



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**CAMPUS IZTACALA**



**CARACTERIZACION Y ANALISIS BROMATOLOGICO DE UNA CEPA MONOALGAL: *Chlorella vulgaris* Beijerinck COLECTADA DE LA ATMOSFERA CON POSIBLE USO EN ACUACULTURA.**

B01190/96  
E7°1

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE LICENCIADO EN BIOLOGIA PRESENTA : SONIA MA. DEL SOCORRO VEGA QUINTERO





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.

" Estamos haciendo un libro  
testimonio de lo que no decimos.  
Reunimos nuestro tiempo, nuestros dolores,  
nuestros ojos, las manos que tuvimos,  
los traemos al libro  
y quedamos, no obstante,  
más grandes y más miserables que el libro.  
El lamento no es el dolor.  
El canto no es el pájaro.  
El libro no soy yo, ni es mi hijo  
ni es la sombra de mi hijo.  
El libro es sólo, el tiempo,  
un tiempo mío entre todos mis tiempos,  
un grano en la mazorca,  
un pedazo de hidra"

Jaime Sabines (1956)

DEDICATORIA

A mis familiares,

maestros

y amigos.

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar un agradecimiento especial a la Biól. Gloria Garduño Solórzano. Directora de esta tesis, sobre todo por su apoyo moral, económico y porque hizo posible la realización de este trabajo.

A la Q.F.B. María Eugenia Garín, del Lab. de Investigación L-514 por permitirme realizar las valoraciones químicas y por aceptar la revisión del presente trabajo.

Al M. en C. Ernesto Aguirre León, responsable del lab. de cultivo de tejidos de la UMF-ENEPI por su apoyo incondicional en el uso de material y equipo.

Al Dr. Antonio Peña, del lab. de fisiología celular, UNAM; por su asesoría en la técnica de rompimiento celular. Asimismo a la M. en C. Ma. Teresa García Castañeda, Javier Hernández y Rosa Olivia Cañizares, del Instituto Politécnico Nacional CINVESTAV; por facilitarme el uso de la prensa francesa.

Al M. en C. Eberto Novelo de la Facultad de Ciencias, UNAM; por compartir conmigo su conocimiento sobre taxonomía del género y apoyo bibliográfico.

A la M. en C. Guadalupe Roy-Ocotla del Instituto de Ciencias de la Atmósfera, UNAM; por su apoyo bibliográfico concerniente a la aerobiología de México.

A la Biól. Ma. Guadalupe Oliva, Biól. Ma. Elena Huidobro, Biól. Mario Fernández y Biól. Gloria Vilaclara. Sinodales de esta tesis.

Un agradecimiento especial a la Biól. Martha López Carmona por su apoyo incondicional, por compartir conmigo su amistad y por financiar la impresión de esta tesis.

Al Biól. Sergio González Vazquez del Mercado por su participación en la estandarización de las técnicas bioquímicas empleadas.

Al Biól. e ilustrador Guillermo Jiménez Bastida por la realización final de las figuras.

A los biólogos Miguel Vargas, Lucía Pavón Meza, Rita Flores León y Lety Vázquez Sánchez por facilitar mi trabajo.

A la Biól. Edith López Villafranco y a todo el personal del Herbario IZTA, por brindarme la oportunidad de compartir su espacio, su amistad y por sus palabras de aliento.

Y por supuesto... a todas las personas que directa o indirectamente contribuyeron a la realización de este sueño.  
¡gracias..... muchas gracias!

## INDICE

Página

### RESUMEN

INTRODUCCION.....	1
-------------------	---

### ANTECEDENTES

1.- Aerobiología.....	3
2.- Taxonomía del género.....	4
3.- Empleo de microalgas en acuicultura.....	5

OBJETIVOS.....	8
----------------	---

### METODO

1.- Aislamiento.....	9
a) colecta y determinación	
b) aspersión y estriado en placa	
c) selección de unidades algales	
d) mantenimiento de la cepa	
2.- Caracterización de la historia de vida.....	10
3.- Cinética poblacional.....	11
4.- Evaluación de los constituyentes químicos....	11

RESULTADOS.....	13
-----------------	----

### ANALISIS Y DISCUSION

1.- Aislamiento.....	20
2.- Historia de vida.....	20
3.- Cinética poblacional.....	21
4.- Constituyentes químicos.....	22

CONCLUSIONES.....	26
-------------------	----

RECOMENDACIONES.....	27
----------------------	----

BIBLIOGRAFIA.....	28
-------------------	----

ANEXO.....	33
------------	----

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo principal realizar el aislamiento, caracterización y evaluación del contenido químico proximal de *Chlorella vulgaris* Beijerinck, en condiciones de cultivo en volumen limitado, no axénico.

A partir de cuatro muestreos atmosféricos llevados a cabo en el norte de la ciudad de México, se determinaron 7 especies de microalgas, tres de las cuales constituyen nuevos registros para México. Las Chlorophyta fue el grupo de mayor dominancia, seguido de las Cyanophyta y Chromophyta.

De estos muestreos se aisló la cepa de *Chlorella vulgaris* por la técnica de aspersión en placa y posteriormente en cultivo se caracterizó en sus diferentes estadios celulares.

El cultivo de *Chlorella vulgaris* Beijerinck, en medio Bold, se mantuvo a temperatura ambiente, aireación continua, intensidad luminosa promedio de 3407 lux y fotoperíodo de 12:12 h. La cinética poblacional en la fase exponencial, mostró una velocidad de crecimiento de 0.37 div./día, duplicándose la población cada 0.81 días y un promedio de divisiones celulares de 1.23 cél/día.

Después de un período de adaptación de 2 días, se registró la fase exponencial, en el 10mo. día, con una concentración máxima de  $33.3 \times 10^6$  cel/ml.

En cuanto al análisis químico proximal, realizado mediante las técnicas de tinción-ligadura, ácido fenol-sulfúrico y Soxhlet. Se registró una concentración de 24 pg/cél. de proteína, 28 pg/cél. de carbohidratos y 6 pg/cél. de lípidos respectivamente.

Cabe mencionar que los valores de obtenidos se encuentran dentro de los intervalos señalados para especies marinas, conocidas por su amplio uso en acuicultura.

## INTRODUCCION

Pettersson (1915) fue el primer investigador en definir las algas subaéreas como "aquellas que obtienen agua, totalmente o en gran parte, de la humedad del aire y son capaces de resistir la sequía sin entrar en estados de resistencia especiales". Pero no fue hasta 1974, cuando Shlichting demostró que estas microalgas pueden pasar de ambientes acuáticos, rocas o suelo a la atmósfera, debido a factores tales como la velocidad del viento, tormentas de polvo, frecuencia e intensidad de la lluvia. Su presencia en muestras del aire, lluvia, nieve y granizo aportan pruebas de que los movimientos atmosféricos son más importantes de lo que se creía para su dispersión; por lo tanto, las microalgas subaéreas forman parte de las partículas suspendidas en la atmósfera.

Edmons (1979) señala, por otra parte, que la transferencia de algas y de otros microorganismos a la atmósfera en las zonas urbanas, se debe entre otras cosas a la actividad vehicular, emanaciones industriales de partículas, plantas de tratamiento de aguas residuales, rastros, etc.

Las microalgas son importantes tanto por su amplia distribución y abundancia, como por ser el primer eslabón en la cadena trófica, además de asimilar el bióxido de carbono y liberar oxígeno. Su uso actual incluye el tratamiento de aguas residuales, producción de combustible y alimento. Sin embargo, el potencial del cultivo masivo podría extenderse en un futuro, a la producción de sustancias químicas importantes para el sector industrial (Cohen, 1986; Richmond, 1990).

La idea del cultivo masivo de microalgas fue introducida en Alemania y empleada en la producción de lípidos almacenados por diatomeas (Harder y Von Wtsch 1942 citados por Richmond, 1990). Los estudios más extensos se iniciaron a partir de los años 50's y buscaron, en primera instancia, la aplicación comercial de cultivos masivos y a gran escala.

Más tarde, Tamiya (1957) -del Instituto de Biología en Tokugawa, Tokio- introdujo el cultivo de *Chlorella* como parte de un proyecto internacional, permitiendo que Japón fuera el primer país en comercializar microalgas en forma de píldora y extracto soluble a partir de 1960.

La investigación y producción de microalgas con fines de alimentación humana fue desarrollada por otros países como Estados Unidos, Alemania, Checoslovaquia, Israel, China y Bulgaria. Sin embargo, la avanzada tecnología requerida y los altos costos de producción imposibilitó su avance a nivel industrial. Por ello, en la actualidad se buscan alternativas, como el diseño de sistemas múltiples, donde se obtenga una biomasa de algas y bacterias cultivadas en plantas de tratamiento de aguas residuales, con el



propósito de alimentar a bivalvos y peces filtradores, empleados a su vez para el consumo humano. Se genera así, un procedimiento reductible (Durrant, 1969; Darley, 1987).

Las microalgas, son componentes esenciales de la dieta natural de bivalvos como almejas, ostras y mejillones; larvas de algunos gastrópodos marinos (*Abaloni*); larvas de camarones (*Penaeus*) y algunos peces (tilapia y carpa). Además constituyen el alimento del zooplancton, este último es empleado, a su vez como alimento vivo para las crías de numerosos peces de agua dulce y marinos (Ukeles, 1975).

De esta manera, el alimento vivo -fitoplancton y zooplancton- ofrecen una alternativa como base en la producción comercial y es llevada a cabo con éxito en Japón, donde se mantienen cultivos masivos de microalgas para alimentar rotíferos (*Brachionus*), copépodos (*Tigriopus*), cladóceros (*Daphnia*) y anostracos (*Artemia salina*). Las investigaciones muestran que el suplemento algal incrementa en forma significativa, la supervivencia de las crías de peces y larvas de moluscos (Watanabe, 1983; Gendrop, 1986).

Entre las algas más utilizadas en acuicultura podemos mencionar los siguientes grupos. Para Bacillariophyceae: *Phaeodactylum tricornutum* y *Skeletonema costatum*; Chlamydomonadaceae: *Chlamydomonas* sp.; Chrysophyceae: *Tetraselmis suecica*; Gymnodiniaceae: *Gymnodinium splendens*; Haptophyceae: *Pavlova lutheri* e *Isochrysis galbana* y Chlorophyceae: *Dunaliella* sp, *Chlorella* sp, *Scenedesmus* sp y *Chlorococcum* sp. (Torreterra, 1989; Paniagua et al., 1989).

Las características deseables de una cepa algal incluyen su alto valor nutricional, nula toxicidad, fácil acceso de captura y bajos costos de producción. Por otra parte, las cepas utilizadas en sistemas de cultivo a cielo abierto, deben presentar amplios intervalos de respuesta para adaptarse a las variaciones anuales de luz y temperatura, ya que los cambios en la intensidad luminosa, pueden inhibir la división celular por insuficiencia o por fotoinhibición. Esta última se manifiesta al sobrepasar la intensidad de saturación ( $I_s$ ) y, por ende, la capacidad fotosintética de las células en cultivo. A su vez, la  $I_s$  es afectada por la temperatura; con base en este parámetro, las cepas pueden clasificarse en mesofílicas o termofílicas.

Una cepa mesofílica muestra un crecimiento poblacional favorable en todos los meses del año, pero con una disminución en verano. En contraste, las cepas termofílicas presentan gran actividad en los meses de verano, pero no así en invierno. Por lo tanto, para obtenerse altas cosechas en zonas donde las variaciones de temperatura e intensidad luminosa son amplias durante el año, debe analizarse el potencial de diferentes cepas en sistemas de producción y su caracterización a través del tiempo para una mejor selección (Richmond, 1986).

## ANTECEDENTES

### 1.- AEROBIOLOGIA

Es importante puntualizar que los trabajos hasta hoy referidos al aislamiento y caracterización de algas provenientes de la atmósfera, han tenido la finalidad de establecer las relaciones que existen entre la biota aérea y las condiciones ambientales.

Los trabajos sobre aerobiología de las algas efectuados en México se han desarrollado principalmente en el Instituto de Ciencias de la Atmósfera UNAM. Rivera (1985) realizó el aislamiento de 3 Cyanophyta y 4 Chlorophyta a partir de muestras de lluvia y aire colectadas entre los meses de junio, julio y agosto de 1982. De acuerdo con sus resultados, determinó a *Chlorogloea microcystoides*, *Plectonema gracillimum*, *Chlorella saccharophilla*, *Phormidium jenkelianum*, *Chlamydomonas agloeformis*, *Scenedesmus acutus* y *Botryokoryne simplex*.

Más tarde, Rosas et al. (1987) realizaron muestreos atmosféricos en la Ciudad de México que abarcaron los meses de julio y agosto de 1982 y el periodo de julio a diciembre de 1985. Registraron 11 especies unicelulares, distribuidas en: Chlorophyta (87%) y Cyanophyta (13%). Los organismos aerotrasportados más comunes fueron: *Botryokoryne*, *Scenedesmus* y *Chlorella*. Las concentraciones más altas de microalgas se registraron en días nubosos, bajo humedades relativas de 30 al 60% e intervalos de temperaturas de 9 a 23°C. Por último, los autores sugieren que existe una relación directa entre la velocidad del viento y el número de organismos encontrados.

Caballero (1988) contribuye con doce especies de la división Chlorophyta y seis pertenecientes a Cyanophyta colectadas en zonas urbanas de México. A partir de la determinación, descripción, forma de vida, tamaño, morfología y tipo de cubierta celular, concluye que las especies cumplen o se aproximan a las características "ideales" para ser aerotransportadas.

Finalmente, Rosas et al. (1989) efectuaron muestreos atmosféricos en la Ciudad de México y Minatitlán, Veracruz; encontrando una diversidad similar a pesar de la diferencia de altitud registrada para ambas ciudades. Los géneros dominantes en ambas localidades fueron: *Scenedesmus*, *Chlorella* y *Chlorococcum*. De las doce especies colectadas en la ciudad de México: *Scenedesmus acutus*, *Chlorococcum diplobioticum* y *Chlorella vulgaris* registraron los porcentajes más altos de frecuencia con 42.2%, 24.4% y 8.8% respectivamente.

