



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTADE DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOXÍA CELULAR E MOLECULAR

Área de Microbioloxía



**Cultivo y aplicación de las microalgas
Dunaliella salina y *Chlorella vulgaris*
en Cuba**

LILIANA MARÍA GÓMEZ LUNA

A Coruña, 1997



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTADE DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOXÍA CELULAR Y MOLECULAR

ÁREA DE MICROBIOLOXÍA

**Cultivo y aplicación de las microalgas
Dunaliella salina y *Chlorella vulgaris*
en Cuba**

Memoria que para optar al
Grado de Doctor presenta
LILIANA MARIA GÓMEZ LUNA

A Coruña, 1997

Concepción Herrero López, Catedrática de Microbiología, del Departamento de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de La Coruña,

INFORMAN: que la presente Tesis Doctoral titulada "**Cultivo y aplicación de las microalgas *Dunaliella salina* y *Chlorella vulgaris* en Cuba**", que para optar al Grado de Doctor en Biología presenta **D^a. Liliانا Maria Gómez Luna**, ha sido realizada bajo mi dirección en el Departamento de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de La Coruña y que, hallándose concluida, autorizamos su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmo el presente en La Coruña a 22 de mayo de 1997.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'C. Herrero', written over a long, thin horizontal line that extends to the right.

Fdo. Profa. Dra. Concepción Herrero López

A la memoria de mi padre.

*A mi madre, mi familia, mis amigos y mi
esposo: mis cuatro puntos cardinales.*

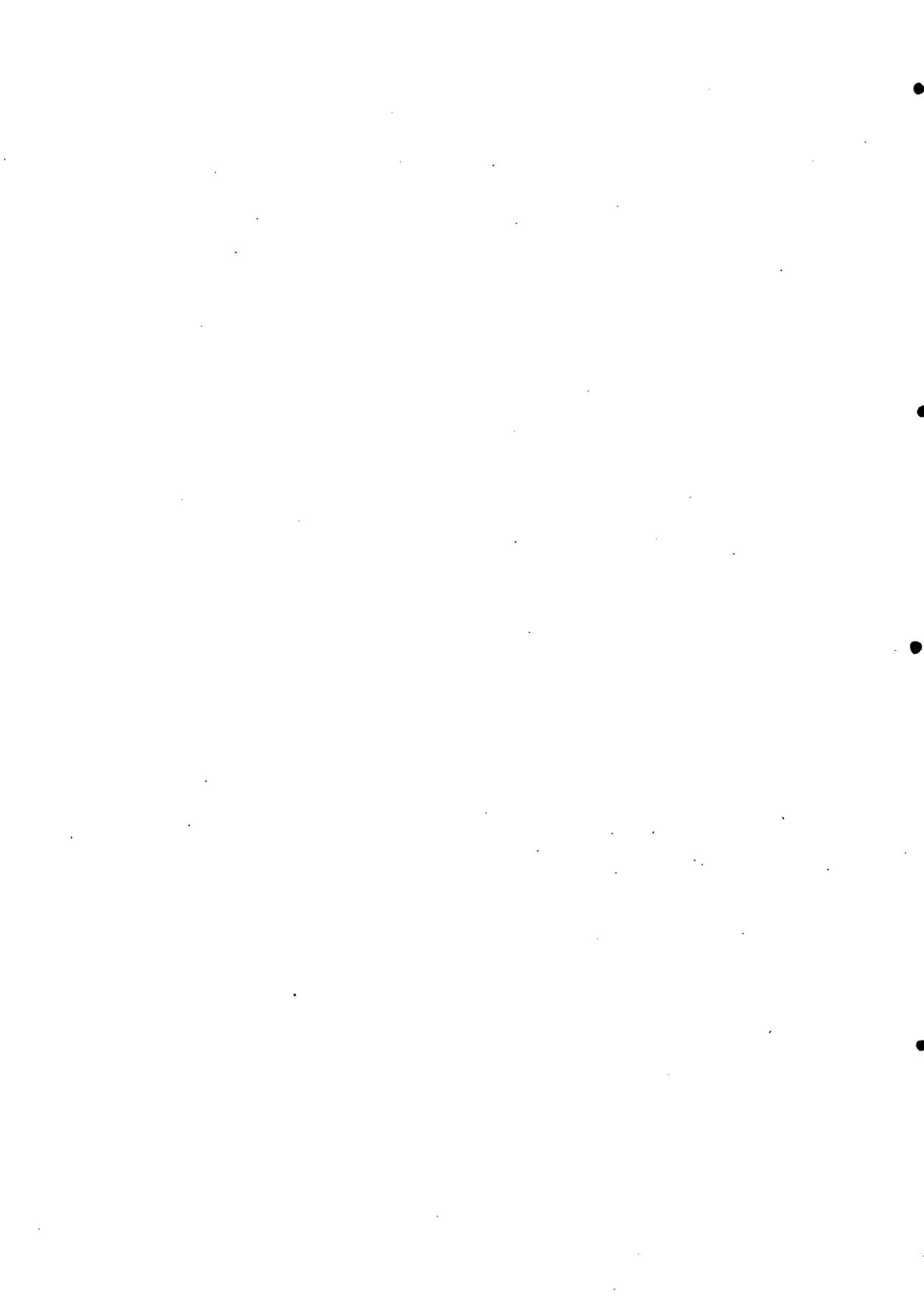
Para Amanda: mi brújula.

*Los hombres no pueden ser más perfectos que el sol.
El sol quema con la misma luz que calienta.
El sol tiene manchas.
Los desagradecidos no hablan más que de las manchas,
Los agradecidos hablan de la luz.*

José Martí

La imaginación es más importante que el conocimiento

Albert Einstein



Agradecimientos

Cuando todo se deja atrás para emprender un camino siempre hay que agradecer, mucho más, si en él se han encontrado razones para seguir y manos que estrechar.

Quiero agradecer especialmente a los Drs. Concepción Herrero y Julio Abalde por haberme dado esta oportunidad, por haber contribuido a mi formación investigadora y porque siempre han sido no sólo un ejemplo de responsabilidad, sino de calidad profesional y humana.

A la Universidad de La Coruña, porque en ella llevé a cabo uno de mis propósitos y por la cordialidad con que me han tratado durante estos años; en especial al Departamento de Biología Celular y Molecular y a su directora la Dra. Josefina Méndez Felpeto.

A los Servicios Centrales de la Universidad de la Coruña, en especial a María, por su constante preocupación.

Al Instituto de Toxicología y a los laboratorios de la Empresa Geólogo Minera de Santiago de Cuba, por su colaboración.

Al Centro de Investigaciones de Energía Solar y a todos mis compañeros.

Al Hospital Infantil Norte de Santiago de Cuba, especialmente al Laboratorio de Microbiología, donde se realizó gran parte de este trabajo.

A las Dras. Isabel Lamela y Amelia Troche, colaboradoras y amigas de siempre, por su apoyo, sus horas de dedicación y porque juntas, hicimos un buen equipo.

A la Dra. Enma Morán y su grupo de trabajo por su colaboración.

Aunque se trata de recordar cada nombre, siempre queda alguien, por eso quiero agradecer a todos los que contribuyeron directa o indirectamente a la

realización de este trabajo.

A la Dra Angela Noguero por sus valiosas orientaciones taxonómicas.

Al Dr. José A. Villar por el asesoramiento estadístico.

Al Dr Enrique Torres (Quique) por su control sobre "Pili" y "Pelecé", por toda su ayuda (que no ha sido poca), su servicio desinteresado de urgencias, y por soportarme.

A Dr Pablo Fidalgo por haberme transmitido toda su experiencia y conocimientos, por su colaboración en la puesta a punto de muchas técnicas y porque considero que su ayuda ha sido muy valiosa.

A la Dr Angeles Cid por ser como es, por su calidad profesional y por haber traído a Paula antes de que yo marchara.

A Rosa, Susana, Marcial, Loly, Miguel y Liliana B. por todo su apoyo; y a Juan, porque yo se que él (en el fondo...) me aprecia.

A los investigadores del Departamento de Ecología de la Universidad de Málaga por haber contribuido a mi "fotoformación" y por la acogida que me dieron en su laboratorio; en especial al Dr. Félix López-Figueroa.

A los "Robertos" (Isa, Tere, Barry, Pablo y Roberto, por supuesto), por su sentido del humor, la experiencia en inversión de matrices de correlación intramolecular y porque, entre otras cosas, pocas veces me dejaron comer sola.

A los "genéticos" por su solidaridad y porque gracias a esta división invisible siempre fueron buena compañía; a los "bioquímicos" (los de las levaduras) por todo lo que sabemos, y a los "fisiólogos vegetales" porque con ellos aprendí lo que importa un pimiento.

A María y Chari, mis compañeras de piso, por ayudarme a apartar la soledad, por todo lo que valen, y porque si no fuera por ellas aún estaría durmiendo.

A Marga y Mónica por saber ser más que amigas, por todo el apoyo que me han ofrecido y el optimismo que me transmitieron cuando la añoranza bloqueó mi sentido de la responsabilidad.

A Pablo, Agus, Kiko, Maty, Aníbal, Ana, Bea, Carmen, Alejo, Charo y el resto de la pandilla, por su concepto de la amistad, por haberme dado ese calor de hogar que

tanto se necesita cuando se está lejos de casa y porque no se qué me voy a hacer sin ellos.

A Juan R. (porque desde que te conocí camino mejor), a Andrés (apen), Fernando, Cris, Ricardo, María y el resto de la pandilla aeróbica, por todos los buenos ratos que compartimos y porque a pesar de ser los últimos en entrar en mi mundo se las arreglaron para ocupar un gran espacio.

A mi familia de aquí, a los que tuve la oportunidad de conocer y me han brindado todo su apoyo y afecto durante estos años.

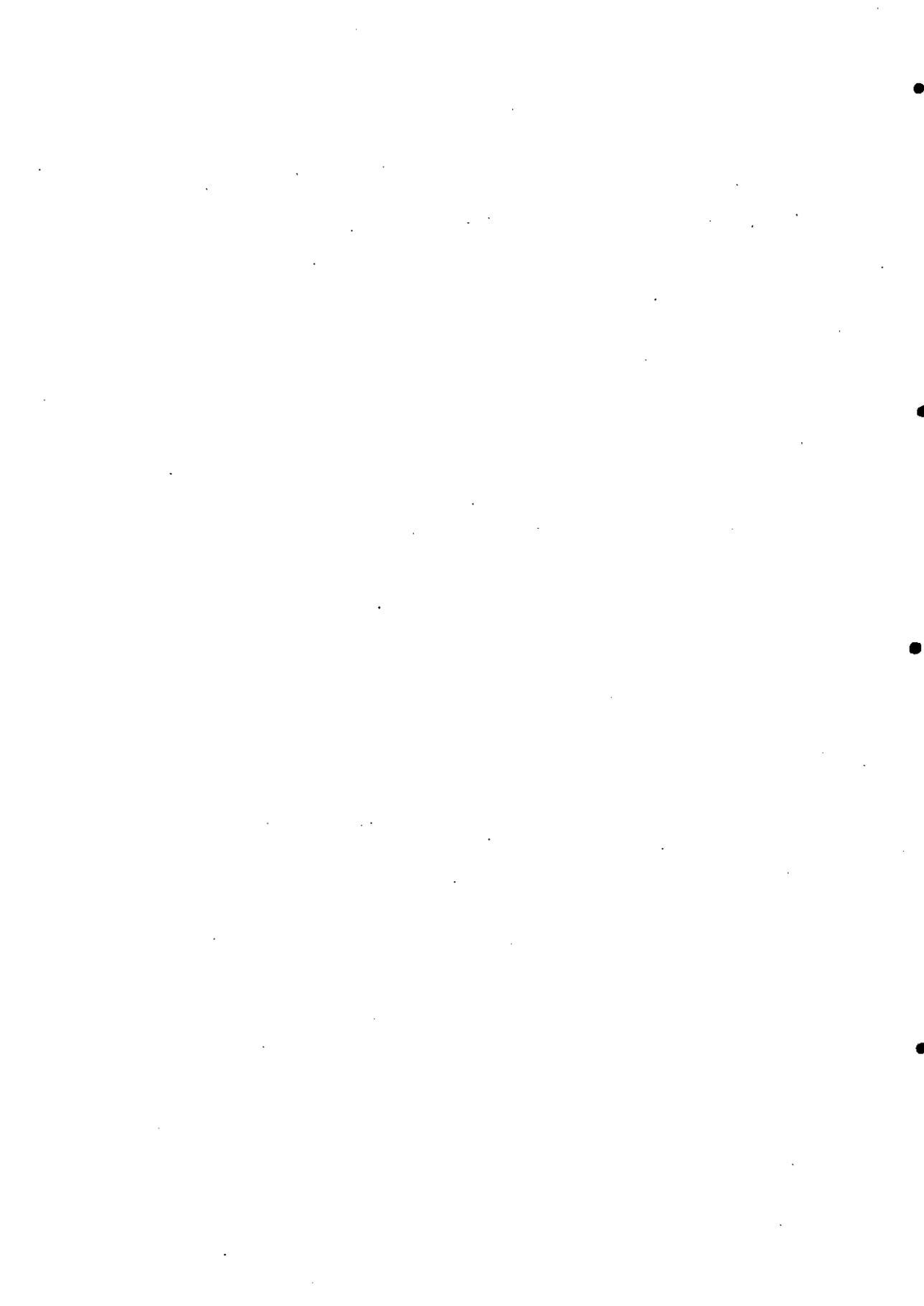
A mi familia y amigos de Cuba por su apoyo de siempre; en especial a Migue, por su servicio gratuito de traducción de patentes; a Mirna (mi traductora de alemán preferida) y Mercedes por su comprensión y porque son las mejores tías del mundo. A Sam, por todo el apoyo que le ha dado a mi familia.

A mi esposo, porque aquello de que la historia de un verdadero amor es la historia de una larga paciencia.

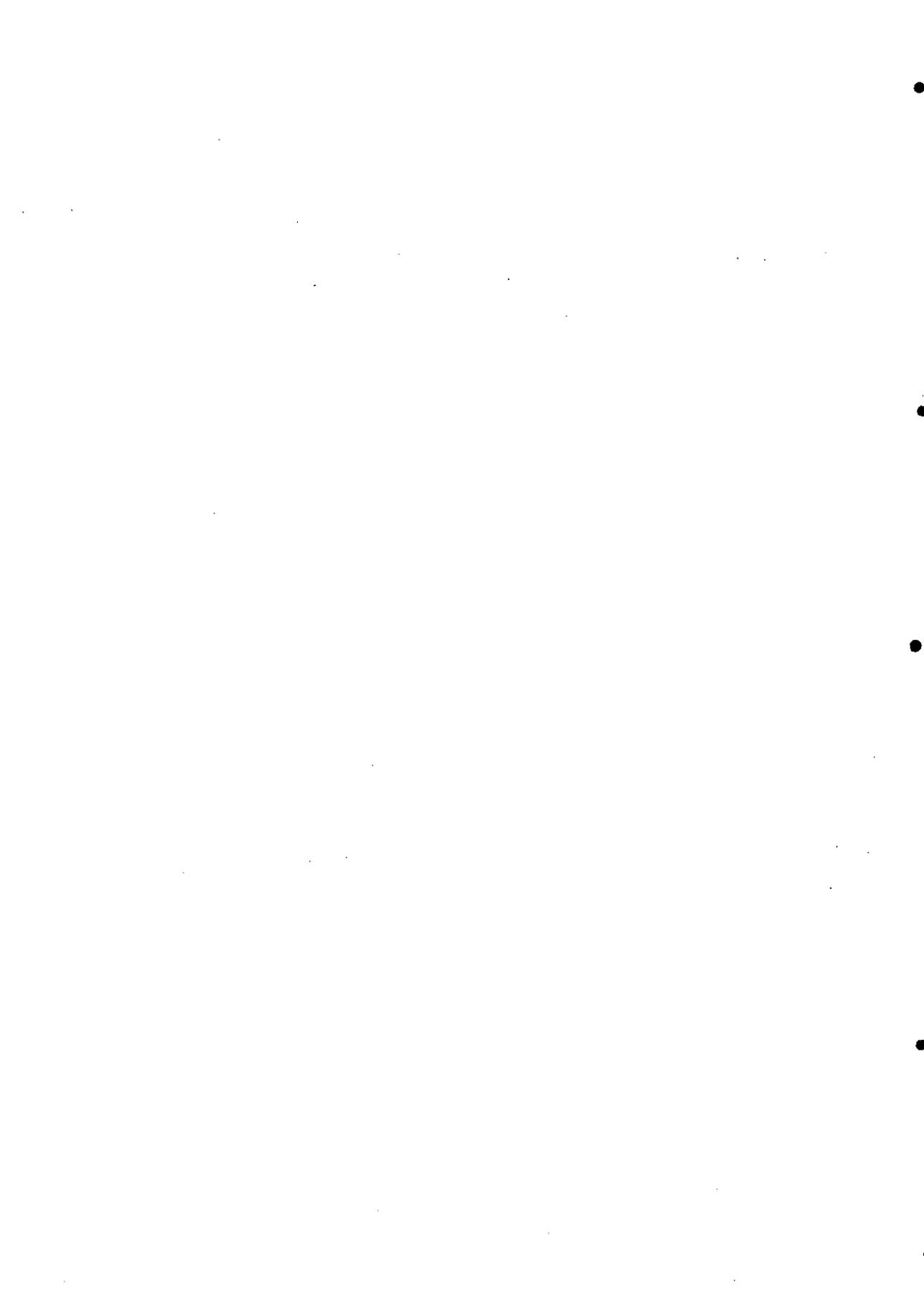
A mi madre porque a ella le debo todo cuanto soy y cuanto he podido hacer, por su sacrificio incalculable y porque además de excelente madre es una gran mujer.

A mi hija, porque es lo mejor que me ha pasado en la vida y porque ha soportado el peso de la palabra añoranza a pesar de su corta edad.

A todos, mi más sincero agradecimiento.



La realización de esta Tesis fue posible gracias a una beca del *Instituto de Cooperación Iberoamericano* (I.C.I.) correspondiente al Plan MUTIS y a la financiación de la *Xunta de Galicia* a través de proyectos de investigación (refs.: XUGA-10302B90 y XUGA-10301B94). Igualmente, este trabajo ha sido posible gracias a la colaboración de la *Universidad de La Coruña*, que ha apoyado institucionalmente la permanencia de la autora durante el tiempo de realización de la misma, y, en particular, queremos agradecer la colaboración prestada por los *Servicios Xerais de Apoio a Investigación* del *Vicerrectorado de Investigación* de la Universidad de la Coruña por su apoyo técnico para la realización de parte de los trabajos experimentales de esta tesis.



Indice

1.- Introducción	17
Antecedentes históricos	20
Utilización de las microalgas en la industria médico-farmacéutica y cosmética	25
Sustancias de interés químico-farmacéutico obtenidas a partir de microalgas	27
Extractos acuosos. Factores de crecimiento	27
Pigmentos: distribución y aplicaciones	28
Clorofilas y derivados	29
Carotenos y Xantofilas	31
Efectos de las condiciones ambientales sobre los cultivos de microalgas	33
Luz	33
Fuentes de luz	35
Efectos de la intensidad de la luz. Fotoaclimatación	37
Efecto de la longitud de onda sobre la composición bioquímica y el crecimiento	39
Fotoperíodo	40
Interacción de otros factores ambientales con la luz	41
Concentración de nitrógeno	41
Temperatura	44
Salinidad	45
2.- Objetivo	47
3.- Material y métodos	51
Descripción de las especies de microalgas	53
Cultivo	57
Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> a escala de laboratorio	57
Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> a gran escala	57
Cultivo de <i>Dunaliella salina</i> a escala de laboratorio	59
Cultivo de <i>Dunaliella salina</i> a gran escala	60

Determinaciones sobre las microalgas	62
Densidad celular	62
Materia seca y cenizas	63
Cuantificación espectrofotométrica de pigmentos	64
Análisis de pigmentos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	65
Análisis de carotenoides	65
Determinación espectrofotométrica de proteínas	67
Determinación de carbohidratos	68
Extracción y cuantificación de lípidos	69
Extracción	69
Determinación gravimétrica no destructiva de lípidos totales	70
Determinación de ARN	71
Extracción de compuestos de bajo peso molecular de la ribosa	71
Análisis de la composición elemental (CNH)	72
Determinación de iones metálicos por espectrofotometría de absorción atómica	73
Obtención y caracterización de bioderivados de interés químico- farmacéutico	74
Obtención del extracto acuoso de <i>Chlorella vulgaris</i> BEIJERINCK (EC)	74
Análisis de proteína por SDS-PAGE	75
Análisis de la composición de aminoácidos	75
Evaluación del extracto acuoso de <i>Chlorella vulgaris</i> BEIJERINCK (EC) como medio de cultivo para microorganismos	77
Pruebas de esterilidad	77
Cualidades nutritivas	78
Evaluación como medio sólido	78
Evaluación como medio líquido	79
Obtención del extracto hidroalcohólico de cuproclorofilinas a partir de <i>Chlorella vulgaris</i> BEIJERINCK (EHC)	80
Evaluación del extracto hidroalcohólico de cuproclorofilinas como desinfectante y antiséptico	83
Control microbiológico. Test de Kelsey-Maurer	83
Ensayos microbiológicos	84
Test de dilución	85
Test de suspensión	86
Test portagérmenes	87
Ensayos preclínicos in vivo	88

Test para la desinfección higiénica de las manos	89
Test para la desinfección quirúrgica de las manos	90
Test para la desinfección de la piel sana	90
Test para la desinfección de superficies	91
Análisis estadístico	91

