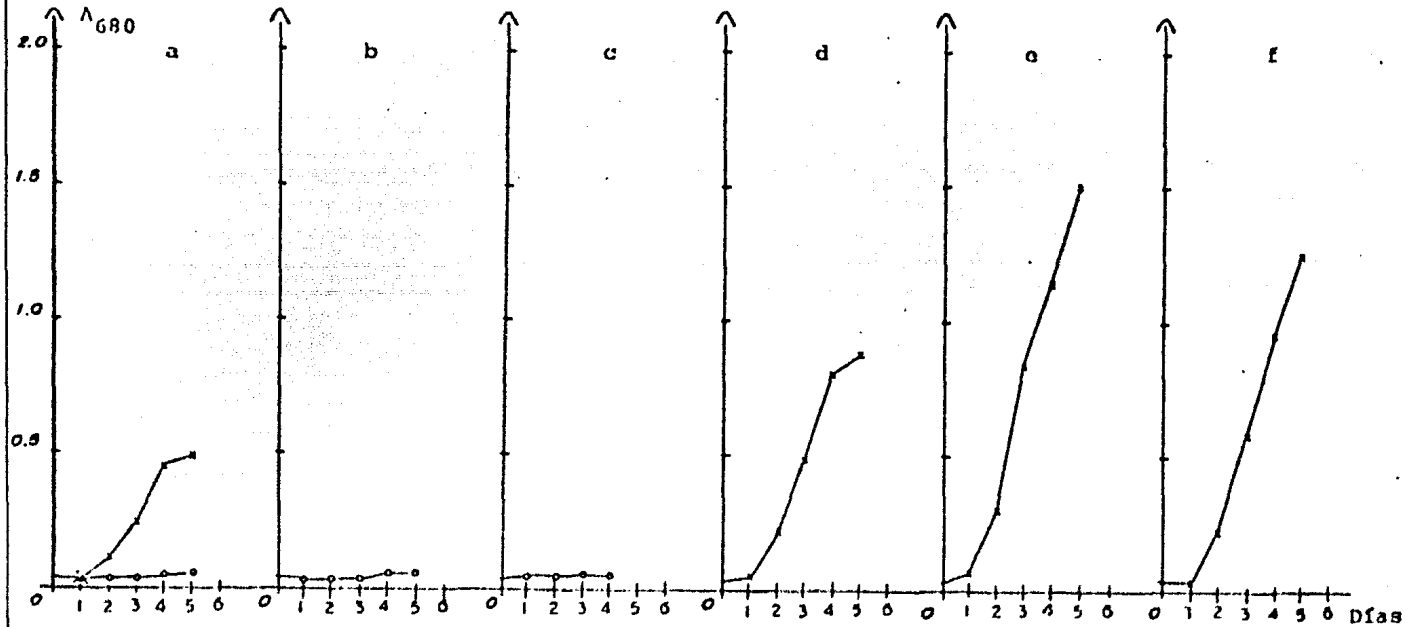
organismos que utilizan la glucosa. Sin embargo Lwoff (41) igualó la oxitrofia con la capacidad de sintetizar polímeros de glúcidos en ausencia de fotosíntesis, generalmente unido a la incapacidad de oxidar glucosa directamente y a la haplotrofia con la capacidad de oxidar glucosa y otros compuestos con carbono.

Provasoli (56) expone: "Es difícil encontrar un protista que no asimile glucosa y muestre durante este proceso una entrada simultánea de O_2 y no pueda utilizar acetato". Aunque ahora es sabido que el rango de utilización de sustratos varía enormemente de especie a especie, pues se han descrito cepas que difieren marcadamente en su versatilidad y preferencia de glucosa y acetato, por lo que muchos límites categóricos empiezan a ser borrosos, por ejemplo las cepas Mainx y Voscher de Euglena gracilis aparentemente utilizan sólo ácido acético y butírico, mientras la cepa Pringsheim de esta especie utiliza un amplio rango de ácidos grasos de cadena lineal incluyendo ácido láurico, mirístico, algunos ácidos del ciclo de Krebs y alcoholes de cadena sencilla (12), mientras que los sustratos aprovechables de las cepas de E. gracilis var. urophora incluyen ácidos ramificados y alcoholes (55).

Generalmente, el aprovechamiento de ácidos grasos y alcoholes en crecimiento heterótrofo decrece con la longitud de la cadena, mientras los ácidos y alcoholes con un número par de átomos de carbono son más usados que aquellos con un número non.

En la gráfica No. 3 se puede observar que la fuente de carbono más apropiada para el crecimiento de Chlamydomonas reinhardtii,

es el acetato de sodio. En las tres concentraciones estudiadas, se observa un incremento mayor en el crecimiento con respecto al control, siendo la concentración más adecuada para un mayor crecimiento 2000 ug/ml (2.4×10^{-2} M). Por otra parte C. reinhardii no crece adecuadamente en las tres concentraciones probadas de glucosa por lo que puede clasificarse como alga de acetato.



Gráfica No. 3. Curvas de crecimiento de *C. reinhardtii* (cepa 11/32 C), con diferentes fuentes de Carbono.

a) Glúcosa $10^{-2}M$

d) Acetato de sodio $1.2 \times 10^{-2}M$

b) Glúcosa $10^{-3}M$

e) Acetato de sodio $2.4 \times 10^{-2}M$

c) Glúcosa $10^{-4}M$

f) Acetato de sodio $4.9 \times 10^{-2}M$

x-x-x- Control

Condiciones de Cultivo.

a) Luz y crecimiento de algas. La relación entre la intensidad de luz y cantidad de fotosíntesis en un crecimiento fotoautotrófico está dado por una función hiperbólica regular con una inhibición de crecimiento que ocurre cuando hay saturación de intensidad de luz, una situación similar es aplicable a una suspensión de algas que crece en un ciclo de luz-obscuridad (75). La forma de las curvas de crecimiento en luz y bajo condiciones de fotosíntesis son afectadas por la temperatura (75) y por otros factores como la salinidad (44) y el nivel de nutrientes (30). Se han empleado varios modelos matemáticos para describir las curvas fotosíntesis-luz, aunque el modelo más aceptado es probablemente el de Shelef (69), el cual considera la intensidad, la calidad de luz y la eficacia de conversión de quantum. Para el crecimiento de algas en el laboratorio la iluminación está provista de lámparas fluorescentes o de tungsteno. Las lámparas de tungsteno tienen la ventaja de emitir un espectro más limpio, en cambio las lámparas fluorescentes tienen la desventaja de que posiblemente la longitud de onda corta que emiten puede penetrar en el vidrio y retardar el crecimiento. La luz blanca "suave" con alta energía y longitud de onda larga, parece ser la más eficiente para la producción de algas.

En presencia de sustratos orgánicos aprovechables el metabolismo y crecimiento de las algas fotosintéticas son, en la mayoría de los casos acrecentados por una intensidad de luz apropiada (67).

Esta estimulación aparente es atribuible a la fosforilación vía fotosistema I y ha sido estudiada en presencia (43) y ausencia (81) de CO_2 , la relación de fotoheterotrofia al fotosistema I ha sido demostrada en algunos miembros de los Volvocales (86). La luz difusa estimula el crecimiento heterotrófico en Chromulina sp. (51) y algunas cepas de Chlorella no pueden crecer heterotróficamente pero son capaces de utilizar sustratos orgánicos en la luz (29). El espectro de acción de este efecto de luz está caracterizado por un mayor pico de absorbancia a 425 nm y uno más pequeño a 575 nm, la molécula fotoreceptora puede ser un precursor de la porfirina del citocromo. El espectro de acción obtenido por Karlander (29), difiere claramente del espectro de acción para la inducción de división celular y síntesis de ácidos nucleicos en algas mixotróficas de glucosa (68). La luz azul dirige el metabolismo de glucosa exógena principalmente hacia la síntesis de proteínas, mientras los carbohidratos son sintetizados preferencialmente a partir de glucosa en luz roja (34).

b) Temperatura y crecimiento.- Todas las células vivas están expuestas a cierto grado de variación térmica del medio, aún cuando la temperatura se regule con mucho cuidado se presentan pequeños cambios y en vista de sus efectos sobre los procesos vitales, y de que la mayor parte de las células sólo tienen límites estrechos de adaptación a los cambios térmicos, la temperatura es un factor importante en la vida de los seres vivos. Los límites dentro de los cuales estos llevan a cabo sus procesos vitales forman la zona biocinética que va aproximadamente

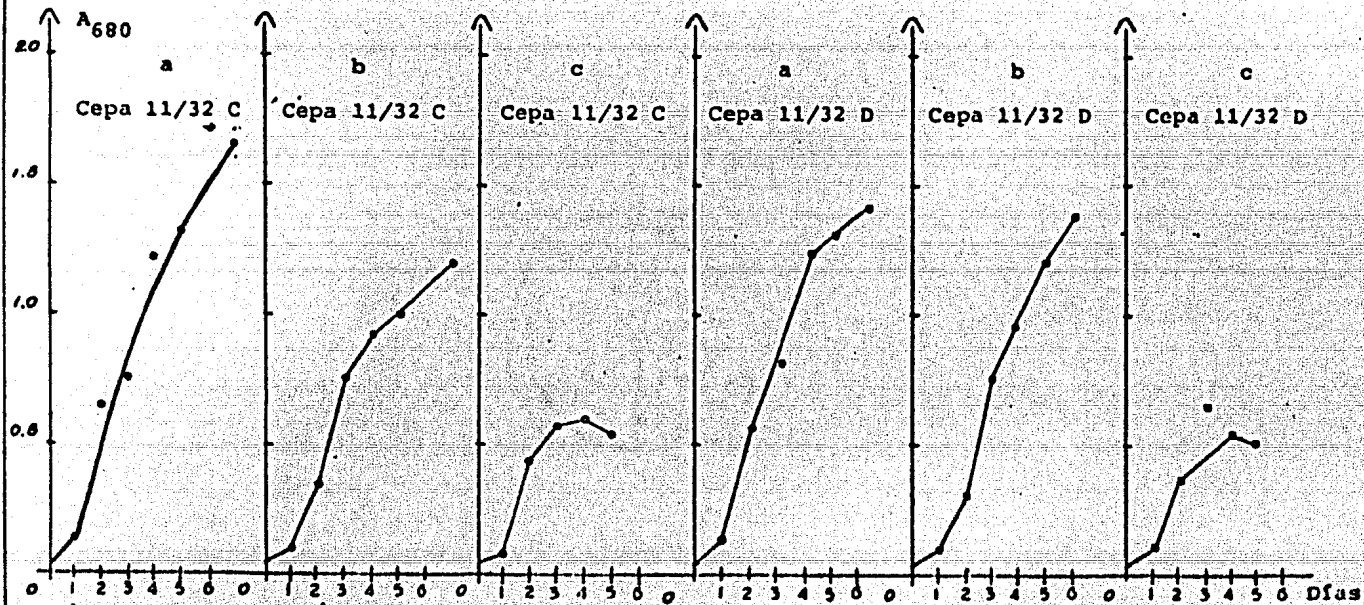
de 10 a 45°C .

Los efectos de temperatura sobre el crecimiento y la división celular han sido estudiados en Chlorella por Sorokin (71) , en general el efecto de temperatura está relacionado con el proceso de síntesis de ADN y las subsecuentes divisiones celulares son más sensibles a la temperatura sub-óptima que en la fase de crecimiento del ciclo de vida celular.

En un período de ciclo celular de Chlorella fusca , el crecimiento es deteriorado cuando se baja la temperatura de 30 a 4°C en dos horas (52), el resultado es una decoloración del alga , la cual es afectada por la intensidad de la luz y el nivel de oxígeno, seguido de una inhibición de la fotosíntesis (38) y el blanqueamiento en Chlorella fusca puede ser inducido por un calentamiento a 46° C por 15 minutos.