## 2.- TAXONOMIA DEL GENERO *Chlorella*

La determinación taxonómica de las especies dulceacuícolas se basa en criterios morfológicos: tamaño, forma celular, tipo de cloroplasto, visibilidad del pirenoide, forma, tamaño y modo de liberación de las autósporas. Sin embargo, a pesar de las descripciones resulta difícil adaptar las características de cada especie en la elaboración de claves taxonómicas adecuadas, debido al marcado pleomorfismo que presenta el género, en respuesta a diferentes condiciones ambientales y/o de cultivo.

Las primeras investigaciones, llevadas a cabo por Kessler y Soeder (1962), se orientaron al uso de pruebas bioquímicas como criterio taxonómico en la determinación de las especies. Evaluaron en primera instancia la actividad de la hidrogenasa, formación de carotenoides secundarios y la presencia de pectina en la pared celular de diferentes cepas cultivadas. A partir de ello, se establecieron cuatro grupos.

Shihira y Krauss (*in* Fott y Nováková 1969) reconocen 20 especies y 8 variedades de 41 aislamientos, con base en la respuesta fisiológica de crecimiento al utilizar diferentes fuentes de carbohidratos, nitrógeno y otros compuestos en el medio de cultivo.

Asímismo, Fott y Nováková (1969) describen con detalle nueve especies -entre ellas *Chlorella vulgaris*- y aportaron claves de identificación basadas en criterios morfológicos como forma, pared celular, cloroplasto, presencia o ausencia del pirenoide, número y tamaño de las autósporas, modo de liberación y dimensiones celulares. De acuerdo con los autores, estas claves facilitan la determinación confiable de las cepas en cultivo por lo menos hasta especie, pero es necesario recurrir a criterios bioquímicos y fisiológicos para distinguir taxa infraespecíficos, donde los criterios morfológicos son insuficientes.

Las especies dulceacuícolas de *Chlorella* poseen células esféricas o elipsoidales, un ciclo de vida simple y modestos requerimientos nutricionales. Pueden localizarse en aguas oligotróficas, en ciénagas distróficas, en manantiales minerales, en mucílago de algas coccoidales y en hábitats subaéreos: rocas, corteza, suelo, en materiales de construcción y como ficobionte en líquenes (Fott y Nováková 1969).

En México, *Chlorella* se ha encontrado en diferentes ambientes acuáticos: lagos, lagunas, canales, estanques acuáticos y piscícolas. Particularmente, *Chlorella vulgaris* se ha localizado en la laguna Victoria ubicada en el Estado de México, en la laguna de estabilización Obregón, Ciudad de México y en el estanque recreativo de Chapultepec, D.F. (Ortega et al. 1995). Para los ambientes subaéreos se han registrado: *Chlorella vulgaris*, *Chlorella saccharophila* y *Chlorella luteoviridis* (Rivera, 1985; Caballero, 1988 y Rosas et al. 1987 y 1989).

### 3.- EMPLEO DE MICROALGAS EN ACUACULTURA

Las investigaciones referidas al empleo de microalgas en acuicultura se centran en tres aspectos básicos. El primero, en obtener la máxima eficiencia de los cultivos como alimento; en segundo término, la optimización de los sistemas de producción, y por último, evaluar la calidad nutricional de las microalgas.

Desde el punto de vista de la eficiencia de los cultivos se estudia la respuesta fisiológica de los organismos alimentados. Snell et al. (1983) evalúan el efecto de dietas mixtas o unialgales de *Chlorella sp*, *Dunaliella tertiolecta* y *Schizothrix calcicola* en poblaciones del rotífero *Brachionus plicatilis*. Las dietas mixtas a base de *Schizothrix-Chlorella* incrementaron los intervalos de crecimiento poblacional, 7.2 veces más comparada con dietas monoalgales. En comparación, otra dieta mixta de *Chlorella-Dunaliella* no registra incremento en forma significativa, y suponen se debe a la presencia de una sustancia en *Schizothrix* que actúa como un factor de crecimiento.

Gendrop et al. (1986) analizan los cambios en el factor de condición de ostiones adultos (*Ostrea edulis*); al ser alimentados con una concentración constante de  $10 \times 10^3$  cel/ml. del alga *Tetraselmis suecica* y un suplemento preparado de almidón de maíz. Los resultados señalan que dicha concentración de algas no fue suficiente para evitar el bajo peso de los ostiones.

Trujillo y Arroyo (1991) analizan la mortalidad y esperanza de vida del copépodo *Acartia californiensis*, usando una dieta mixta de *Isochrysis tahitiana* y *Tetraselmis sp*. Ellos, concluyen que el alimento fue adecuado pero no óptimo, debido probablemente al tamaño de las células algales que influyeron sobre la eficiencia de filtración, ya que el copépodo experimenta cambios de alimentación dados por variaciones morfológicas en sus apéndices cefálicos, registrados durante su ciclo de vida y "periodos críticos" (eclosión y mudas).

En cuanto a la optimización de los sistemas de cultivo Ortiz y Garduño (1985), Spektorova et al. (1986), Trotta (1981), Geldenhuys et al. (1988), James y Al-Khars (1990) y Pacheco et al. (1991) evaluaron la respuesta de las microalgas bajo diferentes condiciones ambientales y modificaciones del medio; con el propósito de reducir los altos costos de producción y obtener valores máximos de rendimiento.

Con respecto a la calidad nutricional de las microalgas se citan diversos autores, entre ellos: Watanabe et al. (1983) analizaron las cualidades nutricionales de organismos empleados como alimento vivo en acuicultura para la propagación de peces. ellos emplearon cepas de *Chlorella vulgaris* tanto dulceacuícola como marina y por otra parte levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) en la crianza de rotíferos; en ellos, los contenidos proximales de minerales, proteínas y ácidos grasos presentes indicaron que los ácidos grasos esenciales aportados por las microalgas vía los rotíferos, influyeron en forma significativa sobre el valor

dietético de las larvas de peces; en contraste con el aporte nutricional de la levadura.

La explicación del por qué los cultivo de rotíferos alimentados con *Chlorella vulgaris* presentaron un valor nutricional superior en contraste con aquellos alimentados con levadura, se halla en que ambas fueron evaluadas con respecto a los contenidos de ácidos grasos transferidos. Los rotíferos alimentados con levadura presentaron valores inferiores de ácidos grasos de la serie (W3 HUFA), en particular el 20:5W3 (ac. eicosapentanoico) y altos valores de ácidos grasos monoenoicos de las series 16:1 y 18:1. En comparación, los alimentados con *Chlorella vulgaris* contenían gran cantidad de 20:5W3, uno de los ácidos grasos esenciales reportado para peces marinos. Estos resultados demostraron porque los cultivos de rotíferos alimentados con *Chlorella* presentaron un valor nutricional superior, provocando tasas bajas de mortalidad en larvas de peces.

James y Abu-Rezeq (1988) investigaron los efectos sobre el contenido de ácidos grasos y producción del rotífero *Brachionus plicatilis*, al utilizar como alimento diferentes densidades de *Chlorella sp.* aislada y de *Chlorella capsulata* proveniente de un cultivo intensivo. Los resultados mostraron que las cualidades nutricionales del rotífero dependen no sólo de la densidad, sino también del contenido y grado de insaturación de los ácidos grasos presentes en la microalga. En particular, eso fue cierto para los ácidos grasos serie W3 con más de 20 átomos de carbono encontrados en la cepa de *Chlorella capsulata*, que resultaron adecuados en contraste con la cepa MFD-*Chlorella*, cuyo contenido de estos ácidos grasos fue menor. Esta variación en la concentración de ácidos grasos entre ambas cepas se manifiesta -de acuerdo con los autores- en respuesta a fluctuaciones de salinidad, altas temperaturas, intervalos e intensidades de luz y diversas fuentes de nutrimentos requeridos en particular para cada cepa en cultivo.

Fábregas et al. (1985) evaluaron la respuesta de un cultivo masivo de *Tetraselmis suecica*, al aumentar las concentraciones de nitrato de sodio y su efecto sobre los contenidos de proteínas, carbohidratos, clorofila y RNA.

Fábregas et al. (1989) cultivaron *Dunaliella tertiolecta*, para evaluar los cambios en la concentración de proteínas y carbohidratos, al utilizar diferentes fuentes y concentraciones de nitrógeno (nitrato, nitrito y urea).

Molina (1991) determinó la composición química proximal de *Isochrysis galbana* y *Tetraselmis chuii* en cultivo bajo condiciones experimentales. El estudio reveló una concentración promedio en proteínas de 18 a 24%, para lípidos de 14 a 36% y para carbohidratos 4 a 21%. Los aminoácidos determinados fueron alanina, isoleucina, ácido aspártico y glutámico. En relación al contenido de ácidos grasos, predominaron el ácido oleico y palmítico.

Herrero et al. (1991) evalúan la composición química de proteínas, carbohidratos y lípidos en cuatro especies de microalgas

marinas cultivadas en diferentes medios de cultivo. Los valores máximos de proteína/cél. fueron: 32.22 pg/cél. para *T. suecica*; 18.82 pg/cél para *D. tertiolecta* Y 9.57 pg/cél. para *I. galbana* (obtenidos en el medio Algal-1) y 5.21 pg/cél. para *P. tricornutum* (en medio Walne).

Los valores máximos de carbohidratos por célula se presentaron en el medio Algal-1 para *T. suecica*, con 8.83 pg/cél; cultivo f/2 para *D. tertiolecta* e *I. galbana*, con 17.91 y 5.59 pg/cél respectivamente, y medio Walne para *P. tricornutum*, con 9.20 pg/cél.

Los lípidos constituyeron la fracción celular más constante para todas las especies en los diferentes medios de cultivo. Para *T. suecica*, los valores fueron entre 1.04 a 8.65 pg/cél; entre 18.18 y 23.94 pg/cél. para *D. tertiolecta*; entre 20.68 y 28.38 pg/cél para *I. galbana* y entre 5.52 y 6.45 para *P. tricornutum*.

En México, a partir de la década de los 60's se desarrollaron diversos tópicos sobre el cultivo de microalgas llevadas a cabo por Santillán (1968), Alfonso y de la Cruz (1975), Palacios et al. (1977 a, b), Mason y Aviles (1980), Martínez (1983), Torrentera (1983), Ortíz y Garduño (1985), Díaz (1987), Chávez (1989) y Molina (1991).

De acuerdo con los antecedentes aquí expuestos, se consideró necesario aportar información sobre aspectos ficológicos: historia de vida, fenología en cultivo y dinámica poblacional, como herramienta básica para establecer y caracterizar cepas monoalgales.

**Objetivo general:**

Realizar el aislamiento de *Chlorella vulgaris* a partir de muestras obtenidas de la atmósfera y caracterizarla en condiciones de cultivo no axénico.

**Objetivos particulares:**

Registrar la historia de vida y cinética poblacional en cultivo para la cepa *Chlorella vulgaris* Beijerinck.

Evaluar el contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos de la microalga.

Comparar estos valores con los reportados en la bibliografía y proponer su posibilidad de uso en acuicultura.

## METODO

Para la realización del presente trabajo se cubrieron las siguientes fases: 1.- aislamiento, 2.- caracterización de la historia de vida, 3.- cinética poblacional y 4.- evaluación de proteínas, carbohidratos y lípidos.

### 1.- AISLAMIENTO

#### A) Colecta y determinación

Las colectas fueron realizadas en la zona Norte del Estado de México, a través de dos técnicas de muestreo. Una de ellas mediante el uso de cajas de Petri, preparadas con medio de cultivo sólido Bold Basal y expuestas en posición vertical a la atmósfera, desde un automóvil en movimiento a 80 Km/hora durante un lapso de 20 a 30 seg; el procedimiento fue repetido en cada caja aumentando el intervalo de exposición hasta totalizar un minuto (Stein, 1979; Ortega et al. 1989). La segunda técnica se basó en colectas mediante el uso de "trampas de lluvia", utilizando matraces que contenían medio Bold Basal previamente esterilizado, colocados a una altura de 80 cm del suelo y expuestos a la lluvia en periodos que oscilaron entre 5 y 15 minutos (Maguire, 1963; Schlichting, 1985).

En el laboratorio, algunas de las muestras se revisaron al microscopio; las restantes fueron incubadas en condiciones estándar de cultivo, efectuando revisiones periódicas con el fin de seleccionar aquellas que manifestaron la presencia de microalgas, y de manera particular, de *Chlorella vulgaris*. Se consideró esta muestra como "cultivo crudo" del cual se inició el aislamiento. Para la determinación infragenérica se emplearon las claves de Fott y Nováková (1969) y Komárek-Fott (1983).

#### B) Aspersión y estriado en placa

El medio Bold Basal usado como sustrato en todas las fases experimentales se preparó a partir de soluciones patrón mantenidas en refrigeración.

Las cajas de Petri con medio de cultivo sólido fueron sembradas a partir del "cultivo crudo" mediante estriado y aspersión en placa. En el método de aspersión en placa, la muestra algal se esparce sobre la superficie de la caja de Petri, usando una fuente de aire.

Con éste propósito, se utilizó un dispositivo que consistió en fijar una pipeta sobre una superficie sólida, con la punta de la pipeta libre sobre el borde y conectarla a una fuente de aire para crear un rocío fino. Enseguida, las cajas de Petri que contenían medio de cultivo se colocaron en forma perpendicular a la pipeta a una distancia aproximada de 20 cm. Posteriormente, se tomó una suspensión del "cultivo crudo" con una pipeta que fue colocada



cerca de la pipeta aspersora; de esta manera, la suspensión algal es distribuida sobre toda la superficie del agar. Este procedimiento se llevó a cabo en una área previamente esterilizada (Stein, 1979).