4.- Experiencias y resultados 93

Obtención de productos de interés químico-farmacéutico a partir de

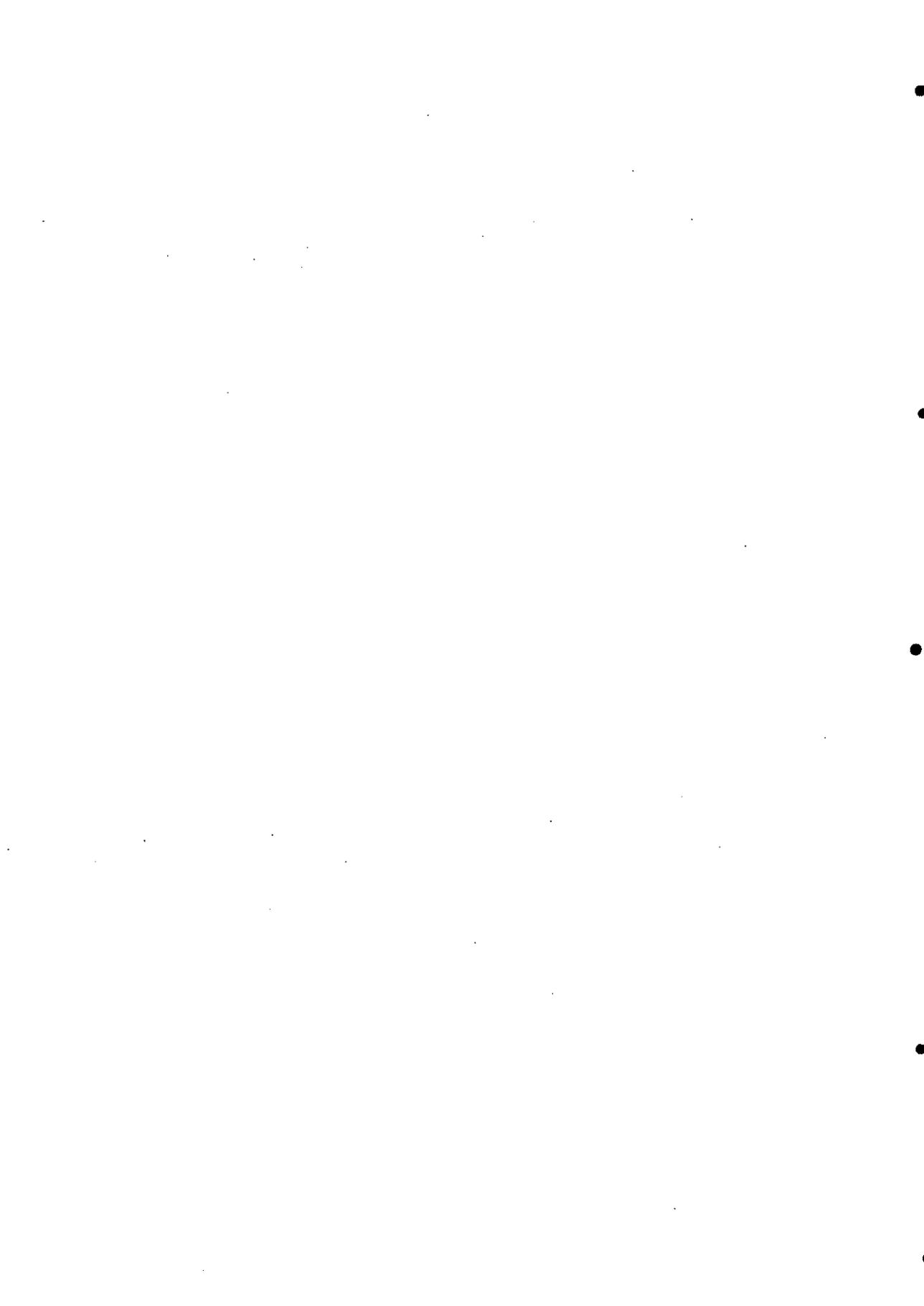
<i>Chlorella vulgaris</i>	95
Composición bioquímica de la materia prima	95
Obtención y evaluación del extracto acuoso de <i>Chlorella vulgaris</i> (EC) ..	97
Composición bioquímica	97
Evaluación como medio de cultivo para microorganismos	101
Evaluación como medio sólido	101
Evaluación como medio líquido	103
Evaluación como medio de cultivo para células vegetales	104
Evaluación del extracto hidroalcohólico de cuprococolifinas de	
<i>Chlorella vulgaris</i>	106
Composición bioquímica	106
Evaluación del extracto como desinfectante y antiséptico	109
Test de dilución	109
Test de suspensión	110
Test portagérmenes	111
<i>Espectro bactericida</i>	111
Test para la desinfección higiénica de las manos	113
Test para la desinfección quirúrgica de las manos	114
Test de desinfección de la piel sana	115
Test de desinfección de superficies	115

Efecto de la concentración de nitrógeno, la irradiancia espectral y la longitud de onda sobre células en cultivo de *Dunaliella salina* a

escala de laboratorio	117
Diseño experimental	117
Resultados	119
Crecimiento	119
Composición celular	131
Concentración de pigmentos respecto al peso seco	159
Concentración proteica respecto al peso seco	162

Relación caroteno:proteína	163
Análisis de la composición pigmentaria por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	165
Relación β -caroteno:clorofila a	175
5.- Discusión	177
6.- Conclusiones	227
7.- Bibliografía	231

1.- Introducción



La exploración de nuevas formas de aprovechamiento de la energía solar por medio de sistemas biológicos se ha enfocado en los últimos años hacia la explotación comercial de las microalgas; sin embargo, su utilización por el hombre comenzó hace muchos años.

En un sentido amplio y desde el punto de vista biotecnológico, el término microalga se refiere a aquellos microorganismos que contienen clorofila a y otros pigmentos fotosintéticos, capaces de realizar fotosíntesis oxigénica. En este contexto, las cianobacterias o algas verde-azules se han considerado tradicionalmente dentro del grupo (Borowitzka y Borowitzka, 1988c). Por tanto, el término microalga no tiene sentido taxonómico alguno; dentro del mismo se incluyen organismos con dos tipos celulares distintos: cianobacterias (procariota) y las restantes microalgas (eucariota) (Rodríguez y Guerrero, 1992).

Las microalgas eucariotas son microorganismos unicelulares (Dodge, 1973; Berner, 1993) que presentan una enorme variedad en cuanto a forma, tamaño, organización y hábitat; se caracterizan, además, por presentar altas tasas de reproducción, gran adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales (Shelef y Soeder, 1980), un ciclo biológico relativamente breve y una alta eficiencia fotosintética; son capaces de convertir la energía solar en biomasa con una eficiencia dos a cinco veces mayor que las plantas superiores (Thomas *et al.*, 1984).

Numerosas investigaciones han puesto de manifiesto el potencial de las microalgas para la producción de una gran variedad de sustancias de interés químico, farmacéutico e industrial, además de sus aplicaciones en la alimentación animal y la purificación de aguas residuales. No obstante, la característica más importante del cultivo de microalgas es su versatilidad, posibilitando la integración de diferentes aplicaciones en un único proceso tecnológico, lo que constituye una ventaja desde el punto de vista económico.

ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Los hallazgos fósiles revelan que las cianobacterias son los organismos fotosintéticos oxigénicos más antiguos que existen, probablemente del periodo Precámbrico o Arqueozoico, hace aproximadamente tres mil millones de años. La necesidad primaria que condicionó su utilización por el hombre fue la de alimentarse, necesidad que estuvo siempre determinada por particularidades geográficas, socio-culturales y temporales.

A lo largo del tiempo surgieron culturas que se adaptaron al entorno local, descubriendo, usando y modificando los recursos bióticos. En México, desde 1524, según las descripciones hechas por Fray Toribio de Benavente (Richmond, 1988) los aztecas elaboraban unos bizcochos que llamaban tecuitlatl. Eran comunidades nativas asentadas en los alrededores del lago Texcoco, donde espontáneamente crecían cianobacterias del género *Spirulina*. El médico y naturalista español Francisco Hernández en 1521 detalla su elemental proceso de obtención, que consistía en un secado solar de las tortas después de la recogida (Tirso y Vadjlha, 1988).

En 1940 Dangeard descubre que una población de Africa Central consumía tortas secas de un alga verde-azul; veinte años después, el botánico belga Jean Léonard describe la forma de obtención de unas tortas similares preparadas por la tribu Canambú en Kanem, El Chad, llamadas "dié" o "dihé", destinadas al consumo local y elaboradas a base de *Spirulina platensis* (Richmond, 1988; Shubert, 1988; Tirso y Vadjlha, 1988).

La utilización de las microalgas por el hombre ha sido amplia, considerándose incluso muchas de ellas manjares exóticos y otras platos comunes, fundamentalmente de la cocina oriental. Diferentes especies de cianobacterias se consumen y comercializan en todo el mundo, siendo su uso más extendido en países asiáticos; tal es el caso del *Nostoc pruriforme* o "lakeplum", plato común en Mongolia, China, Tartaria y los Andes Peruanos (Aldave-Pajares, 1969). En Japón, por ejemplo, se considera un manjar la

microalga *Phyllocladus sacrum*, mientras que las microalgas verdes filamentosas *Oedogonium* y *Spirogyra* se consumen en Burma, Vietnam y la India (Johnston, 1970).

La primera evidencia científica de la existencia de las microalgas se remonta a 1830, cuando el científico francés Dunal constata la presencia de un alga flagelada pequeña en los pantanos salados de las costas mediterráneas francesas; esta microalga fue descrita posteriormente por Teodoresco en 1905 y nombrada por éste, en honor a Dunal, *Dunaliella salina* (Ginzburg, 1987). En 1849, Naegeli describe y nombra otra especie de microalga, a la que por su color púrpura denomina *Porphyridium* (Vonshak, 1988), y en 1878 Strasburger utiliza *Haematococcus* en los primeros estudios sobre fototaxis (Braune y Ekelund, 1990). Sin embargo, el desarrollo de tecnologías que permitieron la explotación y utilización racional de las microalgas comenzó a finales del siglo XIX.

En 1890 el microbiólogo holandés Beijerinck obtuvo por primera vez cultivos puros de la microalga de agua dulce *Chlorella vulgaris*; a partir de entonces se trabajó en la obtención de cultivos con alta densidad celular, logrado por Otto Warburg en 1919 (Oh-Hama y Miyashi, 1988), quien introdujo, además, la idea de utilizar estas suspensiones densas de microalgas como instrumento en las investigaciones sobre fotosíntesis (Richmond, 1986c; Fogg, 1988). En 1912 Kufferath ya había obtenido cultivos puros de *Porphyridium*, y en 1935 Vischer publica aspectos fundamentales para el desarrollo de los cultivos de esta microalga en medio sólido (Vonshak, 1988).

El concepto de producción masiva se establece por primera vez en 1942, durante la Segunda Guerra Mundial, cuando Harder y von Witsch utilizan *Chlorella pyrenoidosa* y *Nitzschia palea* para la producción de lípidos. Los primeros cultivos continuos de microalgas habían sido diseñados en 1938 con el objetivo de cultivar *Phaeodactylum tricorutum* (Ketchum y Redfield, 1938). En los primeros años de la década de los 40 surge en Alemania un interés especial por las diatomeas como fuente de combustible líquido; sin embargo,

no es hasta finales de esta década que el potencial de las microalgas para su cultivo masivo atrae la atención de los científicos (Richmond, 1986c).

En 1948, Spoerhr y Milner, después de realizar estudios sobre la composición química de *Chlorella sp.*, sugieren el uso de las microalgas como fuente de proteínas debido a la carencia global de éstas. Durante estos años, en una leprosería venezolana, Jorgensen y Convit comenzaron a concentrar *Chlorella* en una charca eutrófica que tenía un bloom constante de esta microalga; después de cocerla la administraban a los pacientes, comprobando la mejoría de su estado físico con una ingesta de 21 g día⁻¹ de biomasa seca (Jorgesen y Convit, 1953); de esta forma se dan los primeros pasos en los ensayos clínicos con microalgas. Estos trabajos fueron seguidos por diferentes pruebas en humanos sanos, donde *Chlorella* y *Scenedesmus* se incorporaron a diferentes concentraciones en la dieta de voluntarios, durante tiempos preestablecidos, destacando los trabajos de Dam *et al.* (1965), Lee *et al.* (1967) y Kofranyi (1978).

En 1952 se celebra el Primer Simposio sobre el Cultivo Masivo de Algas. Un año después, aparece el primer trabajo publicado que resume los avances del cultivo de microalgas: "Algal culture from Laboratory to Pilot Plant" (Burlaw, 1953); su principal objetivo era el desarrollo de cultivos de *Chlorella* para la producción de alimento.

En 1953, Gummert introduce la idea de utilizar dióxido de carbono para los cultivos de *Chlorella* y *Scenedesmus* (Richmond, 1986c), dando los primeros pasos para el desarrollo de cultivos autótrofos. Esta idea se transfirió a Dormund, donde Soeder y sus colaboradores desarrollaban tecnologías importantes, que se emplean actualmente en los cultivos masivos de microalgas.

En 1954, Morimura desarrolla productos experimentales usando *Chlorella ellipsoidea*, entre los que se incluían polvos verdes para infusiones, sopas, galletas, panes, helados, pastas y salsas (Kay, 1991); se inicia así el

interés por la diversificación de aplicaciones dentro del campo alimentario. Estos trabajos fueron seguidos por los de Gross en 1978, quien investigó la aceptación de 54 productos de *Scenedesmus* con 1745 voluntarios (Kay, 1991).

En la década de los 60 se establecen los fundamentos científicos y tecnológicos del cultivo de microalgas, en los que se venía trabajando desde 1948. Los pioneros fueron científicos del Instituto Carnegie de California y del Instituto Tokogawa de Biología de Tokyo (Richmond, 1986c), destacando los trabajos de Oswald, quien introdujo un nuevo concepto en la producción a gran escala, sugiriendo la doble función de los cultivos masivos en referencia a su papel en el tratamiento de aguas residuales, idea que había surgido en la década de los 50 (De Pauw y De la Noüe, 1988).

En 1960 se desarrolló un sistema de cultivo tipo cascada para cultivos masivos de *Scenedesmus*, en Trebon (Checoslovaquia), utilizado posteriormente para *Chlorella* en Bulgaria (Richmond, 1986c). En este mismo año, Oswald y Golueke desarrollaron sistemas de producción masiva de algas para la bioconversión de la energía solar en metano. Durante esta década, comenzaron los trabajos con *Dunaliella salina* en Rusia, y con su descubrimiento como fuente natural de β -caroteno por Massyuk en 1966, aumenta el interés comercial por las microalgas (Borowitzka y Borowitzka, 1988c). En estos años se desarrollan, además, sistemas de cultivos cerrados para misiones espaciales (Nichiporovich *et al.*, 1962; Semenenko *et al.*, 1966), iniciados en 1959 por Golueke.

En el campo de los cultivos masivos, el gobierno alemán dio un impulso importante durante los años 70, apoyando las investigaciones sobre producción de microalgas en varios países en vías de desarrollo, por lo que se comenzó a cultivar *Scenedesmus* en Tailandia, India y Perú, utilizando la tecnología del sistema Dortmund. En esta década, debido a la profunda crisis energética, se hizo necesaria la investigación sobre nuevas fuentes de energía; dentro de éstas, la aplicación biológica de la energía solar atrae gran interés, en particular, las tecnologías de producción de biomasa algal, ya que

las algas constituyen un eficiente sistema para su utilización (Benemann *et al.*, 1977).

En la década de los 80 las investigaciones sobre microalgas tuvieron un avance significativo y la producción comercial tiene un buen soporte tecnológico, por lo que se establecen numerosas industrias. El cultivo de microalgas se extiende y desarrolla en países como Cuba, Chile y Venezuela.

En 1983 Soeder introduce el término "albazod" para referirse al material recogido en los sistemas de cultivo destinados al tratamiento de aguas residuales, que consiste en microalgas, bacterias, zooplancton y detritus. Continúan los avances tecnológicos en este campo y, aunque las plantas comerciales por sí solas no tienen beneficios económicos probados (Richmond, 1986c), se valoran por sus importantes beneficios ecológicos, como punto de partida en el control de la contaminación.

En las últimas décadas el desarrollo tecnológico en cuanto a la producción de microalgas a gran escala ha sido importante, todo ello vinculado con su incorporación en la alimentación y, más recientemente, en la industria farmacéutica y cosmética. Especies de microalgas como *Chlorella*, *Spirulina*, *Porphyridium*, *Coelastrum*, *Scenedesmus* y *Dunaliella* han sido muy estudiadas, pero son numerosas las especies que hasta hoy se conocen y que aportan beneficios al hombre.

Desde los inicios de la producción de biomasa algal, mucho se ha avanzado en cuanto a aplicaciones de los cultivos a gran escala. Actualmente, se incluyen la producción de alimento, sustancias de interés químico-farmacéutico e industrial, preparados algales dietéticos y cosméticos, además de su aplicación en el tratamiento de aguas residuales (Oswald, 1975) y en acuicultura, donde juegan un importante papel en el desarrollo de cultivos marinos para la alimentación de moluscos, crustáceos y peces (De Pauw y Persoone, 1988; Brown y Miller, 1992).

Debido a la importancia de las microalgas en la alimentación animal y humana, la utilidad de las sustancias que de ellas se extraen y el desarrollo tecnológico alcanzado en este área de investigación, han aparecido en trabajos recientes términos como biotecnología solar (De Pauw y De la Noüe, 1988) y biotecnología algal (Chapman y Gellenbeck, 1989; Borowitzka, 1992a; Becker, 1994), que en cierta forma reflejan el interés por la evolución tecnológica alcanzada; ésta es consecuencia lógica de un largo proceso histórico que comenzó hace millones de años cuando el hombre, espontáneamente, empezó a utilizar a las microalgas en su alimentación.

UTILIZACIÓN DE LAS MICROALGAS EN LA INDUSTRIA MÉDICO-FARMACÉUTICA Y COSMÉTICA

La mayoría de las drogas útiles para el hombre son de origen natural. Hasta hace algunos años, la fuente primaria eran las plantas terrestres. Sin embargo, aproximadamente el 70% del planeta está cubierto por agua, por lo que muchos organismos acuáticos han sido objeto de estudio y explotación comercial, fundamentalmente las macroalgas (Hansen *et al.*, 1981), mientras que numerosas especies de microalgas representan hoy un recurso natural no explotado.

Una de las aplicaciones más interesantes de las microalgas es la relacionada con las sustancias de interés químico-farmacéutico, debido a la utilidad práctica que éstas encuentran en biomedicina, farmacología, fitocosmética y en la industria alimentaria.

A partir de diferentes especies de microalgas se extraen sustancias como vitaminas, pigmentos, alcoholes, aminoácidos, polisacáridos sulfatados, glicerol, ácidos grasos poliinsaturados, enzimas, extractos acuosos reguladores del crecimiento, ceras, biosurfactantes, fosfolípidos, lecitinas, betaínas y precursores de prostaglandinas, dependiendo de las que sean capaces de sintetizar. Algunas sustancias poseen efectos terapéuticos como: cicatrizan-

tes, inmunorreguladores, anticancerígenos, tensorreguladores, antiinflamatorios, hipocolesterolémicos, entre otros (Becker, 1988; Borowitzka, 1988; Borowitzka, 1992a).

La extracción de sustancias de interés químico-farmacéutico a partir de microalgas se remonta a los trabajos de von Esenbeck en 1836, quien extrajo ficocianina de una cianobacteria (Rowan, 1989); desde entonces los avances en este campo han sido numerosos.

Diferentes especies de microalgas son fuentes de valiosos productos. *Porphyridium cruentum* es importante por su contenido en ficoeritrina, ácido eicosapentanoico (EPA), superóxido dismutasa (SOD), ácidos grasos poliinsaturados, polisacáridos sulfatados (Gudin, 1988; Thepenier *et al.*, 1988), α tocoferol y vitamina K (Borowitzka, 1988).

Spirulina sp. destaca por su alto contenido proteico, en ficocianinas, vitamina B₁₂ (cianocobalamina), β -caroteno (provitamina A), vitamina E, cantidades significativas de vitaminas del complejo B y ácidos grasos insaturados esenciales (Keto, 1983), con un alto contenido en γ -linolénico (Richmond, 1988). Se conoce, además, la existencia de una patente de Kunamoto (1984) en la que se usan extractos acuosos de *Spirulina* y *Scenedesmus* como sustitutos del suero bovino fetal (FBS) en medios de cultivo (Borowitzka, 1988).

Dunaliella salina y *Dunaliella bardawil* son muy valiosas por su alto contenido en β -caroteno, además de ser fuentes de glicerol y proteína; aunque estos son los tres productos de mayor interés comercial en estas microalgas, pueden incluirse, además, vitaminas, enzimas, como la glicerol deshidrogenasa, ácidos grasos y reguladores del crecimiento (Borowitzka y Borowitzka, 1988c; Ben-Amotz y Avron, 1990).

Chlorella pyrenoidosa es productora de ácido L-ascórbico, mientras que *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.* han sido incorporadas en la alimentación

como SCP (Single Cell Protein) o proteína de origen unicelular. De ambas se extrae, además, un factor que estimula el crecimiento y productividad de levaduras y otros microorganismos (Borowitzka, 1988).

Estas han sido algunas de las especies más citadas por sus beneficios bien establecidos y el desarrollo alcanzado en sus tecnologías de cultivo, por lo que su explotación comercial ha sido posible; sin embargo, hay muchas otras especies valiosas de microalgas, fuentes de productos útiles para el hombre.

SUSTANCIAS DE INTERÉS QUÍMICO-FARMACÉUTICO OBTENIDAS A PARTIR DE MICROALGAS

EXTRACTOS ACUOSOS. FACTORES DE CRECIMIENTO

Una de las aplicaciones potenciales de las microalgas a escala industrial es el uso de sus extractos acuosos en el cultivo de microorganismos y de tejidos (Borowitzka, 1988).

Por sus cualidades, los extractos pueden ser utilizados como medio de cultivo en la fermentación a escala industrial, donde las posibilidades de mercado son amplias, como sustituto del suero bovino fetal (Borowitzka, 1988), en el cultivo comercial de alevines y en el desarrollo de larvas (De Pauw y De la Noüe, 1988). Se cita, además, la utilidad de los extractos acuosos de *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Spirulina* y *Porphyridium*, bien por su acción antibacteriana *in vitro*, o por su acción estimulante sobre el crecimiento y productividad de levaduras y otros microorganismos (Fingerhut *et al.*, 1984; Borowitzka y Borowitzka, 1988c; De Pauw y De la Noüe, 1988).

El extracto de *Scenedesmus obliquus* ha sido utilizado para el cultivo de *Rizhobium japonicum*, con el objetivo de mejorar su rendimiento (Fingerhut *et*

al., 1984; Borowitzka, 1988), y como medio de cultivo para estimular el crecimiento del *Lactobacillus* sp. (Zielke et al., 1978).