En la gráfica No. 4 se puede apreciar el crecimiento de C. reinhardii. En las 3 condiciones de cultivo disponibles en nuestro laboratorio, las cuales presentaban cierta variación unas con otras. Para ambas cepas, la 11/32 C y la 11/32 D las mejores condiciones de crecimiento fueron en la incubadora ya que ésta posee luz y temperatura constantes, la temperatura es de 26.5°C ± 0.5 y la iluminación es de 1000 lúmenes en la parte central y 400 en las zonas laterales, la difusión de la luz no es variable aún cuando el campo de iluminación no es homogéneo. En el baño con luz y temperatura constantes se obtiene un rendimiento aceptable, pero se aprecia que el crecimiento de la cepa 11/32 D es muy parecido al que se obtiene en la incubadora, la temperatura es de

25°C \pm 1.5 y la iluminación es de 1000 lumenes para todos los matraces. Por último el agitador tiene una temperatura de 26°C \pm 2.0 y una iluminación de 400 lumenes por lo que el rendimiento fue bajo.



Gráfica No. 4 . Curvas de crecimiento de *C. reinhardtii* en diferentes condiciones.

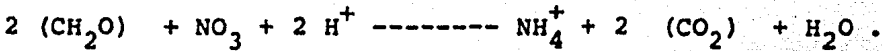
- a) Incubadora
- b) Baño con temperatura constante.
- c) Agitador

Metabolismo de Compuestos Nitrogenados.

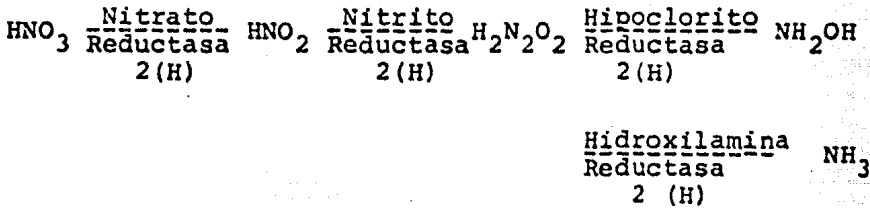
Dos de las fuentes de Nitrógeno más comunmente empleadas para el crecimiento de algas son los iones de amonio y de nitrato. El nitrito también es usado, pero puede ser tóxico a altas concentraciones por lo que es más recomendable emplear los primeros.

La mayoría de las algas utilizan preferentemente el amonio (80), cuando a un cultivo de algas se agrega ambos iones, el nitrato no es utilizado hasta que todos los iones amonio han sido asimilados. Se sabe que esta utilización preferencial del amonio está relacionada a la regulación de asimilación de nitrato. Sin embargo hay algunas excepciones para esta preferencia por el amonio; en un estudio hecho por Cañ (8) en 38 algas de agua dulce observó que Chlamydomonas gloeopara, C. microsphaerella, C. peterfi y Gloeocystis gigas tenían preferencia por la utilización de nitrato (el medio de cultivo contenía amonio y nitrato).

Reducción de Nitrato.- El Nitrógeno del nitrato es reducido a amonio antes de ser incorporado a compuestos orgánicos (80). Para la reducción de un ión nitrato a el nivel de amonio son necesarios ocho electrones o sus equivalentes de Hidrógeno ($4 H_2$). Se ha demostrado (28) que Chlorella pyreneidosa, crecida en una mezcla de HNO_3 0.01 M y $NaNO_3$ 0.1 M pH 2, en obscuridad reduce nitrato a amonio y se producen aproximadamente dos moléculas de CO_2 por cada molécula de amonio formada, esto se puede expresar mediante la ecuación:



La reducción de nitrato a amonio se lleva a cabo en cuatro pasos, en cada uno se requieren dos electrones:



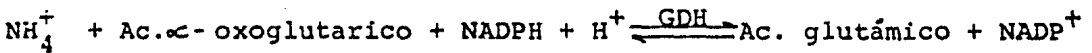
Aunque hay evidencias de esta secuencia (48), Virtanen y Rautanen (85) sugieren que los compuestos orgánicos nitrogenados se pueden formar directamente de la hidroxilamina por lo que el amonio no es un intermediario. El hiponitrato y la hidroxilamina no han sido detectados en cultivos de algas que crecen en nitrato, pero el nitrito y el amonio siempre están presentes en pequeñas cantidades.

Asimilación del Nitrógeno del Amonio.- En las algas existen tres reacciones mediante las cuales el Nitrógeno en forma de amonio es asimilado para formar compuestos orgánicos (71). La primera es la aminación reductiva de algunos ceto-ácidos con la formación de aminoácidos. La segunda es la ulterior aminación de aminoácidos para formar amidas. La tercera es la reacción entre amonio, ATP y CO_2 para formar carbamil-fosfato-sintetasa.

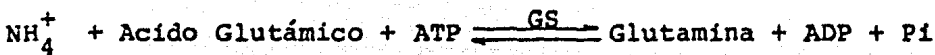
Las enzimas que catalizan la aminación de ceto ácidos y que se han detectado en cultivo de algas son: la glutámico deshidroge

nasa que cataliza la aminación reductiva de α -ceto glutarato o glutamato (30). La alanina deshidrogenasa que cataliza la conversión de piruvato a alanina (30) y por último Jacobi (27) sugiere una tercera reacción análoga a la glutámico deshidrogenasa que produce aspartato.

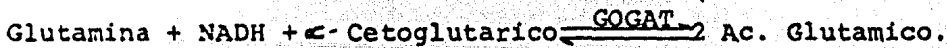
El ácido glutámico se forma a partir de Amoniac y ácido α -oxo glutámico catalizado por la glutamato deshidrogenasa (GDH),



Esta reacción es de importancia fundamental en la biosíntesis de amino ácidos pues se trata de la ruta primaria de la formación directa de grupos α -amino a partir de Amoniac. La glutamina se forma a partir del ácido glutámico por la acción de la glutamino sintetasa (GS) mediante la siguiente reacción,



La glutamina producida así en presencia de la enzima α -oxo glutamato amino transferasa (GOGAT) produce ácido glutámico mediante la reacción:



Si bien se producen 2 moléculas de Ac. glutamico una de ellas es aprovechada nuevamente para formar glutamina y la otra mediante la reacción:



Si bien se han detectado las enzimas que catalizan la aminación, su significado en la asimilación primaria del amonio para la producción de aminoácidos aún no es lo bastante claro. Se han realizado experimentos en levaduras y algas (1) para resolver este problema, utilizando amonio¹⁵ - N; los datos obtenidos sugieren que la ruta de la glutámico deshidrogenasa es la más importante, ya que mediante ésta el nitrógeno inorgánico es asimilado para formar aminoácidos; otros ceto-ácidos son convertidos a aminoácidos por transaminación, en vez de una aminación reductiva directa.

Los datos de Smith et al. (73) sugieren que la alanina deshidrogenasa interviene en una reacción importante para la incorporación de amonio.

Un aspecto importante de la asimilación de amonio es la regulación de este proceso. Kretovich et al. (32) observaron un incremento de la actividad de la NADP-glutamato deshidrogenasa en Chlorella pyreneidosa cuando ésta crece en amonio y un descenso en la actividad de esta enzima cuando el nitrato es la fuente de nitrógeno. El cambio de la fuente de nitrógeno no tuvo efecto sobre la actividad de la NAD-glutamato deshidrogenasa y tuvo poco efecto sobre la alanina-deshidrogenasa. Con base en estos resultados Kretovich concluyó que NADP unido a la enzima fue inducido por el nitrógeno del amonio.

La incorporación de amonio a compuestos orgánicos también puede llevarse a cabo mediante la actividad de la carbamil-fosfato-sin

tetasa; el carbamil-fosfato es un precursor de la citrulina (37).

Utilización de compuestos orgánicos nitrogenados como fuentes de nitrógeno para el crecimiento.- Si bien la mayoría de las algas son capaces de formar compuestos orgánicos nitrogenados a partir de fuentes nitrogenadas inorgánicas, algunas son capaces de utilizar ciertos compuestos orgánicos nitrogenados como única fuente de nitrógeno (70). Birdsey y Linch (3) describieron ocho especies de Chlorophycophytas que son capaces de utilizar urea y cinco especies que utilizan ácido úrico y xantina como fuentes de nitrógeno. En el mismo estudio encontraron que Anacystis nidulans y Synechococcus cedrorum (Cianophytas), Porphyridium cruentum (Rhodophycophyta) y Euglena gracilis (Euglenophycophyta) no pueden utilizar ninguno de estos tres compuestos; A. nidulans descompone ácido úrico a alantoina, y ninguna de estas algas es capaz de utilizar la alantoina, y observaron que el alga Prototheca zopfii utiliza adenina y amonio pero no puede utilizar nitrato. Bollard (5) midió el crecimiento de Chlorella vulgaris en un amplio rango de compuestos orgánicos nitrogenados el crecimiento fue estimado cualitativamente y las pruebas fueron hechas bajo un solo tipo de condiciones experimentales, los puntos principales de este estudio son:

a) De los veinte aminoácidos que forman las proteínas, todos excepto cisteína, histidina, hidroxiprolina, lisina, metionina, fenilalanina y triptofano mantienen un buen crecimiento.

b) Glutamina, serina y treonina mantienen un ligero crecimiento, pero los ácidos aspártico, glutámico y la asparagina no son aprovechados.

c) Algunos dipéptido (por ejemplo: glicil-glicina, glicil-serina etc.) y amidas mantienen el crecimiento.

d) Las aminas y amino-alcoholes no permiten el crecimiento.

e) Otros aminoácidos y sus derivados que pueden ser usados para el crecimiento, incluyen ornitina, citrulina, ácido diaminopimelico, etc.

Den Dooren de Jong (17), hizo un estudio similar utilizando 23 aminoácidos en Chlorella vulgaris, encontrando que los L-aminoácidos producen un mejor crecimiento que los D-aminoácidos (18).