Para ambas técnicas, las cajas de Petri, una vez sembradas, se incubaron en condiciones de iluminación con intensidades promedio de  $10.02 \text{ Wm}^{-2}$  PAR ó  $46.04 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  PAR, equivalentes a 3407 lux, empleando cuatro lámparas de 20 W (luz de día) colocadas a 3cm de los cultivos, con fotoperíodo de 12:12 y temperatura ambiente; esta última, registrada mediante termómetro de máximos y mínimos. El material empleado fue esterilizado mediante calor húmedo a 15 libras/pulgada<sup>2</sup> de presión durante 15 minutos. Como prueba de esterilidad se usaron tubos y cajas testigo.

### C) Selección de unidades algales

Una vez registrado el crecimiento de colonias a simple vista, se revisarán al microscopio estereoscópico y se escogieron diferentes colonias. A su vez, éstas fueron revisadas al microscopio óptico para iniciar la selección de aquellas unidades algales correspondientes a *Chlorella vulgaris*.

Las colonias seleccionadas se transfirieron con ayuda de una pipeta Pasteur a tubos con medio líquido. Posteriormente, los tubos se colocaron en la cámara de cultivo hasta apreciar el cambio de color en el medio. Se repitieron las técnicas de aspersión, estriado en placa y selección de unidades algales, hasta asegurar la obtención de un cultivo monoalgal (Palacios et al. 1977; Arriola, 1982).

### D) Mantenimiento de la cepa

El monocultivo fue inoculado en tubos de ensaye mediante la técnica de dilución seriada ( $1:10^1$  a  $1:10^5$ ) en dos líneas de dilución. En forma paralela, se hicieron inoculaciones en cajas de Petri y tubos de ensaye con medio solidificado, que -una vez incubadas hasta apreciar crecimiento algal sobre toda la superficie del medio- fueron conservadas en refrigeración. Las transferencias se realizaron de acuerdo con el tiempo y condiciones establecidos por Paniagua et al. (1989).

## 2.- CARACTERIZACION DE LA HISTORIA DE VIDA

La fase de caracterización se inició con los registros de la forma, textura, color y tamaño desarrollado por las colonias en medio sólido. Posteriormente, a nivel microscópico se registraron las dimensiones celulares, forma, morfología del cloroplasto, tamaño y forma de liberación de las autósporas. Además de elaborar esquemas en cámara clara, que ilustran la historia de vida y fenología de la cepa en cultivo (Round, 1981).

### 3.- CINETICA POBLACIONAL

Para cubrir esta etapa se iniciaron bioensayos en volúmenes de 50ml, con el fin de promover un periodo de adaptación a las condiciones imperantes en la cámara de cultivo y establecer el tiempo en qué se obtendría un inóculo adecuado para volúmenes de 500ml. Las experiencias indicaron que intensidades menores a los 1500 lux ( $4.41 \text{ Wm}^{-2}$  PAR o  $20.3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  PAR), prolongaron la fase de inducción en los cultivos por más de 15 días. Se alcanzó en la fase exponencial una concentración máxima de  $9 \times 10^6$  cel/ml.

Los cultivos de 300 ml sometidos a las mismas intensidades presentaron aglutinación y precipitación celular que hizo imposible continuar con el conteo directo en cámara de Neubauer. Las células vistas al microscopio no presentaron cambios en su morfología. Sin embargo, la coloración de las células fue más oscura con respecto a aquellas provenientes de cultivos incubados a intensidades del orden de los 3500 lux. Todo ello sugirió un aumento en la cantidad de clorofila como respuesta general de las microalgas ante condiciones de baja intensidad luminosa (Dubinsky et al. 1986 in Richmond, 1990).

Después de realizar los ajustes necesarios en la cámara de cultivo, asegurando una intensidad promedio a los 3500 lux en volúmenes de 50ml; se registraron concentraciones máximas de  $30 \times 10^6$  cel/ml, alcanzando la fase exponencial en un período máximo de 7 días, tiempo seleccionado para obtener los inóculos.

Terminados los bioensayos, los cultivos experimentales se efectuaron por triplicado en botellas de 700ml, con 500ml de medio. Una vez inoculados, los cultivos fueron mantenidos en una cámara a temperatura ambiente, con aireación continua mediante bomba peristáltica y bajo iluminación con intensidades promedio de  $10.02 \text{ Wm}^{-2}$  PAR o  $46.04 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  PAR, equivalente a 3407 lux. La luz fue proporcionada por cuatro lámparas de luz de día de 20W, manteniendo un régimen de luz-obscuridad 12-12 horas. La densidad inicial de *Chlorella vulgaris* sembrada en cada cultivo fue de  $1 \times 10^6$  cel/ml. El crecimiento de los cultivos se determinó por conteo directo en cámara de Neubauer hasta alcanzar la fase estacionaria, calculándose la velocidad de crecimiento, tiempo de duplicación, producción diaria, variación porcentual de la concentración celular y la representación gráfica de la curva de crecimiento resultante. La valoración de los parámetros poblacionales mencionados fueron determinados con base a las ecuaciones establecidas por Guillard y Ryther (1973), Strickland y Eppley (1968).

### 4.- EVALUACION DE LOS CONSTITUYENTES QUÍMICOS

Una vez alcanzada la fase exponencial de crecimiento, las células algales fueron cosechadas, recuperadas por centrifugación y nuevamente resuspendidas en agua destilada.

La suspensión obtenida fue colocada posteriormente en un dispositivo mecánico llamado Braun; el cual provoca la ruptura celular por trituración al utilizar junto con la suspensión, perlas de vidrio (Bu'lok y Kristiansen 1991).

El extracto fue nuevamente centrifugado y, después de

descartar las pastillas, las concentraciones de proteínas y carbohidratos fueron determinados en el sobrenadante usando técnicas espectrofotométricas. Las proteínas se determinaron mediante el método de tinción-ligadura y los carbohidratos por el método del ácido fenol-sulfúrico descritos por Kochert (1978). En cuanto a los valores de lípidos, éstos se determinaron por diferencia de peso mediante el método de Soxlet usando como disolvente cloroformo. Todas las evaluaciones se realizaron por triplicado.

El método de tinción-ligadura, se basa en la unión establecida entre el colorante (commassie azul brillante) y la proteína presente en la muestra. Al formarse el complejo proteína-colorante, se tiene un alto coeficiente de extinción, dando gran sensibilidad a la prueba y fácilmente adaptable a micrométodos. Por otra parte, se utilizan reactivos muy comunes en laboratorio y es aproximadamente cuatro veces más sensible que el método estandar de Lowry (Kochert, 1978).

El método del ácido fenol-sulfúrico, es utilizado para la determinación colorimétrica de glucosa, polisacáridos y azúcares metilados. La técnica resulta sencilla, rápida y de alta sensibilidad. El color desarrollado por la reacción es muy estable y no es afectado por las proteínas presentes en la muestra problema.

## RESULTADOS

### 1.- AISLAMIENTO

A partir de los muestreos atmosféricos, se determinaron un total de siete taxa: cuatro de la división Chlorophyta: *Chlorella vulgaris*, *Chlorococcum sp.*, *Scenedesmus acutus* y *Ulothrix tenerrima*; dos que corresponden a la división Cyanophyta: *Tolypothrix phyllophila*, *Pseudoanabaena cf. catenata* y una especie para Chromophyta: *Hantzchia amphioxix*.

La mayoría de estos organismos fueron formas de vida libre, unicelulares y tres mostraron organización filamentosa. De estos taxa, se observó la dominancia en todas las muestras de lluvia; del grupo de las Chlorophyta, en particular de especies como *Chlorella vulgaris*, *Chlorococcum sp.* y *Scenedesmus acutus*.

Por otro lado, el método por exposición de placas a la atmósfera presentó resultados negativos en todos los muestreos. No se obtuvo desarrollo de unidades algales durante la incubación de las Cajas de Petri. Se observó, en cambio, la proliferación de bacterias y hongos, los cuales no fueron determinados por considerarse ajenos a los objetivos planteados para esta investigación.

Las técnicas de aspersión y estriado en placa para el aislamiento permitieron obtener la cepa de *Chlorella vulgaris* a partir de "cultivos crudos", en un lapso de 30 días. En cuanto a las ventajas de una y otra técnica, el método de aspersión en placa favoreció más la separación entre las colonias algales desarrolladas sobre la superficie del agar, facilitando su manipulación.

Una vez obtenida la cepa de *Chlorella vulgaris* se modificó el mantenimiento citado en la bibliografía, usando un sistema de aireación continua mediante bombas peristálticas aplicado a volúmenes de 50 ml., hasta alcanzar la densidad celular deseada.

Asimismo, para el caso de las cepas de *Chlorococcum sp.* y *Scenedesmus acutus*, se manipularon por agitación manual.

### 2.- CARACTERIZACION

#### a) Historia de vida (fig. 1)

Las colonias de *Chlorella vulgaris* desarrolladas en medio sólido mostraron en su mayoría formas circulares con diámetro promedio de dos milímetros, superficie lisa y una coloración verde clara. El aspecto es diferente en comparación con la superficie granulosa y tonalidades verde oscuras presentadas por otras colonias correspondientes a *Chlorococcum sp.* y *Scenedesmus acutus*.

Las células de *Chlorella vulgaris* cultivadas en medios líquidos y sólidos, presentan una pared celular bien definida, carente de ornamentaciones en todos los estadios de vida. Las células jóvenes y adultas muestran, en su mayoría, un plasto en forma de copa que cubre casi la totalidad de la periferia celular, dejando sólo una parte al descubierto. Las células jóvenes con formas subesféricas de 2.6-3.9  $\mu$  de ancho y de 3.9-4.6  $\mu$  de largo; al madurar, cambian a formas esféricas con un diámetro máximo de 5.3  $\mu$ . En estado adulto, inician el proceso de división formando esporangios que contienen de dos a cuatro autósporas de idéntico tamaño. (según se observa en la fig. 1, # 9, 15-18). La mayoría de estas autósporas, muestran al liberarse, una forma ligeramente triangular, debido probablemente a su disposición apretada en el esporangio (fig. 1, # 22). En las autósporas, el cloroplasto tiene generalmente forma de banda en posición parietal. Después de la liberación de las autósporas, la pared de la célula madre puede permanecer adherida por corto tiempo a las autósporas, para después desprenderse y permanecer en el medio quedando de dos a cuatro fragmentos cóncavos (fig. 1, #27).

Conforme la célula envejece, el aumento en tamaño de las vacuolas, hace que se desplace el cloroplasto, dejando una gran parte de la célula al descubierto (fig. 1, #25, 26). El pirenoide es visible en todos los estadios celulares, ubicándose a lo ancho de la abertura del cloroplasto y presentando tres gránulos o reservorios de almidón en forma de copa.

-----

**Fig. 1. Historia de vida registrada para *Chlorella vulgaris***

- 1-3 Células vegetativas, observe el cloroplasto en forma de copa. 5 a 5.3  $\mu$ m de diámetro.
- 4-8 Formación del esporangio. 5 a 6.5  $\mu$ m de diámetro.
- 9 Esporangio que muestra dos autósporas de idéntico tamaño; cloroplasto en forma de banda.
- 10-14 Liberación de las autósporas, observe como la pared de la célula madre permanece adherida a las autósporas. 3 a 3.3  $\mu$ m en el eje axial largo.
- 15-18 Esporangios. Observe el cloroplasto en forma de banda en las autoesporas # 17.
- 19-22 Liberación de las autoesporas, el # 22 muestra las autoesporas con forma ligeramente triangular.
- 23 Célula vegetativa joven.
- 24 Célula vegetativa adulta.
- 25-26 Célula vegetativa vieja, observe el desplazamiento del cloroplasto dejando una gran parte de la célula al descubierto
- 27 Restos de la pared de la célula madre formando 2 a 4 fragmentos cóncavos que permanecen en el medio de cultivo sin disolverse.