El extracto acuoso de *Chlorella vulgaris* estimula el crecimiento de tejidos vegetales y animales (Borowitzka, 1988). Inyectado o administrado de forma oral a animales de laboratorio, aumenta su resistencia a infecciones bacterianas y a procesos tumorales (Hasegawa, 1990; Tanaka, 1990). Se ha estudiado, además, su actividad como modificador de la respuesta biológica en la protección de ratas contra el efecto letal del citomegalovirus murino (MCMV) (Ibusuki y Minamishima, 1990). Recientemente, se cita su papel en la formación de linfocitos polimorfonucleares, la regeneración celular en médula y bazo, y la acumulación de leucocitos en la sangre periférica y en la cavidad peritoneal, por lo que se considera un potente modificador de la respuesta inmune (Tanaka, 1990). Por otra parte, los extractos acuosos de *Chlorella* y *Spirulina* restablecen de forma significativa la actividad de la colinesterasa, por lo que, de forma general, se puede hablar de su papel en la reactivación de enzimas en humanos (Matsueda et al., 1976).

Los extractos acuosos de microalgas han mostrado actividad estimulante sobre el crecimiento de plantas superiores, lo que puede deberse, en parte, a la presencia de auxinas, giberelinas, citoquininas u otras hormonas (Burkiewicz, 1987), aunque se discute la participación de un compuesto natural liberador de etileno, el ácido carboxílico 1-aminociclopropanoico, como responsable de algunos de estos efectos (Borowitzka, 1988).

PIGMENTOS: DISTRIBUCIÓN Y APLICACIONES

Los pigmentos son moléculas orgánicas de mucha utilidad en la industria alimentaria, química y farmacéutica, así como en biomedicina, cosmetología y acuicultura.

Las algas contienen los tres grupos de pigmentos fotosintéticos mayoritarios: clorofilas, que absorben luz azul y roja; carotenoides, que

absorben en la región del verde y el azul; y ficobilinas, que absorben luz verde, amarilla y anaranjada. Por medio de estos pigmentos, que aparecen asociados a proteínas en el cloroplasto, se lleva a cabo la absorción de la luz en toda la zona del espectro visible y gracias a ellos se realiza la fotosíntesis.

Además de la importancia fisiológica y el papel que juegan los pigmentos en la vida de los organismos fotosintéticos, éstos constituyen valiosos productos al servicio de las necesidades del hombre. Se puede citar la utilización de las ficoeritrinas como colorante fluorescente en inmunoensayo (Stryer *et al.*, 1985), de las ficocianinas en fitocosmética, además de su amplio uso como moduladores de la respuesta inmune (Ijima *et al.*, 1982). Es bien conocido el uso de diferentes carotenoides como colorantes alimentarios (Borowitzka, 1988), implicados en la calidad de productos de origen animal, así como la utilización de derivados de la clorofila en la conservación de alimentos y como aditivos en diferentes preparaciones farmacéuticas y cosméticas.

CLOROFILAS Y DERIVADOS

La clorofila es el pigmento lipofílico predominante en vegetales, responsable de la fotosíntesis; debe su nombre a Pelletier y Caventon, quienes la aislaron en 1817 (Hall y Rao, 1994). Por su importancia para los sistemas vivos, pertenece al grupo de metalo-tetrapirroles denominados pigmentos de la vida (Rüdiger y Schoch, 1988).

En las algas, la contribución pigmentaria al peso seco es de un 0.5-5% (Brown *et al.*, 1989), aunque hay autores que citan un contenido superior al 5% (Becker, 1988), siendo la clorofila el pigmento mayoritario.

Esencialmente pueden definirse cinco tipos de clorofilas algales: clorofila a, pigmento fotosintético primario, presente en todos los organismos fotosintéticos oxigénicos (Rüdiger y Schoch, 1988); clorofila b (Chlorophyta, Euglenophyta y Prochlorophyta) (Liaaen-Jensen, 1977; Rüdiger y Schoch,

1988); clorofilas c_1 , c_2 y c_3 (Chrysophyta, Pyrrophyta y Phaeophyta) (Rüdiger y Schoch, 1988; Brown *et al.*, 1989; Fookes y Jeffrey, 1989); clorofila d (Rodophyta) (Rüdiger y Schoch, 1988), y la RCI (centro de reacción del PSI) ó P 700 (Chlorophyta, Cyanophyta y Prochlorophyta) (Rüdiger y Schoch, 1988); además de las bacterioclorofilas de bacterias fotosintéticas anoxigénicas verdes y púrpuras.

El número de estructuras conocidas de la clorofila se ha incrementado durante los últimos años. En 1960 se conocían tres, en 1970 veinte y en 1980 más de cien, clasificándose de forma general en tres grupos: porfirinas, dihidroporfirinas (clorinas) y tetrahidroporfirinas (bacterioclorinas).

La clorofila a, en función de las proteínas a las que se encuentre unida de forma no covalente *in vivo*, tiene diferentes máximos de absorción en el rojo del espectro; se denomina por tanto, clorofila a 660, 670, 680, 685, 690, 700 ó 720. Las más fluorescentes son las que absorben entre 650-680 nm, constituyendo predominantemente los pigmentos antena del fotosistema (PS) II (De la Rosa *et al.*, 1990).

En algas no se puede definir una sola ruta de síntesis para las clorofilas. En cianobacterias y en el alga eucariótica *Cyanidium caldarium* parece ser que la única ruta es la C_5 , pero en *Scenedesmus obliquus* y *Euglena gracilis* operan tanto la ruta C_5 como la de Shemin, es decir, a partir de glicina y succinil CoA. En este caso, se discute la compartimentación de las rutas de síntesis: Shemin en mitocondria para el grupo hemo y C_5 en el cloroplasto para la clorofila a (Rüdiger y Schoch, 1988).

La síntesis de clorofilas depende de la concentración de carbono y la intensidad de la luz de forma lineal (Maloney *et al.*, 1989), además de la concentración y fuente de nitrógeno (Piorreck *et al.*, 1984).

La clorofila, reconocida como principio colorante vegetal (Cook y Martin, 1953), no sólo es inocua, sino que es útil desde el punto de vista industrial en el campo alimentario, farmacéutico y cosmético.

En el campo de aplicaciones de las microalgas, se conoce la existencia de un preparado férrico en alcohol absoluto, elaborado a partir de clorofila obtenida de *Spirulina sp.*, patentado como un poderoso desodorante (Yamaguchi, 1981).

CAROTENOS Y XANTOFILAS

Los carotenoides son pigmentos isoprenoides poliénicos muy hidrofóbicos, derivados del licopeno. En contraste con las plantas superiores, numerosas especies de algas, exceptuando la mayoría de las clorofíceas, acumulan en el cloroplasto una gran variedad de carotenoides, característicos e inusuales (Goodwin y Britton, 1988).

Las xantofilas, por su parte, son también muy diversas y sus características dependen de la naturaleza del caroteno que les de origen (epoxi, ceto o hidroxil), ya que no son más que derivados oxigenados de estos pigmentos (Benemann y Weissman, 1984).

Las Chlorophyta generalmente contienen los mismos carotenoides mayoritarios que las plantas superiores: α -caroteno, β -caroteno, luteína, neoxantina y los componentes del ciclo de las xantofilas: violaxantina, zeaxantina y anteraxantina (Rowan, 1989); sin embargo, algunas especies acumulan xantofilas inusuales como la loroxantina o pyrenoxantina (*Chlorella pyrenoidosa*), fritschiellaxantina (*Fritschiella tuberosa*) y sifonaxantina (Goodwin y Britton, 1988).

Bajo condiciones de estrés, especialmente déficit de nitrógeno, muchas especies de algas verdes se tornan rojas o anaranjadas debido a la formación de grandes cantidades de β -caroteno o combinaciones de sus

cetoderivados: equinenona, hidroxiequinenona, cantaxantina, hidroxycantaxantina y astaxantina. Estos carotenoides secundarios se acumulan fuera del cloroplasto en forma de gotas (glóbulos) liposolubles, o bien en la pared celular, asociados con la esporopolenina, un polímero estructural del cual pudieran ser precursores (Britton, 1988), como en el caso del alga verde *Spongiochloris typica*, durante la senescencia y formación de quistes (Borowitzka, 1988). *Haematococcus pluvialis* acumula astaxantina fuera del cloroplasto, en la región perinuclear de la aplanospora (Borowitzka, 1992b); sin embargo, *Dunaliella bardawil* acumula grandes cantidades de β -caroteno en condiciones de alta salinidad e irradiación (Ben-Amotz y Avron, 1983a; Ben-Amotz y Avron, 1983b; Goodwin y Britton, 1988) en la periferia del cloroplasto.

La luteína, cantaxantina (Benemann y Weissman, 1984), astaxantina y zeaxantina, son xantofilas que se utilizan fundamentalmente como colorantes alimentarios; su efecto sobre la pigmentación de la piel y de la yema del huevo es bien conocido (Marusich y Bauerfeind, 1981). A pesar de la baja concentración de luteína en la biomasa de *Dunaliella bardawil*, con una proporción β -caroteno: luteína (15:1), se ha encontrado que en la yema del huevo y en el suero de los animales alimentados con dietas suplementadas con biomasa de esta microalga, sólo hay luteína y no β -caroteno (Ben-Amotz *et al.*, 1986), ya que éste se acumula preferencialmente en hígado, riñones, tejido adiposo y corazón (Mokady, 1992).

Chlorella pyrenoidosa, bajo condiciones heterotróficas, en la oscuridad, acumula gran cantidad de luteína, según la patente de Farrow y Tabenkin (1966) (Borowitzka, 1988), al igual que *Dunaliella salina*, en condiciones de alta irradiación o hipersalinidad (Cowan *et al.*, 1995).

Sin embargo, de todos los carotenoides mencionados es el β -caroteno, específicamente el isómero 9-*cis*, el de mayor importancia en la industria médico- farmacéutica y cosmética.

El posible papel del β -caroteno en la prevención de la carcinogénesis ha sido ampliamente estudiado. Aunque su mecanismo de acción específico es desconocido se sabe que, de forma experimental, inhibe el cáncer oral (Schwartz *et al.*, 1988). Asimismo, actúa de forma positiva sobre la reproducción y el desarrollo corporal (Nagasawa *et al.*, 1989), es importante para la visión (Mathews y Van Holde, 1990), es un potente captador de radicales libres, agente antioxidante y elimina oxígenos en singlete, además de su acción biológica como provitamina A (Mokady, 1992).

El alga unicelular *Dunaliella salina* es especialmente rica en β -caroteno cuando se cultiva en condiciones especiales de luz, salinidad y concentración de nitrógeno; ofreciendo una mezcla ideal de isómeros 9-*cis* y todo-*trans*. Estos isómeros tienen propiedades diferentes; el 9-*cis* sirve como solvente del todo-*trans*, por lo que al estar juntos, aumenta su biodisponibilidad (Mokady, 1992), ya que el todo-*trans* cristaliza con facilidad.

Bajo condiciones apropiadas de cultivo *Dunaliella salina* acumula hasta más del 10% de su peso seco de β -caroteno, en forma de glóbulos lipoides en la región periférica del cloroplasto (Ben-Amotz y Shaish, 1992); éste es hasta el momento, el mayor valor encontrado en comparación con otras algas, plantas y microorganismos (Ben-Amotz y Shaish, 1992).

EFFECTOS DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES SOBRE LOS CULTIVOS DE MICROALGAS

En el cultivo de microalgas, el rendimiento depende de factores como la viabilidad y concentración celular, el suministro de nutrientes, el control de parámetros físico-químicos como el pH, la salinidad y la temperatura; las condiciones de iluminación y la disponibilidad de la luz; ésta constituye un factor fundamental tanto por sus efectos como por sus interacciones con otros parámetros.

LUZ

La palabra luz, en el lenguaje común, se refiere a la radiación del segmento del espectro electromagnético para el cual el ojo humano es sensible.

Desde los tiempos de Newton se conoce que la luz blanca puede ser separada dentro de un espectro y que la porción visible de éste va desde el violeta (380 nm) al rojo lejano (750 nm).

Aunque la energía radiante del sol se representa por un espectro electromagnético completo, la atmósfera de la tierra sólo permite el paso de parte del infrarrojo, el ultravioleta y todo el visible. Por lo que, aunque el flujo de radiación solar sobre la tierra es de aproximadamente 1755×10^{14} W, la energía total recibida cada año es de $3-5.53 \times 10^{24}$ J (10^{17} W); siendo la intensidad y distribución espectral funciones de la emisión característica y de la distancia tierra-sol (De la Rosa *et al.*, 1990; Kirk, 1994b).

En los sistemas acuáticos, la captura de la energía luminosa es el factor primario que controla la productividad (Geider y Osborne, 1992; Hall y Rao, 1994). La mayoría de las microalgas viven en ambientes acuáticos donde la luz se atenúa exponencialmente con la profundidad de acuerdo con la ley de Lambert-Beer:

$$I_d = I_0 e^{-kd}$$

d es la profundidad, I_0 la radiación incidente en la superficie del agua, I_d la densidad del flujo fotónico a la profundidad d , y k el coeficiente de extinción (Richardson *et al.*, 1983; Kirk, 1994b).

Además de esta atenuación, el agua filtra de forma selectiva la luz incidente; por tanto, la composición espectral de la luz que penetra varía con la profundidad en dependencia del tipo de agua (Richardson *et al.*, 1983). El rojo lejano y el rojo del espectro visible (> 600 nm) no se detectan prácticamente

a partir de los 10 m (Richardson *et al.*, 1983); a más de 100 m, el flujo radiante de 400 nm es muy débil, y por debajo de esta longitud de onda es inaparente; sin embargo, permite que se lleve a cabo la fotosíntesis (Klein, 1992).

El agua pura absorbe sólo débilmente en la región del azul y el verde del espectro; la absorción comienza a ser mayor a longitudes de onda superiores a los 550 nm y muy significativa en la región del rojo, al final del espectro visible (Kirk, 1992). Una capa de 1 m de grosor de agua pura puede absorber aproximadamente el 35% de la luz incidente con una longitud de onda de 680 nm, lo que aumenta ligeramente con la temperatura. En los cultivos de microalgas a gran escala, la película de agua no alcanza nunca esta profundidad, por lo que este efecto no tiene una incidencia significativa en la productividad.

La cantidad de luz utilizada por las microalgas en el medio acuático no sólo depende de la cantidad total de pigmentos fotosintéticos presentes, sino también del tamaño y distribución de las células algales. La densidad algal influye en la disponibilidad de la luz, puesto que las características del campo de luz dentro del agua están determinadas, en parte, por las propiedades de absorción y dispersión de las microalgas en sí.

De forma general, se puede decir que la luz influye de un modo u otro en función de su composición espectral, intensidad y periodicidad.

FUENTES DE LUZ

La disponibilidad de la luz es el factor principal que influye sobre la productividad de los cultivos cuando los demás factores están dentro de los límites razonables (Abalde *et al.*, 1995).

La luz utilizada para los cultivos de microalgas puede ser natural o artificial. El uso de la luz natural ofrece la ventaja de que no supone gasto energético alguno, lo que abarata el proceso de obtención de biomasa a partir

de cultivos a gran escala. Su inconveniente es que no permite el control de la intensidad ni el fotoperíodo, por lo que las fluctuaciones diarias, estacionales y las condiciones climatológicas afectan notablemente a los cultivos; sólo se pueden registrar datos útiles en estaciones actinométricas que, en última instancia, permiten explicar cualquier cambio en la composición bioquímica de las células en cultivo; o bien manipular indirectamente, ajustando la densidad celular, la profundidad o la dilución del cultivo (Ben-Amotz, 1995).

La utilización de la luz natural limita desde el punto de vista económico el desarrollo de cultivos a gran escala, en aquellos lugares donde las condiciones climáticas son variables o no son favorables la mayor parte del año, en lo que se refiere, fundamentalmente, a la iluminación, temperatura, precipitaciones, evaporación, viento, nubosidad y humedad relativa, ya que éstas son el factor más importante a tener en cuenta para el diseño de sistemas de cultivo a cielo abierto (Oswald, 1988).

La iluminación artificial permite el control tanto de la intensidad como de la composición espectral de la luz en los cultivos, pero supone un gasto energético considerable (Abalde *et al.*, 1995); generalmente, se usa en el cultivo de microalgas a nivel de laboratorio, en fotobiorreactores o en cultivos a menor escala, en lugares donde la intensidad de luz no es la adecuada durante todo el año, o donde las condiciones climáticas no son favorables; está generalizada en el desarrollo y mantenimiento de inóculos.

El uso de luz artificial implica la necesidad de sistemas de refrigeración debido a la generación de calor (Abalde *et al.*, 1995), lo que encarece aún más el cultivo. Su aplicación en cultivos a gran escala sólo puede justificarse si el precio del producto final por gramo de alga, es mucho mayor que el coste de producción.

Las fuentes de luz artificial tienen espectros de emisión que difieren bastante del espectro solar, excepto las lámparas True Light (Duro Light), con un espectro total prácticamente idéntico, pero de menor intensidad. Las

lámparas fluorescentes tubulares (Daylight, Cool-White y Gro-lux), con máximas emisiones en el rojo y el azul, son las más utilizadas para la iluminación de cultivos interiores en cámaras con temperatura controlada, ya que son las que emiten menos calor y permiten tasas máximas de crecimiento y división (Abalde *et al.*, 1995).

Con el aumento de la densidad celular de los cultivos, independientemente de la fuente de luz, la disponibilidad de ésta por célula decrece, por lo que la razón de crecimiento específico también disminuye (Raven y Geider, 1988); de aquí que sea importante el diseño de sistemas de cultivo donde otros factores no contribuyan a afectar su disponibilidad, como es el caso de la profundidad y el tiempo de residencia de las células en suspensión, en los cultivos a gran escala.

EFFECTOS DE LA INTENSIDAD DE LA LUZ. FOTOACLIAMATACIÓN

El término aclimatación, más que adaptación, se usa para definir los ajustes que puede hacer un organismo como respuesta al medio ambiente, dentro de los límites de su genoma, mientras que si hay alteraciones genómicas es más preciso usar el término adaptación (Ramus, 1981); sin embargo, con frecuencia ambos términos se usan indistintamente y sólo se distinguen en algunos trabajos de los últimos años (Algarra y Rüdiger, 1993).

La mayoría de los organismos fotosintéticos ajustan su contenido pigmentario como respuesta a los cambios de irradiación, con el propósito de optimizar la utilización de la luz para la fotosíntesis, fenómeno que ha sido denominado fotoaclimatación (Sukenic *et al.*, 1990). Sin embargo, se sugiere que los fenómenos pueden ser a nivel morfológico (volumen celular) o fisiológico (fotosíntesis y velocidad de crecimiento) (Algarra y Rüdiger, 1993).

La fotoaclimatación además de ser importante desde el punto de vista fisiológico y ecológico, es fundamental para el crecimiento y supervivencia de

las algas (Levy y Gantt, 1988), y debe tenerse en cuenta para el desarrollo de cultivos masivos; ésta se relaciona con la intensidad de la luz, que tiene también un efecto marcado sobre la composición bioquímica de las microalgas.

Existen especies como *Dunaliella salina*, que multiplican su potencial como respuesta a la fotoaclimatación a altas irradiaciones, aumentando considerablemente su contenido de β -caroteno, que es precisamente el metabolito de mayor interés comercial de esta microalga (Borowitzka, 1988a; Ben-Amotzy y Avron, 1989a; Ben-Amotzy y Avron, 1989b; Ben-Amotzy *et al.*, 1989). Sin embargo, existen considerables variaciones en los mecanismos de fotoaclimatación entre las diferentes especies de microalgas (Levy y Gantt, 1988).

En relación con la intensidad de la luz, Soeder y Stengel distinguen dos tipos de reacciones de adaptación luz-sombra. La más usual, tipo *Chlorella*, se caracteriza por una relación inversa entre la intensidad de la luz a la que se expone el alga y el contenido de clorofila a, acompañada fundamentalmente por cambios en la concentración pigmentaria. El metabolismo de la clorofila es muy dinámico, los cambios en el contenido pigmentario ocurren en un tiempo relativamente corto y pueden estar parcialmente compensados por cambios en la intensidad de la luz, mediante la optimización de la habilidad de las células para captar la luz disponible. El otro patrón de adaptación es el tipo *Cyclotella*, en el que hay una relación inversa entre la intensidad de la luz y las actividades o concentraciones de los enzimas fotosintéticos (Richmond, 1986a).

Por otra parte, Falkowsky y Owens definen dos estrategias de adaptación luz-sombra para las microalgas marinas: en las diatomeas (*Skeletonema costatum*), la adaptación se caracteriza por cambios en el tamaño, y no en el número, de las unidades P 700; la estrategia de *Skeletonema costatum* es más efectiva a intensidades de luz por debajo de la de saturación. En algas clorofíceas (*Dunaliella tertiolecta*), la totalidad de los cambios en el contenido

de clorofila están relacionados con el número y no con el tamaño de las unidades P 700 (Richmond, 1986a).

La fotoaclimatación no sólo se relaciona con las intensidades de luz; también existe una fotoadaptación cromática, en la que las algas producen pigmentos que tienen máximos de absorción a las longitudes de onda que prevalecen, según el tipo de luz (Gantt, 1990).

EFECTO DE LA LONGITUD DE ONDA SOBRE LA COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA Y EL CRECIMIENTO

Las primeras observaciones del efecto de la composición espectral de la luz sobre procesos fisiológicos se remontan a 1882, cuando Berthold encontró diferencias en la coloración de algas rojas del Golfo de Nápoles, que eran más o menos rojas o azules en función de la profundidad del agua (Klein, 1992). En 1883 Englemann atribuyó estos cambios a la variación en la concentración de ficobilinas, y concluyó que las macroalgas eran capaces de alterar su composición pigmentaria con el propósito de absorber de forma más eficiente la luz disponible; sin embargo, en 1892 Oltmans refuta esta teoría, concluyendo que las algas crecían a diferentes profundidades debido totalmente a la intensidad de la luz, y que la adaptación cromática no tenía mucho significado a nivel ecológico o carecía de importancia; esto contribuyó a que Englemann y Gaidukov llevaran a cabo una serie de experimentos en los que exponían las algas a lámparas de diferentes colores, corroborando en 1902 que como respuesta a estos cambios de luz, había una adaptación cromática en la cianobacteria *Oscillatoria sancta*. En 1923 Härder concluye que tanto la intensidad como la longitud de onda son factores que determinan la distribución vertical de algas bentónicas (Klein, 1992); sin embargo, hay evidencias fisiológicas que demuestran que los cambios en la composición pigmentaria, relacionados con la profundidad de las aguas, son más una adaptación a bajos niveles de irradiación que a la composición espectral de la luz (Crossett *et al.*, 1965; Ramus, 1983).

En el entorno acuático natural la irradiación y la longitud de onda cambian drásticamente con la profundidad (Kirk, 1994). En las aguas oceánicas la luz azul predomina en las profundidades, mientras que en las aguas costeras predomina la región verde-naranja del espectro (Kirk, 1994; Anderson, 1986). El ensombrecimiento de las profundidades viene acompañado de un descenso del rojo lejano, un incremento del rojo y del azul en aguas oceánicas, y del verde en aguas costeras (Larkum y Barret, 1983; Dring, 1987).