En la serie de curvas de las gráficas 5,6 y 7 se observa el crecimiento de Chlamydomonas reinhardtii; cepas 11/32 C y 11/32 D, con distintos compuestos nitrogenados. El control utilizado fue el Nitrato de amonio que es la fuente nitrogenada reportada por Sager (64) para el crecimiento de C. reinhardtii, las concentraciones de los compuestos nitrogenados son equimolares con respecto al N_2 del control conforme el medio basal de Sager, quién utiliza una concentración de nitrato de amonio 3.7×10^{-3} M. El crecimiento en distintas fuentes de nitrógeno es mejor en presencia de algunos compuestos orgánicos que en compuestos inorgánicos. En los compuestos orgánicos se observa un mayor aprovechamiento de nitrógeno proveniente de la glutamina. Es sorprendente que la cepa 11/32 D -

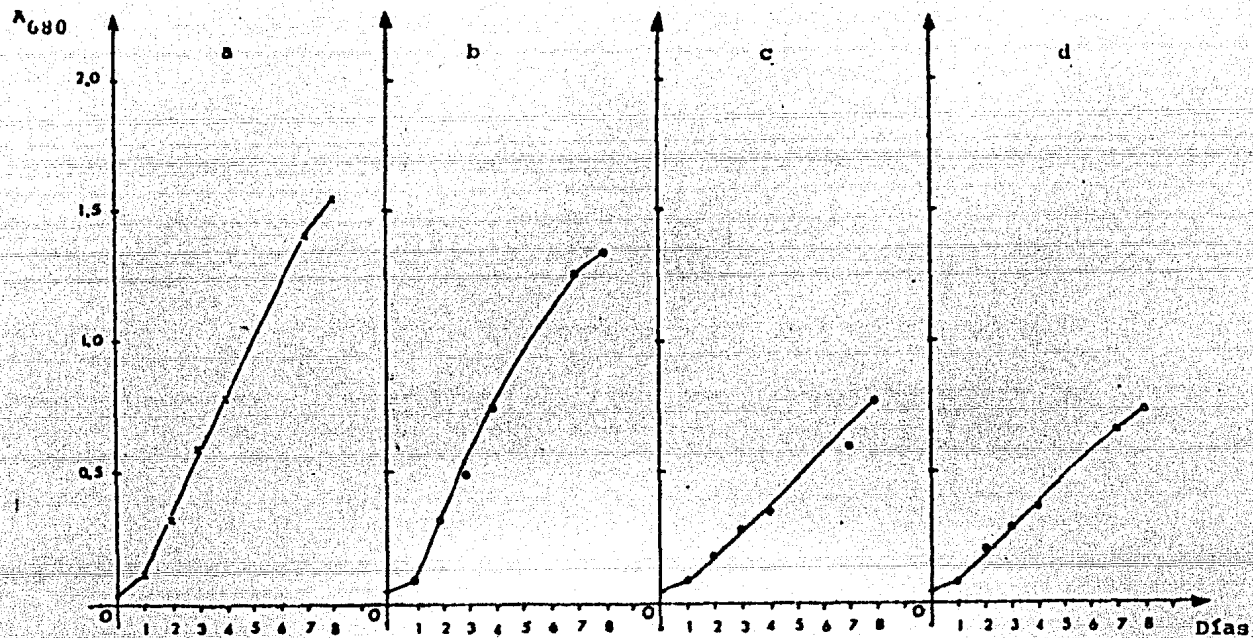
aproveche mejor el ácido glutámico y que la cepa 11/32 C aproveche mejor la glutamina; pues se esperaba que el crecimiento fuese el mismo o similar.

Los resultados con nitrato de amonio, cloruro de amonio, nitrato y nitrito de sodio, indican claramente un mejor aprovechamiento del ion amonio y no del nitrato y nitrito. Las curvas entre nitrato y cloruro de amonio son muy similares entre sí, (curvas a y b de las gráficas 5 y 6); resultados que concuerdan con Cramer (12) quien reporta un mejor aprovechamiento de amonio en Chlorella. Se muestra también en la gráfica 7 la influencia de la concentración, así como del tipo molécula (aminoácido) de la cual proviene el nitrógeno; el mejor crecimiento se obtiene con una mayor concentración de asparagina. Los aminoácidos probados no son representativos del grado de crecimiento que producirían otros aminoácidos, pero nos dan una idea de las concentraciones que se requieren para optimizar el crecimiento y de las posibles diferencias de aprovechamiento entre las dos cepas utilizadas.

El mejor crecimiento en presencia de NH_4 se debe probablemente como ya se dijo, a la mayor accesibilidad de este ion para la asimilación del Nitrógeno pues los otros iones deben ser primeramente reducidos a NH_3 .

La mayor eficiencia del NO_3 sobre el NO_2 , pese a que este último representa un paso más avanzado en el esquema de reducción a amonio, puede deberse a efectos tóxicos del ion NO_2 .

En el caso de los aminoácidos estos representan nitrógeno ya asimilado y su utilización, dependería de su grado de incorporación y no de la eficiencia de asimilación.



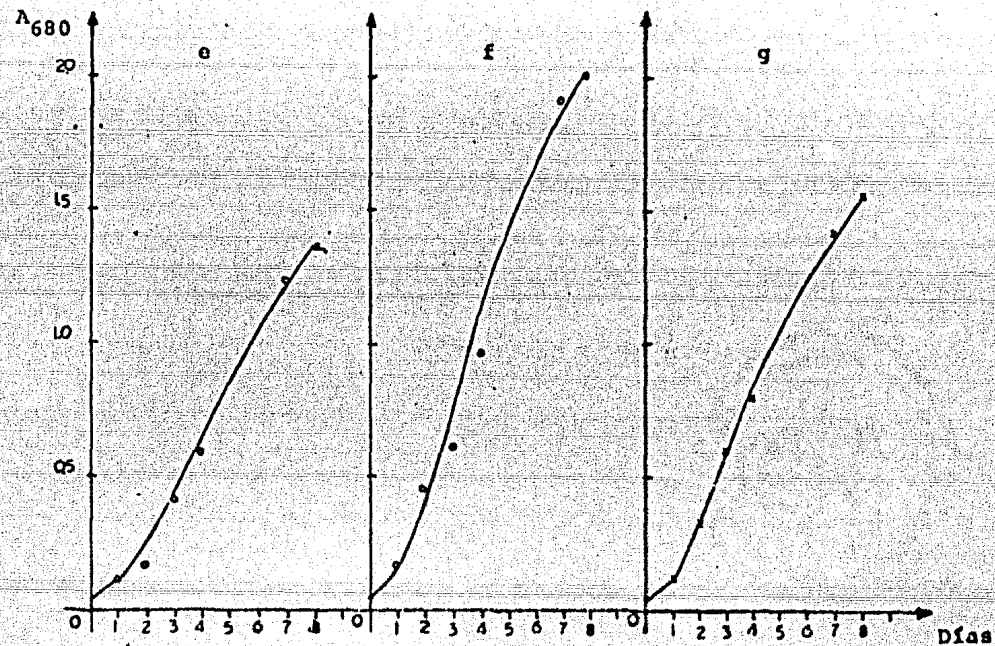
Gráfica No. 5. Curvas de crecimiento de *C. reinhardii* (cepa 11/32 C) con diferentes fuentes de nitrógeno.

a) Nitrate de amonio

c) Nitrate de sodio

b) Chlorure de amonio

d) Nitrite de sodio

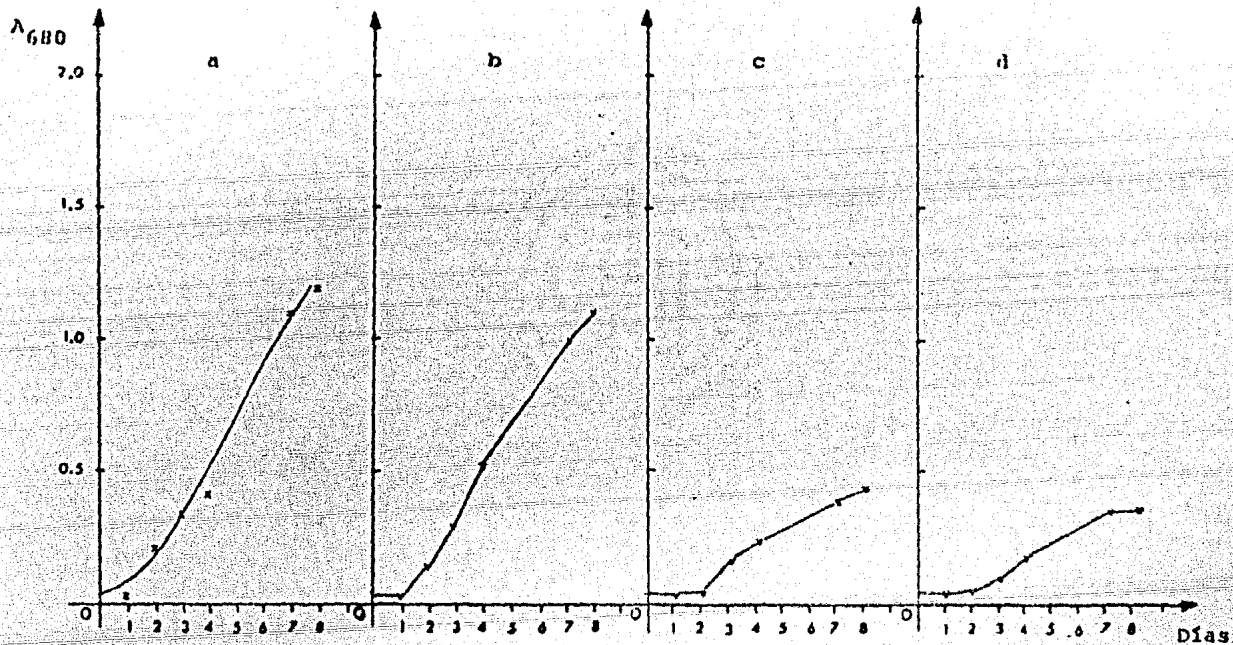


Gráfica No. 5. Curva de crecimiento de *C. reinhardtii* (cepa 11/32 C) con diferentes fuentes de nitrógeno.

a) Ac. glutámico

g) Nitrato de amonio

f) Glutamina



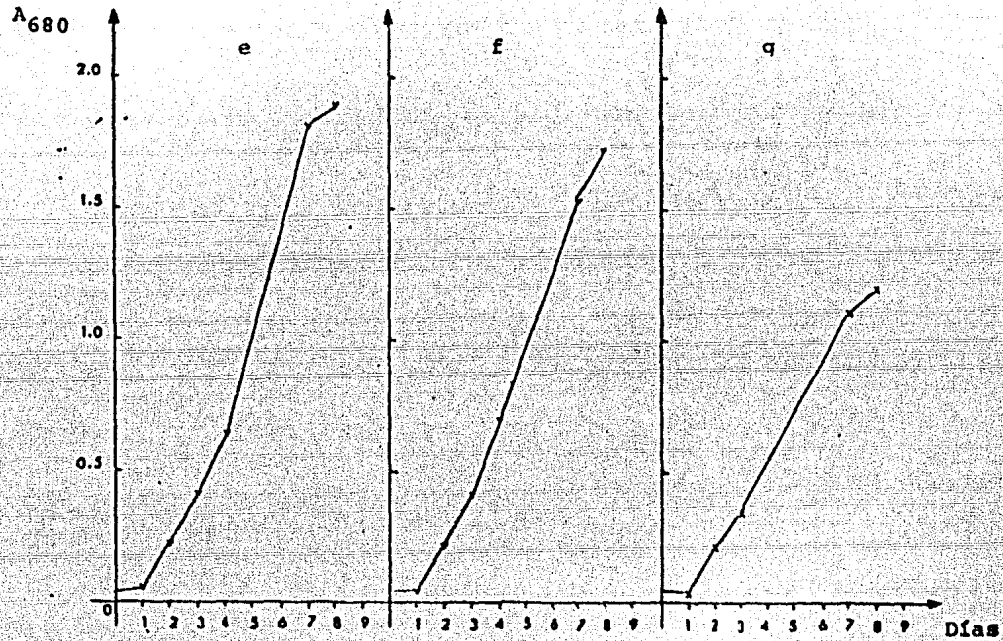
Gráfica No. 6. Curvas de crecimiento de *C. reinhardtii* (cepa 11/32 D) con diferentes fuentes de nitrógeno.