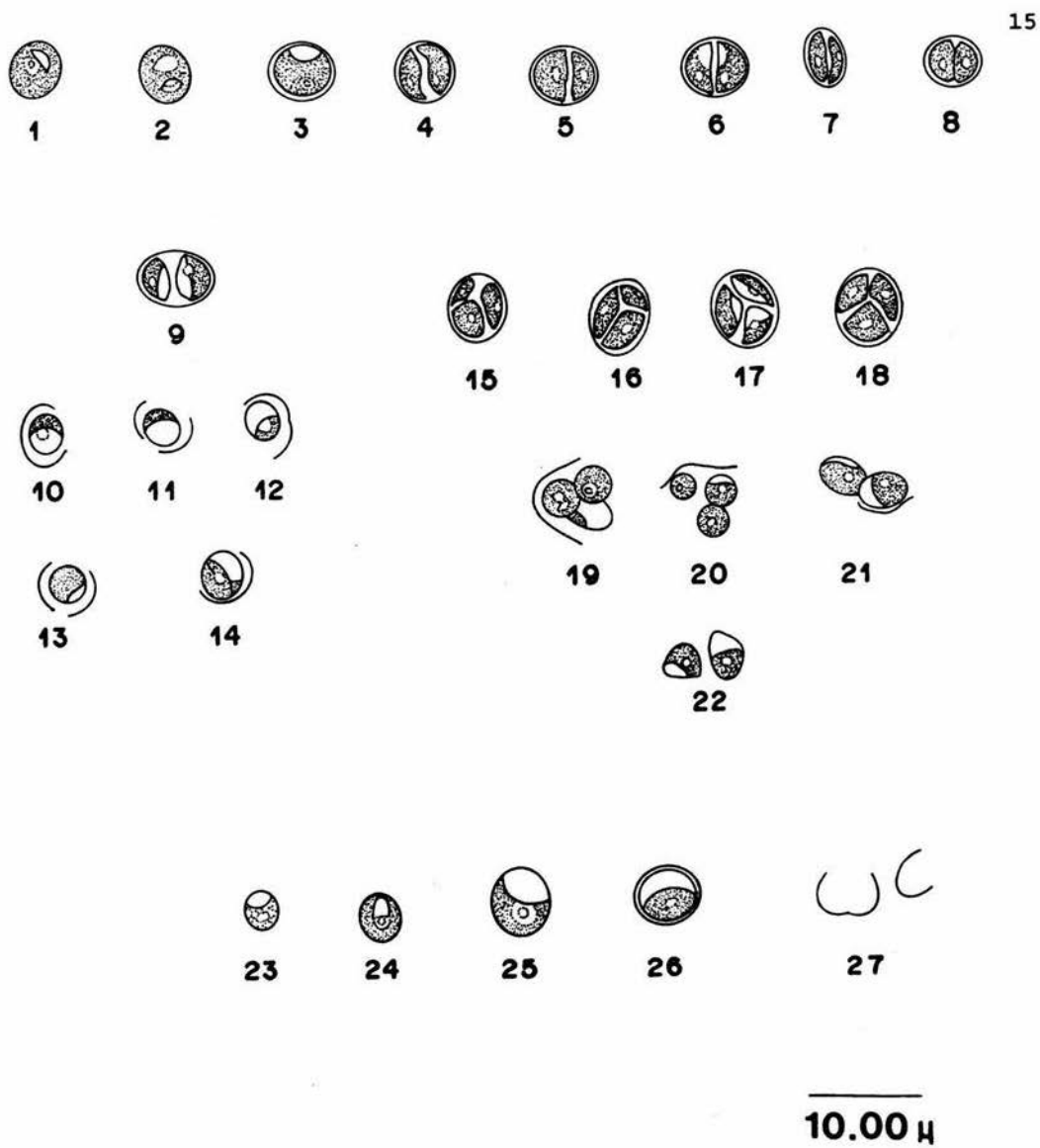


Fig. 1. Historia de vida registrada para *Chlorella vulgaris*

### 3.-CINETICA POBLACIONAL (figs. 2A y 2B)

La fase de inducción o adaptación se llevó a cabo en dos días, para continuar -a partir de éste- la fase de crecimiento exponencial con una duración de siete días y donde se alcanzó una concentración máxima de  $33.3 \times 10^6$  cél/ml. Posteriormente, la fase estacionaria fue registrada por varios días, donde se mantuvo la concentración de células con variaciones moderadas. En esta etapa se alcanzó la máxima concentración celular, que fue de  $40.3 \times 10^6$  cél/ml.

Los resultados obtenidos de la cinética poblacional (**cuadro 1**) muestran que la fase exponencial de crecimiento registra un valor de 0.37 div/día como constante en la velocidad de crecimiento (**k**). La población se duplicó (**TD**) cada 0.81 días y con un número promedio de divisiones celulares (**D**) de 1.23 cél/día.

**CUADRO 1. Cinética poblacional**

FAS. EXP.	k	TD	D
7 días.	0.37 div/día	0.81 días	1.23 c/día

Finalmente, el **cuadro 2** indica los valores correspondientes a la producción diaria, en donde el valor máximo se registra en el octavo día de cultivo, con una concentración celular de  $8.4 \times 10^6$  cél/ml. En cuanto a la variación porcentual en la concentración celular por día (**VP**), se registran los valores más altos en los días 1, 8 y 9, con 160%, 62% y 34% respectivamente.

# CINETICA POBLACIONAL

*Chlorella vulgaris*

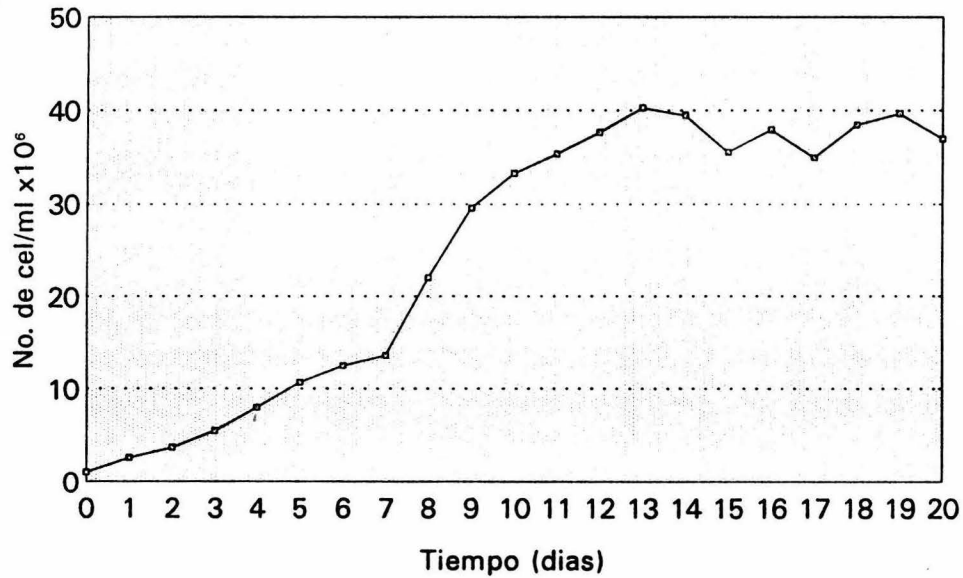


Figura 2A. Curva de crecimiento de *Chlorella vulgaris* en medio Bold-Basal.

$\eta = 98$



## CINETICA POBLACIONAL

*Chlorella vulgaris*

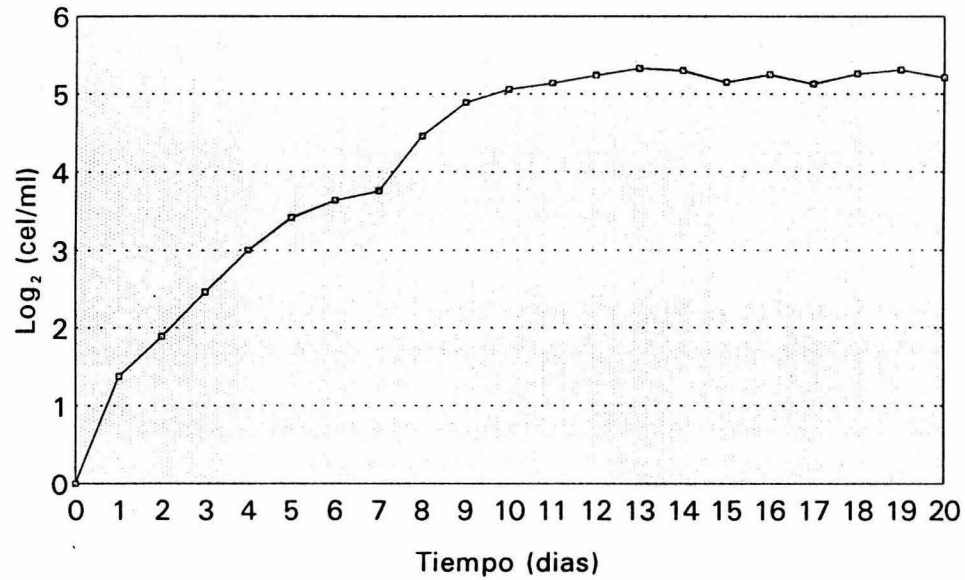


Figura 2B. Curva semilogarítmica en base 2, que ilustra las fases de crecimiento.

**CUADRO 2. Valores de producción y variación porcentual diaria registradas en cultivo**

t (días)	PD (c/ml)	VP (%)
1	1.6	* 160.0
2	1.1	42.3
3	1.8	48.6
4	2.5	45.2
5	2.7	33.7
6	1.8	16.8
7	1.1	8.8
8	* 8.4	* 61.8
9	7.6	* 34.5
10	3.7	12.5
11	2.1	6.3
12	2.3	6.5
13	2.6	6.9
14	-0.8	-2.0
15	3.9	-9.9

\* indica los valores máximos obtenidos en cada caso.

PD= producción diaria

VP= variación porcentual

#### 4.- EVALUACION DE LOS CONSTITUYENTES QUIMICOS

En el **cuadro 3** se exhiben los valores de proteínas, carbohidratos y lípidos obtenidos para la cepa *Chlorella vulgaris*. Estas evaluaciones se realizaron en la fase exponencial de crecimiento, hacia el 10° día de cultivo obteniéndose un valor de 24 pg/cél. de proteínas, 28 pg/cél. en carbohidratos y 6 pg/cél. en lípidos.

**CUADRO 3. Valores obtenidos del análisis bioquímico**

Proteínas pg/cel	Carbohidratos pg/cel	Lípidos pg/cel
24	28	6

## ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

### 1.- AISLAMIENTO

A partir de los taxa encontrados en las muestras de lluvia, las Chlorophyta fue el grupo de mayor dominancia, seguido de Cyanophyta y Chromophyta; este resultado corresponde con los publicados por Rosas et al. (1989). Sin embargo, dicho patrón aun no puede generalizarse, ya que la biota algal subaérea presente en otras regiones urbanas o rurales del país no ha sido investigada.

De los siete taxa determinados, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus acutus* y *Chlorococcum* sp. se mantuvieron constantes en todos los muestreos. Al respecto, Schlichting (1985) y Rosas et al. (1989) coinciden en que las algas más representadas en la atmósfera pertenecen a las Chlorophyta y el orden más frecuente corresponde a Chlorococcales.

Por otra parte, se incrementa el conocimiento en el campo de la aerobiología con tres nuevos registros: *Tolypothrix phyllophila*, *Hantzchia amphioxys* y *Pseudanabaena* cf. *catenata*; todas provenientes de habitats expuestos; la primera se presenta en charcos temporales y las dos restantes en suelo (Ortega, 1984).

Con respecto a las técnicas de muestreo, las trampas de lluvia permitieron cumplir con los objetivos planteados. En contraste, la exposición de placas con agar no fue satisfactoria. Esta situación puede atribuirse a que el intervalo de exposición fue insuficiente para permitir la adherencia de las células algales y, por otro lado, a las condiciones meteorológicas en el momento de la colecta. Tal resultado se debe probablemente, a que la velocidad y dirección del viento, la lluvia y la temperatura ambiental, favorecen la distribución y abundancia de las algas subaéreas (Schlichting 1985 y Rosas et al. 1989).

Por otra parte, para el establecimiento de cualquier sistema de cultivo, debe considerarse la disponibilidad de aquellas especies utilizadas con fines de producción. Esto se puede hacer efectuando aislamientos a partir de ambientes naturales o por adquisición de cepas mantenidas en colecciones. En el presente trabajo, la elección de un habitat de muestreo subaéreo permitió la obtención de un monocultivo no axénico en corto tiempo.

### 2.- CARACTERIZACIÓN DE LA HISTORIA DE VIDA

*Chlorella vulgaris* mostró una pared celular bien definida, sin ornamentaciones ni fragmentada. Las células jóvenes presentaron forma subsférica y en etapa adulta cambian a esféricas. Fue necesario teñir la células empleando lugol, a fin de observar claramente el pirenoide y determinar el número de gránulos de almidón. Las autoesporas y células jóvenes, las cuales fueron predominantes en la fase exponencial de crecimiento, presentaron cloroplastos en forma de cinta, cambiando a una forma de copa en el estadio adulto. Se observaron esporangios con dos y cuatro autoesporas; llama la atención, que este último fue observado preferentemente en la fase estacionaria de crecimiento, donde

se logró observar además, la mayoría de los estadios celulares.

La comparación de diferentes estadios celulares de la cepa a lo largo de su historia de vida y la descripción morfológica atribuida a *Chlorella vulgaris* por Fott y Nováková (1969), mostraron gran similitud y constancia bajo las condiciones de cultivo empleadas, sin observar cambios en la morfología que impidieran reconocer con facilidad la especie. Sin embargo, el pequeño diámetro de las células dificulta la distinción de las estructuras internas, debido sobre todo al límite de resolución del microscopio óptico empleado.

Kessler y Soeder (1962) propusieron que las características morfológicas y estructurales son insuficientes para la evaluación taxonómica infragenérica de *Chlorella*, debido al marcado pleomorfismo dependiente de las condiciones de cultivo.

Por otra parte, Fott y Nováková (1969) y Komárek-Fott (1983) sugieren que los criterios morfológicos resultan prácticos para el reconocimiento de las especies empleadas en estudios básicos y con aplicaciones económicas. Indican, además, que los criterios fisiológicos y bioquímicos pueden ser aplicados cuando se trata de distinguir taxa infraespecíficos.

Es importante añadir, que las claves fueron establecidas por dichos autores a partir del análisis de la morfología y ontogenia de diversas colecciones de cepas y aislamientos en diferentes hábitats (incluyendo subaéreos); las cepas se mantuvieron en cultivos masivos uniformes, tanto en laboratorio como a cielo abierto para conocer la variabilidad morfológica causada por cambios en las condiciones ambientales; de esta manera, se podían distinguir las características morfológicas que permanecieron constantes para cada una de las especies descritas.

### 3.-CINETICA POBLACIONAL

La curva de crecimiento obtenida en cultivo no axénico para *Chlorella vulgaris* describió las fases comunes que, de acuerdo con Fogg (1975), corresponden a cultivos de volumen limitado -Cultivo "Bach"- . La fase de inducción o de retraso, tuvo una duración de dos días al emplear un inóculo en fase exponencial, aproximado a  $1 \times 10^6$  cél/ml. y calculado para volúmenes de 500ml. El tiempo de duración de esta fase, dependió de la concentración de células viables y de la edad del inóculo llegando a cero al encontrarse en plena fase exponencial. Al incrementar la edad del inóculo también se incrementa la fase de inducción.

La fase exponencial, en la cual la multiplicación celular es rápida y el número se incrementa en progresión geométrica, es representada mediante la expresión:  $N = N_0 e^{kt}$  siendo  $k$  una medida de la eficiencia del crecimiento en poblaciones en las cuales las divisiones no están sincronizadas. El valor de  $k$  obtenido en cultivo, se basó en el incremento de la biomasa (número de células), que alcanzó una velocidad de 0.37 div/día, bajo intensidades de 3500 lux y con intervalos de temperatura de 15 a 30° C.