La longitud de onda puede alterar procesos como: asimilación de nitrato o amonio (López-Figueroa, 1993), síntesis de ADN, ARN y pigmentos; fotosíntesis, crecimiento, actividad enzimática y producción de metabolitos en general. Las respuestas pueden estar vinculadas con la orientación, el metabolismo o el desarrollo vegetativo (Dring, 1988; Lüning, 1992; Rüdiger y López-Figueroa, 1992; Schmid y Dring, 1992).

Las algas tienen un sistema pigmentario que les permite utilizar la energía lumínica en todo el espectro visible y regular la concentración de pigmentos en función de la intensidad y la composición espectral de la luz natural. Desde los trabajos de Emerson y Lewis en 1943, se ha demostrado que la luz azul y azul mezclada con verde influyen sobre la composición pigmentaria y la fotosíntesis en microalgas (Kirk, 1994).

La acumulación de compuestos de nitrógeno y carbono dependen de la calidad de la luz. Generalmente, el metabolismo del carbono se ve estimulado por la luz roja (acumulación de polisacáridos de la pared celular) y el del nitrógeno por la luz azul (acumulación de biliproteínas) (Torres *et al.*, 1995). La luz verde parece estimular la síntesis de ficoeritrina en *Porphyra umbilicalis*, *Corallina elongata* y *Plocamium cartilagineum* (López-Figueroa, 1991; Rüdiger y López-Figueroa, 1992) y la síntesis de peridina en el alga *Prorocentrum* (Klein, 1992).

En muchos trabajos se citan los efectos fotorreversibles de la luz roja y el rojo lejano. Un pulso de luz roja seguido de oscuridad es suficiente para

producir un descenso en el ARNm; mientras que si en lugar de oscuridad se da un pulso de rojo lejano, este efecto no se observa (Castelfranco y Beale, 1983).

FOTOPERÍODO

El control de procesos biológicos por la longitud del día tiene numerosas ventajas ecológicas (Häder y Tevini, 1987).

En condiciones naturales las microalgas están sometidas a un ciclo de luz: oscuridad que se establece, generalmente, en los cultivos a nivel de laboratorio; éste puede ser el factor cíclico ambiental más importante en la mayoría de los sistemas (Abalde *et al.*, 1995).

Muchos aspectos de la fisiología microalgal varían en un ciclo de 24 horas. Las tasas de absorción de nutrientes están influenciadas por el fotoperíodo, siendo mayores durante el día; la capacidad fotosintética también está influenciada por este fenómeno, observándose las tasas máximas por las mañanas y mínimas al anochecer; el fotoperíodo favorece además la sincronización de los cultivos y respecto a la bioluminiscencia, en las especies que la poseen (dinoflagelados), se detectan picos nocturnos (Sournia, 1974).

Se han seguido diseños experimentales con fotoperíodos muy breves; los pulsos de luz han sido desde 5 min (López-Figueroa y Niell, 1989; López-Figueroa, 1991) hasta de menos de 1 s, incluso de 200 μ s (Klockare y Hemming, 1984); así como la combinación de pulsos de luz cortos con largos períodos de oscuridad (Terry, 1986), sugiriéndose que la tasa de fotosíntesis puede aumentar en estas condiciones. La luz continua también ha sido utilizada en condiciones experimentales (Toro, 1989). De cualquier forma, el fotoperíodo, en condiciones de experimentación, depende del alga en estudio y los objetivos de la experiencia en cuestión.

INTERACCIÓN DE OTROS FACTORES AMBIENTALES CON LA LUZ

CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO

Entre los diferentes componentes del medio de cultivo, la fuente y concentración de nitrógeno determinan en gran medida los cambios en el crecimiento y composición bioquímica de una especie microalgal, influyendo fundamentalmente, sobre el contenido proteico y de la fracción lipídica (Cohen, 1986; Fábregas *et al.*, 1989a; Fábregas *et al.*, 1989b; Sriharan *et al.*, 1989).

Un factor importante en la preparación de un medio de cultivo para microalgas es la forma en la cual el nitrógeno es suministrado. Generalmente, las microalgas son capaces de utilizar nitrato, amonio o urea. Por su toxicidad a altas concentraciones, el nitrito es menos conveniente como fuente de nitrógeno (Kaplan *et al.*, 1986a; Becker, 1994); éste tiene, además, un efecto negativo sobre la productividad de los cultivos de algunas especies de microalgas (Fidalgo, 1995). Aunque los resultados de algunos estudios sugieren que, en la práctica, el amonio o la urea son las fuentes de nitrógeno preferidas por las microalgas (Syrett, 1987), el crecimiento de algunas especies en medios con amonio conlleva a un rápido descenso del pH a valores extremadamente ácidos, por lo que llega a ser tóxico para las células en cultivo (Becker, 1994). Por otra parte, algunas especies de microalgas son incapaces de crecer con urea, que es la fuente de nitrógeno más utilizada en los cultivos a gran escala (Becker, 1994). Sin embargo, en la mayoría de los casos, utilizando nitrato, se alcanza la misma velocidad de crecimiento que si se utilizan amonio o urea (Becker, 1994), siendo el nitrato la fuente más importante frecuentemente disponible en medios naturales (Syrett, 1981). De forma general, en la naturaleza, las microalgas rara vez disponen de abundante concentración de nitrógeno, lo que ha inducido a la explotación eficiente de cualquier fuente potencialmente disponible sin cambios apreciables en las tasas de crecimiento (Ginzburg, 1987).

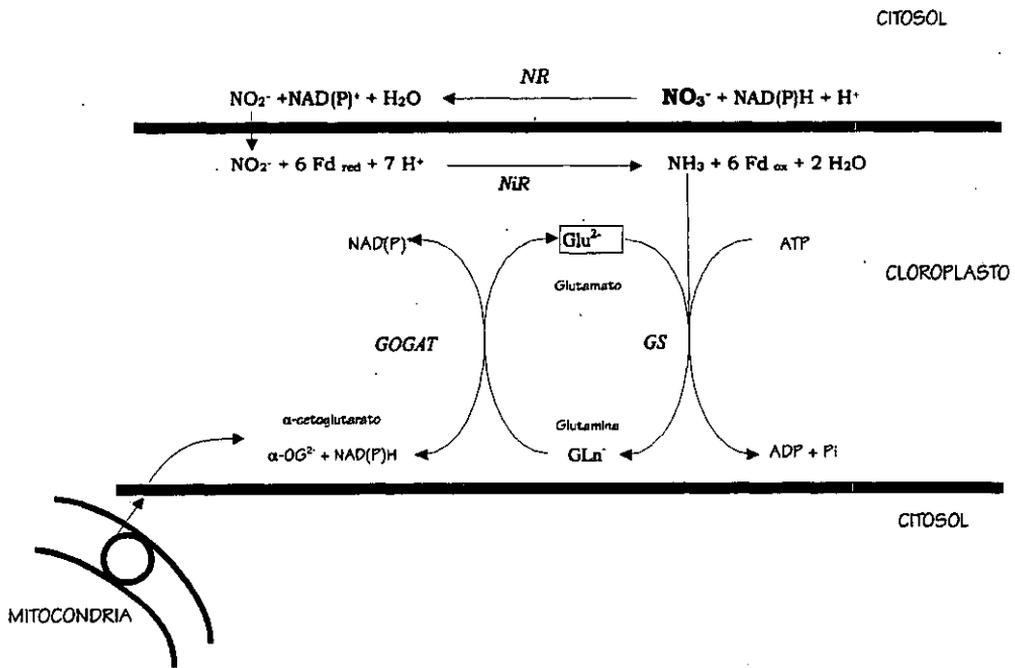


Figura 1. Asimilación reductora del nitrógeno inorgánico en microalgas.

Por otra parte, hay evidencias de que, en ocasiones, las poblaciones microalgales disponen de varias fuentes de nitrógeno en el medio natural; en tal situación éstas asimilan preferencialmente el amonio (McCarthy *et al.*, 1977). No obstante, hay casos en que el nitrato y el amonio son asimilados de forma simultánea (Maestrini *et al.*, 1982). Aunque éstas son las fuentes de nitrógeno más comunes, existen especies capaces de utilizar el ácido úrico, el glutámico o el aspártico (Ginzburg, 1987).

En microalgas el proceso de asimilación reductora del nitrato en aminoácidos puede considerarse un proceso fotodependiente (Losada *et al.*, 1987), ya que utiliza directa o indirectamente gran parte del poder reductor generado en el cloroplasto (Maldonado y Aparicio, 1987). Este proceso consta de dos pasos fundamentales: la incorporación del nitrato a partir del medio, y su reducción intracelular, catalizada por la nitrato reductasa (NR) y la nitrito

reductasa (NiR) (Syrett, 1987). El amonio es incorporado al esqueleto carbonado por acción de la glutamina sintetasa (GS) y de la glutamato sintasa (GOGAT) (Guerrero *et al.*, 1981; Huppe y Turpin, 1994) (Fig. 1).

La luz estimula la incorporación y asimilación de nitrógeno inorgánico en microalgas, probablemente por fotorreducción directa del compuesto de nitrógeno, afectando la reducción del nitrito (Thomas *et al.*, 1976), o bien mediante el suministro de ATP vía fotofosforilación (Tischner y Lorenzen, 1979); otra vía puede ser a través de la producción fotosintética de compuestos de carbono para aceptar el nitrógeno reducido; esta vía indirecta se apoya en el hecho de que para obtener las tasas máximas de incorporación de nitrato se necesita tanto luz como CO₂ (Grant, 1968).

La asimilación de nitrato y nitrito por las microalgas está regulada a tres niveles: la actividad y capacidad de los sistemas de transporte; la actividad de la NR y la NiR, enzimas fuertemente reguladas por las condiciones de luz y la concentración de nitrógeno celular; y la concentración de estas enzimas en la célula (Fernández y Cárdenas, 1989).

TEMPERATURA

La saturación de la luz en la fotosíntesis está influenciada por factores como la concentración de nutrientes, la composición química y, particularmente, por la temperatura.

Un aspecto importante de la interacción luz-temperatura es que la temperatura óptima para la fotosíntesis aumenta proporcionalmente con la intensidad de la luz (Richmond, 1986a), por lo que para cada temperatura hay una intensidad específica a la cual se logra la máxima velocidad fotosintética.

En la producción de biomasa algal a gran escala, el efecto de estos dos factores ambientales es fundamental, puesto que al ser los más difíciles de controlar representan la mayor limitación práctica para la producción. En los

sistemas de cultivo a cielo abierto es raro que las limitaciones del crecimiento se manifiesten por uno de estos factores de forma individual. Usualmente, tanto el crecimiento como la productividad están gobernados por la interacción entre ambos (Richmond, 1986b). En climas tropicales existe una temperatura ideal para el desarrollo de sistemas de cultivo a cielo abierto; sin embargo, un problema que ocurre a menudo es que aumenta la nubosidad, por lo que se atenúa la disponibilidad de luz, mientras que la temperatura permanece alta. En este caso, la respiración nocturna ocurre a una velocidad proporcional a la temperatura, prácticamente igual a la de síntesis celular, por lo que la productividad neta por unidad de área y tiempo, disminuye (Oswald, 1988); este fenómeno es llamado respiración intensiva (Hall, 1986).

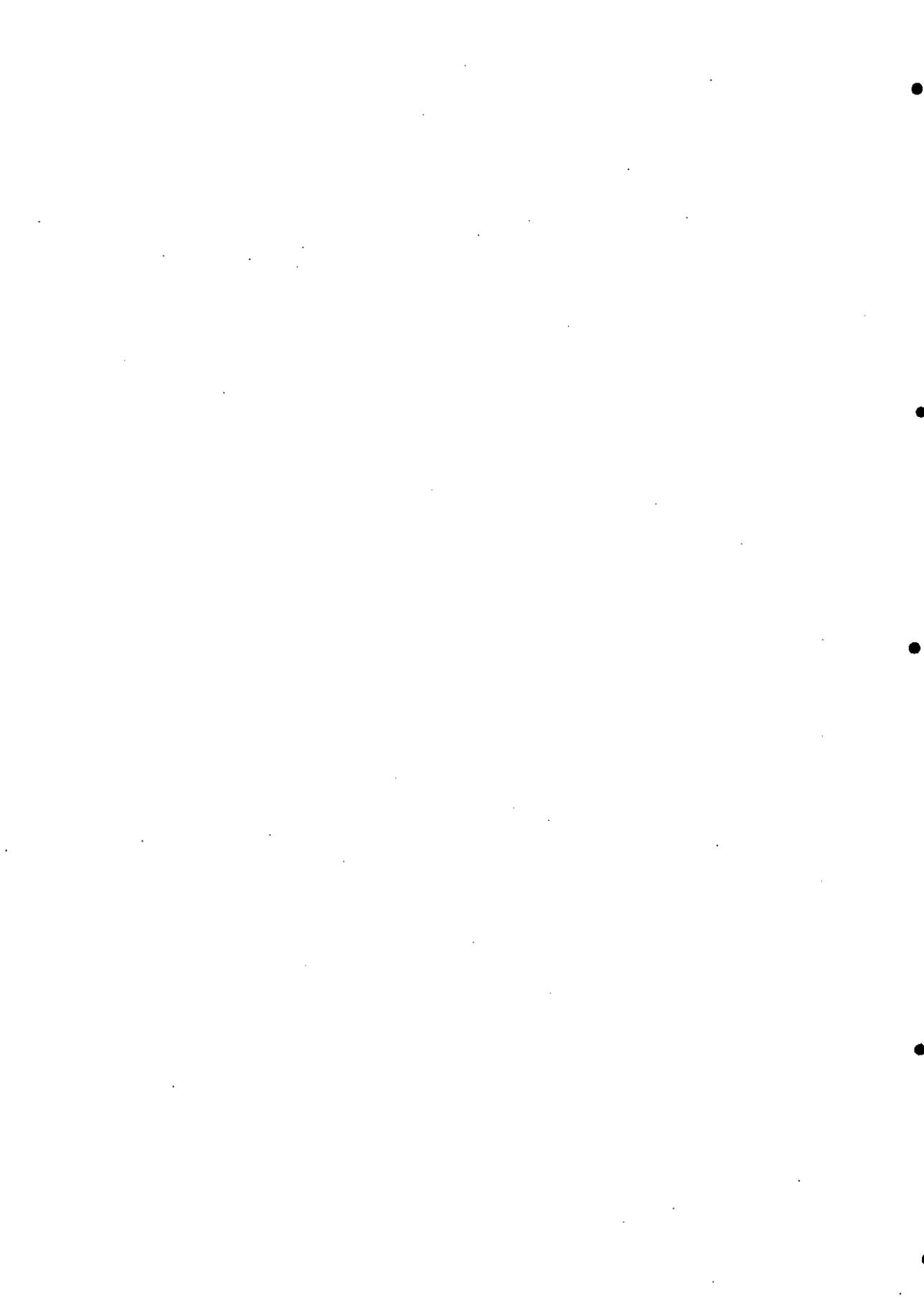
SALINIDAD

La concentración de sales inorgánicas disueltas afecta el crecimiento de las microalgas en función de la actividad osmótica, que a su vez varía según la especie. Existen microalgas que sólo toleran concentraciones milimolares, mientras que otras se desarrollan en soluciones salinas saturadas.

La intensidad de la luz tiene un efecto marcado sobre la adaptación de algunas especies de microalgas verdes a altas concentraciones salinas. Los niveles de irradiación necesarios para llevar a cabo procesos como la división celular y la síntesis proteica son mayores a medida que aumenta la salinidad del medio (Ginzburg y Ginsburg, 1993).

El efecto de la salinidad está influenciado también por otros parámetros como: temperatura, fuente de nitrógeno y concentración de nutrientes (Terlizzi y Karlander, 1980; Fábregas *et al.*, 1984; Fábregas *et al.*, 1985a; Fábregas *et al.*, 1986; Booth y Beardall, 1991).

2.- Objetivo



Las microalgas *Dunaliella salina* TEODORESCO y *Chlorella vulgaris* BEIJERINCK fueron elegidas para este estudio debido a los productos de interés químico-farmacéutico e industrial que de ellas se obtienen.

En el Centro de Investigaciones de Energía Solar (Cuba), se desarrollan sistemas de cultivo a gran escala de estas microalgas; la biomasa recogida se procesa en una planta piloto polivalente con el objetivo de obtener β -caroteno a partir de *Dunaliella salina* y, en el caso de *Chlorella vulgaris*, la biomasa seca se utiliza para la elaboración de tabletas.

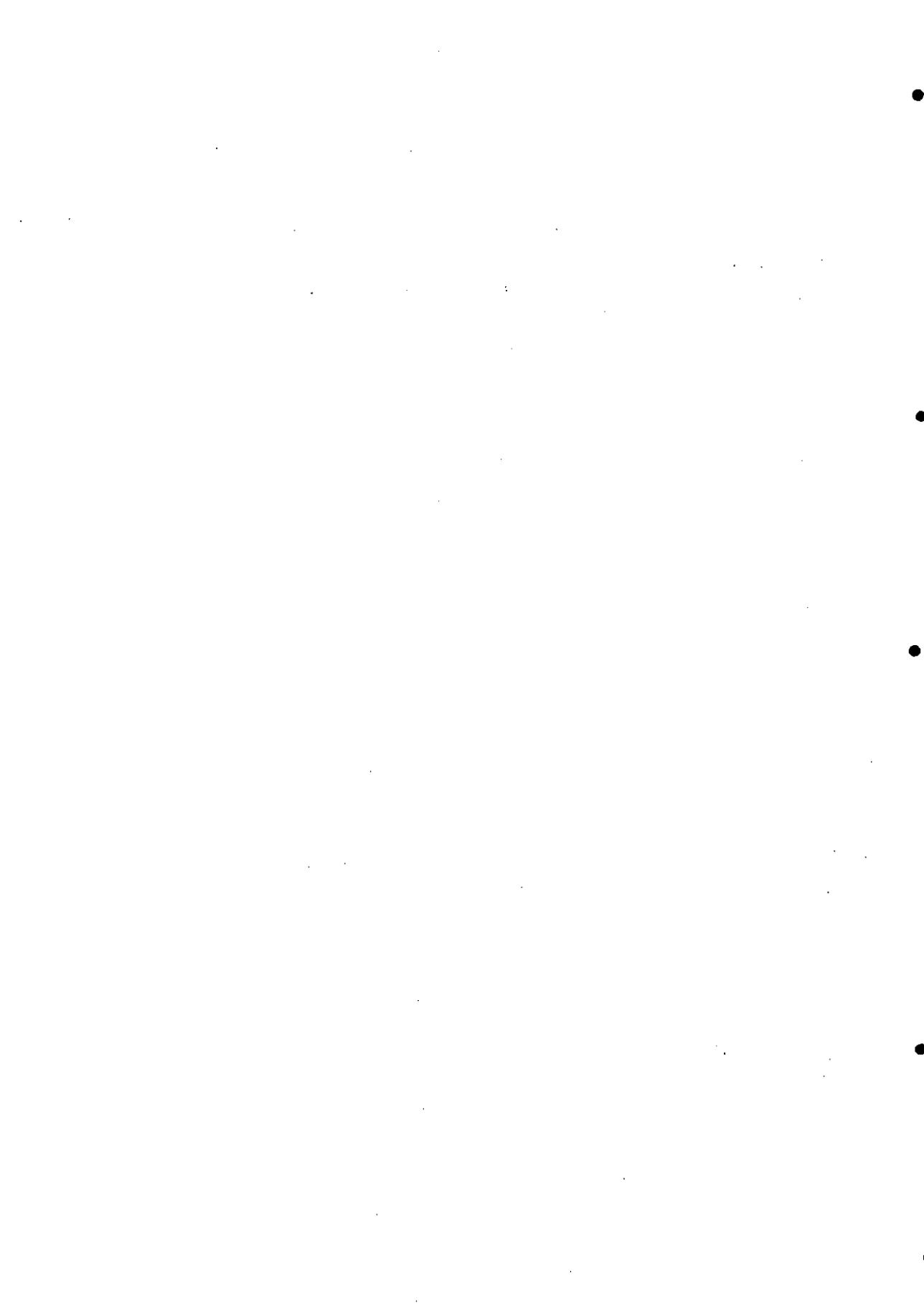
La biomasa de *Chlorella vulgaris* que se destina a la fabricación de tabletas es previamente despigmentada, por lo que el extracto alcohólico de pigmentos es un subproducto del proceso tecnológico. Con el objetivo de darle utilidad a este subproducto se estudia su posible utilización como materia prima en la obtención de un extracto hidroalcohólico con propiedades desinfectantes y antisépticas.

Se estudia además el posible uso de la biomasa de *Chlorella vulgaris* en la obtención de un extracto acuoso con propiedades estimulantes sobre el crecimiento celular; este extracto, haría posible la utilización de materia prima devaluada desde el punto de vista de los controles de calidad para su uso en humanos.

Asimismo, en este trabajo se propone analizar la influencia del nivel de irradiancia espectral, la longitud de onda y la concentración de nitrato sobre el crecimiento, la composición bioquímica y el contenido de β -caroteno de la microalga *Dunaliella salina*, con el objetivo de desarrollar metodologías y tecnologías de cultivo que permitan la manipulación de dichos factores para lograr una mayor productividad y rendimiento en cuanto a la concentración de este pigmento.

Se propone, además, estudiar el fotocontrol de la acumulación de carotenoides, teniendo en cuenta que este tema ha sido poco investigado, especialmente la influencia del rojo lejano. *Dunaliella salina* constituye un excelente sistema biológico para estos estudios debido a su capacidad de acumular, bajo ciertas condiciones de cultivo, grandes cantidades de carotenoides, fundamentalmente, β -caroteno.

3.- Material y métodos



DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES DE MICROALGAS

Chlorella vulgaris BEIJERINCK

La especie se obtuvo de la colección de Trebon, República Checa y fue aclimatada para el desarrollo de los cultivos a cielo abierto, en condiciones climáticas totalmente diferentes a las de su lugar de procedencia, con una temperatura media de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y una irradiación solar media diaria de $5.41 \text{ kW h}^{-1} \text{ m}^{-2}$.

El género *Chlorella* pertenece a la clase *Chlorophyceae*; orden *Chlorococcales* (*Chlorellales* según Kouwets) (Van den Hoek *et al.*, 1995), familia *Oocystaceae* (Bourrelly, 1990).