a) Nitrato de amonio

c) Nitrato de sodio

b) Cloruro de amonio

d) Nitrito de sodio

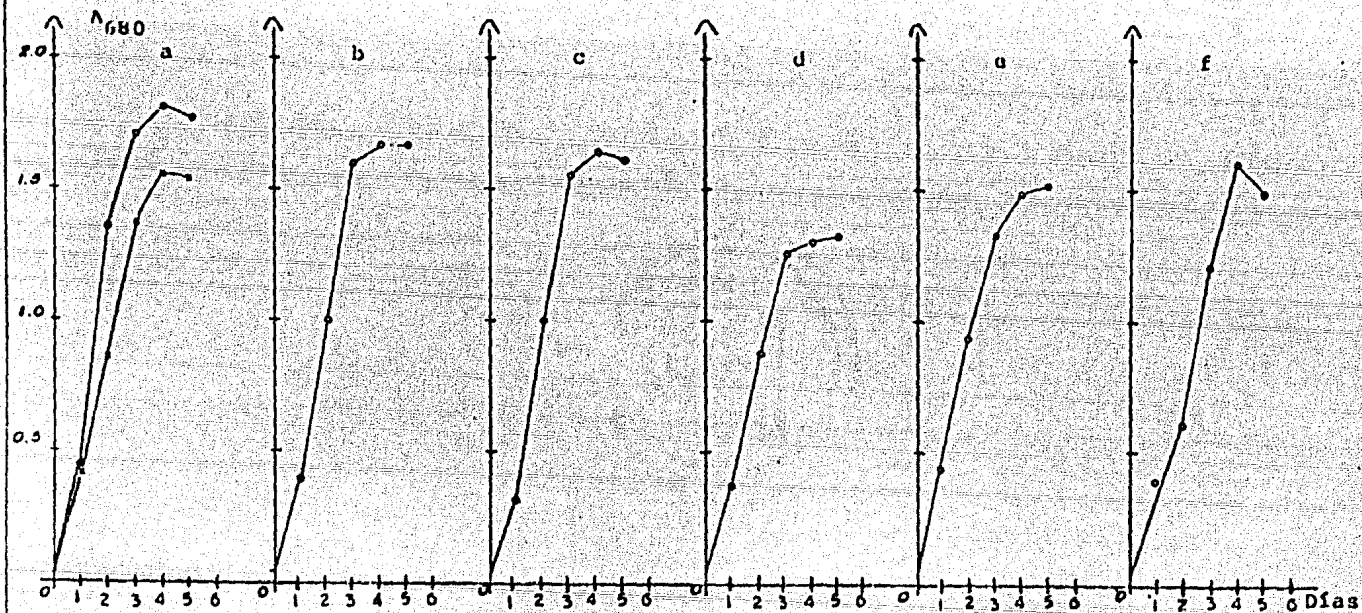


Gráfica No. 6. Curvas de crecimiento de *C. reinhardtii* (cepa 11/32 D) con diferentes fuentes de nitrógeno.

e) Ac. glutámico

g) Nitrato de amonio

f) Glutamina



Gráfica No. 7. Curvas de crecimiento de *C. reinhardtii* (cepa 11/32 C) con Aminoácidos.

a) Fenil alanina $10^{-2} M$

d) Asparagina $10^{-2} M$

b) Fenil alanina $10^{-3} M$

e) Asparagina $10^{-3} M$

c) Fenil alanina $10^{-4} M$

f) Asparagina $10^{-4} M$

-x-x-x- Control.

Compuestos Fenólicos.

Las plantas con flores, helechos, musgos, hepáticas y muchos microorganismos contienen varios tipos y cantidades de compuestos fenólicos. La función de la mayoría de estos compuestos aún es oscura y hasta ahora muchos parecen ser subproductos del metabolismo (metabolitos secundarios). Todos los compuestos fenólicos contienen uno o más anillos benzénicos con varios grupos substituyentes como el hidróxilo, carboxilo y metoxilo ($-O-CH_3$) y algunas veces estructuras de anillos no aromáticos. Los compuestos fenólicos difieren de los lípidos en que generalmente son solubles en agua y poco solubles en solventes orgánicos no polares como el benceno. Sin embargo hay algunos solubles en éter, especialmente cuando el pH es lo bastante bajo como para prevenir la ionización de los grupos carboxilo e hidroxilo (66). En plantas superiores la abundancia de estos compuestos solo es superada por los carbohidratos, y muestran una gran variedad de estructuras que van desde derivados de fenoles simples, como el quinol, hasta polímeros, como la lignina (53).

Existen pocos datos sobre la presencia de compuestos fenólicos en algas. No hay investigaciones sistemáticas de este grupo de compuestos en microorganismos fotosintéticos, aún cuando estos estudios serían muy interesantes en términos de evolución bioquímica. El primer reporte de la existencia de compuestos fenólicos complejos, en algas, fue publicado en 1951, cuando

Moewus (47) reportó la separación de tres flavonoides, de cultivos de líneas mutantes de Chlamydomonas, y aparentemente no hay duda de la presencia de compuestos fenólicos en diferentes tipos de algas multicelulares verdes, cafés, rojas, así como de derivados halogenados de estos en algas azul-verdes (11).

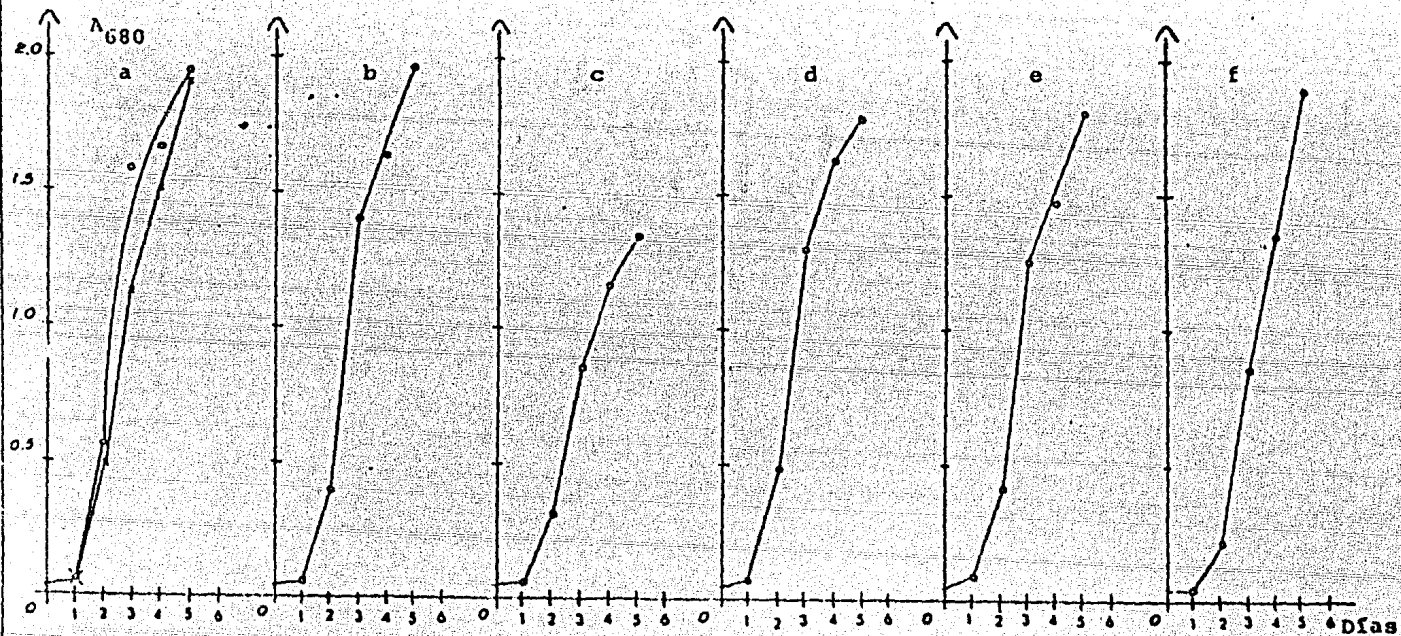
La presencia de estos compuestos en algas verdes unicelulares como los reportados por Moewus , ha sido puesto en duda (21), sin embargo los datos disponibles indican la presencia de compuestos fenólicos en dos especies de Chlamydomonas (33) y en diferentes especies de Chlorella (50), lo que permite emitir la hipótesis de la presencia de compuestos fenólicos en formas unicelulares de algas verdes (82).

Si bien, se acepta la presencia de compuestos fenólicos, la literatura no aporta datos acerca de las funciones, metabolismo y efecto de dichos compuestos en algas verdes.

Se ha demostrado que los ácidos fenólicos regulan la actividad de la enzima ácido indol acético -oxidasa (AII-oxidasa), en el caso de monofenoles se ha encontrado una estimulación y en los difenoles una inhibición de la actividad de la enzima (59,60).

Es sabido que en plantas superiores los derivados de los ácidos hidroxibenzoico y p-coumárico tienen actividad como cofactores de la AII-oxidasa y un efecto inhibitorio sobre la producción de etileno (61). Sin embargo, estos sistemas no han sido aún estudiados en algas. En trabajos posteriores se tratará de demostrar la producción de etileno por Chlamydomonas y el efecto de los ácidos fenólicos en su regulación (62).

Es por esta razón que se probó el efecto de los ácidos p-OH benzóico, cinámico y coumárico en el crecimiento de Chlamydomonas reinhardtii. La serie de curvas que se presentan en la gráfica 8 muestran el crecimiento de esta alga con ácidos fenólicos. La presencia de estos compuestos en el medio no produjo ningún incremento notable en el crecimiento y sí en cambio se nota un decremento en presencia de ácido cinámico en las tres concentraciones usadas y con el ácido p-benzóico 10^{-4} M. La diferencia estructural principal del ácido cinámico con respecto a los ácidos p-benzóico y coumárico es la carencia de un grupo hidroxilo en el anillo, lo cual tal vez podría estar relacionado con el decremento observado en el crecimiento.



Gráfica No. 8. Curvas de crecimiento de *C. reinhardtii* (cepa 11/32 C) con Acidos Fenólicos.

a) Acido p-Benzóico 10^{-2} M

d) Acido cumárico 10^{-2} M

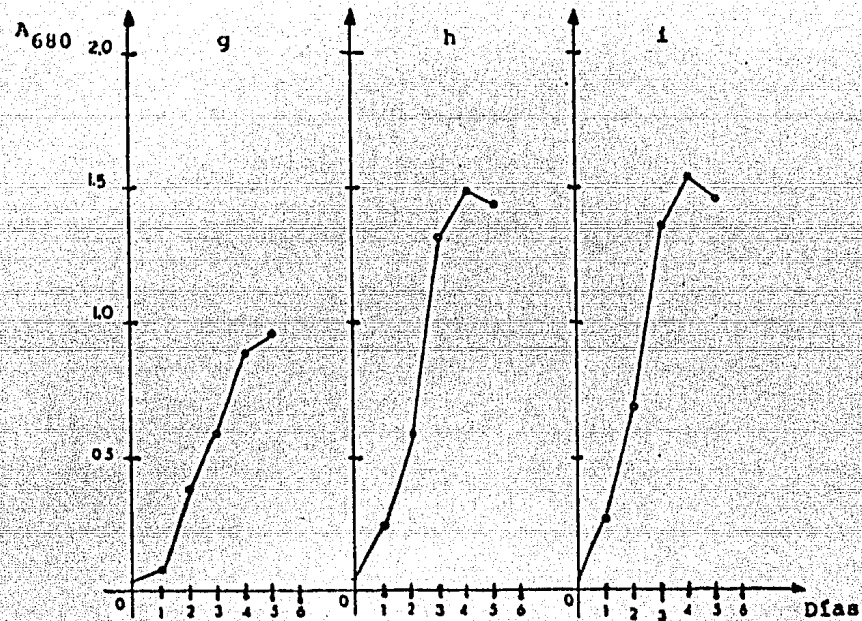
b) Acido p-Benzóico 10^{-3} M

e) Acido Cumárico 10^{-3} M

c) Acido p-Benzóico 10^{-4} M

f) Acido Cumárico 10^{-4} M

x-x-x- Control.



Gráfica No. 8. Curvas de crecimiento de C. reinhardtii (cepa 11/32 C) con .Acidos Fenólicos.

g) Acido cinámico 10^{-2} M

h) Acido cinámico 10^{-3} M

i) Acido cinámico 10^{-4} M

Gametogénesis.