Sin embargo, es necesario determinar en estudios posteriores, la influencia de la intensidad luminosa sobre la velocidad de crecimiento de la cepa a intensidades mayores a los 3500 lux y bajo diferentes intervalos de temperatura; esto con objeto de calcular los valores próximos de saturación y evaluar su posibilidad de cultivo, sobre todo en sistemas a cielo abierto. De acuerdo con Richmond (1986), en la mayoría de las microalgas la constante relativa de crecimiento muestra algunas de las interrelaciones entre la intensidad luminosa y la tasa de fotosíntesis. Esta se incrementa de manera proporcional al aumentar la intensidad y la temperatura; no obstante, cuando los valores de saturación son alcanzados, decae. Por lo tanto, las máximas velocidades de crecimiento pueden lograrse a intensidades próximas a las de saturación, lo cual depende de la capacidad intrínseca de las especies y cepas en cultivo. Es posible inferir que, al encontrar los valores próximos a la intensidad de saturación para la cepa, se incrementa la velocidad de crecimiento y el número de divisiones celulares.

Si bien las tasas de crecimiento algal son reguladas por los parámetros ambientales y repercuten sobre la productividad del sistema en cultivo, se puede establecer la influencia de tres factores principales: la temperatura, la luz y el medio de cultivo; éstos a su vez determinan la variabilidad bioquímica de la microalga, característica que juega un papel importante para establecer el valor del material algal como una probable fuente de proteína, productos químicos o de alimento en acuicultura.

A partir del décimo día de cultivo, se registró la fase estacionaria, cuya duración se prolongó más de siete días sin mostrar un cambio brusco en la curva de crecimiento que indicara el inicio de la fase de muerte o decaimiento.

De acuerdo con Fogg (1975), la fase estacionaria en cultivos "batch" muestra gran variación, dependiendo del factor limitante involucrado.

Finalmente, los valores referidos a la velocidad de crecimiento, tiempo medio de generación, divisiones por día y variación porcentual presentados en esta investigación, son considerados como base de futuras investigaciones, enfocadas a encontrar las condiciones óptimas de cultivo y permitir comparaciones en cultivos similares, empleando cepas aisladas de ambientes subaéreos.

#### 4.- CONSTITUYENTES QUÍMICOS (proteínas, carbohidratos y lípidos).

Los trabajos sobre la composición química de las microalgas, en particular de cepas dulceacuícolas, es muy escasa con respecto a los generados sobre especies marinas (Ortega et al. 1995). Tomando en cuenta esta condición, los resultados fueron contrastados con valores obtenidos para algunas de las especies marinas, conocidas por su amplio uso en el campo de la acuicultura; en este caso: *Tetraselmis suecica*, *Dunaliella tertiolecta*,

*Isochysis galbana* y *Phaeodactylum tricornutum* (Herrero y Cid, 1991).

Es importante aclarar que la comparación es interpretada, sólo como referencia preliminar para conocer la condición bioquímica de la cepa en estudio, ya que la evaluación de los constituyentes químicos en las especies marinas se realizaron en cuatro medios de cultivo diferentes a intensidades luminosas próximas a las de saturación.

Por otra parte, las concentraciones de proteínas, carbohidratos y lípidos se presentan en unidades de picogramos por célula, con el fin de calcular el rendimiento alcanzado para dichos componentes por volumen de cultivo.

En el **cuadro 4** se muestran los datos sobre densidad celular y composición química de las microalgas, reportadas en la bibliografía y los valores experimentales obtenidos en el presente estudio.

La densidad celular de *Chlorella vulgaris* ( $33 \times 10^6$  cél/ml), indica un valor superior con respecto a las microalgas en todos los medios de cultivo, a excepción de la densidad alcanzada por *P. tricornutum* ( $39.04 \times 10^6$  cél/ml) en el medio Algal-1.

*Chlorella vulgaris* registró 24 pg/cél de proteínas, valor superior a los reportados para *D. tertiolecta*, *I. galbana* y *P. tricornutum*. Con respecto a *T. suecica*, presentó un valor semejante en tres de los medios de cultivo utilizados, a excepción del medio algal-1, donde el alga marina muestra un valor de 32.22 pg/cél.

Asimismo, la concentración de carbohidratos, con un valor de 28 pg/cél, es superior con respecto a los valores máximos reportados para las cuatro especies de microalgas marinas de referencia.

por último, la concentración de lípidos (6 pg/cél) es semejante al registrado para *P. tricornutum* e inferior con respecto al reportado para *T. suecica*, *D. tertiolecta* e *I. galbana*.

Como puede apreciarse, los valores obtenidos de proteínas y carbohidratos resultan superiores con respecto a las concentraciones reportadas para las cuatro microalgas. Este aspecto sugiere, una composición química aceptable tomando en cuenta las condiciones de cultivo empleadas.

Herrero y Cid (1991) sugieren, que la variabilidad en el contenido de proteína por célula en particular, debe considerarse como un factor importante al momento de diagnosticar el uso de la microalga sobre todo en acuicultura, ya que estos sistemas se ven afectados severamente por la variación en el contenido proteico.

Por otra parte, aunque la concentración de lípidos se ubicó dentro de los intervalos propuestos en la bibliografía -tal vez ligeramente inferior a la mayoría-, debemos tomar en cuenta que es uno de los componentes de mayor variación dependiente de las condiciones ambientales, del contenido de nitrógeno en el medio de cultivo y a la influencia del método de extracción incluyendo el rompimiento celular y los disolventes usados para dicho propósito (Cohen, 1986).

Finalmente podemos decir en forma muy general, que lo expuesto hasta el momento, en cuanto al comportamiento poblacional y bioquímico de la cepa en estudio -*Chlorella vulgaris*-, aportan datos preliminares y de referencia para futuros diseños experimentales. Tales diseños estarán encaminados en primera instancia, a evaluar con exactitud la respuesta fisiológica de la cepa para adaptarse a los factores ambientales como son la temperatura e intensidad luminosa, que además de controlar el crecimiento, son los que experimentan mayores variaciones tanto diarias como estacionales en cultivos exteriores. En forma paralela, evaluar las concentraciones de proteínas, carbohidratos y lípidos obtenidas en las diferentes fases del cultivo; para establecer en que momento se alcanzan las máximas concentraciones de algún componente en particular y calcular el rendimiento de la cepa en cultivo por unidad de volumen.

Es necesario además conocer en forma particular el valor químico y biológico de la proteína algal, así como el tipo de ácidos grasos insaturados presentes en la cepa. De esta forma, se podrá establecer con precisión el valor nutricional y en consecuencia determinar su eficiencia como alimento en acuicultura.

**CUADRO 4.** Densidad celular (Cel x 10<sup>6</sup> /ml y composición química pg/cel) de cuatro microalgas marinas creciendo bajo diferentes medios de cultivo. Tomado de Herrero y Cid (1992).

Especie	densidad celular	Proteínas	Carbohidra tos	Lípidos
<i>T. suecica</i>				
Walne	2.29	13.31	6.20	7.04
ES	2.58	16.98	6.93	7.22
f/2	2.38	21.75	8.37	7.92
Algal-1	4.11	32.22	8.83	8.65
<i>D. tertiolecta</i>				
Walne	4.04	13.37	13.22	22.28
ES	4.24	14.88	15.73	23.94
f/2	4.97	13.26	17.91	23.67
Algal-1	8.45	18.82	11.08	18.18
<i>I. galbana</i>				
Walne	10.11	5.17	4.28	25.95
ES	12.09	7.23	5.21	28.38
f/2	10.81	8.13	5.59	26.82
Algal-1	16.15	9.57	4.28	20.68
<i>P. tricornutum</i>				
Walne	19.01	2.65	6.42	6.51
ES	16.23	5.21	9.20	6.45
f/2	24.65	3.34	6.90	5.52
Algal-1	39.04	4.20	5.98	5.79

Densidad celular (celx10<sup>6</sup> /ml) y composición química (pg/cel) de *Chlorella vulgaris* cultivada, en medio Bold basal.

Especie	densidad celular.	Proteínas	Carbohidra tos	Lípidos.
<i>Chlorella vulgaris</i>	33.30	24	28	6



### CONCLUSIONES

- 1.- Con base en los cuatro muestreos efectuados en época de lluvias se determinaron un total de siete taxa; cuatro correspondientes a la división Chlorophyta, dos a la división Cyanophyta y uno para Chromophyta.
- 2.- De los organismos encontrados, la mayoría fueron formas de vida unicelulares y tres filamentosas. Estas últimas, representantes del orden Ulotrichales y Nostococcales.
- 3.- Se registran tres nuevas especies en el campo de la aerobiología de México: *Tolypothrix phyllophila*, *Hantzchia amphioxys* y *Pseudoanabaena* cf. *catenata*, provenientes de hábitats expuestos.
- 4.- De los taxa encontrados, se observó la dominancia del grupo de las Chlorophyta seguido de Cyanophyta y Chromophyta, resultado acorde con lo reportado en la bibliografía para este rubro.
- 5.- La inclusión de técnicas de muestreo atmosférico, sugiere una alternativa para la obtención y aislamiento de cepas monoalgales con posibilidades de uso en cultivos masivos.
- 6.- Con base en criterios morfológicos, el seguimiento de la historia de vida en cultivo de la cepa, permitió reconocer varios de los estadios celulares; atribuibles a la especie de *Chlorella vulgaris*.
- 7.- La cinética poblacional de la cepa *Chlorella vulgaris* mostró, en la fase exponencial una velocidad de crecimiento de 0.37 div./día, duplicándose la población cada 0.81 días y un promedio de divisiones celulares de 1.23 cél/día.
- 8.- La curva de crecimiento obtenida describe las fases típicas correspondientes a cultivos de volumen limitado. Después de un período de adaptación de dos días, se inició la fase exponencial con una concentración máxima de  $33.3 \times 10^6$  cél/ml hacia el 10mo. día de cultivo. La fase estacionaria se prolongó durante siete días sin observar que la curva declinara o se presentara la fase de muerte.
- 9.- Se observó que la intensidad luminosa por debajo de 1500 lux resulta insuficiente e inhibitoria para el cultivo. En este caso, la curva de crecimiento mostró la permanencia de la fase de adaptación y un bajo conteo celular.
- 10.- La cepa de *Chlorella vulgaris* cultivada en 500ml con medio Bold-Basal, bajo intensidades promedio de 10.02 Wm s PAR, aireación continua y temperatura ambiente, registró una concentración de 24 pg/cél de proteína, 28 pg/cél para carbohidratos y 6 pg/cél de lípidos.

- 11.- Los valores de los constituyentes anteriormente citados se encuentran dentro de los intervalos reportados para especies marinas, conocidas por su amplio uso en acuicultura.
- 12.- La comparación de dicho valores, sugiere una composición química proximal aceptable tomando en cuenta, las condiciones de cultivo manejadas.

#### RECOMENDACIONES

- 1.- Es necesario conocer los límites de tolerancia mínimo y máximo de la cepa de *Chlorella vulgaris*, bajo parámetros tales como la temperatura e intensidad luminosa, y determinar su amplitud de respuesta fisiológica. Este es un factor muy importante para establecer su posibilidad de cultivo, sobre todo en sistemas a cielo abierto. En forma paralela, registrar la fluctuación de las concentraciones de proteínas, carbohidratos y lípidos bajo diversos condiciones de cultivo.
- 2.- Si bien es de suma importancia la cantidad de proteína producida por el material algal, lo es también, la determinación del tipo de aminoácidos que la constituyen, es decir conocer el valor químico de la proteína y determinar su calidad nutricional. Por lo tanto se sugiere para efectos de investigaciones posteriores la realización de aminogramas. Así mismo, es recomendable evaluar el valor biológico de la proteína entendido como la fracción de nitrógeno retenido en el cuerpo para el crecimiento y mantenimiento de la síntesis celular. Estos índices en conjunto (valor químico y valor biológico) darán a conocer el valor nutricional de la microalga.
- 3.- Con respecto a los lípidos, es importante disponer de información sobre el tipo de ácidos grasos y conocer el grado de insaturación ya que de acuerdo a varios autores; los ácidos grasos altamente insaturados y en particular los ácidos: eicosanpentanoico (EPA) y linoleico son indispensables en los primeros estadios de vida de los peces además de ser requeridos para el crecimiento y sobrevivencia de las larvas.
- 4.- Dado que los trabajos sobre el cultivo de especies dulceacuícolas usadas en acuicultura es insuficiente, deben realizarse aislamientos y evaluaciones de diversas cepas, para poder seleccionar aquellas que muestren la mayor eficiencia de cultivo y calidad nutricional. Todo ello resultará en un adecuado apoyo para la propagación de especies dulceacuícolas de importancia comercial en México.

## BIBLIOGRAFIA

- Alfonso, E. y A. de la Cruz. 1975. Planctónicas marinas mediante fertilización. *Ciencias. Univ. Habana* 8(17):1-21.
- Arrijoa, R.V., 1982. Aislamiento, purificación y caracterización parcial de una cepa de una alga verde-azul fijadora de Nitrógeno. *Nostoc sp.* Tesis profesional. ENCB-IPN. México. 81 pp.
- Bu'Lock J. y B. Kristiansen. 1991. *Bioteología básica*. Ed. Acribia S.A. Zaragoza, España. pp. 181-182.
- Caballero, F.S.A., 1988. Aspectos de la Biología de ciertas especies de algas presentes en la atmósfera. Tesis profesional. Facultad de Ciencias UNAM. México. 66 pp.
- Chavez, S.F., 1989. Establecimiento de las mejores condiciones para el cultivo de las algas microscópicas *Isochrysis aff. galbana* Parke y *Tetraselmis chuii*, utilizadas como alimento en maricultura. Tesis profesional. ENEP Iztacala UNAM. México. 80 pp.
- Cohen, Z., 1986. Products from microalgae. In handbook of microalgae mass culture. Ed. A. Richmond. CRC Press, Florida, pp. 421-451.
- Darley, M., 1987. Biología de las algas. Enfoque fisiológico. Ed. Limusa. México D.F. pp. 225-230.
- Díaz, A.O.I., 1987. Cultivo y aislamiento de algas clorofíceas en aguas residuales. Tesis profesional. ENCB-IPN. México.
- Durrant, N.W. y C. Jolly, 1969. Green algae, *Chlorella*, as a contributor to the food supply of man. *Fishery Industriol Resersh* 5(2):67-82.
- Edmonds, R.L. 1979. *Aerobiología. The ecological systems approach*. Ed. Dowden, Hutchinson & Ross, Inc. Stroudsburg, Pennsylvania, 386 pp.
- Fábregas, J., C. Herrero, B. Cabezas y J. Abalde, 1985. Mass culture and biochemical variability of the marine alga *Tetraselmis suecica* Kylin (Butch) with high nutrient concentration. *Aquaculture* 49:231-244.
- Fábregas, J., J. Abalde, B. Cabezas y C. Herrero, 1989. Changes in protein, carbohydrates and gross energy in the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) by nitrogen concentration as nitrate, nitrite and urea. *Aquaculture* 8:223-239.