Chlorella vulgaris BEIJERINCK es un alga verde unicelular de agua dulce; las células se presentan aisladas aunque eventualmente pueden formar agregados; tienen forma esférica (Sant'Anna, 1984) y un tamaño que oscila entre 3.75 y 5 μm . Cada célula posee un pirenoide y un cloroplasto parietal único en forma de copa con abertura irregular, que ocupa gran parte del volumen celular (Sant'Anna, 1984). Se reproduce solamente por autósporas (Van den Hoek *et al.*, 1995).

Las células de *C. vulgaris*, al igual que la mayoría de las especies pertenecientes a la clase *Chlorophyceae*, presentan una pared celular celulósica rígida que dificulta su digestibilidad por animales monogástricos (Becker, 1994). Debido a esto, aunque ofrece grandes ventajas desde el punto de vista nutricional, la biomasa utilizada para la alimentación debe ser sometida previamente a tratamientos adecuados de disrupción celular, con el objetivo de exponer las proteínas celulares a la acción de enzimas proteolíticas, facilitando así su digestibilidad. La pared celular es fina, lisa y está compuesta fundamentalmente por esporopolenina (Van den Hoek *et al.*, 1995), que es un politerpeno resistente a la degradación (Soeder y Hegewald, 1988).

Las especies del género *Chlorella* tienen marcadas diferencias en cuanto al comportamiento ante factores como la salinidad, acidez y elevadas temperaturas (Kessler, 1986), aunque de forma general, toleran amplios intervalos de salinidad y valores de pH (Oh-Hama y Miyashi, 1988).

La mayoría de las especies del género crecen con gran facilidad, lo que favorece el desarrollo de sus cultivos; debido a esto frecuentemente se utilizan como modelo biológico en investigaciones fisiológicas y bioquímicas (Van den Hoek *et al.*, 1995). La microalga utilizada crece rápidamente a elevadas temperaturas y tolera hasta 37°C, en condiciones de cultivo a cielo abierto. *C. vulgaris* es una de las especies más abundantes y frecuentes en la flora de las aguas residuales y lagunas de oxidación (Lincoln y Earle, 1990).

En condiciones normales de cultivo la biomasa seca de *Chlorella*, obtenida a partir de cultivos a cielo abierto, puede llegar a tener un contenido proteico del 50-56%, por lo que constituye una fuente valiosa de SCP (Soeder y Hegewald, 1988) con excelente calidad nutricional (Becker, 1988).

Dunaliella salina TEODORESCO

La microalga utilizada se aisló a partir de muestras tomadas en aguas hipersalinas de la costa sudeste de la isla de Cuba, específicamente en la salina de Joa, provincia de Guantánamo. Esta zona se caracteriza por recibir altos niveles de irradiación diaria, con una media aproximada de 5.41 kW h⁻¹ m⁻² y una temperatura media anual de 30 ± 2°C.

Según la clasificación de Ettl (1983) el género *Dunaliella* pertenece a la clase *Chlorophyceae*, orden *Dunaliellales*, familia *Dunaliellaceae* (Borowitzka y Borowitzka, 1988a).

Dentro del género se incluyen formas unicelulares móviles de morfología variable, que pueden cambiar con las condiciones del cultivo, volviéndose frecuentemente esféricas en condiciones desfavorables (Preising, 1992). De todas las especies conocidas sólo las células de *Dunaliella salina* TEODORESCO



Figura 2. Imagen al microscopio electrónico de barrido de *Dunaliella salina*. Condiciones: 20 kV, x 13 000

y *Dunaliella bardawil* BEN-AMOTZ & AVRON, *nom. nud.* (Borowitzka y Borowitzka, 1988a), son capaces de producir grandes cantidades de β -caroteno (Ben-Amotz y Shaish, 1992).

D. salina, descrita originalmente por Dunal en 1838 como *Haematococcus salinus*, es un alga verde unicelular, biflagelada. Las células tienen, en condiciones normales, forma ovoide, anchas en la región basal y estrechas en la parte anterior, aunque pueden variar con las condiciones de cultivo presentándose elipsoidales, cilíndricas, fusiformes o esféricas. En condiciones adversas se presentan estados no móviles o palmeloides, donde aparecen células esféricas, cubiertas por una pared muy fina y un mucus gelatinoso (Preising, 1992). Las dimensiones celulares descritas para *D. salina* son de 5-29 μm de largo y 2.5-21 μm de ancho (Preising, 1992); las células de la microalga de trabajo tienen 10-15 μm de largo y 7.5 -10 μm de ancho, con un tamaño medio de 12.5 x 7.5 μm , dependiendo de las condiciones de crecimiento y la intensidad de la luz.

Los flagelos, insertados en la región apical (Fig. 2), tienen igual longitud y exhiben un patrón homodinámico de movimiento (Preising, 1992). Por regla general, las células presentan simetría dorso-ventral, carecen de pared celular y están cubiertas por una membrana fina y elástica, que a su vez está rodeada por un mucus o glicocálix (Fig. 2) de naturaleza glucoproteica (Preising, 1992); esta característica morfológica está estrechamente relacionada con la osmorregulación.

Cada célula presenta un cloroplasto parietal único en forma de copa que ocupa gran parte del volumen celular, con un pirenoide embebido en la región basal, alrededor del cual se acumulan polisacáridos de reserva. El núcleo se localiza en la mitad anterior de la célula, generalmente enmascarado por la presencia de numerosos gránulos que ocupan tanto la mayor parte anterior de la célula, como la del cloroplasto (Preising, 1992). Aunque para otras especies del género se describe la presencia de una o más de una mancha ocular, en las células de *D. salina* ésta es difusa o difícil de observar (Preising, 1992); en el caso de la microalga en estudio, no se observa estigma alguno al microscopio óptico. Las células presentan reproducción asexual por división longitudinal y sexual isogamética (Preising, 1992).

D. salina es un alga halófila, su crecimiento óptimo es a salinidades entre 6 y 12% (Preising, 1992), pero es capaz de resistir salinidades extremas; sus propiedades osmorreguladoras se deben a la acumulación intracelular de glicerol (Ben-Amotz y Shaish, 1992). La microalga en estudio puede resistir hasta 24% de salinidad.

Bajo determinadas condiciones las células son capaces de acumular grandes cantidades de β -caroteno, en forma de glóbulos liposolubles, en el espacio intertilacoidal (Ben-Amotz y Shaish, 1992), que dependiendo de las condiciones de cultivo puede exceder el 10% del peso seco del alga (Mokady, 1992).

CULTIVO

CULTIVO DE *Chlorella vulgaris* A ESCALA DE LABORATORIO

El mantenimiento de las células se logra mediante cultivos "stock", que se doblan periódicamente para mantener el crecimiento en fase logarítmica.

Los cultivos a escala de laboratorio crecen en condiciones de iluminación y aireación idénticas a las descritas para *Dunaliella salina*. El medio utilizado para el mantenimiento y desarrollo de los cultivos es el sugerido por Brown *et al.* (1967), modificado.

Medio de Cultivo *Chlorella vulgaris* BEIJERINCK

<u>Macroelementos</u>		<u>Oligoelementos</u>	
	(g l ⁻¹)		(ml l ⁻¹)
NaNO ₃	1.000	Solución de Algal -1 (8.3 g l ⁻¹)	3
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.025		
Mg SO ₄ · 7H ₂ O	0.075		
K ₂ HPO ₄	0.075		
KH ₂ PO ₄	0.175		

La solución de oligoelementos se esteriliza por separado y se añade en frío, ésta se prepara a partir de la formulación comercial Algal, de Nutrición Avanzada, S.A.

CULTIVO DE *Chlorella vulgaris* A GRAN ESCALA

Se desarrollan cultivos unialgales intensivos no axénicos, bajo régimen autotrófico, en sistemas de cultivos modulares a cielo abierto de 2 m². El suministro de CO₂ (10 ml h⁻¹ l⁻¹) es constante durante los periodos de

iluminación. El módulo de 2m² (2 x 1 m) es rectangular, con una superficie lisa tipo película descendente y un volumen de 15 l; tiene acoplado un sistema de goteo constante para eliminar las pérdidas de agua por evaporación.

El escalado siguiente corresponde a un área de 500 m² (Fig. 3) construido sobre una plataforma de hormigón. El sistema de cultivo tiene una serie de canales de 1m de ancho con una superficie lisa de cemento pulido, tipo película descendente, con un 2% de inclinación; al principio de cada canal hay un distribuidor que permite la circulación del cultivo desde el tanque de almacenamiento hasta la superficie, con un flujo de salida de 0.75 l s⁻¹. Las pérdidas por evaporación se restituyen por la apertura de válvulas que suministran agua directamente al cultivo.

En ambos casos se utilizan los fertilizantes comerciales: MgSO₄ y NPK (nitrógeno, fósforo y potasio), que no es más que una mezcla de las sales NaH₂PO₄, KNO₃, KH₂PO₄ y NaNO₃, suministrados por CUBANIQUEL, S.A.

Los cultivos se someten a controles microbiológicos semanales para detectar, fundamentalmente, la aparición de *Rhodospseudomonas* y Vibrionáceas, que limitan el uso de la biomasa obtenida.

La biomasa producida se procesa por centrifugación al comienzo de la fase estacionaria. En el sistema de cultivo de 500 m² se usa una centrifuga de tornillo, mientras que en los cultivos modulares se usa una centrifuga de tambor de menor capacidad. La biomasa húmeda se puede usar directamente, o puede secarse por medio de un secador por aspersión ("spray dryer"), para su posterior almacenamiento.

La biomasa húmeda o seca se puede usar indistintamente para la fabricación de tabletas de *Chlorella vulgaris*, despigmentándola previamente. Este paso se hace para evitar exceder los límites de feofórbidos establecidos, y para mejorar la aceptabilidad de la biomasa.



Figura 3.- Cultivo a gran escala de *Chlorella vulgaris* (500 m²). Centro de Investigaciones de Energía Solar, Santiago de Cuba.

CULTIVO DE *Dunaliella salina* A ESCALA DE LABORATORIO

El mantenimiento de las células se logra mediante cultivos "stock", que se doblan periódicamente para mantener el crecimiento en fase logarítmica.

Los cultivos se realizan con una iluminación de $72.26 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ proporcionada por tubos fluorescentes MAZDAFLUORTF40/36W, con un ciclo nictimeral (12:12), en una cámara con temperatura controlada ($18 \pm 2^\circ\text{C}$) y aireación constante a un flujo medio de 2 l min^{-1} . Antes de la entrada de aire de cada cultivo se coloca un filtro Millipore de $0.25 \mu\text{m}$. La aireación permite la agitación constante del cultivo, lo que evita la sedimentación y de esta forma las células se exponen a la misma intensidad lumínica media, evitándose la formación de gradientes de nutrientes minerales o gaseosos,

por lo que se obtiene un crecimiento uniforme. A partir de estos cultivos se toman los inóculos utilizados para las diferentes experiencias.

El medio utilizado para los cultivos "stock" es una modificación del medio propuesto por Ben-Amotz y Avron (1983). Para esterilizar, el bicarbonato se prepara en una solución aparte, de forma tal que una vez estéril pueda mezclarse con el resto de los componentes sin afectar el volumen final. Las soluciones 1 y 2 se esterilizan por separado e independientemente del medio. Se añaden, después de la esterilización, en frío. La esterilización se hace en autoclave, a 120°C durante 20 min.

El pH del medio es de 8.3, aunque *D. salina* tolera valores de pH entre 5.5 y 10 (Borowitzka y Borowitzka, 1988b).

Medio de Cultivo *Dunaliella salina* Ben-Amotz Modificado (BAM)

	(g l ⁻¹)	Solución No.1 (1ml l ⁻¹)		Solución No.2 (1ml l ⁻¹)	
NaCl	87.75	CoCl ₂	259 mg	ZnCl ₂	10.9 mg
MgSO ₄	0.6015	CuCl ₂	2.69 mg	MnCl ₂	88.1 mg
KCl	0.0745	H ₂ O dest.	100 ml	FeCl ₃	24.3 mg
CaCl ₂	0.033			EDTA	111 mg
NaH ₂ PO ₄	0.012			H ₂ O dest.	100 ml
NaHCO ₃	0.84				
NaNO ₃	0.425				

CULTIVO DE *Dunaliella salina* A GRAN ESCALA

El cultivo de *Dunaliella salina* a gran escala (50 m²) se desarrolla en un sistema de cultivo en canales, con suministro constante de CO₂ (10 ml h⁻¹ l⁻¹), durante los períodos de iluminación. Cada canal es un estanque oblongo de 6 m de largo y 3 m de ancho en su parte recta, con un radio de 1.5 m en los semicírculos que forman los extremos. El canal está dividido por un tabique central, lo que permite el movimiento continuo del cultivo a una velocidad



Figura 4. Sistema de cultivo en canales de *Dunaliella salina* a gran escala (50 m²). Centro de Investigaciones de Energía Solar, Santiago de Cuba, Cuba.

ente 2-10 cm s⁻¹, que se logra mediante una rueda de paletas (Fig. 3). La altura de la columna de líquido es de 10-20 cm.

Las condiciones climatológicas de la zona de cultivo, en la región sudeste de la isla de Cuba, son favorables prácticamente todo el año. Los parámetros climatológicos más importantes se registran en una estación actinométrica ubicada en el área de cultivo.

Se prepara el medio para un volumen de 3 m³, teniendo en cuenta que en una solución de NaCl comercial al 1% hay un contenido de Ca de 50.10 mg l⁻¹ y 8.63 mg l⁻¹ de Mg, y que en el agua común utilizada en los sistemas de cultivo hay 33.67 mg l⁻¹ de Ca y 7.54 mg l⁻¹ de Mg. Al eliminar algunos nutrientes del medio original usado para el cultivo a escala de laboratorio, se

sustituye el NaNO_3 por KNO_3 para que se mantenga el equilibrio iónico del K y el Na, que en los cultivos de laboratorio se logra con la adición de KCl.

Las pérdidas por evaporación se restituyen con la adición de agua hasta el volumen inicial, dos veces por día.

Los cultivos se mantienen en condiciones normales durante 15 días y una vez transcurrido este tiempo se le retira el suministro de CO_2 , se aumenta la concentración salina y se disminuye la velocidad del flujo, para inducir la carotenogénesis. La biomasa se recoge por floculación en un tanque de sedimentación cuando la absorbancia *in vivo* a 450 nm es máxima. Se realizan controles microbiológicos semanales para descartar contaminación de los cultivos.

Medio de cultivo a gran escala *Dunaliella salina*

	(g l ⁻¹)
NaCl	120
MgSO ₄	0.05
NaH ₂ PO ₄	0.012
NaHCO ₃	0.84
KNO ₃	0.425

DETERMINACIONES SOBRE LAS MICROALGAS

DENSIDAD CELULAR

La densidad celular se determina en los cultivos microalgales por recuento diario de una alícuota de los mismos, convenientemente diluida, en cámara de recuento hematológica Neubauer improved.

La cinética de crecimiento de las poblaciones microalgales se ajusta a una curva logística, mediante una regresión polinómica por el método de los

mínimos cuadrados, utilizando para ello el algoritmo de Marquadt (Saila *et al.*, 1988) por medio del programa informático Fishparm.

La representación matemática de la función logística es:

$$N_t = K / (1 + B) (\exp -zt)$$

donde N_t (células ml^{-1}) representa la densidad de la población en un tiempo t ; K es la capacidad de carga del medio o tamaño límite de la población; B es una constante que carece de significado biológico y se calcula a partir de la ecuación:

$$B = (K - N_0) / N_0$$

el parámetro z está relacionado con la tasa de crecimiento y t es el tiempo expresado en días.

A partir de los datos diarios de densidad celular se determina la tasa de crecimiento μ (divisiones celulares por día) en la fase exponencial.

MATERIA SECA Y CENIZAS

Para la determinación del peso seco se sigue el protocolo de Vonshak modificado (Vonshak, 1986). Se recogen volúmenes conocidos de las suspensiones celulares en filtros GF/C ($1.2 \mu\text{m}$) de 25 mm de diámetro, utilizando para ello un sistema multifiltros Millipore, con filtrado a vacío. Una vez que se recogen las células se añaden sobre los filtros dos volúmenes de solución de amonio formiato al 0.9% (p/v), para retirar las sales, si la muestra lo requiere. Las muestras se secan hasta peso constante a 60°C durante 24 h y se dejan enfriar a temperatura ambiente en un desecador, antes de pesarlas.

Para la determinación de las cenizas se filtra un volumen determinado de cultivo en filtros GF/C pretratados. El pretratamiento consiste en

incinerar en horno Mufla a 550°C durante 5 h, que es el mismo tratamiento que se le hace a las muestras.

Los filtros con las muestras y uno utilizado como blanco, se colocan en cápsulas de porcelana para la incineración a 550°C. Posteriormente, el horno se deja enfriar hasta 110°C, se retiran las cápsulas de porcelana con los filtros y se dejan enfriar hasta temperatura ambiente en un desecador, procediendo a su pesada.

Si las determinaciones de peso y cenizas se realizan sobre biomasa seca, se recogen cantidades determinadas de muestra en tubos de ensayo o cápsulas de porcelana, respectivamente. Los tratamientos que se siguen en cada caso son los descritos anteriormente

Las determinaciones de peso se hacen en una balanza digital de ± 0.01 mg. A partir de los resultados se calcula el peso seco libre de cenizas.

CUANTIFICACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE PIGMENTOS

Las células se recogen por centrifugación durante 10 min a 2540 g y se resuspenden en metanol; en caso de trabajar con biomasa seca, una cantidad determinada de ésta se resuspende directamente en dicho solvente. La extracción se hace durante 24 h a 4°C, en oscuridad. Posteriormente, manteniendo la oscuridad, se deja que las muestras alcancen la temperatura ambiente y se clarifican por centrifugación. Las lecturas se realizan a 665.2, 652.4 y 470 nm, en un espectrofotómetro UV-visible con un rango de resolución de 0.1- 0.5 nm. Para los cálculos se utilizan las ecuaciones de Wellburn (1994). Las concentraciones se expresan en $\mu\text{g ml}^{-1}$.

$$\text{Clorofila a} = 16.72 A_{665.2} - 9.16 A_{652.4}$$

$$\text{Clorofila b} = 34.09 A_{652.4} - 15.28 A_{665.2}$$

$$\text{Carotenoides}_{x+c} = (1000 A_{470} - 1.63 \text{ Chl a} - 104.96 \text{ Chl b}) / 221$$

Para determinar el contenido de feofórbidos se usa acetona al 90% enfriada a 4°C, con las mismas condiciones de extracción descritas anteriormente. Las células se rompen por ultrasonidos durante 30 s en baño de hielo y en oscuridad. El extracto debe ser igualmente clarificado. Las lecturas espectrofotométricas de las muestras se realizan a 665 nm (A). A continuación, la misma muestra se acidifica con 3 gotas de una solución de HCl al 50% (v:v) y se vuelve a leer la absorbancia a 665 nm (A*). Para los cálculos se usa la ecuación de Strickland y Parson (1972).

$$\text{Feopigmentos } [\mu\text{g ml}^{-1}] = 26.7(1.7(A) - A^*)$$

Los valores obtenidos en $\mu\text{g ml}^{-1}$ se multiplican por el volumen del extracto y se dividen por el número total de células presentes en dicho volumen, para obtener el contenido celular de pigmentos.

ANÁLISIS DE PIGMENTOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

ANÁLISIS DE CAROTENOIDES

Estos análisis se realizaron sobre células en cultivo de *Dunaliella salina*. Para realizar el análisis de carotenoides, las células recogidas por centrifugación durante 10 min a 2540 g, se resuspenden y homogenizan en una mezcla etanol: hexano (2:1) calidad HPLC. A esta mezcla se le añade 1ml de agua Milli-Q y se vuelve a homogenizar; se centrifuga durante 2 min a 2540 g y se separa la fase hexano (superior). Una alícuota de esta fase se trasvasa a un vial de 1 ml para centrifugar a 12000 g durante 10 min. Este último paso se hace para impedir la interferencia de cualquier partícula residual en la cromatografía.

Se inyectan 25 μl de la muestra previamente preparada en un cromatógrafo Hewlett Packard Serie 1050, equipado con un muestreador automático y un detector de fotodiodos. Se usa una columna de fase reversa

C₁₈, ODS Hypersil 5 µm (250 x 4 mm), equipada con un protector de columna LiChrospher 100 RP-18.5 µm (4 x 4 mm). La elución de la muestra se realiza con un sistema de solventes compuesto por metanol: acetonitrilo: tetrahidrofurano (15:75:10) (v:v:v) como solvente A, y agua como solvente B. La detección se hace a 445 nm. Se utiliza un patrón de todo-*trans* β-caroteno de SIGMA Química.

Programación de la elución:

Tiempo (min)	Flujo (ml min ⁻¹)	%A	%B	
0	1	80	20	<i>inyección</i>
20	1	100	0	
30	1	100	0	<i>reequilibrado columna</i>
50	1	80	20	

ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN PIGMENTARIA TOTAL

Para analizar la composición pigmentaria total, la biomasa se resuspende en metanol calidad HPLC, la extracción se realiza durante 24 h a 4°C, en oscuridad; se centrifuga y se separa el extracto clarificado, se toma una alícuota y se centrifuga a 12000 g para eliminar partículas residuales, como se describe anteriormente.

Para el análisis por HPLC se sigue el protocolo de Wright *et al.* (1991). Las condiciones cromatográficas son las que se describieron anteriormente. La elución de la muestra se realiza utilizando como solvente A metanol: acetato de amonio 0.5 M pH 7.2 (80:20), como solvente B acetonitrilo: agua (90:10) y como solvente C acetato de etilo. La detección se hace a 436 nm. Se utilizan patrones de todo-*trans* β-caroteno y de las clorofilas a y b, de SIGMA Química.

Programación de la elución:

Tiempo (min)	Flujo (ml min ⁻¹)	%A	%B	%C	
0	1	100	0	0	<i>inyección</i>
4	1	0	100	0	
18	1	0	20	80	
21	1	0	100	0	<i>reequilibrado columna</i>
26	1	100	0	0	

DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE PROTEÍNAS

Para la cuantificación de proteína total se sigue el protocolo de Lowry *et al.* (1951) modificado por Herbert *et al.* (1971). El ensayo se basa en la determinación espectrofotométrica de la intensidad del color obtenido con el reactivo de Folin-Ciocalteau (ácido fosfomolibdotúngstico, FMT), después de un tratamiento con solución alcalina de cobre. El ácido FMT oxida los aminoácidos aromáticos como la tirosina, presente en la mayoría de las proteínas, reduciéndose a heteropolimolibdeno azul; esta reacción está catalizada por el cobre, resultando un color azul cuya intensidad depende del contenido de tirosina o triptófano (Waterborg y Matthews, 1996). Los reactivos utilizados son:

Reactivo A: Na₂CO₃ al 2% (p/v) en NaOH al 0.1 N.