El alga unicelular Chlamydomonas, ha sido ampliamente utilizada en el análisis de los mecanismos de gametogénesis y apareamiento. Para inducir gametogénesis experimentalmente es necesaria una deficiencia de nitrógeno en el medio (64) este hecho tiene algunas aplicaciones experimentales importantes ya que es posible controlar el apareamiento de cepas para análisis genéticos. Es importante también obtener gran cantidad de cigotos, para este propósito, y en Chlamydomonas es posible obtener aproximadamente el 90% de cigotos al poco tiempo de mezclar las cepas mt^+ y mt^- .

Reversibilidad de la Gametogénesis.- Provasoli et al. (56) realizaron experimentos en los cuales resuspendían gametos de Chlamydomonas reinhardtii en un medio con nitrato de amonio adecuado para el crecimiento, observaron que no había producción de cigotos. Posteriormente pruebas con otros compuestos nitrogenados como nitrato de sodio, glutamina, cloruro de amonio y urea produjeron resultados similares. El ácido glutámico sin embargo, el cual puede ser utilizado como fuente de nitrógeno mostró poca acción inhibitoria de la gametogénesis y la glicina no tuvo ningún efecto sobre la producción de cigotos.

La concentración de nitrógeno apropiada para la inhibición de formación de cigotos es la misma que la requerida para el crecimiento. Por el contrario, cuando las células han sido inhibidas con nitrato de amonio y son posteriormente lavadas y resuspendidas

en agua destilada en luz, la formación de cigotos se lleva a cabo nuevamente después de algunas horas. Para este proceso se requiere luz, suspensiones de células puestas en la obscuridad con o sin acetato no forman cigotos. Estos experimentos demuestran la reversibilidad del proceso de gametogénesis.

El papel de la luz en el proceso de gametogénesis.- Las células que tienen una baja concentración de nitrógeno en el medio necesitan mayor tiempo de exposición a la luz para formar gametos, de la misma manera los gametos que se han desdiferenciado por la exposición a una fuente de nitrógeno, requieren varias horas de luz para regresar al estado somático. Esta relación recíproca entre la luz y el nitrógeno ha llevado a pensar que la luz actúa en una forma indirecta formando carbohidratos a través de la fotosíntesis los cuales proveen energía para el proceso de apareamiento. Con esta hipótesis se puede especular que la acción del espectro de luz requerida para la formación de cigotos puede coincidir con el espectro de absorción de la clorofila. Los trabajos de Smith (72) proponen que tanto luz verde, azul, anaranjada y roja son efectivas para inducir la copulación de células de Chlamydomonas reinhardtii, crecidas en la obscuridad y Lewin (36) encontró que el espectro de luz para la copulación en C. moewusii es parecido al espectro de absorción de la clorofila. Moewus (46) reportó que en C. eugametos la sexualidad está determinada por pigmentos carotenoides específicos y que una pequeña exposición a la luz de baja intensidad es necesaria para un paso fotoquímico el cual controla la copulación.

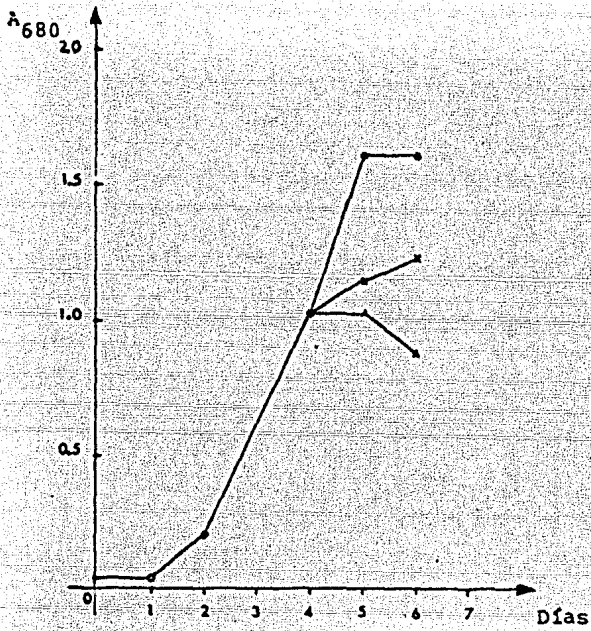
Contenido de nitrógeno y carbono en células vegetativas y en gametos.- Sager (64) ha intentado encontrar una relación entre la cantidad de nitrógeno y carbono por células en el estado de gameto y vegetativo en C. reinhardii; basándose en reportes anteriores (63) en los cuales se había encontrado que la función del carbono provisto por el acetato de sodio, mejoraba de manera notable la producción de cigotos; el método seguido fue: hacer crecer células en diferentes concentraciones de nitrógeno y carbono y cosechar a intervalos definidos y luego medir la cantidad total de nitrógeno y carbono por célula. La relación C/N aparentemente no tiene relación con la sexualidad, siendo la concentración de nitrógeno en el medio la determinante, sin embargo, experimentos realizados por Reynoso et al (58) hacen suponer que la concentración de carbono en el medio es determinante en el proceso de gametogénesis, ya que al tratar de inducir gametos mediante una baja concentración de nitrógeno y en presencia de acetato de sodio no se observó ningún apareamiento por lo que se puede suponer que no hubo formación de gametos.

En la gráfica 9 es notoria la presencia y concentración del nitrógeno en el medio para crecimiento de Chlamydomonas reinhardii al cambiar la concentración de nitrógeno a 0.03 g/l (MBN) y 0.0 g/l (MSN) las curvas varían considerablemente con respecto al control (0.3 g/l de nitrógeno), este fenómeno es fácilmente explicable ya que al haber una baja concentración de nitrógeno o ausencia de éste las células somáticas se transforman en gametos y se dividen 2-4 veces o ninguna. En las curvas de las gráficas

10 y 11 se aprecia el apareamiento de C. reinhardii en MBN y MSN; estas curvas son semejantes hasta las 12 horas. pero en MSN a las 24 hrs. el conteo ya no es posible puesto que el cultivo ha empezado a decaer, en cambio con MBN la capacidad de apareamiento es más alta al cabo de 24 hrs., se nota además que el rendimiento de apareamiento es más bajo a 6 y 12 hrs.

El proceso de gametogénesis en C. reinhardii aún no ha sido aclarado completamente (24-26) y muy probablemente pueda estar relacionado con una relación C/N en el medio de cultivo.

El ciclo sexual de C. reinhardii pudo llevarse a cabo en las condiciones de laboratorio, no está descrito ya que los resultados obtenidos son similares a los reportados en la literatura (78) y solamente se corroboró este hecho.

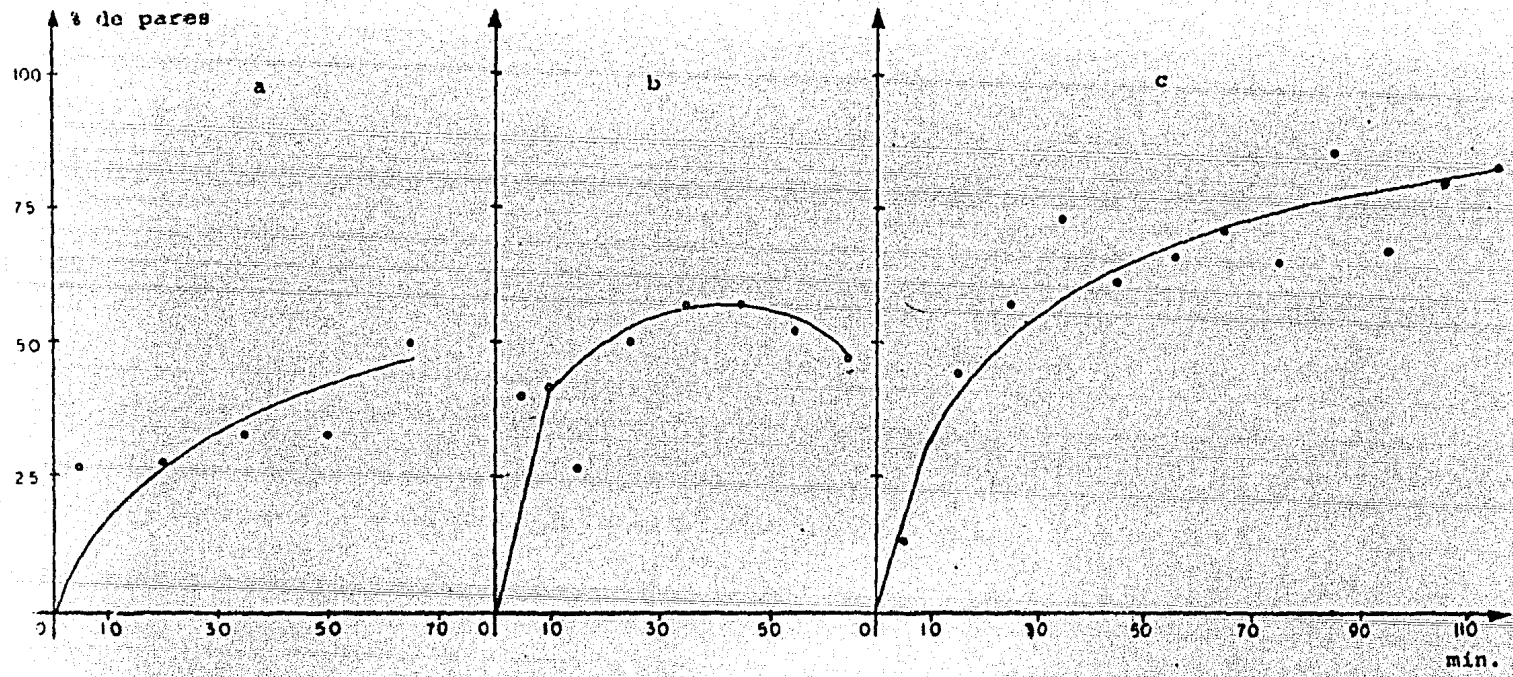


Gráfica No. 9. Efecto del cambio de medio en el crecimiento de C. reinhardtii (cepa 11/32 C).

o-o-o- MIA Control

x-x-x- MBN

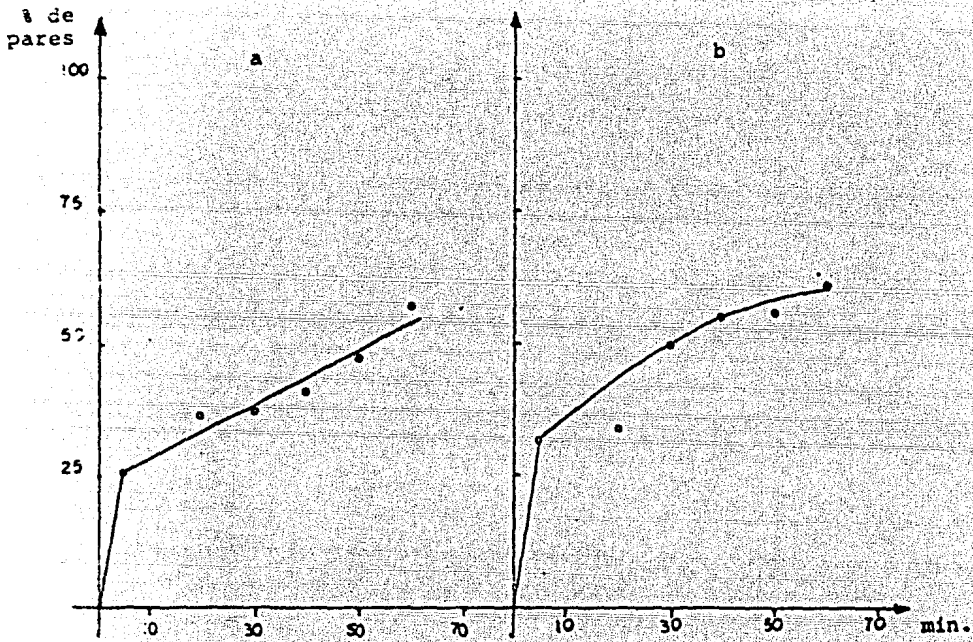
v-v-v- MSN



Gráfica No. 10. Curvas de apareamiento de

C. reinhardii en MBN.

- a) 6 hrs. en MBN
- b) 12 hrs. en MBN
- c) 24 hrs. en MBN



Gráfica No. 11. Curvas de apareamiento
de *C. reinhardii* en MSN
a) 6 hrs. en MSN
b) 12 hrs. en MSN

V. C O N C L U S I O N E S

1) El crecimiento de los cultivos de Chlamydomonas reinhardtii bajo condiciones constantes son satisfactoriamente reproducibles por lo que provee un material experimental adecuado. Si bien las células no son homogéneas respecto a su edad, lo son en cuanto a la mayor parte de sus características metabólicas.