- Fogg, G.E., 1975. Algal cultures and phytoplankton ecology. second edition. University of Wisconsin Press, London. pp. 12-36.
- Fott, B. y M. Nováková, 1969. A monograph of the genus *Chlorella*. The freshwater species. In B. Fott (Ed.). Studies in Phycology. Praga acad. pp. 7-79.
- Gendrop, G., M.J. Duarte y J.R. Andrade, 1986. Experimentos de mantenimiento del ostión europeo (*Ostrea Edulis*) en condiciones de laboratorio. *Ciencias marinas* 12(3):70-81.
- Guillard, R. y J.H. Ryther, 1973. Division rater. In: J.R. Stein (ed.), Handbook of phycological methods and growth measurement. Cambridge Univ. Press. pp. 289-311.
- Herrero, C., A. Cid, 1991. Biomass and chemical constituents of four commercially important marine microalgae with different culture media. *Aquaculture engineering* 10:99-110.
- James, C. y T.S. Abu-Rezeq, 1988. Effect of different cell densities of *Chlorella capsulata* y *Chlorella* sp. for feeding the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture* 69:43-56.
- Kessler, E. y C. Soeder, 1962. Biochemical contributions to the taxonomy of the genus *Chlorella*. *Nature* 194(4833):1096-1097.
- Kochert, G., 1978. Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric acid method. In: Handbook of phycological methods. Edited by J.A. Hellebust y J.S. Craigie. Cambridge University Press. pp. 95-97.
- Kochert, G., 1978. Protein determination by dye binding. In: Handbook of phycological methods. Edited by J.A. Hellebust y J.S. Craigie. Cambridge University Press. pp. 91-93.
- Komarék, J. y B. Fott, 1983. Das phytoplankton des süsswassers. E. schweizerbartsche verlagsbuchhandlung (Nagele u. Obermiller) Stuttgart. pp. 567-604.
- Maguire, B. 1963. The passive of small aquatic organisms and their colonization of isolated bodies of water. *Ecol. Monographs* 33:161-185.
- Martínez, J.F.F., 1983. Comparación de curvas de crecimiento poblacional de *Ankistrodesmus falcatus* (Corda) Ralfs. (Chlorellales:Chlorellaceae) obtenidas al utilizar diferentes medios de cultivo. Tesis profesional. ENCB-IPN. México.

- Mason, S.J.M. y Q.A. Aviles, 1980. Experiencias en cultivo de flagelados fotosintetizadores. Memorias del II Simposio de la Sociedad Latinoamericana de Acuicultura. Tomo III Departamento de Pesca. México. D.F. pp. 2073-2097.
- Molina, G.M.G., 1991. Composición química de microalgas marinas (*Isochrysis aff. galbana* Parke y *Tetraselmis chuii*) desarrolladas en diferentes sustratos. Tesis profesional. ENEP. Iztacala UNAM. México. pp. 74.
- Ortega M., 1984. Catálogo de las algas continentales recientes de México. Univ. Nal. Autón. Méx., México, 565 pp.
- Ortega M., J. Godínez, H. Schlichting y M. Schlichting, 1989. Plantas que nadan, plantas que vuelan. El maravilloso mundo de las algas. ed. Pangea. pp. 23-24.
- Ortega M., J. Godínez, G. Garduño y G. Oliva, 1995. Ficología de México. Algas continentales. AGT Editor. 221 pp.
- Ortíz, J.M.A. y R.A. Garduño, 1985. El MR-2: un aparato que facilita el manejo de cultivos de algas unicelulares. *Rev. Lat-Amer. Microbiol.* 27:293-299.
- Pacheco, R.I., E.E. Valenzuela y R.L. Aguilar, 1991. Producción masiva de *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch. (Prasinophyceae), bajo diferentes concentraciones de nutrientes y adiciones de carbono. *Ciencias Marinas* 17(1):1-12.
- Palacios, M.S., M.M. Ortega y B.L.O. Muñoz, 1977. Algunas modificaciones al aislamiento y cultivo de *Chlorella vulgaris* Beijerinck. *Rev. Lat-Amer. Microbiol.* 19:95-103.
- Paniagua, M.J., R.F. Buckle, M.C. Granados y S. Loya, 1989. Manual de metodologías y alternativas para el cultivo de microalgas. CICESE. 2a. edición. Ensenada Baja California. México. 67 pp.
- Richmond, A., 1986. Microalgae of economic potential. In: Richmond, A. (Ed.). *Handbook of microalgal mass culture*. CRC Press Florida, pp. 119-235.
- Richmond, A., 1990. Large scale microalgal culture and applications. *Progress in phycological research*, Vol. 7 (Roud/Chapman eds.), Biopress Ltd. 62 pp.
- Rivera, G.L., 1985. Aislamiento e identificación de algas muestreadas de la atmósfera de una zona urbana. "Ciudad Universitaria". Tesis profesional. Facultad de Ciencias UNAM México. 64 pp.

- Rosas I., G. Roy-Ocotla, P. Mosiño, A. Baez y L. Rivera, 1987. Abundance and heterogeneity of algae in the México city atmosphere. *Geof. Int.* 26(3):359-373.
- Rosas I., G. Roy-Ocotla y P. Mosiño, 1989. Meteorological effects on variation of airborne algae en México. *Int. J. Biometeorol.* 33:173-179.
- Round, F.E., 1981. The ecology of the algae. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 68-70.
- Santillan, S.C., 1968. Cultivo del alga *Scenedesmus quadricauda* a nivel de planta piloto y laboratorio. Tesis profesional. ENCB-IPN. México.
- Schlichting, H.E., 1985. Techniques for sampling, isolating, culturing and identifying aerial microalgae. V Coloquio Interno de Investigación. E.N.E.P. Iztacala. UNAM-SEDUE pp. 223-232.
- airborne algae. V Coloquio Interno de Investigación. E.N.E.P. Iztacala. UNAM-SEDUE. pp. 257-267.
- Snell, T.W., C.J. Bierberich y R. Fuerst, 1983. The effects of green and blue-green diets on the reproductive rate of the rotifer brachionus plicatilis. *Aquaculture* 31:21-30.
- Stein, J.R., 1979. Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements. Cambridge University Press, Cambridge, 448 pp.
- Strikland, J.D. y R.W. Eppley, 1968. Kinetics of marine phytoplankton growth. M.R. Droop E.J. In: *Advances in Microbiology of the sea*, New York, Academic Press. 1:23-62.
- Tamiya, H., 1957. Mass culture of algae. *Ann. Rev. Microb.*, 8:309-334.
- Torrentera, B.F., 1983. Cultivo semicontinuo de *Chlorella saccharophilla* Kruger. Tesis profesional E.N.E.P. Iztacala UNAM. 68 pp.
- Torrentera, B.F., 1989. La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura. FAO-Italia. documento No. 12 Brasilia, Brasil. 90 pp.
- Trotta P., 1981. A simple and inexpensive system for continous monoaxenic mass culture of marine microalgae. *Aquaculture* 22:383-387.

- Trujillo A. y J. Arroyo, 1991. Análisis de la mortalidad y esperanza de vida de *Acartia californiensis* Trinast (Copepoda: calanoidea) cultivada en condiciones de laboratorio. *Ciencias Marinas* 17(4):11-18.
- Ukeles, R., 1975. Views on bivalve larval nutrition. Proceedings of the first international conference on acuaculture nutrition. Delaware. University Delaware. pp. 127-162.
- Watanabe, T., C. Kitajima y S. Fujita, 1983. Nutritional values of live organisms used en Japan for mass propagation of fish: a review. *Aquaculture* 34:115-143.

## ANEXO

Descripción de *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890

(Traducido de Komárek y Fott, 1983)

Célula aislada o en pequeños grupos. Forma elipsoidal, hasta esférica o globular en células viejas. Autósporas generalmente elipsoidales, raramente esféricas y ligeramente irregulares. Pared celular delgada sin zonas fragmentadas. Cloroplasto en forma de copa o bien, formando una banda como cinta ligeramente en forma de caldero; generalmente de lado a lado presenta dos profundas muescas o escotadura ancha formando una banda. Cercana a la liberación de las autósporas la célula presenta un cloroplasto en forma de copa o molde.

Un pirenoide visible (raramente dos), encontrándose a lo ancho de la abertura del cloroplasto; usualmente el pirenoide presenta de dos a cuatro gránulos de almidón en forma de copa y cubiertos. Esporangio con 2,4,8 ó 16 autoesporas similares en tamaño. La célula madre se rompe dejando 2 a 4 porciones elípticas que permanecen por largo tiempo unidas.

Dimensiones celulares: 1.5-10 (-13.3) $\mu$  de diámetro.

Var. *vulgaris* (Syn.: *Pleurococcus beijerrenckii* ART. 1892, *Chlorella pyrenoidosa* CHICK 1900, *Chlorella communis* ART, 1906, *Chlorella vulgaris-sufurea* GERN. 1907, *Chlorella terricola* HOLLERB, 1936.? *Chlorella ovalis* BUICHER 1952, *Chlorella candida* SHIH. y KRAUSS 1965). (taf. 168:2).

Célula con 7.5 $\mu$  en diámetro, vacuolas pequeñas generalmente una o varias; liberación de 2,4,(8-16) autósporas elipsoidales. Hábitat: dulceacuícola y subaérea, en suelo y muros.

Var. *viridis*. CHOD. 1910 (Syn.: *Chlorella infusionum* (SCHRANK) BEIJ. sintipo, non sensu SCHARANK, *Chlorella infusionum* BEIJ. sensu SHIH. y KRAUSS 1965 incl. var *auxenophila* SHIH. y DRAUSS 1965) (taf. 168:3).

Células con 12 (-14) $\mu$  en diámetro, célula vieja generalmente con una gran vacuola; liberación de (2)-4-8-16 autósporas elipsoidales. Hábitat: dulceacuícola.



## FORMULARIO (CALCULOS POBLACIONALES).

A) Velocidad de crecimiento:  $k = \frac{3.322}{t_2 - t_1} \cdot \log(N_2/N_1)$

B) Tiempo medio de duplicación:  $tg = \frac{\log_2(t_2 - t_1)}{\log N_2 - \log N_1} = \frac{\log_2}{K}$

C) Número promedio de div. cel:  $D = \frac{K}{\log_2} = \frac{1}{TD}$

D) Producción diaria:  $PD = \frac{N_2 - N_1}{t_2 - t_1}$

donde:  $N_1$  = concentración celular al tiempo  $t_1$

$N_2$  = concentración celular al tiempo  $t_2$

**Determinación de proteínas por el método de tinción-ligadura**  
(descrito por Kochert, 1978).

Reactivos:

- 1.- colorante azul de coomssie brillante G-250 y albúmina de bovino (2x Cristalizada Sigma).

Soluciones:

- 1.- Reactivo proteico. Disolver 100mg azul de Comassie brillante en 50 ml de etanol al 95% y añadir 100 ml de  $H_3PO_4$  al 85% (p/v). Diluir la solución resultante a un volumen final a un litro con agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente.
- 2.- Solución estandar de Proteína. Disolver 100 mg de albúmina en agua destilada y aforar a 100 ml. Almacenar a 4°C.

MÉTODO.

A. Método estandar

Colocar la proteína patrón (solución 2), en intervalos de 10 a 100  $\mu$ l en una serie de tubos de ensaye de 12x100mm y ajustar el volumen de cada tubo a 0.1 ml con agua destilada.

Colocar 10, 50 y 100  $\mu$ l de la muestra proteica desconocida en tres tubos de ensayo y ajustar el volumen a 0.1 ml con el buffer, en el cual se disolvió la muestra. Preparar además un tubo blanco con 0.1 ml de buffer.

Finalmente, añadir 5 ml de reactivo proteico a todos los tubos y mezclar con vortex o por inversión. Medir la absorvancia a 595nm después de dos minutos y antes de una hora. Elaborar la curva patrón a partir de la absorvancia correspondiente.

Las concentraciones de proteína en muestras desconocidas son determinadas gráficamente.

B. Micrométodo

Diluir la solución estandar de proteína 10 veces con agua y pipetear intervalos de 1 a 10  $\mu$ l en tubos de 12x100 mm. Ajustar el volumen final de cada tubo a 0.1 ml con agua destilada y proceder como indica el método estandar a excepción de agregar solo 1.0 ml de reactivo proteínico en todos los tubos. Leer a 595 nm usando cubetas de 1 ml.

**Determinación de carbohidratos por el método del Acido Fenol-Sulfúrico (descrito por Kochert, 1978).**

Reactivos:

- 1.- Fenol al 90%
- 2.-  $H_2SO_4$  (95.5%, grado específico 1.48)

Soluciones:

- 1.- Solución de fenol. Se prepara adicionando 10 ml de agua a 90 ml de reactivo de fenol al 90%. Esta solución puede desarrollar un color amarillo pálido al transcurrir el tiempo, sin interferir en la determinación de carbohidratos.  
La solución puede almacenarse por varios meses a temperatura ambiente.
- 2.- Solución de glucosa estandar. Consiste en disolver 50 mg de glucosa en agua y aforar a 100 ml.