Reactivo B: CuSO₄ 0.5 N, en tartrato de sodio y potasio al 1%; este reactivo es una suspensión, por lo que se deja en reposo y se usa el sobrenadante claro.

Reactivo C: Se prepara a partir de los reactivos A y B en una proporción 50: 1, respectivamente, en el momento de realizar el ensayo.

Reactivo D: Es el reactivo comercial de Folin-Ciocalteau.

Las muestras se preparan en NaOH 1N, bien sea biomasa seca o células recogidas por centrifugación durante 10 min a 2540 g. Posteriormente, se ponen en un baño de agua a una temperatura de 95-100°C durante 1 h, o se hace ruptura celular por ultrasonidos durante 30 s en baño de hielo. Las muestras se dejan enfriar a temperatura ambiente y se centrifugan. Se recoge el sobrenadante y se diluye convenientemente.

Se preparan diluciones conocidas de seroalbúmina bovina (BSA), un blanco de NaOH 1N y las diluciones de las muestras. A continuación, se reparte por triplicado 1 ml de cada dilución de BSA, del blanco y de cada una de las muestras problema en tubos de ensayo; se le añaden 5 ml del reactivo C, se mezcla a temperatura ambiente y se espera 15 min; se añaden 0.5 ml del reactivo D; se agita y espera que se estabilice el color durante 40 min a temperatura ambiente. La lecturas se hacen en un espectrofotómetro UV-visible a 750 nm.

A partir de la ecuación de la recta patrón de BSA se determina la concentración proteica de las muestras.

DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS

Los métodos más utilizados para la determinación de carbohidratos totales son colorimétricos y se basan en el test de Molisch, el cual implica un calentamiento de la muestra a analizar en H₂SO₄ concentrado. Para el desarrollo del color se usa una amina aromática o un fenol (Herbert *et al.*, 1971); éste es el fundamento del método del fenol-sulfúrico de Dubois *et al.* (1956).

El fenol es un alcohol muy reactivo que reacciona con los azúcares reductores dando un compuesto coloreado (amarillo-marrón). Esta reacción coloreada es lineal a 485 nm y consume gran cantidad de energía, proporcionada por la reacción entre el ácido sulfúrico y el agua.

Este método sólo permite determinar concentraciones en el intervalo de 5-100 $\mu\text{g ml}^{-1}$; su único inconveniente es que puede haber interferencias debido a la presencia de pentosas de los ácidos nucleicos (Kochert, 1978a).

La determinación se hace sobre un extracto diluido convenientemente; éste se obtiene por resuspensión en agua destilada de células recogidas por centrifugación o biomasa seca, y ruptura por ultrasonidos.

Se reparte 1 ml por triplicado en tubos de ensayo de cristal reforzado; al mismo tiempo se prepara un blanco de agua destilada y una serie de patrones de glucosa. A los tubos se les añade 0.5 ml de fenol al 4%, agitando a continuación. Inmediatamente se adicionan 2.5 ml de H_2SO_4 concentrado ($\rho = 1.84$), dirigiendo la caída del ácido hacia la superficie del líquido. Se deja enfriar 30 min a temperatura ambiente, agitando las muestras dentro de este intervalo; la absorbancia se lee a 485 nm antes de las 2 h, en un espectrofotómetro UV-visible.

La concentración de carbohidratos de las muestras se determina a partir de la ecuación de la recta patrón de glucosa.

Mediante este ensayo se cuantifican las hexosas, disacáridos, oligosacáridos, polisacáridos y derivados metilados que tengan un grupo reductor libre o potencialmente libre. Las pentosas y metil-pentosas también reaccionan, pero la glucosamina y la galactosamina son inertes (Kochert, 1978a).

EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LÍPIDOS

EXTRACCIÓN

Para la extracción de los lípidos se utiliza una modificación del protocolo de Dubinsky y Aaronson (1979) y del procedimiento de Bligh y Dyer (Holland y Gabbott, 1971).

Las células microalgales recogidas por centrifugación, o bien una cantidad determinada de biomasa seca, se resuspenden en metanol: cloroformo 2:1 (v:v). Se hace una ruptura por ultrasonidos durante 60 s; después de agitar 30 s, se dejan reposar los extractos 5 h a temperatura ambiente, protegiéndolos de la luz. A continuación, se centrifuga a 800 g durante 10 min a 4°C y se recoge el sobrenadante. A la biomasa residual se le hace una segunda extracción durante 14 h con una mezcla ácida de metanol: cloroformo (2:1), a la que se añaden 3 gotas de HCl 6 N por cada 100 ml de mezcla.

Al sobrenadante final se le añade cloroformo y agua destilada Milli-Q, para una relación final de solventes metanol: cloroformo: agua (2:2:1); se agita hasta obtener una solución homogénea y se centrifuga a 800 g durante 5 min. Con este fraccionamiento se eliminan los contaminantes no lipídicos, no eliminados en la primera extracción. Se retira la fase acuosa superior y a la fase orgánica se le añade acetona para eliminar trazas de agua residual. Los solventes se retiran de las muestras por evaporación al vacío a 40-50°C o en atmósfera de N₂.

Los extractos se conservan en cloroformo a -20°C (Holland y Gabbott, 1971). Si no se van a usar inmediatamente se recomienda conservar en cloroformo con butil-hidroxitolueno (BHT 50 mg l⁻¹) a -80°C en viales de tapón de rosca.

DETERMINACIÓN GRAVIMÉTRICA NO DESTRUCTIVA DE LÍPIDOS TOTALES

La cuantificación de la fracción lipídica total se hace transfiriendo la fase orgánica resuspendida en un volumen conocido de cloroformo, a un vial de cristal cónico pequeño, previamente tarado. Las muestras se llevan a sequedad, evaporando el cloroformo bajo atmósfera de N₂. Las determinaciones del peso se hacen en una balanza digital de ± 0.01 mg.

DETERMINACIÓN DE ARN

EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS DE BAJO PESO MOLECULAR

El método usual consiste en la precipitación de los ácidos nucleicos, proteínas y otras moléculas de alto peso molecular con ácidos como el tricloroacético (TCA) o el perclórico, en frío. El TCA tiene como desventaja que absorbe la luz ultravioleta y puede interferir en las determinaciones.

Se recogen las células por centrifugación en tubos de ensayo o se trabaja con biomasa seca. Los tubos con las muestras se colocan en hielo y se resuspenden en 10 ml de ácido perclórico 0.2 N frío. Después de 15 min a 4°C, las muestras se centrifugan a 800 g durante 10 min en una centrífuga refrigerada. Se desecha el sobrenadante y se repite la extracción. Los sobrenadantes contienen fosfato inorgánico, nucleótidos, aminoácidos, azúcares y una gran variedad de otros compuestos de bajo peso molecular. El sedimento contiene compuestos macromoleculares.

DETERMINACIÓN DE ARN POR ESTIMACIÓN DE LA RIBOSA

Este método se basa en la conversión de la pentosa en furfural, en presencia de ácido caliente, que reacciona con el orcinol dando un compuesto de color verde (Lin y Schjeide, 1969; Kochert, 1978b); como catalizador se usa FeCl_3 ó CuCl_2 . El reactivo de orcinol se prepara mezclando dos soluciones previamente preparadas, la solución A: 0.15 g $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de HCl concentrado y la solución B: 12.5 g de orcinol en 25 ml de etanol al 95%. Para preparar la solución de trabajo se mezclan 2 ml de B por cada 100 ml de A, antes de cada determinación. El desarrollo del color se completa después de 30 min a 100°C.

El sedimento previamente obtenido, libre de compuestos de bajo peso molecular, se trata con KOH 0.3 N y se incuba 18-24 h a 30°C. Después de esta hidrólisis alcalina, la muestra se enfría en hielo y se acidifica la solución a

pH 1 con ácido perclórico concentrado; se centrifuga para recoger el sobrenadante. El precipitado se lava con 1 ml de ácido perclórico 0.2 N en frío, se centrifuga nuevamente y se juntan los sobrenadantes.

Se preparan en tubos de ensayo una serie de concentraciones de ARN de levadura de SIGMA Química, un blanco de agua destilada y diluciones de las muestras. A cada tubo se añaden 2 ml del reactivo de orcinol; se tapan y se colocan en un baño de agua hirviendo durante 15 min. Se dejan enfriar y se lee la absorbancia a 665 nm en un espectrofotómetro UV-visible.

ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN ELEMENTAL (CNH)

Los análisis de la composición elemental CNH (carbono, hidrógeno, nitrógeno) se realizan sobre muestras de peso seco recogidas en filtros GF/C (1.2 μ m) de 25 mm de diámetro. Para el análisis los filtros se colocan en cápsulas especiales de estaño. Los análisis se realizaron en los Servicios Generales de Apoyo a la Investigación de la Universidad de La Coruña, en un analizador elemental Carlo Erba CNHS-O EA 1108 acoplado a un detector de conductividad térmica (DCT), con un introductor de muestras automático Autosampler AS 200 y una unidad de procesado EAGER 200.

El método analítico se basa en la oxidación completa de la muestra mediante combustión instantánea. Los gases resultantes de la combustión son transportados mediante un gas portador (He) a través de un horno de reducción, hasta el interior de una columna cromatográfica (Porapak QGS 50/80), donde son separados para su detección y eluidos como nitrógeno, dióxido de carbono, agua y dióxido de azufre; para ello se utiliza un detector de conductividad térmica que emite una señal proporcional a la concentración de los componentes individuales de la muestra.

El equipo se calibra previamente mediante el análisis de un compuesto estándar, que en este caso es la sulfanilamida, utilizando el método de factores *K*.

La concentración de las muestras se calcula mediante un algoritmo de regresión lineal, en base al área de los picos generados por el detector. El error asociado a la técnica es de 0.5-2%.

A partir de los resultados de la cantidad nitrógeno se calcula la composición proteica de las células utilizando para ello el factor de conversión 5.8, sugerido por Gnaiger y Bitterlich en 1984, que sustituye al clásico factor de conversión para proteínas 6.25.

A partir de los resultados de la composición elemental se calcula la relación C:N.

DETERMINACIÓN DE IONES METÁLICOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA

La espectrofotometría de absorción atómica es una técnica analítica muy útil para la determinación de metales. Estos análisis se realizaron en los laboratorios de la Empresa Geólogo-Minera de Santiago de Cuba, Cuba.

El método analítico se basa en el fenómeno de autoinversión de las líneas espectrales, debido a la producción simultánea por el mismo elemento de un espectro de emisión, que al atravesar la capa de vapores, relativamente fríos, de la sustancia volatilizada, pierde los fotones correspondientes a las frecuencias que con más intensidad emiten esos mismos átomos en el estado excitado. Su aplicación analítica se fundamenta en la absorción por los átomos de un metal, de longitudes de onda características, que coinciden con las líneas espectrales emitidas por el mismo metal.

En la técnica experimental se utiliza la llama de acetileno-oxígeno, sobre la cual se vaporiza la muestra; este proceso consta de dos etapas: la nebulización, donde se transforma la disolución a analizar en una niebla fina

y la atomización o disociación del compuesto químico contenido en la disolución. La absorbancia producida por dicha llama se mide utilizando lámparas de cátodo hueco específicas para cada metal; la luz procedente de la lámpara pasa a través de la llama a un monocromador visible-UV, e incide sobre un detector de resonancia. Para una luz de longitud de onda resonante, la absorbancia de la llama es una medida directa de la concentración de los átomos absorbentes y, por ello, de la concentración de los átomos en la muestra.

En el caso del arsénico, el mercurio y el estaño, se emplea la técnica de generación de hidruros para aumentar la sensibilidad del método.

En todos los casos, la calibración de los intervalos de concentración se hace utilizando reactivos comerciales de alta pureza, diluidos convenientemente. Las determinaciones se hacen por triplicado.

Los resultados se expresan como la diferencia entre el valor obtenido y el valor del blanco o matriz empleada.

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BIODERIVADOS DE INTERÉS QUÍMICO-FARMACÉUTICO

OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Chlorella vulgaris* BEIJERINCK (EC)

Se prepara una suspensión homogénea a partir de biomasa seca en polvo de *Chlorella vulgaris*, 20:250 (p/v). Esta suspensión se somete a un tratamiento térmico durante 5 min, a una temperatura próxima a la ebullición; se deja enfriar y se centrifuga durante 20 min a 2800 g. El sobrenadante se separa de la biomasa y se somete a una segunda centrifugación para eliminar restos celulares. El extracto se congela a -20°C y se liofiliza.

ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR SDS-PAGE

Este análisis se lleva a cabo para determinar la composición de la fracción proteica del extracto acuoso obtenido a partir de *Chlorella vulgaris*. La técnica SDS-PAGE es una de las más usadas en separaciones electroforéticas de muestras proteicas. El SDS (dodecil sulfato de sodio) es un detergente aniónico muy efectivo como agente solubilizante (Harris y Angal, 1993).

La muestra liofilizada se resuspende en etanol al 70%, se homogeniza y se centrifuga a 12 000 g durante 10 min. El "pellet" se resuspende en tampón fosfato pH 7. Para el desarrollo de la electroforesis se utiliza una celda Mini-Protean II de Bio Rad. Se prepara un gel separador al 14%, Tris-0.375 M, pH 8.8 y un gel "stacking" al 4%, Tris-0.125 M, pH 6.8 (Laemmli, 1970). La electroforesis se desarrolla a 200 V durante 45 min.

La tinción del gel se hace con azul de Coomasie R-250 en metanol al 40% y ácido acético al 10%, durante 30 min; posteriormente, el gel se decolora en una solución de metanol: ácido acético (40:10), durante 1-3 h.

Se utilizan como patrones de proteínas una mezcla de alcohol deshidrogenasa (150 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), BSA (66 kDa), citocromo c (12.4 kDa) y patrones individuales de cada una de estas proteínas, suministrados por SIGMA Química.

ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS

Se determinó la composición de aminoácidos libres por HPLC en el extracto crudo; mientras que en la fracción proteica purificada se determinó la composición total después de la hidrólisis.

La determinación de la composición de aminoácidos se lleva cabo según la técnica de Barkholt y Jensen (1989). El método se basa en la conversión de la cisteína en cistina usando el ácido 3, 3'-ditiodipropiónico (DTDPA) para formar un compuesto estable, la S-2-carboximetiltiocisteína.

Finalmente este compuesto, junto con el resto de los aminoácidos se determina por HPLC.

La metodología seguida consiste en añadir una solución al 10% de DTDPA en NaOH 0.2 N a la muestra a analizar y dejar que se produzca la reacción durante 1 h, al cabo de la cual se realiza la hidrólisis (si es necesario) con una mezcla de HCl 6 N y fenol al 0.1% durante 24 h a 110°C. Finalizada la hidrólisis, la muestra se evapora al vacío, a una temperatura de 60°C. A continuación se resuspende en tampón borato y se centrifuga a 12 000 g durante 10 min a 4 °C. Por último se procede a su análisis por HPLC.

El análisis por HPLC se realiza mediante una técnica de derivatización en dos etapas. Primero se derivatizan los aminoácidos primarios con el o-ftaldehído (OPA); en la segunda etapa los aminoácidos secundarios, que no reaccionan con el OPA, se derivatizan con el 9- fluorenmetilcloroformato (FMOC). La separación de los aminoácidos se realiza en un cromatógrafo Hewlett Packard 1050 equipado con un muestreador automático Hewlett Packard 1050, un detector de fluorescencia Hewlett Packard 1046 A, y una columna de fase reversa C₁₈ ODS Hypersyl 5 µm (250 x 4 mm) con un protector de columna LiChrospher 100 RP- 18.5 µm (4 x 4 mm). El protocolo de elución es el siguiente:

Eluyente A: 20 mM acetato de sodio pH 7.2/ 0.3% de tetrahidrofurano (THF)/ 0.018% trietilamina (TEA).

Eluyente B: 100 mM acetato de sodio pH 7.2/ acetonitrilo/ metanol (20: 40: 40).

Después de la derivatización de los aminoácidos con el OPA y el FMOC, éstos se eluyen de la columna con las siguientes condiciones:

Programación de la elución:

Tiempo (min)	Flujo (ml min ⁻¹)	%B	
0	1.63	0	
17	1.63	60	
18	1.63	100	
18.5	2.50	100	
28	2.50	100	
28.2	1.63	100	
30	1.63	0	
35	1.63	0	reequilibrado columna

La detección se realizó por fluorescencia:

aminoácidos primarios (OPA) excitación: 340 nm emisión: 450 nm

aminoácidos secundarios (FMOC) excitación: 266 nm emisión: 305 nm

EVALUACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Chlorella vulgaris* BEIJERINCK (EC) COMO MEDIO DE CULTIVO PARA MICROORGANISMOS

El extracto se evalúa como medio de cultivo sólido y líquido para microorganismos. Previamente, se realizan pruebas de esterilidad, verificación del pH y control biológico con una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; para ello el extracto fue esterilizado en autoclave y formulado como medio sólido y líquido.

PRUEBAS DE ESTERILIDAD

El extracto crudo de *Chlorella vulgaris* se incubó 72 h a 37°C; se hacen subcultivos en agar sangre y tioglicolato para comprobar si hay o no crecimiento bacteriano.

Se prepara medio sólido a partir de dicho extracto, homogenizando previamente y solidificando con agar bacteriológico Oxoid. El pH se ajusta a 7.3 ± 0.2 . Unas placas se incuban 24 h a 37°C y otras 72 h a temperatura ambiente.

Las pruebas de esterilidad se hacen durante 7 días consecutivos, procesando cada día una muestra diferente de las escogidas al azar para la realización del ensayo, según lo establece la Norma Cubana 57-94-1, vigente desde 1986.

CUALIDADES NUTRITIVAS

Previa realización de este ensayo se hace un control biológico. Para ello se inocular un volumen determinado del extracto crudo y el medio sólido preparado a partir de dicho extracto, con *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, previamente aislada en una placa de agar MacConkey. Si el microorganismo crece en el medio de cultivo que se está evaluando, se prosigue con el ensayo de las cualidades nutritivas. Para evaluar las cualidades nutritivas del medio se estudia su comportamiento como medio líquido y sólido, según lo establece la Norma Cubana 57-94-1 (1986).

EVALUACIÓN COMO MEDIO SÓLIDO

Para la evaluación del extracto como medio sólido se utilizó el método de Misra y Miles (1938) modificado (Micliane *et al.*, 1992). Se utilizan como microorganismos de ensayo *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Serratia sp.* y una levadura. En cada caso se utilizan medios convencionales como referencia.

Se hacen siembras en agar nutritivo de cada microorganismo, y se incuban 24 h a 37°C. A partir de estos cultivos se preparan suspensiones bacterianas en solución salina fisiológica estéril, con una turbidez correspondiente al patrón óptico de turbidez N° 5 de la escala de MacFarland. A partir

de estas suspensiones se preparan diluciones decimales hasta 10^{-8} . Se inoculan 5 μl de cada dilución en los medios de cultivo de referencia correspondientes para cada microorganismo y en placas de medio sólido del extracto de *Chlorella vulgaris*. Las placas inoculadas se incuban durante 24 h a 37°C . En el caso de la levadura, ésta se incuba a temperatura ambiente durante 48 h.

El recuento de colonias en placa se hace con ayuda de una lente amplificadora. En cada caso se realiza tinción de Gram a las colonias típicas para confirmar los resultados.

A partir de los resultados se calcula la razón de productividad según la fórmula:

$$N_s/N_o$$

donde: N_s , es el valor de ufc ml^{-1} del medio en prueba y N_o , es el valor de ufc ml^{-1} del medio de referencia en la primera dilución de crecimiento contable.

EVALUACIÓN COMO MEDIO LÍQUIDO

El extracto fue evaluado como medio líquido según el método de Stokes (1968) (Norma 57-94-1, 1986), utilizando como microorganismos de ensayo: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. Se prepararon suspensiones bacterianas, y a partir de éstas, diluciones hasta 10^{-8} en el extracto de *C. vulgaris*. Después de incubar 24 h a 37°C , se hicieron subcultivos de un volumen determinado de la suspensión bacteriana en agar sangre y agar MacConkey.

OBTENCIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE CUPROCLOROFILINAS A PARTIR DE *Chlorella vulgaris* BEIJERINCK (EHC)

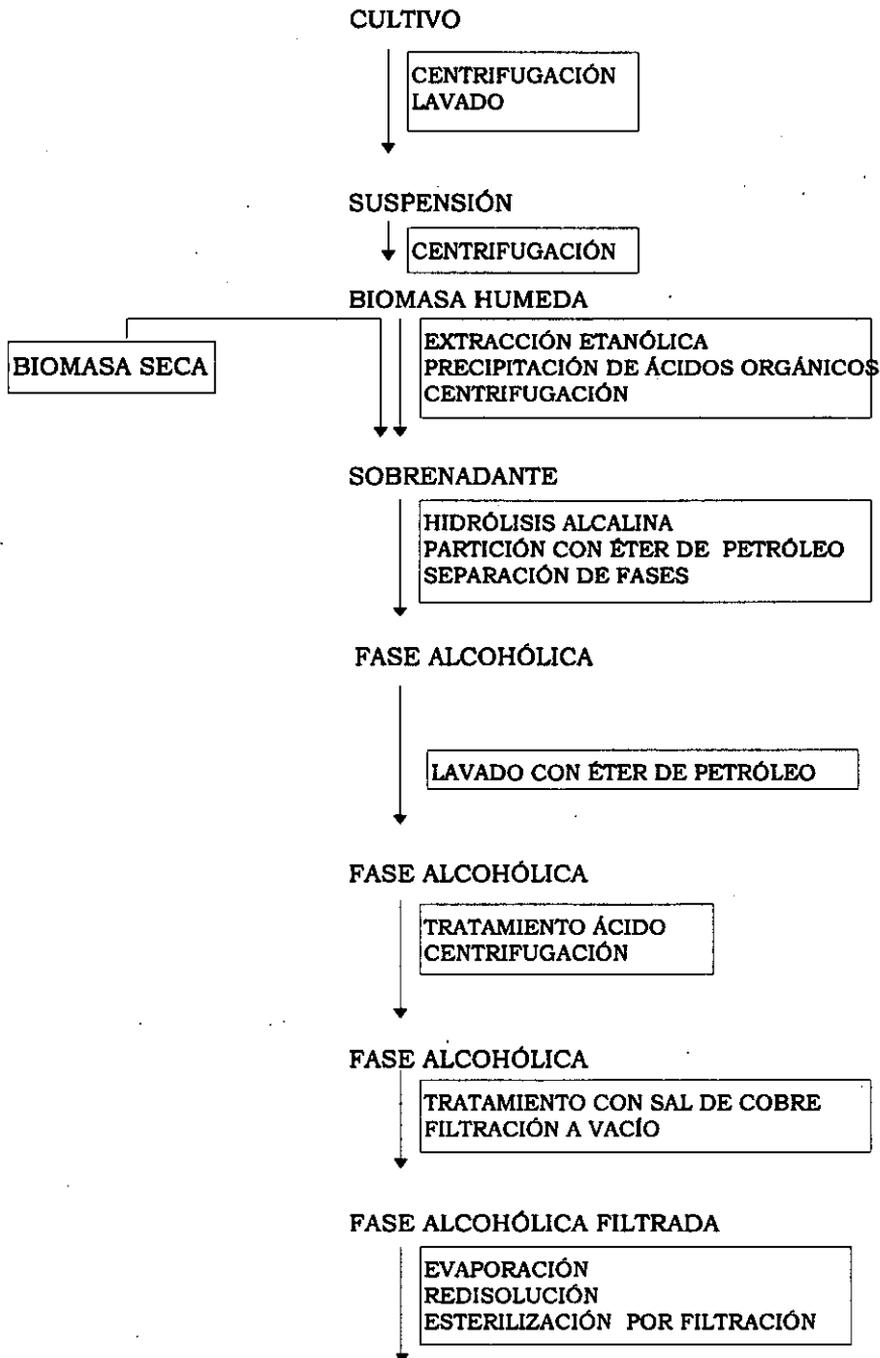
Para la extracción de las clorofilas y la obtención del extracto hidroalcohólico de cuproclorofilinas se sigue el flujo operativo que se describe a continuación (Fig. 5).