2) La forma de crecimiento de C. reinhardtii es muy similar a las curvas de crecimiento en otros organismos por lo que factores como la luz, temperatura, pH, fuentes de carbono y nitrógeno son determinantes para obtener un rendimiento celular óptimo.

3) El uso de nitrato de amonio, ácido glutámico y glutamina como fuentes de nitrógeno es recomendable, los nitratos y nitratos requieren energía para ser reducidos antes de ser asimilados y por ello su aprovechamiento es menos eficiente.

4) La fuente de carbón más adecuada para el crecimiento es el CO_2 fijado fotosintéticamente, sin embargo, en condiciones de baja concentración de CO_2 el acetato de sodio es un sustituto ideal en concentraciones que pueden variar desde 1-4 g/l, siendo la óptima 2 g/l.

5) El control de la diferenciación celular de células somáticas a gametos se puede llevar a cabo con MBN y obtener hasta un 84.6% de apareamiento.

En general para cualquier cultivo de micro-algas en condiciones de laboratorio se deben controlar cinco factores principales. Elementos mayores y concentración total, fuentes de carbono y nitrógeno, pH, iluminación y factores orgánicos de crecimiento.

El presente trabajo es solo el principio de proyectos en vías de iniciación y contribuye en la resolución de las condiciones de mantenimiento y desarrollo de los cultivos del organismo experimental. Dichos proyectos son:

- a) El estudio de la diferenciación gamética relacionada con el N_2 y C del medio ambiente.
- b) El efecto de regulación de crecimiento en el desarrollo de C. reinhardii .
- c) Estudios de genética citoplasmática para experimentos de transformación genética en un organismo eucariote.

- 1.- Bassham J. and Kirk M. (1964). Photosynthesis of amino acids. *Biochem. Biophys. Acta.* 90, 553-562.
- 2.- Bentrys F. (1971) *Electrophysiologie der Zelle. Fortschr. Bot.* 33, 51-61.
- 3.- Birdsey E. and Lynch V. (1962). Utilization of nitrogen compounds by unicellular algae. *Science, N.Y.* 137, 763-4.
- 4.- Bold, H.C. (1973). *Morphology of Plant. Harper and Row ed. New York. U.S.A.* 13-23.
- 5.- Bollard, E. (1966). A comparative study of the ability of organic nitrogenous compounds to serve as sole sources of nitrogen for the growth of plants. *Plant and Soil.* 25 , 153-66.
- 6.- Bristol-Roach, B. (1926). On the relation of certain soil algae to some soluble organic compounds. *Ann. Bot.* 40 149-201.
- 7.- Brock, T.D. (1969) *Microbiol growth under extreme conditions Symp. Soc. gen. Microbiol.* 19, 15-41.
- 8.- Cain J. (1965). Nitrogen utilization in 38 freshwater chlamudomonad algae. *Can. J. Bot.* 43 . 1367-78.

- 9.- Clement H. (1970). In Biology of Acetobalaria, eds. Brachet J. and Bonotto S. pp. 177-191. Academic Press, New York-London.
- 10.- Cook, J.K. (1965) Influence of light on acetate utilization in green Euglena. Pl. Cell. Physiol, Tokyo, 6, 301-7.
- 11.- Craigie, J.S. and Grueng, D. (1967). Science, 157, 1058. In Algal Physiol and Biochemistry (1972). Steewart Ed. London.
- 12.- Cramer, M. (1952). Growth and photosynthetic characteristics of Euglena gracilis. Arch. Mikrobiol. 17 384-402.
- 13.- Cronquist, A. (1969). Introducción a la Botánica. C.E.C.S.A. México, D.F. 131-156.
- 14.- Chai-Ho, L. (1972). Interference by polysucrose in protein determination by the Lowry method. Analytical Bioche, 45 331-336.
- 15.- Chiang, K.S., J.R. Kates, K.F. Jones and N. Sueoka . On the formation of a homogenous zygotic population in Chlamydomonas reinhardtii . Develop. Biol. 22: 655-669 (1970).
- 16.- Delevoryas, T. (1968) . Diversificación Vegetal. Compañía Editora Continental. México, D.F. 28-30.
- 17.- Den Dooren De Jong L. (1967). Dark and light metabolism of amino acids in Chlorella. J. Microbiol. and Serol. 33, 166-70.

- 18.- Den Dooren De Jong I. (1969). Light and dark metabolism of D-and L-amino acids in 5 strains of Chlorella vulgaris. J. Microbiol. and Serol. 35, 107-12.
- 19.- Fogg, G.E. (1973) The blue-green algae. Academic Press. London-New York.
- 20.- Fott, B. and McCarthy, A. (1964). Three acidophilic flagellates in pure culture. J. Protozool. 11, 116-20.
- 21.- Harborne, J.B. (1967). Comparative Biochemistry of the Flavonoids. Academic Press. London -New York.
- 22.- Hartmann, M. (1961). El sexo y su determinación en animales y vegetales. U.T.E.H.A. México, D.F. 24-28.
- 23.- Hegewald E. (1972). Untersuchungen zum zeta-potential von planktonalgen. Arch. Hydrobiol./ Suppl. 42, 14-90.
- 24.- Ishiura, M. and Iwaza, K. (1973). Gametogenesis in Chlamydomonas. I effect of light on the induction of sexuality. Plant and Cell Physiol. 14 . 911-921.
- 25.- Ishiura, M. and Iwaza, K. (1973). Gametogenesis in Chlamydomonas II. Effect of cycloheximide on the induction of sexuality. Plant. and Cell. Physiol. 14, 923-933.
- 26.- Ishiura, M. and Iwaza, K. (1973). Gametogenesis in Chlamydomonas III. Daily fluctuation of sexcompetence. Plant and Cell Physiol. 14: 935-939.

- 27.- Jacobi, G. (1957). Vergleichende enzymatische Untersuchungen an marinen grun rotalgen. Kieler Meeresforsch. 13 212-214.
- 28.- Kanazawa, T. (1970) Regulatory effects of amonia on carbon metabolism in synchronously growing Chlorella pyreneidosa . Pl. Cell Physiol., Tokyo, 11 149-160.
- 29.- Karlander I. and Krauss, R. (1966). Responses of heterotrophic cultures of Chlorella vulgaris beigernick to darkness and light. I. Pigment and pH changes . Pl. Physiol., Lancaster, 41 1-6.
- 30.- Kates S.R. and Jones K. J. (1964). Fluoroacetate inhibition of amino acids during photosynthesis by Chlamydomonas reinhardtii . Science, N.Y. 143 145-6.
- 31.- Kessler, E. (1967). Physiologische und biochemische Beitrage zur toxonomic der gattung Chlorella. III. Merkmale non 8 autotrophen Arten. Arch. Mikrobiol. 55 , 346-357.
- 32.- Kretovick, W. et. al. (1970). Effect of nitrogen source on glutamate dehydrogenase and alanine dehydrogenase of Chlorella. Can. J. Bot. 48 , 1179-83.
- 33.- Kroes, H.W. (1972). Arch. Mikrobiol. 84 , 270. In the blue green algae (1973) London- New York.
- 34.- Laudenbach, B. (1969). Uber den Kohlenhydratumsatz in Chlorella unter dem einfluss von blauem und roten licht. Arch. Mikrobiol. 67, 226-242.

- 35.- Layne E. (1957). Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods Enzymol.* 3: 448-450.
- 36.- Lewin, R.A. (1952). *Proc. Soc. Protozool.* 3, 6. In the *Blue-green algae* (1973) Academic Press. London.
- 37.- Linko, P., Holn, O. (1957). Formation of radioactive citrulline during photosynthetic CO₂ fixation by blue-green algae. *J. Exptl. Botany.* 8, 147-156.
- 38.- Lorenzen, H. (1963). Temperature influsse auf Chlorella pyreneidosa unter besonderer Berücksichtigung der Zellentwicklung. *Flora, Jena*, 153, 554-592.
- 39.- Lowry, O.H. et. al. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265.
- 40.- Lwoff, A. (1932). *Recherches Biochimiques sur la nutrition des protozoaires.* Massow, Paris.
- 41.- Lwoff, A. (1944). *L'Evolution Physiologique.* Hermann, Paris. In the *blue-green algae* (1973). Academic Press London-New York.
- 42.- Lynn, R.I. (1970) The biology of the acetate flagellate Diplostauron elegans Skuja. *Arch. Protistenk.* 112, 283-302.
- 43.- Lysek G. and Simonis W. (1968). Substanzaufnahme und Phosphatstoffwechsel bei Ankistrodesmus braunii. *Planta*, 79 133-45.

- 44.- McCombie, A.M. (1960). Actions and interactions of temperature, light intensity and nutrient concentration of the green algae. Chlamydomonas reinhardtii .J. Fish. Res. Bd. Can. 17, 871-94.
- 45.- Miale, J.B. (1972). Laboratory medicine hematology (4th Ed.) The C.U. Mosby Co., Phila, Pa. 631,640,904,1198.
- 46.- Moewus, F. (1940). Biol. Zentr 60, 143. In algae physiology and Biochemistry (1972) Steewart Ed. London.
- 47.- Moewus, F. (1951). Enzymforschung, 12, 173. cited by T. Heissman in: Biochemical Methods of Plant Analysis, Izd. Inostr. Lit. (1960). p. 434.
- 48.- Nicholas, D.J. (1959) Metallo-enzymes in nitrate assimilation of plants with special reference to micro-organisms. Symposia Soc. Exptl. Biol. No. 13, 1-23.
- 49.- Parker, B.C. (1970) Life in the sky. Natur. Hist. 79, 54-59.
- 50.- Pimenova, M.N. (1966). In: controlled Biosynthesis, Nauka p. 165.
- 51.- Pintner I.J. and Provasoli L. (1968) Heterotrophy in subdued light of 3 Chrysochromulina species. Bull. Misaki Mar. Biol. Inst. Kyoto Univ. 12, 25-31.
- 52.- Pirson, A. and Lorenzon H. (1966). Synchronized dividing algae. A. Rev. Pl. Physiol. 17, 439-458.

- 44.- McCombie, A.M. (1960). Actions and interactions of tempera ture, light intensity and nutrient concentration of the green algae. Chlamydomonas reinhardtii .J. Fish. Res. Bd. Can. 17, 871-94.
- 45.- Miale, J.B. (1972). Laboratory medicine hematology (4th Ed.) The C.U. Mosby Co., Phila, Pa. 631,640,904,1198.
- 46.- Moewus, F. (1940). Biol. Zentr 60, 143. In algae physiology and Biochemistry (1972) Steewart Ed. London.
- 47.- Moewus, F. (1951). Enzymforschung, 12, 173. cited by T. Heissman in: Biochemical Methods of Plant Analysis, Izd. Inostr. Lit. (1960). p. 434.
- 48.- Nicholas, D.J. (1959) Metallo-enzymes in nitrate assimila- tion of plants with special reference to micro-organisms. Symposia Soc. Exptl. Biol. No. 13, 1-23.
- 49.- Parker, B.C. (1970) Life in the sky. Natur. Hist. 79, 54-59.
- 50.- Pimenova, M.N. (1966). In: controlled Biosynthesis, Nauka p. 165.
- 51.- Pintner I.J. and Provasoli L. (1968) Heterotrophy in sub- dued light of 3 Chrysochromulina species. Bull. Misaki Mar. Biol. Inst. Kyoto Univ. 12, 25-31.
- 52.- Pirson, A. and Lorenzon H. (1966). Synchronized dividing algae. A. Rev. Pl. Physiol. 17, 439-458.