METODO

Agregar la solución de glucosa estandar a intervalos de 20 a 140  $\mu$ l en tubos de 18x15 mm y ajustar el volumen de cada tubo a 2 ml con agua destilada. Pipetear dos o tres diferentes volúmenes de la solución de carbohidratos desconocida, en tubos marcados por separado y ajustar el volumen de cada uno a 2 ml con buffer. Añadir 50  $\mu$ l de reactivo fenol a todos los tubos y mezclar. Finalmente agregar 5 ml de  $H_2SO_4$  a cada tubo. Se sugiere un tiempo de liberación de 15 a 20 segundos para el ácido sulfúrico, directamente sobre la superficie del líquido, con el fin de promover, el mezclado y el calor necesario para el ensayo.

Mantener las muestras a temperatura ambiente por 30 minutos y leer la absorbancia a 485 nm. Graficar los resultados de la glucosa estandar usando la absorbancia correspondiente para generar la curva patrón.

La concentración de carbohidratos desconocidos son determinados gráficamente.

CLAVES PARA DETERMINAR LOS GENEROS DE  
CHLORELLLOIDEAE (Fig. 3\*)

(Traducido de Komárek y Fott, 1983)

- 1a. Células incoloras, sin cloroplasto.
- 2a. Pared celular más o menos gruesa (pero sin estrato o lámina de celulosa) mucilaginoso por fuera, después de la liberación sus autósporas generalmente se atrofia; material de reserva probablemente glicógeno.....1. **Hyalochlorella**
- 2b. Pared celular más o menos delgada (probablemente también con estrato de celulosa), después de la liberación de sus autósporas no se atrofia.....2. **Prototheca**
- 1b. Alga verde con cloroplasto.
- 3a. Pared más o menos delgada, lisa, interior no fragmentado.
- 4a. Cloroplasto apoyado a la pared, en forma de red o esponjoso.
- 5a. Cloroplasto en forma de red hasta esponjoso.
- 6a. Pirenoide no verdadero.....3. **Aeosphaera**
- 6b. Pirenoide verdadero...4. **Pseudoespongiococcum**
- 5b. Hasta varios cloroplastos apoyados en la pared, varias marcas con profundas lobulaciones, pero no formando una red.
- 7a. Un cloroplasto, apoyado en la pared, en células viejas con profundas lobulaciones, varias marcas o estrechamientos perforados (cribados) presentes.
- 8a. Pirenoide no verdadero.....5. **Lobosphaera**
- 8b. Pirenoide verdadero.....6. **Lobophaeropsis**
- 7b. Cloroplasto (uno hasta a varios) apoyados en la pared, en forma de disco, copa o en forma de caldero.
- 9a. En células viejas de dos hasta varios cloroplastos en forma de discos que permanecen durante todo el ciclo de vida.

- 10a. Pirenoide no verdadero.....7. **Muriella**
- 10b. Pirenoide verdadero.
- 11a. En todos los cloroplastos un  
        pirenoide.....8. **Planktosphaerella**
- 11b. Pirenoide (rara vez dos) varios de  
        los cloroplastos adheridos a las  
        paredes.....9. **Muriellopsis**
- 9b. El cloroplasto, apoyado en la pared,  
        moldeado en forma de copa o salcera, cerca  
        de la liberación de las autoesporas este se  
        divide; pirenoide verdadero (*Chlorella*) o  
        no verdadero (*palmellococcus*).....  
        .....10. **Chlorella**
- 4b. Cloroplasto central, legeramente lobulado en los  
    bordes.....11. **Pseudochlorella**
- 3b. Pared celular gruesa hacia la superficie raramente  
    liso hacia el centro presenta varias marcas  
    fragmentadas.
- 12a. Pared celular no fragmentada hacia la superficie  
        rugosa, cloroplasto apoyado en la pared,  
        pirenoide en forma de copa.....12. **Mychonastes**
- 12b. Pared celular gruesa y fragmentada hacia afuera,  
        pirenoide verdadero.
- 13a. Cloroplasto central, pared celular hacia la  
        superficie más o menos lisa pero gruesa hacia  
        el interior.....13. **Placosphaera**
- 13b. Cloroplasto parietal, pared celular reticulada.  
        .....14. **Keriochlamys**

-----  
\* Nota: Las opciones numeradas en la clave con negrillas se ilustran en la fig. 3 y corresponden a los atributos morfológicos más sobresalientes (pared, plasto y pirenoide) que distinguen a los géneros de *Chlorelloideae*.

Py- = pirenoide ausente

Py+ = pirenoide presente

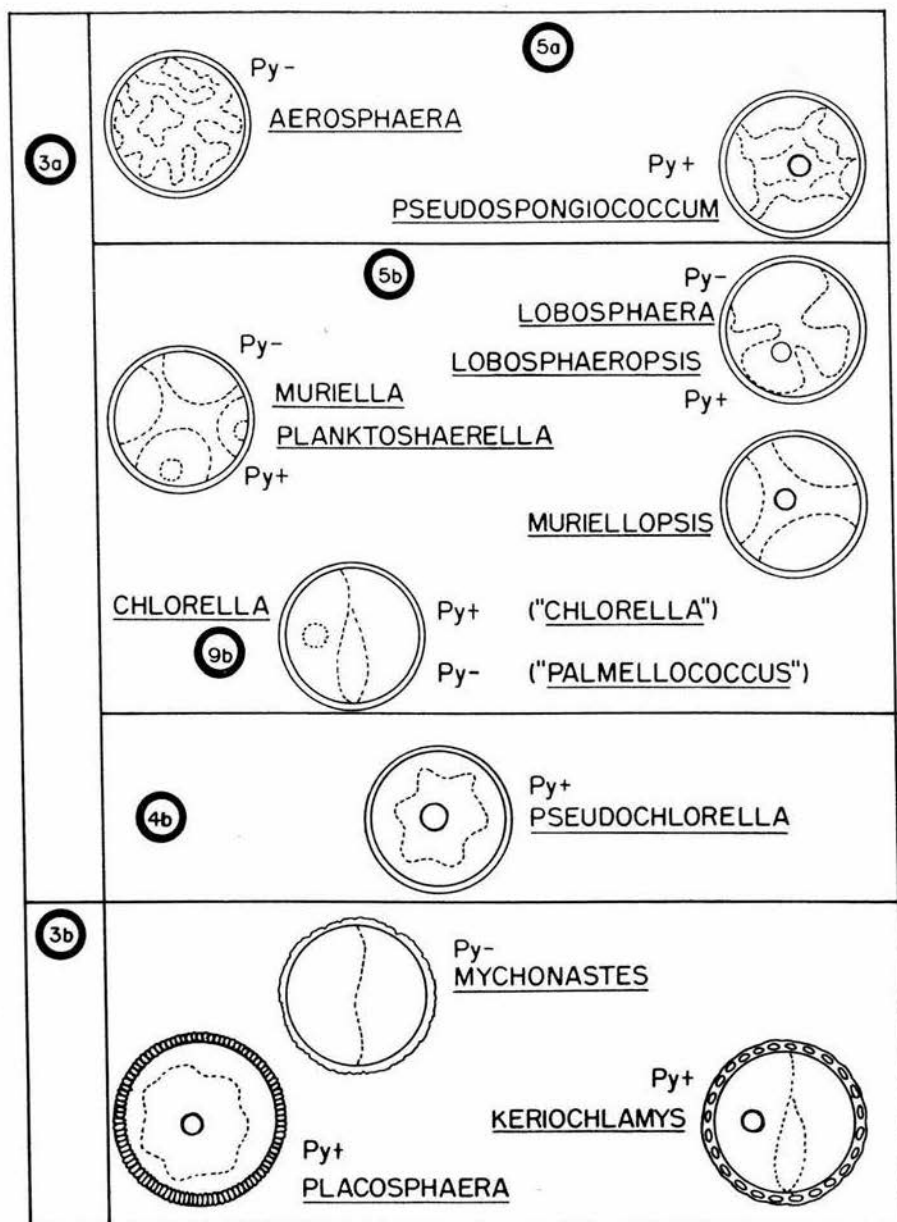


Fig. 3\* Atributos morfológicos más sobresalientes que distinguen a los géneros de Chlorelloideae. (tomado de Komárek y Fott, 1983).

**CLAVES PARA DETERMINAR LAS ESPECIES  
DE CHLORELLA (Fig. 4<sup>a</sup>)**

(Traducido de Komárek y Fott, 1983)

- 1a. Cloroplastos con un pirenoide.
  - 2a. Células adultas generalmente en forma elipsoidal algunas veces extendida o en forma oval.
  - 3a. Cloroplasto en forma de banda, autósporas similares a la célula adulta.
    - 4a. Cloroplasto bastante grande moldeado de costado a costado formando una H. pirenoide obvio.....**1. C. oocystoides**
    - 4b. Cloroplasto bastante grande en forma de molde, en el pirenoide se aprecian los gránulos de almidón.....**2. C. saccharophilla**
    - 3b. Cloroplasto en cinta, autósporas diferentes en tamaño, una autoespora es claramente más grande que las demás.....**3. C. ellipsoidea**
- 2b. Células adultas generalmente esféricas.
  - 5a. Autósporas diferentes en tamaño (una autoespora es claramente más grande que las demás) cloroplasto bastante pequeño, en células adultas redondeado en forma de copa.....**4. C. luteoviridis**
  - 5b. Autósporas similares en tamaño, cloroplasto en forma de copa.
    - 6a. Cloroplasto completamente estrecho, con perforaciones en forma de poros... **5. C. emersonii**
    - 6b. Cloroplasto no dividido.
      - 7a. Cloroplasto, cubriendo casi la totalidad de la pared celular, solo con una pequeña hendidura formando una abertura u orificio.....**6. C. Kessleri**
      - 7b. Cloroplasto en forma de banda, copa o salcera (una parte de la pared celular permanece siempre al descubierto).
        - 8a. Cloroplasto en forma de banda, copa o salcera en la totalidad del borde celular, pirenoide con 2, 3, 4, gránulos o reservorios de almidón en forma de copa.

- 9a. Célula adulta (no esporangio) de 7,5 (-10) micrómetros de diámetro, no termofílica.....7. *C. vulgaris*
- 9b. Célula adulta (no esporangio a lo más 5 micrómetros de diámetro, especie termofílica.....8. *C. Sorokiniana*
- 8b. Cloroplasto en forma de copa o en cinta; con varias marcas hacia adentro, pirenoide ajustado y pequeño, los gránulos de almidón alejados unos de otros.....9. *C.miriabilis*
- 1b. Pirenoide siempre ausente (*Palmellococcus*).
- 10a. Los restos de pared de la célula madre en forma de saco. Células vegetativa de 3-24 micrómetros de diámetro.
- 11a. Cloroplasto en cinta y lobulado, las células viejas se desintegran en diversos fragmentos.  
.....10. *C. zofingiensis*
- 11b. Cloroplasto esférico hueco o cóncavo, cubriendo casi la totalidad de la célula.....11. *C. miniata*
- 10b. La pared de la célula madre vacía y disgregada en dos ó más porciones en parte fragmentada o desgastada totalmente; célula vegetativa 2-9 (-11  $\mu$  de diámetro).
- 12a. Célula adulta generalmente con más de 3  $\mu$  de diámetro.
- 13a. Cloroplasto en forma de copa o en forma de banda ancha.....12. *C. protothecoides*
- 13b. Cloroplasto que cubre casi totalidad de la célula.....13. *C. homosphaera*
- 12b. Célula menor de 2-3  $\mu$  de diámetro.....14. *C. minutissima*

-----

\* Nota: Las opciones numeradas en la clave con negrillas se ilustran en la Fig. 4 y corresponden a los atributos morfológicos más sobresalientes (forma celular, cloroplasto y pirenoide) que distinguen a las especies de *Chlorella*.

Py- = pirenoide ausente

Py+ = pirenoide presente



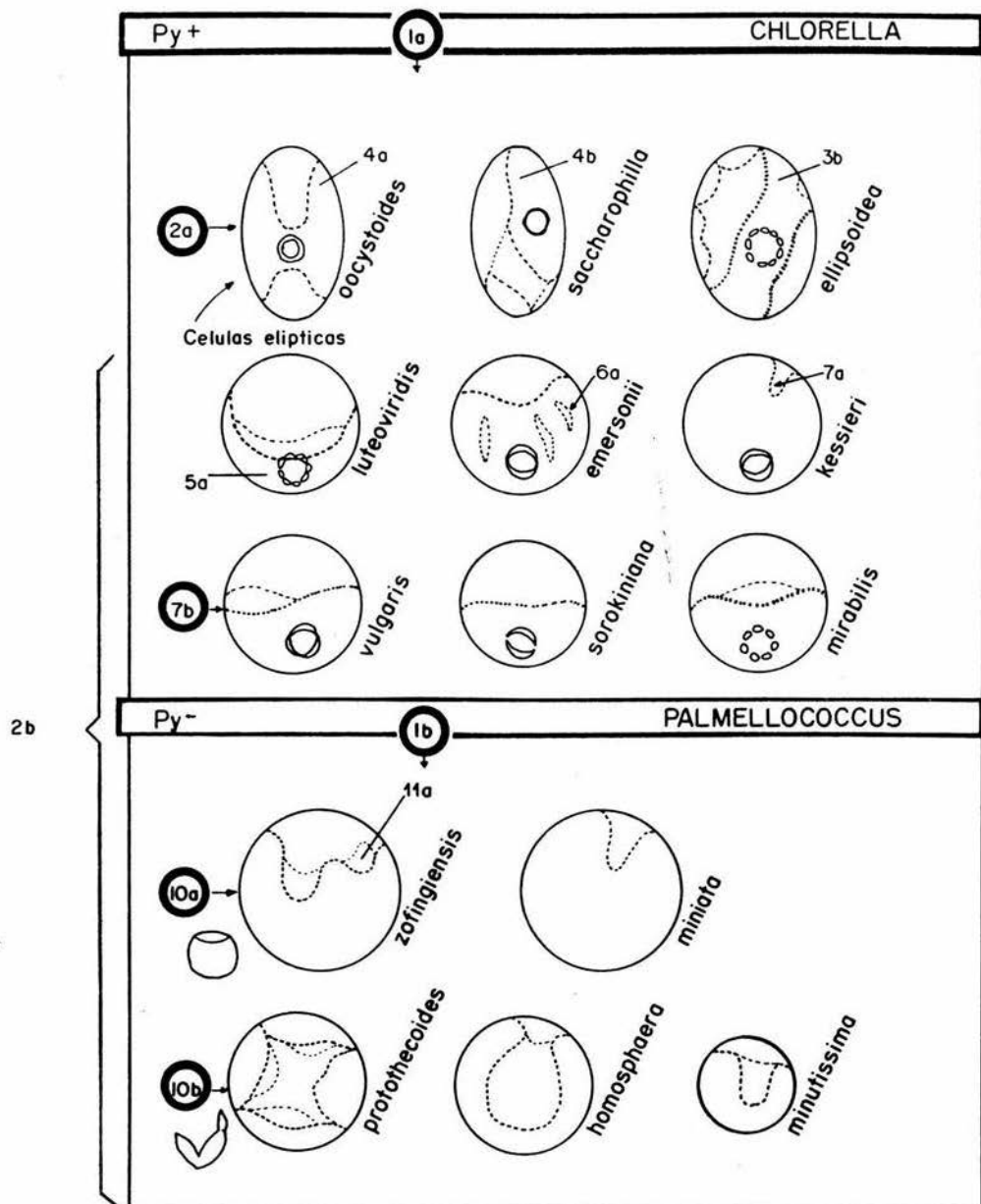


Fig. 4\* Atributos morfológicos más sobresalientes que distinguen a las especies de *Chlorella*.  
(tomado de Komárek y Fott, 1983).