La materia prima es un extracto alcohólico de pigmentos obtenido a partir de biomasa húmeda o seca de la microalga *Chlorella vulgaris*; en el caso de la biomasa húmeda, la humedad promedio debe ser de 67,75%; la humedad residual de la biomasa seca, de 6.99%.

La extracción alcohólica se hace con alcohol al 96% durante 1h a temperatura ambiente, con agitación constante y en condiciones de semioscuridad. La precipitación de ácidos orgánicos se hace con $\text{CaCO}_3(s)$. Después de centrifugar, el sobrenadante se somete a una hidrólisis alcalina, con el objetivo de romper la cadena fitólica, para lo que se utiliza una solución de NaOH al 30%. Se hace una partición con éter de petróleo y después de separar las fases, se hace un tratamiento ácido a la fase alcohólica con una solución de ácido oxálico al 30%; con este tratamiento se elimina el átomo central de magnesio (Moreno y Yusta, 1967) para sustituirlo luego por el de cobre; para ello se utiliza una solución al 50% de CuSO_4 .

La fase alcohólica clarificada se evapora en condiciones de vacío; con este paso se eliminan las trazas de metanol que pueden quedar en la solución como consecuencia de la hidrólisis del anillo de ciclopropanona de la molécula de clorofila.

El extracto obtenido se esteriliza por filtración en un filtro bacteriológico Sartorius con membrana de acetato de celulosa Nuflow (Oxoid) de 0.2 μm . El producto final se envasa en frascos estériles de 100 ml, en una cámara de



EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE CUPROCLOROFILINAS

Figura 5. Metodología de obtención del extracto hidroalcohólico de cuproclorofilinas (EHC) a partir de *Chlorella vulgaris* BEIJERINCK.

flujo laminar y se almacena en un local semioscuro climatizado con una temperatura de $8 \pm 2^\circ\text{C}$.

Los lotes obtenidos se someten a controles microbiológicos, según las normas establecidas por el Instituto Nacional de Higiene y Epidemiología de Cuba (INHE) (Chiong *et al.*, 1985); éstos se llevaron a cabo en los laboratorios de Microbiología del Hospital Pediátrico Norte de Santiago de Cuba, Cuba.

La extracción sobre biomasa seca necesita más tiempo y es recomendable usar un alcohol al 80-70% para garantizar una buena extracción. Se pueden realizar dos ó más extracciones, dependiendo de la norma de producción establecida en los controles de calidad. En este caso para la biomasa seca se realizan tres extracciones sucesivas y dos, si se trabaja con biomasa húmeda.

ANÁLISIS DEL EHC POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)

Aunque en los últimos años ha existido una tendencia a eliminar la TLC, sustituyéndola por las determinaciones mediante HPLC, esta técnica es muy útil por su flexibilidad y simplicidad, por lo que actualmente su aplicación práctica se enfoca hacia la combinación con otros métodos.

Un volumen determinado del extracto hidroalcohólico de cuproclorofilinas se lleva a sequedad en una placa calefactora a 37°C y se resuspende en 300 μl de metanol. Las muestras se analizan mediante cromatografía de capa fina (TLC) sobre cromatofolios de sílica gel 60 (20 x 20 cm, 0.2 mm de espesor), de MERCK, en condiciones de semisaturación a 22°C . Se utiliza una fase móvil constituida por el sistema de solventes metanol: acetona: n-propanol: agua (20:10:1:2). Una vez desarrollada la cromatografía la bandas son eluidas en metanol y analizadas por HPLC.

EVALUACIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE CUPROCLOROFILINAS COMO DESINFECTANTE Y ANTISÉPTICO

CONTROL MICROBIOLÓGICO. TEST DE KELSEY-MAURER

Después de 15 días de almacenamiento, se realiza un control de soluciones según el test de Kelsey-Maurer, establecido como análisis de rutina para todas las preparaciones farmacéuticas de uso común en los servicios hospitalarios, según la norma cubana vigente que rige la actividad (Chiong *et al.*, 1985). Este ensayo se repitió cada 15 días, incluso para las soluciones en uso, con el objetivo de descartar cualquier contaminación posible. Este test se hace para comprobar que la solución en estudio no está contaminada.

Se añade 1 ml de la solución a evaluar como desinfectante, a un tubo de ensayo que contiene 9 ml de caldo triptona con perlas de vidrio; se agita en un Vortex durante 5 s y se hacen subcultivos por duplicado en placas Petri con agar triptona y plasma inactivado al 10% como neutralizante. Para ello se siembran 10 gotas de 0.02 ml por placa a una distancia mínima de 2 cm, en forma de círculo hacia la parte externa de la placa. Una de las placas se deja incubar a temperatura ambiente durante 7 días, la otra placa se incuba 72 h a 37°C.

Si hay crecimiento bacteriano se procede a la identificación y recuento de colonias totales por cada placa. Si el microorganismo no es patógeno y el crecimiento es menor o igual a 100 ufc ml⁻¹ (20 colonias por placa), se considera contaminación ambiental y el producto es apto para su uso; si la contaminación es mayor el producto no está apto para su uso. En caso de crecimiento de microorganismos patógenos se considera no apto (Kelsey y Maurer, 1966).

ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS

El producto se somete a los tres ensayos establecidos por las normas del INHE para evaluar desinfectantes químicos de nueva circulación: test de dilución, test de suspensión (sin aditivos, con jabón y con suero) y test portagérmenes (Chiong *et al.*, 1985), que además de verificar sus propiedades desinfectantes, determinan su utilidad práctica en la desinfección. Estas normas, establecidas por la sección de Microbiología Sanitaria del Laboratorio de Desinfección y Esterilización del INHE, rigen desde 1985 y fueron transferidas desde el laboratorio de referencia en desinfección del Instituto de Investigaciones Científicas de Higiene y Microbiología de Bad-Elster, Alemania (Chiong *et al.*, 1985).

Para la realización de los ensayos se obtienen microorganismos altamente patógenos, aislados a partir de infecciones nosocomiales, recomendados por la FDA (Food and Drug Administration) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, según los métodos estandarizados para el estudio de desinfectantes.

MICROORGANISMOS	PROCEDENCIA	RESULTADOS DEL ANTIBIOGRAMA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Secreción	S/ G, Ak, Co
	endotraquial	I/ Pi, Cl R/ T, Es, K, Ce, Ap
<i>Escherichia coli</i>	Urocultivo	S/ Cl, K, Ce, Ak, G, Co, T, Es
		R/ Pe, Ap, Pi
<i>Salmonella typhimurium</i>	Hemocultivo	S/ Cl, T, Es, K, Ap, Pi, G, Co, Ak
		I/ Ce
<i>Staphylococcus aureus</i>	Conjuntiva	Sensible todos antibióticos ensayados

Amikacina (Ak), Ampicillina (Ap), Eritromicina (Er), Cloranfenicol (Cl), Tetraciclina (T), Ceforán (Ce), Gentamicina (G), Kanamicina (K), Penicilina (Pe), Estreptomycin (Es), Novomicina (N), Piorán (Pi), Colimicina (Co).

S/Sensible; **I/**Sensibilidad intermedia; **R/**Resistente

Los microorganismos se someten previamente al test de resistencia al fenol y a un antibiograma según la técnica universal de Kirby-Bauer, para tener el patrón de drogo-sensibilidad de cada uno, que aparece a continuación. Los microorganismos de ensayo son: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, sensibles al fenol 1% en 10 min y *Staphylococcus aureus*, sensible al fenol 1% en 15 min.

TEST DE DILUCIÓN

Se preparan las suspensiones de los microorganismos de ensayo a una concentración correspondiente a 10^9 ufc ml⁻¹ en caldo nutritivo y se incuban 16-18 h a 37°C.

Se prepara un tubo de ensayo con 5 ml de caldo nutritivo a doble concentración y se le añaden 5 ml de la solución cuya capacidad desinfectante se quiere determinar. A partir de esta solución se preparan diluciones seriadas en tubos con caldo nutritivo, que en este caso fueron hasta 1/64. A cada tubo se le añade 0.1 ml de la suspensión bacteriana previamente preparada. Se hace un control negativo utilizando agua destilada estéril en vez de la solución en estudio y dos controles positivos con alcohol al 70% y fenol al 2%, siguiendo el mismo procedimiento descrito para la solución problema.

Los tubos se incuban a 37°C durante 7 días. La primera lectura se hace a las 24 h. Si los tubos presentan turbidez después de la incubación, se hacen subcultivos en agar sangre y se procede a la identificación de los microorganismos. Para verificar los resultados negativos se hacen subcultivos de todos los tubos. Se considera una concentración bactericida hasta el último tubo donde no hay crecimiento bacteriano.

El ensayo se hace por triplicado con los respectivos controles para cada microorganismo. Este test ofrece la información necesaria en cuanto al intervalo de concentraciones óptimas para llevar a cabo el test de suspensión,

con el que se determina el tiempo mínimo de acción letal de la solución en estudio (Chiong *et al.*, 1985).

TEST DE SUSPENSIÓN

Las suspensiones de los microorganismos de ensayo se preparan como se describe en el ensayo anterior. Se prepara además una serie de tubos de ensayo con caldo nutritivo y neutralizante (Tween 80), al 1%; el número de tubos de la serie depende del gradiente de tiempo que se quiera ensayar, que en este caso fue: 1, 5, 10, 15, 30 y 60 min.

La solución cuya capacidad desinfectante se estudia, se prepara a diferentes concentraciones de acuerdo con los resultados del ensayo anterior. A 10 ml de cada concentración a ensayar de la solución problema, se le añade 0.1 ml de la suspensión bacteriana y una vez transcurrido el tiempo de ensayo se transfiere una alícuota a uno de los tubos de la serie con caldo nutritivo y caldo nutritivo con neutralizante, repitiendo la operación hasta el último tiempo preestablecido (60 min). Los tubos se incuban 7 días a 37°C. El ensayo se hace por triplicado con un control negativo. La primera lectura se hace a las 24 h y a los 7 días la lectura definitiva.

Este ensayo se repite para estudiar el efecto de posibles interferencias como jabones y proteínas; para ello, a la solución en estudio previamente preparada se le añaden 2 ml de solución de jabón líquido al 0.1%, y en el caso del estudio de la interferencia de proteínas, 2 ml de suero inactivado sin conservantes. El suero se inactiva previamente por calor.

Con estos ensayos se evalúa el tiempo de muerte sin aditivos, en presencia de jabón y en presencia de proteínas para cada una de los microorganismos de ensayo, a dos diluciones diferentes de la solución en estudio, de acuerdo con los resultados del ensayo anterior (Chiong *et al.*, 1985).

TESTPORTAGÉRMENES

Para realizar este ensayo se utilizan piezas de tejido textil de popelina blanca de 1 cm² (objetos test) secas y estériles. Se ensayan los tiempos 5, 15 y 30 min, 5 y 12 h, preestablecidos para evaluar la utilización de un desinfectante en la desinfección química de las ropas (Chiong *et al.*, 1985). El tiempo límite mínimo fue de 5 min, teniendo en cuenta los resultados del test de suspensión.

Las suspensiones de los microorganismos de ensayo se preparan de la misma forma que se describe en los ensayos anteriores. Los objetos test se ponen en contacto con 1 ml de suspensión bacteriana durante 15 min; una vez contaminados se secan a 37°C durante 30 min.

Para verificar el crecimiento bacteriano se transfiere uno de los objetos test a un tubo de ensayo que contiene caldo nutritivo. Cada uno de los restantes objetos test se ponen en contacto con 0.5 ml de la solución desinfectante durante los tiempos de ensayo preestablecidos.

Concluido el tiempo de exposición, los objetos test se someten por separado a lavados sin agitación en tubos de ensayo con tapa de rosca. El primer lavado se realiza durante 15 min con agua y Tween 80 al 1%, el segundo lavado se hace durante 2 min con agua estéril y por último, cada test-objeto se coloca en un tubo de ensayo con caldo nutritivo y neutralizante. Los tubos se incuban a 37°C durante 7 días.

La experiencia se hace por triplicado para cada uno de los microorganismos de ensayo. Las lecturas son diarias y la lectura definitiva se hace a los 7 días; en caso de turbidez se hacen subcultivos para la posterior identificación del microorganismo; para verificar los resultados negativos se hacen subcultivos de todos los tubos.

ENSAYOS PRECLÍNICOS *in vivo*

Después de realizar los ensayos microbiológicos se llevan a cabo las pruebas preclínicas. Previamente, el extracto hidroalcohólico de cuproclorofilinas (EHC) fue evaluado toxicológicamente en el Instituto de Toxicología de Santiago de Cuba, autorizando su uso en ensayos sobre piel sana en humanos.

Para el análisis toxicológico se utilizan conejos híbridos F1 (NZBXSGB) adultos, de ambos sexos, con un peso entre 1.7 y 2.1 kg.

Se realizó un control positivo con alcohol al 70% y un blanco o control negativo. El extracto en estudio fue aplicado en dosis únicas a modo de parches dérmicos durante 4 h siguiendo el método semi-oclusivo de exposición. Durante este período los conejos se mantienen en cepos sin acceso a alimentos ni agua.

Las lecturas se hacen a intervalos de 1, 24, 48 y 72 h; basándose en la detección de signos clínicos como eritema, edema, vesículas y cualquier otra respuesta tisular indicadora de algún cambio morfológico, después de retirar los parches. Los cuerpos de los animales se someten a estudios histopatológicos de piel, hígado, riñón y pulmón.

De acuerdo con las normas establecidas por el INHE, con los ensayos preclínicos *in vivo* y el test de desinfección de superficies se concluye la evaluación experimental de un desinfectante y/o antiséptico para su posible utilización en la práctica médica (Chiong *et al.*, 1985). Los ensayos a realizar son: test para la desinfección higiénica de las manos, test para la desinfección quirúrgica de las manos y test para la desinfección de la piel sana. El test para la desinfección de superficies se considera independiente al no ser específicamente un ensayo *in vivo*, pero las normas lo incluyen como tal (Chiong *et al.*, 1985).

Los ensayos *in vivo* ofrecen como desventaja la disponibilidad o no de voluntarios para utilizar microorganismos altamente patógenos, que de hecho constituyen un riesgo, por lo que *Salmonella typhimurium* quedó excluida de los mismos; se trabaja sólo con *Staphylococcus aureus* (conjuntival), *Pseudomonas aeruginosa* (secreción endotraquial) y *Escherichia coli* (urocultivo).

TEST PARA LA DESINFECCIÓN HIGIÉNICA DE LAS MANOS

Para la realización de este ensayo se trabaja con un total de 45 voluntarios (personal médico y paramédico del Hospital Infantil Norte de Santiago de Cuba y el grupo de trabajo), que se distribuyeron en grupos de 15 (mínimo recomendado por las normas) (Chiong *et al.*, 1985), para cada microorganismo de ensayo.

Se utiliza la concentración de mejores resultados en cuanto a tiempo de acción letal; el tiempo de exposición fue de 5 min. Las suspensiones de los microorganismos de ensayo se preparan según se describe en los ensayos microbiológicos.

Se lavan las manos con abundante agua y jabón, tres veces consecutivas y se dejan secar en una cámara de flujo laminar. Posteriormente, se coloca una gota de suspensión bacteriana en la yema de cada dedo, en ambas manos; se frota los dedos homólogos entre sí 2-3 min hasta que se seque la suspensión; se añaden 10 ml de solución desinfectante sobre ambas manos, sin dejar de frotar constantemente durante el periodo de tiempo indicado (5 min). A continuación se lavan las manos con 1 l de agua estéril y se dejan escurrir.

Las muestras se toman por impresión de las yemas antes y después de la exposición a la suspensión bacteriana en agar sangre y medio selectivo. Se hace un control positivo para verificar el crecimiento de cada cepa de ensayo.

Las placas se incuban 48 h a 37°C. Para calcular el porcentaje de efectividad se suma la cantidad de placas con un crecimiento entre 0-10 colonias y se calcula el porcentaje que representan respecto al total. Se considera desinfección efectiva si el porcentaje de efectividad es mayor del 60% (Chiong *et al.*, 1985).

Después del ensayo los voluntarios se lavan las manos tres veces con abundante agua y jabón; se les añade solución fenólica al 0.1% durante 15 min y se vuelven a lavar las manos con abundante agua.

TEST PARA LA DESINFECCIÓN QUIRÚRGICA DE LAS MANOS

Este ensayo es idéntico al anterior y su diferencia estriba en la forma de realizar el lavado de las manos, puesto que la preparación de éstas para efectuar intervenciones quirúrgicas incluye el cepillado de manos y uñas, y el lavado se hace durante 10 min.

TEST PARA LA DESINFECCIÓN DE LA PIEL SANA

Se trabaja con 25 voluntarios y los mismos microorganismos de los ensayos anteriores. Se realizan controles de piel intacta para controlar la flora epidérmica después del lavado, y controles positivos después de inocular cada microorganismo, para comprobar la viabilidad de los mismos. La zona de trabajo es la parte interna del antebrazo, ésta se lava con agua y jabón y se seca con torundas estériles con ayuda de una pinza. Donde no haya vello se marca una zona de 5 x 5 cm y se extiende 0.1 ml de suspensión bacteriana preparada como se describe en los ensayos anteriores, con ayuda de una espátula de Drigalski; se deja secar. A continuación, el área contaminada se limpia con solución salina al 0.9% y se colocan sobre ésta torundas humedecidas con solución desinfectante, que se cambian cada 10 s durante 2 min.

La piel se seca con una torunda estéril y se realiza una impresión con láminas de medio sólido sobre la superficie desinfectada, haciendo una ligera

presión durante 10-15 s. Este procedimiento se hace por triplicado sobre la misma área. Las láminas con los medios correspondientes se preparan sobre portaobjetos previamente lavados con etanol.

La incubación se hace durante 48 h a 37°C. Posteriormente, se hace recuento e identificación de las colonias, considerándose efectivo el desinfectante si no hay crecimiento o hay un crecimiento de menos de 10 colonias por placa (Chiong *et al.*, 1985). Después de los ensayos a los voluntarios se les lava todo el antebrazo con abundante agua y jabón, de la misma forma que se describe en el ensayo anterior.

TEST PARA LA DESINFECCIÓN DE SUPERFICIES

Los 15 objetos test son restos de instrumental quirúrgico y broches metálicos cilíndricos, esterilizados previamente en autoclave. La exposición al desinfectante se hace a los tiempos: 1, 5, 15, 30 y 60 min.