- 53.- Pridham, J. (1965). Low Molecular weight phenols in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 16 13-36.
- 54.- Pringsheim, E.G. (1921) . Zur physiologie von Polytoma uvella Ber. dt. bot. Ges. 38,89.
- 55.- Provasoli, L. (1938). Studi sulla nutrizione dei protozoi *Boll. Lab. Zoll. Agr. Bachic. R. Ist. Sup. Agr. Milano* 9 1-24.
- 56.- Provasoli, L. et. al. (1951) Destruction of chloroplasts by streptomycin. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 16. 113-20.
- 57.- Redford, H.G. (1967). *Planta*, 76, 65-74.
- 58.- Reynoso, G.T., Robert, D.M. y Nieto, S.J. (1979) Datos no publicados.
- 59.- Robert, M.L. et al. (1975). Ethylene production by cress roots and excised cress roots segments and its inhibition by 3,5-diiodo -4-hydroxibenzoic Acid. *Planta* 126 273-284.
- 60.- Robert, M.L. et. al . (1976). The effects of 3,5-Diiodo-4-hydroxibenzoic acid on the oxidation of IAA and auxin-induced ethylene production by cress root segments. *Planta*, 129 , 53-57.
- 61.- Robert, M.L. et. al (1976). The effect of certain phenolic acids on the growth and ethylene production of cress seedling roots. *Planta* 132, 95-96.
- 62.- Robert, M.L. (1979) Comunicación personal.

- 63.- Sager, R. and Granick, S. (1953). Nutritional studies with Chlamydomonas reinhardtii . Ann. N.Y. Acad. Sci. 56, 831.
- 64.- Sager, R. and Granick, S. (1954). Nutritional control of sexuality in Chlamydomonas reinhardtii . J. Gen. Physiol. 37, 729.
- 65.- Sager, R. (1972). Citoplasmic genes and organelles. Academic Press. New York.
- 66.- Salisbury and Ross (1968). Plant Physiology. Wadsworth Publishing company. Belmont, Calif. U.S.A. 567-568.
- 67.- Senger, H. (1962). Über die Wirkung von Glucose und Kohlen-säure auf das Wachstum synchroner Chlorella - Kulturen. Vortr. Ges. geb. Bot. N.F. 1 , 205-16.
- 68.- Senger, H. (1969). Charakterisierung einer Synchronkultur von Scenedesmus obliquus, ihrer potentiellen Photosyntheseleistung und des Photosynthesequotienten während des Entwicklungszyklus. Planta, 90, 243-66.
- 69.- Shelef, et. al (1969). The continuous culture of algal biomass on wastes. In continuous cultivation of microorganisms ed Malek I pp. 601-29. Academic Press, New York and London.
- 70.- Sims A.P. and Folkes B.F. (1964) . A kinetic study of the assimilation of ¹⁵N-ammonio and the synthesis of amino acids in an experimental growing culture of Candida utilis Proc. R. Soc. B. 159, 479-502.

- 71.- Sims A.P. et al (1968). Mechanisms induced in the regulation of nitrogen assimilation in microorganisms and plants. In recent aspects of nitrogen metabolism in plants. Ed. Hewitt E.J. pp. 91-114. Academic Press, New York, and London.
- 72.- Smith, G.M. (1951). In plant growth substances, (F. Skoog, editor), Madison, University of Wisconsin Press. 315.
- 73.- Smith F.W. and Thompson J.F. (1971). Regulation of nitrate reductase in Chlorella vulgaris . Pl. Physiol. Lancaster, 48, 224-7.
- 74.- Snell, W.J. (1976). Mating in Chlamydomonas: A system for the study of specific cell adhesion I. Ultrastructural and electrophoretic analyses of flagellos surface components involved in adhesion J. of Cell Biol. 68: 48-69.
- 75.- Sorokin C. and Krauss R. (1962). Effects of temperature and illuminance on Chlorella growth uncoupled from cell division. Pl. Physiol. Lancaster , 37, 37-42.
- 76.- Starosta, B. (1970). Die regulation der durch stickstoffmangel ausgelosten sekundarcorofinhildung bei Ankistrodesmus. Dissertation, Universitat Munchen, 112 pp.
- 77.- Stengel E. (1970) Zustandsaenderungen verschiedener Eisenverbindungen in Nahrlossimngen fur Algen. Arch. Hydrobiol. Suppl. 38, 151-69.
- 78.- Sueoka, N. Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in Chlamydomna reinhardii. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 46, 83-91 (1960).

- 79.- Sueoka, N. Chiang, K. and Kates, J. (1967). Deoxiribonucleic acid replication in meiosis of Chlamydomonas reinhardii. J. Mol. Biol. 25, 47-66.
- 80.- Syrett, P.J. (1962) Nitrogen assimilation. In Physiology and Biochemistry of Algae. ed. Lewin R.A. pp. 171-88. Academic Press, New York and London.
- 81.- Tanner W. et al. (1968). The quantum requirement for light dependent anaerobic glucosa assimulation by Chlorella vulgaris. Z. Pf/Physiol. 59, 301-3.
- 82.- Tauts, M.I. (1978). Phenolic compounds of the culture medium of a Bacterially uncontaminated Chlorella Culture. Soviet Plant Physiology. 25, 317-319.
- 83.- Trukhin, N.V. (1969). The utilization of light energy by Chlorella under laboratory culture condition Tr. Inst. Biol. Vnutr. Vod. Akad. Nauk. SSSR. 19. 32-8.
- 84.- Ullrich, W.R. (1972). Der Einflub von CO₂ und pH auf die ³²p-Markierung von polyphosphaten und organischen phosphaten bei Ankistrodesmus braunii in Licht. Planta, 102, 37-54.
- 85.- Virtanen, A. and Rautenen, N. (1952). Nitrogen assimilation In "The enzymes" (J.B. Sumner and K. Myrback, eds.) 2 pp. 1084-1130.
- 86.- Wiessner, W. (1969) Effect of autotrophic or photoheterotrophic growth conditions on in vivo absorption of visible light by green algae. Photosynthesis, 3, 225-232.

87.- Zarrouk, C. (1966). Contribution a l'efude d'une cyanophyceé. Influence. de divers facteurs chimiques et physiques. Paris: These Sciences.

VII. A P E N D I C E

Valores de los puntos de las gráficas presentadas. Las \bar{x} son el resultado de cuando me nos tres repeticiones y los va lores iniciales de absorbancia son $A_{680} = 0.02$

GRAPICA No. 1

DIA	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6		
\bar{x}	0.057	0.130	0.252	0.457	0.491	0.765	40.16	74.92	82.00	126.33	202.00	272.16	30.00	40.00	80.00	90.00	140.00	222.00		
σ	0.007	0.020	0.030	0.020	0.011	0.018	4.600	5.120	14.800	16.920	70.700	83.120	1.500	7.500	2.600	2.150	16.00	19.10		
Medio			MI						MI									MI		
Medición	Absorbancia 680 nm						No. de células/ml x 10 ⁴ (hemocitometro)												ug/ml de proteína	

GRAFICA No. 2

DIA	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
\bar{x}	0.010	0.117	0.386	0.741	1.190	0.040	0.060	0.382	1.000	1.110	0.017	0.141	0.411	0.685	1.26
σ	0.002	0.060	0.097	0.152	0.060	0.002	0.050	0.194	0.000	0.100	0.002	0.030	0.050	0.034	0.360
Δ	-0.010	0.107	0.269	0.355	0.449	0.020	0.020	0.322	0.618	0.110	0.003	0.124	0.270	0.274	0.575
$\% \Delta$	-50.00	1070.00	229.91	91.96	60.59	100.00	50.00	536.66	161.00	11.00	-15.00	729.40	191.48	66.66	83.00
Medio		pH	6.0					6.5					6.8		
\bar{x}	0.014	0.095	0.403	0.821	1.300	0.017	0.122	0.375	0.668	1.260					
σ	0.003	0.015	0.072	0.100	0.100	0.004	0.035	0.030	0.050	0.070					
Δ	-0.006	0.081	0.308	0.418	0.479	0.003	0.105	0.253	0.293	0.592					
$\% \Delta$	-30.00	578.57	324.21	103.72	58.34	-15.00	617.64	207.37	78.13	88.62					
Medio		7.0						7.5							

G R A F I C A No. 3

DIA	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
\bar{x}	0.029	0.030	0.035	0.051	0.048	0.032	0.035	0.039	0.062	0.052	0.027	0.030	0.036	0.059	0.061
σ	0.007	0.005	0.007	0.014	0.019	0.020	0.010	0.018	0.018	0.024	0.007	0.008	0.006	0.009	0.015
Δ	0.009	0.001	0.005	0.016	-0.003	0.012	0.003	0.004	0.023	-0.010	0.007	0.003	0.006	0.018	0.007
$\% \Delta$	45	3.44	16.16	45.71	-5.88	60.00	9.37	11.42	58.97	-16.12	35.00	11.11	20.00	50.00	12.96
Medio	Glucosa $10^{-2}M$					Glucosa $10^{-3}M$					Glucosa $10^{-4}M$				
\bar{x}	0.048	0.216	0.483	0.800	0.880	0.072	0.302	0.846	1.148	1.518	0.056	0.225	0.584	0.958	1.266
σ	0.005	0.070	0.080	0.080	0.052	0.010	0.110	0.064	0.121	0.053	0.013	0.010	0.056	0.075	0.213
Δ	0.028	0.168	0.267	0.317	0.080	0.052	0.230	0.544	0.302	0.370	0.036	0.169	0.359	0.374	0.303
$\% \Delta$	140.00	350.00	123.61	65.63	10.00	260.00	319.44	180.13	35.69	32.22	180.00	301.78	159.55	64.04	32.15
Medio	Acetato 1000					Acetato 2000					Acetato 4000				
\bar{x}	0.029	0.039	0.065	0.079	0.104										
σ	0.009	0.010	0.013	0.003	0.04										
Δ	0.009	0.010	0.026	0.014	0.025										
$\% \Delta$	45.00	34.48	66.66	21.53	31.64										
Medio	Control														

GRAFICA No. 4

CEPA 11/32 C

DIA	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5
\bar{x}	0.118	0.650	0.575	1.200	1.380	1.650	0.124	0.353	0.750	0.920	1.00	1.120	0.08	0.443	0.590	0.601	0.533
σ	0.040	0.090	0.130	0.100	0.060	0.020	0.024	0.050	0.020	0.020	0.020	0.100	0.040	0.007	0.010	0.003	0.002
Δ	0.098	0.532	-0.75	0.625	0.18	0.27	0.104	0.229	0.397	0.17	0.08	0.12	0.06	0.363	0.147	0.011	-0.06
$\% \Delta$	450.84	450.84	-11.53	108.69	15.00	19.56	520.00	184.67	112.46	22.66	8.69	12.00	300.00	453.75	33.18	1.86	-11.31
Medio	MI + Acetato			Incubadora			MI + Acetato			Baño			MI + Acetato			Agitador	
CEPA 11/32 D																	
\bar{x}	0.159	0.581	0.818	1.259	1.337	1.460	0.127	0.321	0.765	0.949	1.242	1.445	0.112	0.360	0.640	0.573	0.516
σ	0.020	0.070	0.034	0.060	0.100	0.040	0.004	0.010	0.040	0.026	0.016	0.060	0.002	0.020	0.020	0.002	0.002
Δ	0.139	0.422	0.237	0.441	0.078	0.123	0.107	0.194	0.444	0.184	0.293	0.203	0.092	0.248	0.280	-0.067	-0.057
$\% \Delta$	695.00	265.40	40.79	53.91	6.19	9.19	535.00	152.75	138.31	24.05	30.87	16.34	460.00	221.42	77.77	-10.46	-9.94
Medio	MI + Acetato			Incubadora			MI + Acetato			Baño			MI + Acetato			Agitador	