## Fig. 5

- 1.- *Chlorella saccharophilla* (KRUG.) MIG.; a-c Célula vegetativa, d-f Esporangio (tomado de FOTT y NOVAKOVA 1969).
- 2.- *Chlorella ellipsoidea* GER.; a-d Células, e-d Esporangio (tomado de FOTT y NOVAKOVA 1969).
- 3.- *Chlorella luteoviridis* CHOD.; a-c Células, d-f Esporangio, g Liberación de las autósporas.
- 4.- *Chlorella emersonii* SHIH. y KRAUSS var. *emersonii*; a-c células, d-e Esporangio, f Liberación de las autoesporas.
- 5.- *Chlorella emersonii* var. *rubescens* (DANG.) FOTT et al.; a-d Célula, e-f Esporangio (tomado de KESSLER et al. 1968).

## Fig. 2

- 1.- *Chlorella kessleri* FOTT y NOVAK.; a Célula, b-c Esporangio, d Liberación de las autósporas (tomado de FOTT y NOVAKOVA 1969).
- 2.- *Chlorella vulgaris* BEIJ. var. *vulgaris*; a Célula, b Esporangio, c Liberación de las autósporas.
- 3.- *Chlorella vulgaris* var. *viridis* CHOD.; a-b células, c-d Esporangio (tomado de FOTT y NOVAKOVA 1969).
- 4.- *Chlorella vulgaris* var. *autotrophica* (SHIH. y KRAUSS) FOTT y NOVAKOVA.; a-b Células, c-e Esporangio, f Liberación de las autósporas (tomado de FOTT y NOVAKOVA 1969).
- 5.- *Chlorella sorokiniana* SHIH. y KRAUSS; (tomado de FOTT y NOVAKOVA 1969).
- 6.- *Chlorella mirabilis* ANDR.; a-e Células, f-g Esporangio (tomado de ANDREEVA 1973).
- 7.- *Chlorella homosphaera* SKUJA; a Células, b Esporangio, e Liberación de las autósporas (tomado de FOTT y NOVAKOVA 1969).

## Fig. 3

- 1.- *Chlorella zofingiensis* DÖNZ.; a-d Células, e-f Esporangio (tomado de FOTT y NOVAKOVA 1969).
- 2.- *Chlorella miniata* (NÄG.) OLTM.; (tomado de MIGULA y BRUNNTHALER 1915).
- 3.- *Chlorella protothecoides* KRÜG.; a-b Células, c-g Esporangio, h Liberación de las autósporas (tomado de FOTT y NOVAKOVA 1969).
- 4.- *Chlorella minutissima* FOTT y NOVAK.; a Células, b Esporangio (tomado de FOTT y NOVAKOVA 1969).
- 5.- *Chlorella botryoides* BOYE-PET.; (Tomado de JAMES 1935).
- 6.- *Chlorella acuminata* GERN.; (tomado de GERNECK 1907).
- 7.- *Chlorella neustonica* BOURR.; (tomado de BOURRELLY 1958).
- 8.- *Chlorella* (*Pseudochlorella subsphaerica* REISIGL); (tomado de REISIGL 1964).
- 9.- *Chlorella?* (*Pseudochlorococcum typicum* ARCHIB.); (tomado de ARCHIBALD 1970).
- 10.- *Chlorella* (*Chlorella* (*Palmellococcus*) sp. sensu L. MOEWUS); (tomado de L. MOEWUS 1953).

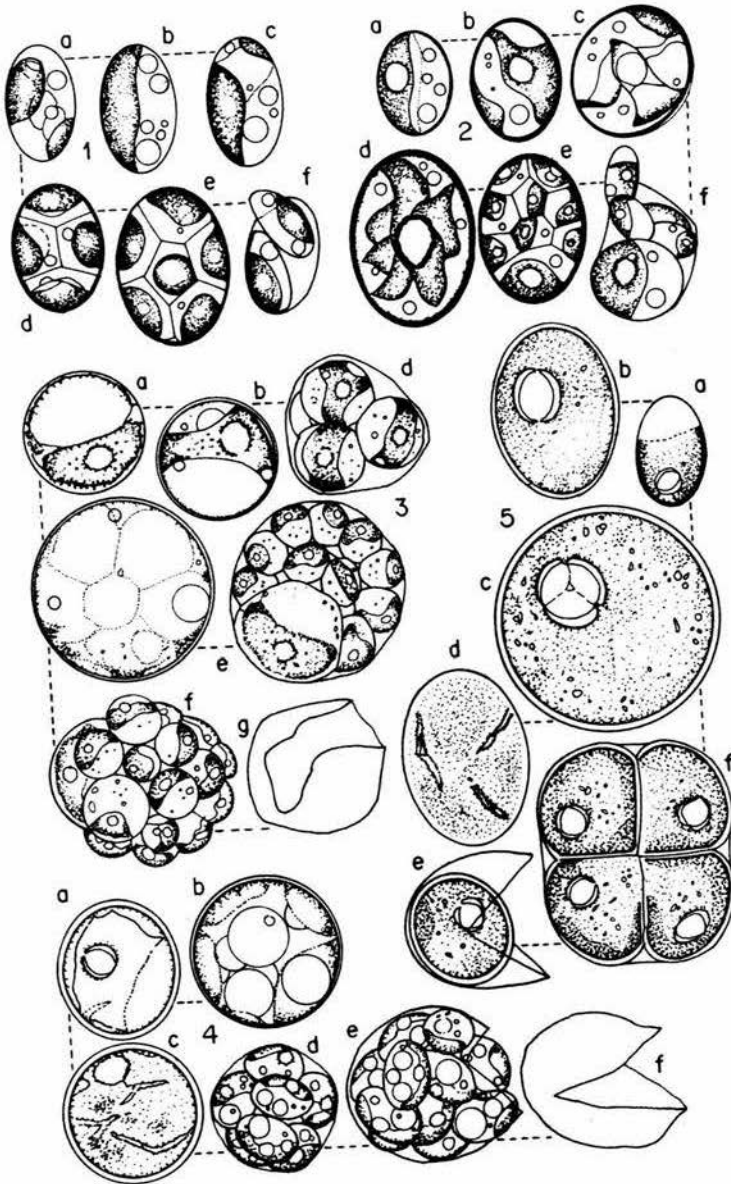


Fig. 5

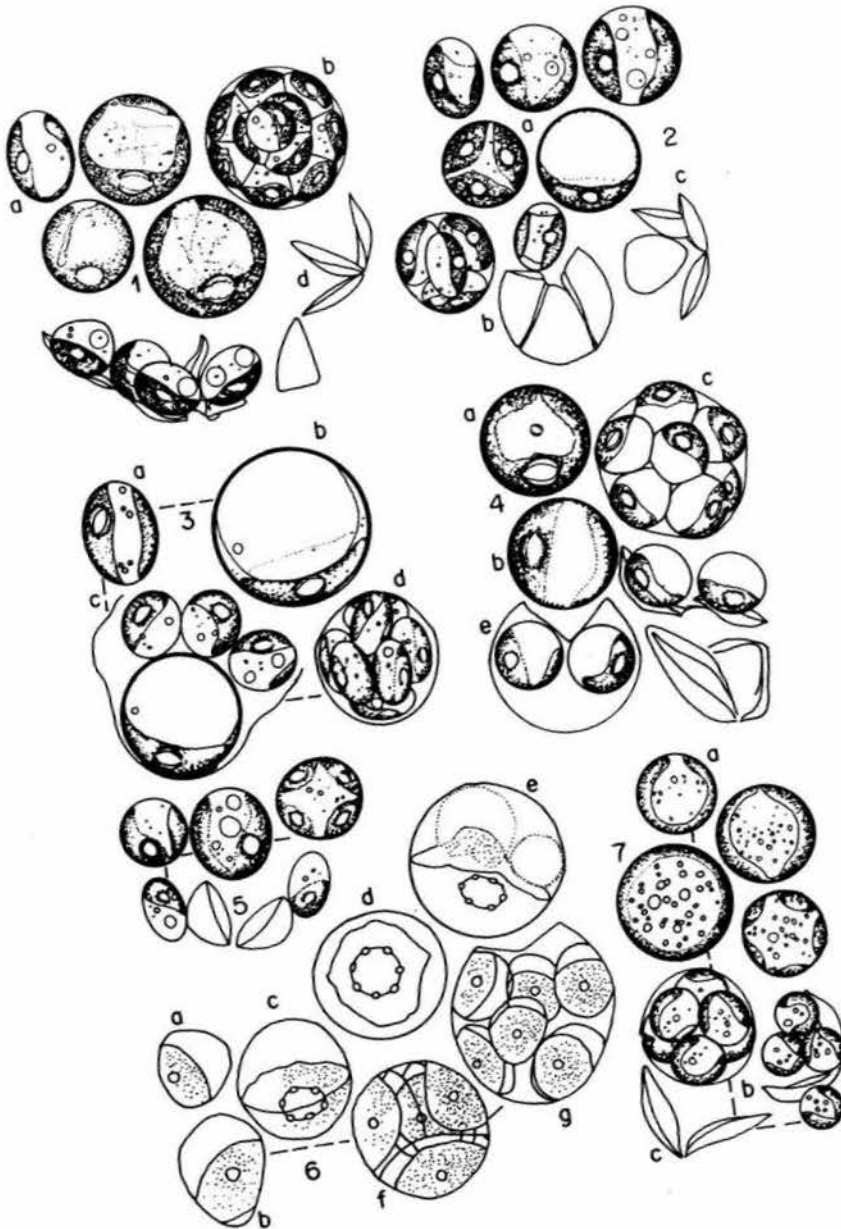


Fig. 6

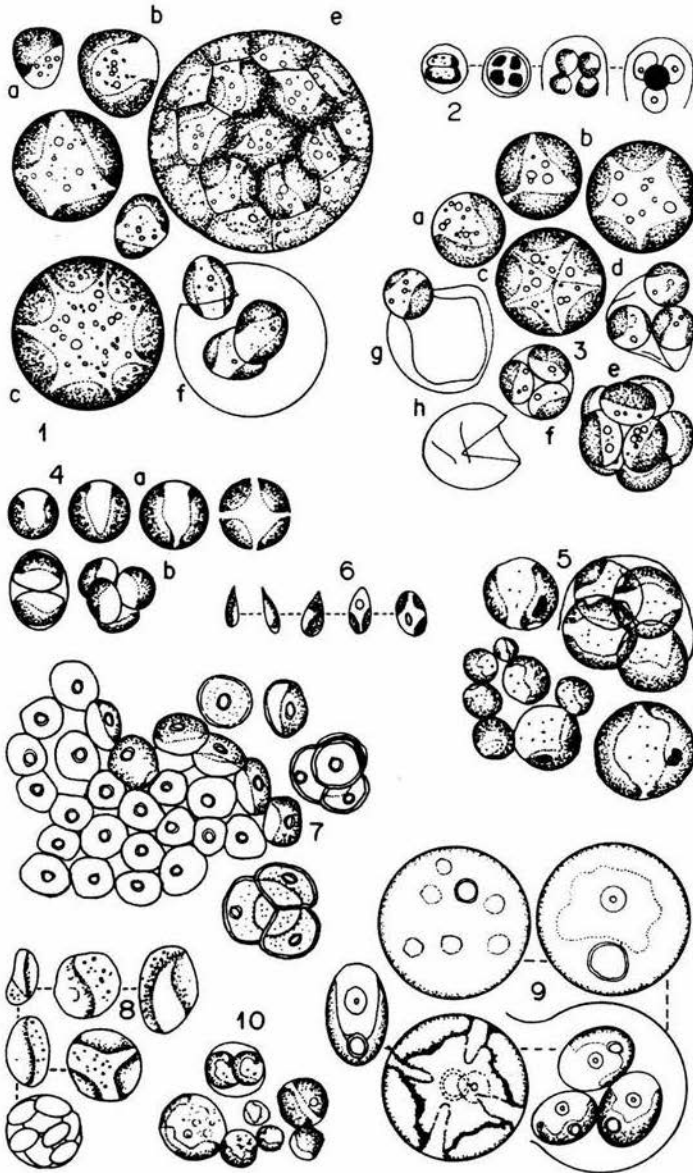


Fig. 7