GRAFICA No. 5

11/32 C

DIA	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
\bar{x}	0.126	0.294	0.595	0.796	1.409	1.547	0.115	0.318	0.506	0.763	1.265	1.349	0.098	0.184	0.294	0.356	0.607	0.782
σ	0.004	0.006	0.070	0.170	0.360	0.034	0.005	0.063	0.029	0.050	0.070	0.023	0.002	0.033	0.084	0.118	0.120	0.135
Δ	0.106	0.168	0.301	0.201	0.613	0.138	0.095	0.203	0.188	0.257	0.502	0.084	0.078	0.086	0.110	0.062	0.215	0.175
% Δ	530.0	133.3	102.3	33.7	77.0	9.79	475.0	176.5	59.1	50.7	65.7	6.640	390.0	87.75	59.78	21.08	70.50	28.83
Medio	Nitrato de Amonio						Cloruro de Amonio						Nitrato de Sodio					
\bar{x}	0.086	0.198	0.293	0.368	0.673	0.743	0.131	0.181	0.426	0.607	1.247	1.372	0.180	0.454	0.630	0.975	1.914	2.096
σ	0.006	0.009	0.054	0.040	0.040	0.010	0.009	0.048	0.009	0.070	0.104	0.051	0.014	0.084	0.040	0.090	0.316	0.290
Δ	0.066	0.112	0.095	0.075	0.305	0.070	0.111	0.050	0.245	0.181	0.640	0.125	0.160	0.274	0.176	0.345	0.939	0.182
% Δ	330.0	130.2	47.97	25.59	82.88	10.40	555.0	38.16	135.3	42.48	105.4	10.02	800.0	152.2	38.76	54.76	96.30	9.500
Medio	Nitrito de Sodio						Acido Glutámico						Glutamina					

GRAFICA No. 6

11/32 D

DIA	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
\bar{x}	0.023	0.238	0.355	0.426	1.122	1.196	0.015	0.158	0.310	0.527	1.020	1.092	0.036	0.055	0.175	0.245	0.409	0.473
σ	0.005	0.080	0.134	0.150	0.022	0.027	0.002	0.027	0.020	0.058	0.074	0.080	0.005	0.013	0.038	0.020	0.049	0.072
Δ	0.003	0.215	0.117	0.071	0.696	0.074	-0.05	0.143	0.152	0.215	0.493	0.072	0.016	0.019	0.120	0.072	0.162	0.064
% Δ	15.00	934.7	49.15	20.00	163.3	6.590	-25.0	953.3	96.20	70.00	93.54	7.060	80.00	52.77	218.1	41.14	65.58	15.65
Medio	Nitrate de Amonio						Cloruro de Amonio						Nitrate de Sodio					
\bar{x}	0.026	0.058	0.099	0.172	0.356	0.463	0.068	0.223	0.415	0.659	1.829	1.923	0.036	0.227	0.406	0.618	1.527	1.728
σ	0.003	0.014	0.030	0.030	0.035	0.032	0.021	0.080	0.100	0.015	0.030	0.330	0.015	0.046	0.090	0.017	0.419	0.280
Δ	0.006	0.032	0.041	0.073	0.184	0.107	0.048	0.155	0.194	0.242	1.170	0.094	0.016	0.191	0.179	0.281	0.840	0.201
% Δ	30.00	123.0	70.68	73.74	106.9	30.05	240.0	227.9	86.99	58.03	177.5	5.140	80.00	530.5	78.85	69.21	122.2	13.16
Medio	Nitrito de Sodio						Acido Glutámico						Glutamina					

GRAFICA No. 7

DIA	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
\bar{x}	0.386	1.290	1.640	1.740	1.700	0.346	1.000	1.540	1.610	1.590	0.260	0.940	1.520	1.590	1.560
σ	0.020	0.023	0.060	0.020	0.030	0.070	0.024	0.150	0.100	0.070	0.011	0.027	0.070	0.010	0.010
Δ	0.366	0.904	0.350	0.100	-0.04	0.326	0.654	0.540	0.070	-0.02	0.240	0.680	0.580	0.070	-0.03
% Δ	1830.	234.1	27.13	6.100	-2.30	1630.	189.0	54.00	4.545	-1.240	1200.	261.5	61.70	4.600	-1.89
Medio	Fenil-alanina 10^{-2} M					Fenil-alanina 10^{-3} M					Fenil-alanina 10^{-4} M				
\bar{x}	0.321	0.830	1.210	1.170	1.280	0.390	0.890	1.280	1.440	1.470	0.240	0.550	1.160	1.560	1.460
σ	0.080	0.032	0.032	0.080	0.030	0.050	0.032	0.190	0.100	0.170	0.008	0.060	0.080	0.030	0.070
Δ	0.301	0.509	0.380	-0.40	0.110	0.370	0.500	0.390	0.160	0.030	0.220	0.310	0.610	0.040	-0.01
% Δ	1505.	158.5	45.78	-3.31	9.400	1850.	128.2	43.82	12.50	2.080	1100.	129.1	110.9	34.48	-6.41
Medio	Asparagina 10^{-2} M					Asparagina 10^{-3} M					Asparagina 10^{-4} M				
\bar{x}	0.364	0.803	1.310	1.470	1.430										
σ	0.036	0.100	0.030	0.052	0.020										
Δ	0.344	0.439	0.507	0.160	-0.04										
% Δ	1720.	120.6	63.14	12.21	-2.72										
Medio	Control														

GRAFICA No. 8

DIA	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
\bar{x}	0.092	0.390	0.590	0.880	0.970	0.252	0.601	1.320	1.490	1.420	0.283	0.672	1.370	1.530	1.470
σ	0.012	0.011	0.029	0.119	0.130	0.087	0.080	0.190	0.080	0.090	0.090	0.130	0.170	0.020	0.060
Δ	0.072	0.298	0.200	0.290	0.090	0.232	0.349	0.719	0.170	-0.07	0.263	0.389	0.698	0.160	-0.06
$\% \Delta$	360.0	223.9	51.28	49.15	10.22	1160.	138.4	119.6	12.88	-4.70	1315.	137.4	103.8	11.68	-3.92
Medio	Acido Cinámico $10^{-2} M$					Acido Cinámico $10^{-3} M$					Acido Cinámico $10^{-4} M$				
\bar{x}	0.072	0.575	1.590	1.650	1.950	0.063	0.390	1.385	1.628	1.970	0.063	0.325	0.848	1.160	1.350
σ	0.010	0.035	0.060	0.010	0.100	0.010	0.110	0.002	0.090	0.240	0.002	0.060	0.080	0.160	0.080
Δ	0.052	0.503	1.015	0.060	0.300	0.043	0.327	0.995	0.243	0.342	0.016	0.262	0.523	0.312	0.190
$\% \Delta$	260.0	698.6	176.5	3.770	18.18	215.0	519.0	255.5	17.55	21.01	315.0	415.8	160.9	36.79	16.38
Medio	Acido OH p-Benzoico $10^{-2} M$					Acido OH p-Benzoico $10^{-3} M$					Acido OH p-Benzoico $10^{-4} M$				
\bar{x}	0.070	0.480	1.290	1.630	1.790	0.077	0.410	1.260	1.480	1.810	0.048	0.210	0.860	1.350	1.900
σ	0.017	0.130	0.063	0.030	0.050	0.010	0.040	0.190	0.190	0.330	0.003	0.080	0.080	0.290	0.140
Δ	0.050	0.410	0.810	0.340	0.160	0.057	0.333	0.850	0.220	0.330	0.028	0.168	0.644	0.490	0.550
$\% \Delta$	250.0	585.7	168.7	26.36	9.820	285.0	432.4	207.3	17.43	22.30	140.0	350.0	298.1	56.98	40.74
Medio	Acido Coumárico $10^{-2} M$					Acido Coumárico $10^{-3} M$					Acido Coumárico $10^{-4} M$				

GRAFICA No. 8

DIA	1	2	3	4	5
\bar{x}	0.046	0.480	1.130	1.499	1.900
σ	0.012	0.060	0.160	0.210	0.300
Δ	0.026	0.434	0.650	0.369	0.401
$\% \Delta$	130.0	943.4	135.4	32.66	26.75

Medio Control

GRAFICA No. 9

Dfa	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
\bar{x}	0.025	0.198	1.014	1.600	1.600				1.140	1.270				1.030	0.850
σ	0.001	0.070	0.245	0.037	0.040	control			0.090	0.060	control			0.050	0.024
Δ	0.005	0.173	0.816	0.586	0.000				0.126	0.130				0.016	-0.18
$\% \Delta$	25.00	692.0	412.1	57.79	0.000				12.43	11.40				1.580	-17.4
Medio	Control					Medio Bajo en Nitrógeno					Medio Sin Nitrógeno				

GRAFICA No. 10
MEDIO BAJO EN NITROGENO
6 HORAS

MINUTOS	5	20	35	50	65
\bar{x}	27.40	27.60	33.40	32.80	49.60
σ	3.200	9.600	5.820	2.520	26.36
Δ	27.40	0.200	5.800	-0.60	16.80
$\% \Delta$	2740.	0.720	21.01	-1.79	51.21

12 HORAS

MINUTOS	5	10	15	25	35	45	55	65
\bar{x}	40.40	42.00	26.60	50.60	57.00	57.20	52.00	46.60
σ	3.340	9.600	3.000	7.100	8.120	9.200	5.380	4.800
Δ	40.40	1.600	-15.4	24.00	6.400	0.200	-5.20	-5.40
$\% \Delta$	4040.	3.960	-36.6	90.22	19.64	0.350	-9.09	-10.3

24 HORAS

MINUTOS	5	15	25	35	45	55	65	75	85	95	105	115
\bar{x}	13.36	40.56	57.40	73.80	62.20	67.00	70.60	64.60	86.60	68.28	82.20	84.60
σ	10.00	8.800	18.60	11.88	12.16	5.000	10.78	14.80	25.40	13.26	19.20	14.00
Δ	13.36	27.20	16.84	16.40	-11.6	4.800	3.600	-6.00	22.00	-18.3	13.92	2.400
$\% \Delta$	1336.	203.5	41.51	28.57	-15.7	7.710	5.370	-8.49	34.05	-21.1	20.38	2.910

GRAFICA No. 11

MEDIO SIN NITROGENO

6 HORAS

MINUTOS	5	20	30	40	50	60
\bar{x}	25.80	35.70	37.30	41.30	47.16	56.60
σ	5.600	4.700	3.600	5.720	2.360	7.800
Δ	25.80	9.900	1.600	4.000	5.860	9.440
$\% \Delta$	2580.	38.37	4.480	10.72	14.19	20.02

24 HORAS

\bar{x}	32.40	34.43	50.05	54.90	55.80	60.80
σ	8.400	6.300	5.420	8.500	7.260	5.500
Δ	32.40	2.030	15.62	4.850	0.900	5.000
$\% \Delta$	3240.	6.270	45.36	9.690	1.640	8.960