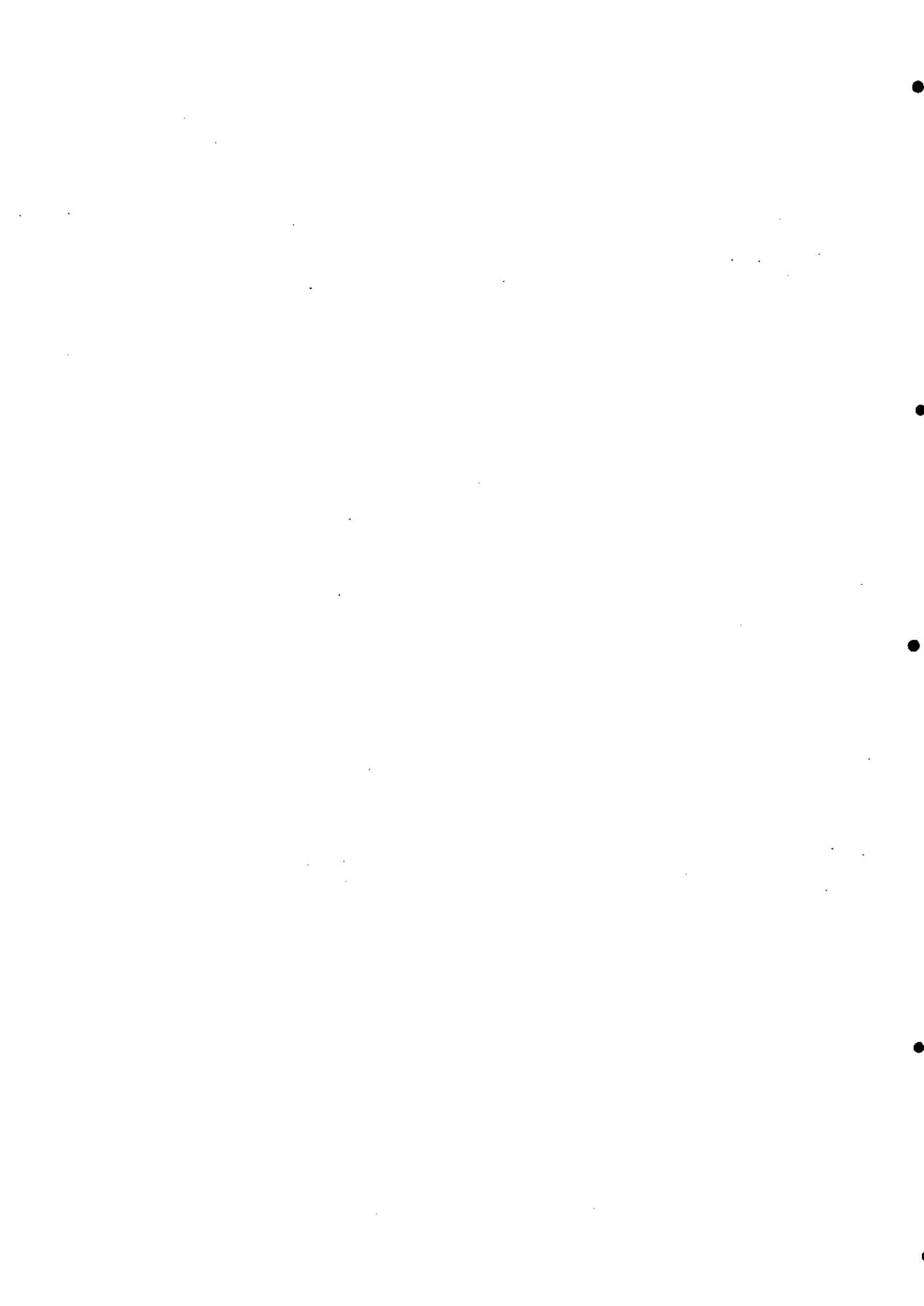
Se preparan 12 tubos de ensayo con las suspensiones de los microorganismos de ensayo. Los objetos test se ponen en contacto con dicha suspensión y, posteriormente, se transfieren a tubos de ensayo con la solución en estudio. A los tiempos establecidos se escurren y transfieren a un tubo de ensayo con caldo nutritivo, donde permanecen hasta después de la incubación. Se incuban durante 48 h a 37 °C; se hacen subcultivos en agar sangre y medios selectivos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos en los experimentos donde se evalúa la influencia espectral de la radiación sobre el crecimiento y composición bioquímica de *Dunaliella salina*, se examinan mediante un análisis de varianza (ANOVA) unifactorial para cada uno de los factores y parámetros estudiados, utilizando para ello el paquete informático SPSS/PC+TM versión 4.10 (SPSS Inc.). Si hay diferencias significativas entre las medias de las combinaciones de cada

factor con el parámetro analizado, se emplea el test de Duncan de rango múltiple para comparar los niveles de significación. En todos los casos este test se aplica con un nivel de significación ($P = 0.05$). Se realizan, además, correlaciones bivariadas y parciales entre todos los parámetros estudiados, y de éstos con el nivel de irradiancia espectral y la concentración de nitrato, utilizando el mismo paquete informático. Para analizar la interacción entre los tres factores ensayados: concentración de nitrato, longitud de onda y nivel de irradiancia espectral, se realiza un ANOVA factorial general, personalizado para la interacción, con una suma única de cuadrados.

4.- *Experiencias y resultados*



OBTENCIÓN DE PRODUCTOS DE INTERÉS QUÍMICO-FARMACÉUTICO A PARTIR DE *Chlorella vulgaris*

COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE LA MATERIA PRIMA

La biomasa de *Chlorella vulgaris* se recogió al inicio de la fase estacionaria en cultivos a gran escala. Ésta fue procesada en un secador por aspersión y se obtuvo un polvo fino, verde, con un 6.99% de humedad residual. Los análisis se realizaron a dos lotes de biomasa seca: A05 y A06, procedentes de diferentes cultivos y procesados siguiendo el mismo diagrama operativo.

De forma general, la composición bioquímica fue similar en ambos lotes. La concentración de carbohidratos ($43.19 \pm 2.84\%$) fue mayor que la de proteínas ($38.54 \pm 0.32\%$); ésta se realizó a partir de los datos del nitrógeno orgánico estimado por análisis elemental, los resultados fueron verificados por el método de Lowry, éstos fueron prácticamente idénticos ($39.13 \pm 0.25\%$). El contenido medio de ARN para los dos lotes analizados fue del $3.46 \pm 0.16\%$. Sin embargo, el contenido lipídico fue bajo ($12.30 \pm 0.39\%$), al igual que el contenido de cenizas ($2.99 \pm 0.72\%$) (Tabla I). Estos resultados se deben a la fase de crecimiento en que la biomasa ha sido recogida.

La composición pigmentaria fue similar para ambos lotes, destacando el alto contenido de feopigmentos presentes en la biomasa (tabla II).

Tabla I. Composición bioquímica en porcentaje de peso seco de dos lotes de biomasa seca de *Chlorella vulgaris* obtenida a partir de cultivos a gran escala.

Componentes (% PS)	Lote A05	Lote A06
Proteína bruta	38.22	38.86
Carbohidratos	41.18	42.5
Lípidos totales	12.70	11.91
ARN	3.35	3.58
Cenizas	3.51	2.48

Tabla II. Composición pigmentaria en porcentaje de peso seco de la biomasa seca de *Chlorella vulgaris* obtenida a partir de cultivos a gran escala.

Composición	Lote A05	Lote A06
Pigmentos totales (%PS)	2.24	1.87
considerando feopigmentos	7.05	6.08
Feopigmentos ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	44.8	39.18
Clorofila a ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	16.4	14.02
Clorofila b ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	2.25	2.27
Carotenoides ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	2.16	1.07

Tabla III. Composición de elementos minerales en porcentaje de peso seco de la biomasa de *Chlorella vulgaris* procedente de cultivos a gran escala.

Elemento	Concentración (% PS)	Elemento	Concentración (% PS)
K	1.1 \pm 0.10	Mn	0.01 \pm 0.05
Na	1.0 \pm 0.02	Al	<0.001
Mg	0.57 \pm 0.10	Ba	<0.001
Ca	1.0 \pm 0.02	Cr	<0.001
Zn	0.03 \pm 0.02	Pb	<0.001
Fe	0.19 \pm 0.02	Al	<0.001
Cu	0.003 \pm 0.001	Sn	<0.001
Co	0.001 \pm 0.00		

Por otra parte, según el análisis de elementos minerales, la biomasa seca de *C. vulgaris* contiene Na, K, P, Mg, Ca, Fe, Cu, Zn, Mn y Co; además, se detectó la presencia de Al, Ni, Ba, Cr, Sn y Pb en concentraciones menores que 0.001% (Tabla III).

OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Chlorella vulgaris* (EC)

COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA

La obtención del extracto acuoso o crudo de *C. vulgaris* (EC) se realizó según la metodología descrita en *Materiales y Métodos*. Se obtienen tres lotes con pH de 6.3 ± 0.2 y un residuo sólido de $12.4 \pm 2 \text{ mg ml}^{-1}$. El espectro UV-visible característico presenta un máximo de absorción a 278 nm (Fig. 6).

El extracto crudo se liofilizó para su posterior análisis; se determinó la composición de proteínas, carbohidratos, ARN, pigmentos, cenizas; y su composición elemental por análisis de CNH y absorción atómica. El contenido proteico medio de los tres lotes del extracto liofilizado fue del 20%, lo que equivale a una concentración de $2.48 \pm 0.3 \text{ mg ml}^{-1}$ de extracto crudo; los carbohidratos suponen el 9%, lo que representa una concentración de $1.11 \pm 0.2 \text{ mg ml}^{-1}$, mientras que el porcentaje de ARN fue del 9.29% ($1.15 \pm 0.03 \text{ mg ml}^{-1}$) y el de las cenizas del 38.16% ($47.31 \pm 0.08 \text{ mg ml}^{-1}$).

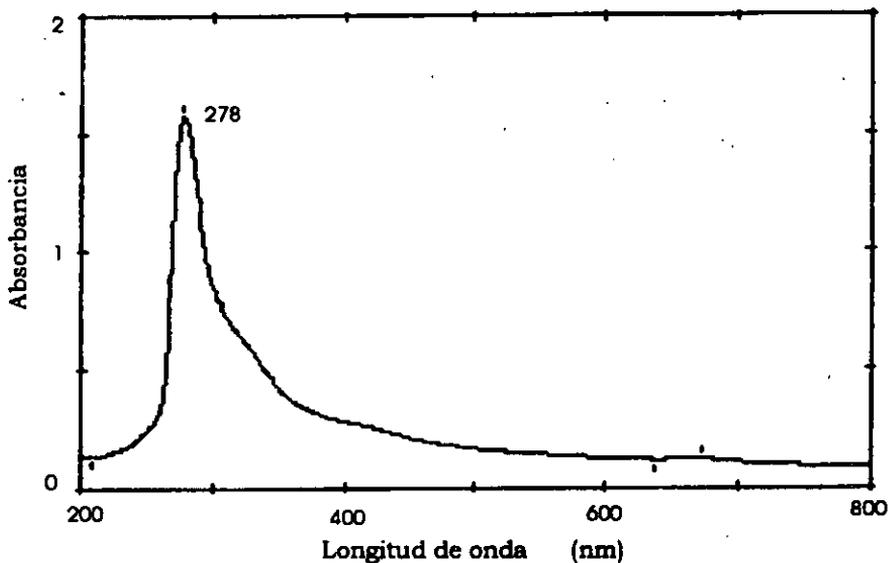


Figura 6. Espectro UV-visible del extracto acuoso de *Chlorella vulgaris* (EC).

Tabla IV. Composición de elementos minerales del extracto acuoso de *Chlorella vulgaris*.

Elemento	Concentración en g/100 ml
K	0.28±0.00
Na	0.22±0.02
Mg	0.02±0.0
Cu	0.00014±0.0
Zn	0.004±0.0
Ca	0.014±0.05
Ni	T
Co	T
Fe	T
Mn	T

El análisis elemental por CNH mostró la siguiente composición: N $3.5 \pm 0.7\%$ y C $25.88 \pm 3.45\%$, siendo todo el nitrógeno presente en dichos extractos de naturaleza orgánica, teniendo en cuenta los resultados de la composición elemental de las cenizas: N $0 \pm 0.0\%$ y C $0.06 \pm 0.01\%$. Respecto al contenido de pigmentos, el extracto contiene restos de clorofila a, b, feopigmentos y cantidades mínimas de carotenoides, que contribuyen al peso seco del extracto acuoso de *C. vulgaris* (EC) en un 0.05%, siendo el mayor aporte debido a los feofórbidos. El extracto contiene además: K, Na, Mg, Cu, Zn, P y trazas de Ca, Fe, Ni, Co y Mn, según los resultados de los análisis de la composición de elementos minerales por absorción atómica (Tabla IV).

Tabla V. Composición de aminoácidos libres del extracto acuoso de *Chlorella vulgaris*.

Aminoácido	Relación respecto a la serina
Ser	1
Glu	6.18
Ala	5.70
Pro	5.52
Lys	2.95
His	1.82
Leu	1.77
Asp	1.09

Se realizó, además, el análisis de aminoácidos libres en el extracto acuoso. De acuerdo con los resultados, éste contiene una cantidad significativa de ácido glutámico, alanina y prolina, así como lisina, histidina, leucina, y pequeñas cantidades de ácido aspártico y serina (tabla V).

A partir del extracto crudo se purificó la fracción proteica mediante precipitación con etanol al 70%. Previamente, se hicieron precipitaciones con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, acetona fría y TCA al 10%; en cada caso la fracción purificada se analizó por SDS-PAGE, según el protocolo de Laemmli (1970), obteniéndose mejores resultados con la precipitación etanólica. La muestra se resuspende previamente en tampón fosfato pH 7, 60 mM; una alícuota de esta suspensión se transfiere a un volumen determinado del tampón para muestras, preparado a doble concentración. De acuerdo con los resultados obtenidos a partir

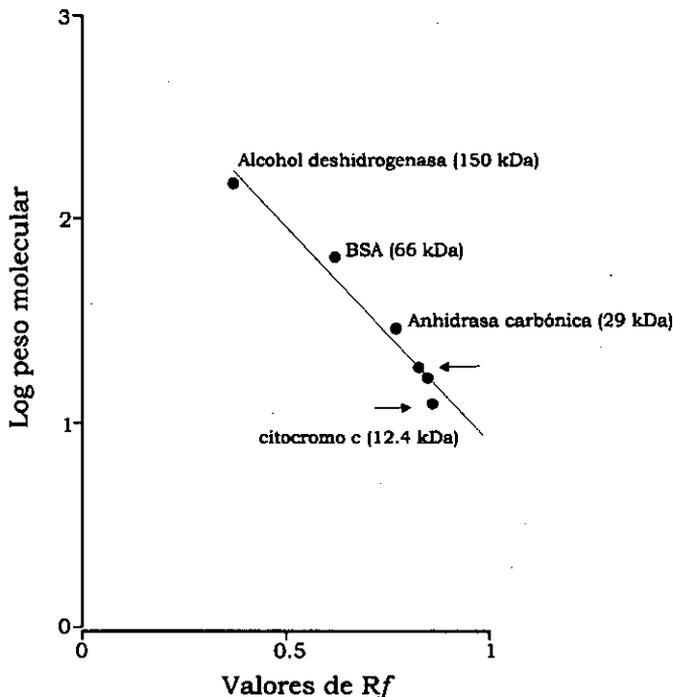


Figura 7. Recta de calibrado para la estimación del peso molecular de los péptidos presentes en el extracto de *Chlorella vulgaris*. SDS-PAGE al 14%.

Tabla VI. Composición de aminoácidos de la fracción proteica del extracto acuoso de *Chlorella vulgaris*.

Aminoácidos	Relación respecto a la cisteína
Cys	1.0
Asp	10.84
His	19.14
Glu	12.40
Ala	12.18
Leu	7.52
Lys	7.36
Gly	7.03
Val	7.00
Ser	5.63
Arg	5.49
Pro	5.09
Ile	3.53
Phe	3.26
Tyr	2.26
Thr	1.78
Met	1.07

de la recta de calibrado de los patrones proteicos con peso molecular conocido y los R_f (cm) de los péptidos de la muestra, la fracción proteica del extracto acuoso de *C. vulgaris* está compuesta por tres péptidos, con pesos moleculares de 12.4, 16.6 y 18.6 kDa.

Posteriormente, la fracción proteica purificada se hidrolizó para determinar la composición de aminoácidos totales de la misma. Los aminoácidos mayoritarios son el ácido aspártico, glutámico, histidina y alanina; se detectan, además, serina, glicocola, treonina, arginina, tyrosina, valina, metionina, fenilalanina, isoleucina, leucina, lisina, prolina y mínimas cantidades de cisteína (Tabla VI).

EVALUACIÓN COMO MEDIO DE CULTIVO PARA MICROORGANISMOS

En todos los casos el extracto mantuvo las condiciones de esterilidad durante los siete días de ensayo, por lo que desde el punto de vista práctico puede ser evaluado como medio de cultivo. El control biológico, realizado con *P. aeruginosa* fue positivo; el crecimiento fue abundante tanto en la formulación sólida del extracto como en la líquida, por lo que se ensayaron sus cualidades nutritivas con otros microorganismos.

EVALUACIÓN COMO MEDIO SÓLIDO

El extracto permite el crecimiento de los microorganismos de ensayo, incluso a altas diluciones, siendo la mínima dilución de crecimiento contable diferente para cada uno: *Serratia* (10^{-6}), *P. aeruginosa* (10^{-5}), *P. mirabilis* (10^{-7}), *S. aureus* (10^{-5}) y levadura (10^{-3}). En el caso de *E. coli* se ensayó hasta la dilución 10^{-9} , siendo ésta la mínima dilución de crecimiento contable en el EC, con 135 colonias (Tabla VII).

A partir de estos datos se calculó la razón de productividad entre el medio de cultivo en estudio y los medios utilizados como referencia utilizando la primera dilución de crecimiento contable. Según los resultados obtenidos, tanto para el extracto acuoso como para los medios de referencia, el crecimiento de *Serratia sp.* no es contable hasta la dilución 10^{-5} , mientras que a la primera dilución de crecimiento contable (10^{-6}) la productividad del EC es mayor que en el agar nutritivo, pero menor que en el agar MacConkey. Respecto a *P. aeruginosa*, el crecimiento no es contable en el extracto acuoso ni en los medios de referencia hasta la dilución 10^{-4} ; sin embargo, a la primera dilución contable (10^{-5}) el extracto es mucho menos productivo que los medios convencionales utilizados. En el caso del *P. mirabilis*, el crecimiento no es contable en el extracto ni en los medios de referencia hasta la dilución 10^{-6} ; a partir de ésta fue menos productivo que los medios de referencia. Para el *S. aureus* la primera dilución contable fue 10^{-5} , donde el

Tabla VII. Crecimiento de *Serratia* sp., *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *S. aureus*, *E. coli* y levadura en el extracto de *Chlorella vulgaris* (EC) formulado como medio sólido.

Cepas	Medios	Número de colonias en las diferentes diluciones								
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
<i>Serratia</i> sp.	EC	I	I	I	I	I	65	33	27	
	Agar Nutritivo	I	I	I	I	I	51	41	37	
	McConkey	I	I	I	I	I	91	69	23	
<i>P. aeruginosa</i>	EC	I	I	I	I	30	23	21	-	
	Agar Nutritivo	I	I	I	I	122	65	40	43	
	McConkey	I	I	I	I	81	64	52	36	
<i>P. mirabilis</i>	EC	I	I	I	I	I	I	37	6	
	Agar Nutritivo	I	I	I	I	I	I	57	21	
	CLED	I	I	I	I	I	I	62	57	
<i>S. aureus</i>	EC	I	I	I	I	94	52	48	67	
	Agar Nutritivo	I	I	I	I	81	106	60	25	
	Agar Sangre	I	I	I	I	127	109	96	89	
<i>E. coli</i>	EC	I	I	I	I	I	I	I	I	135
	Agar Nutritivo	I	I	I	I	I	I	I	I	140
	McConkey	I	I	I	I	132	64	47	38	30
levadura	EC	I	I	71	39	3	6	3	5	
	Agar Nutritivo	I	I	81	21	6	8	6	4	
	Sabouraud	I	I	73	26	8	3	1	1	1

I: número incontable de colonias

medio formulado con EC fue más efectivo que el agar nutritivo, pero menos productivo que el agar sangre. Sin embargo, para *E. coli* el crecimiento fue incontable en el extracto acuoso y en el agar nutritivo hasta 10⁻⁸, a partir de esta dilución fue tan productivo como éste; respecto al agar MacConkey, el EC fue mucho más productivo a todas las diluciones ensayadas (Tabla VII-VIII). Por otra parte, la levadura crece hasta la dilución 10⁻² en todos los medios por igual, y a la primera dilución de crecimiento contable (10⁻³) el EC fue tan productivo como el Sabouraud y el agar nutritivo (Tabla VIII).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, el extracto acuoso de *C. vulgaris* fue tan productivo como el agar nutritivo para el cultivo de *Serratia* sp., *S. aureus*, *E. coli* y levadura; y mucho más productivo que el agar

Tabla VIII. Razón de productividad del extracto acuoso de *C. vulgaris* formulado como medio sólido, respecto a medios de cultivo convencionales.

Microorganismos	Medios	Razón de productividad
<i>Serratia sp.</i>	EC/agar nutritivo	1.3
	EC/agar MacConkey	0.7
<i>P. aeruginosa</i>	EC/agar nutritivo	0.3
	EC/agar MacConkey	0.4
<i>P. mirabilis</i>	EC/agar nutritivo	0.6
	EC/C.L.E.D.	0.6
<i>S. aureus</i>	EC/agar nutritivo	1.2
	EC/agar sangre	0.7
<i>E. coli</i>	EC/agar nutritivo	1.0
	EC/agar MacConkey	4.5
levadura	EC/agar nutritivo	0.9
	EC/Sabouraud	1.0

MacConkey para el cultivo de *E. coli*; además, en el cultivo de levadura fue tan productivo como el Sabouraud. Por el contrario, no es tan productivo como los medios convencionales para el crecimiento de *P. aeruginosa* y *P. mirabilis*, sin embargo, inhibe el crecimiento en velo característico de este microorganismo, y en el caso de *P. aeruginosa* aumenta la pigmentación, lo que podría ser beneficioso para el aislamiento de ambos.

EVALUACIÓN COMO MEDIO LÍQUIDO

En todos los subcultivos realizados a partir de las suspensiones de los microorganismos de ensayo en el EC, el crecimiento fue incontable hasta la última dilución ensayada (10^{-8}). De acuerdo con los límites establecidos en las especificaciones microbiológicas para las formulaciones líquidas en la Norma Cubana 57-94-1, vigente desde 1986, un medio de cultivo líquido es satisfactorio si permite el crecimiento de los microorganismos de ensayo a diluciones de 10^{-7} , por lo que la formulación líquida del extracto en estudio puede considerarse adecuada.

EVALUACIÓN COMO MEDIO DE CULTIVO PARA CÉLULAS VEGETALES

Se evaluó además, la utilidad del extracto acuoso de *C. vulgaris* en la micropropagación somática de callos embriogénicos de orquídeas del género *Cattleya*, realizando tres ensayos diferentes, en los que se varió la concentración del EC en un medio basal; para ello se utilizó el medio agar Murashige (Murashige y Skoog, 1962) y como fuente de carbono, sacarosa al 3%. En cada caso el pH se ajustó a 5.8. Por cada ensayo se realizaron 13 réplicas. Se realizó además, un control con medio basal y los reguladores del crecimiento que normalmente se emplean en el cultivo de callos embriogénicos de orquídeas.

Los ensayos fueron:

1. Control: Medio basal + 2 mg l⁻¹ 6BAP (6-bencil aminopurina) + 1 mg l⁻¹ AIA (ácido indol acético)
2. 10% de extracto de *Chlorella vulgaris* en medio basal (v:v)
3. 50% de extracto de *Chlorella vulgaris* en medio basal (v:v)
4. 100% de extracto de *Chlorella vulgaris*

La siembra de los explantes se realizó en botellas estériles de 500 ml con 25 ml de medio, en cámara de flujo laminar, utilizando segmentos de callos embriogénicos de orquídeas del género *Cattleya*, éstas se incubaron a una temperatura constante de 26 ± 2°C, con luz continua a 29.3 μmol m⁻² s⁻¹. Una vez desarrolladas, las plántulas fueron transplantadas y sometidas a condiciones de vivero, evaluando de forma visual sus características organogénicas, una vez transferidas a condiciones de vivero.

Transcurridos 26 días se determinó el peso fresco de cada callo. Los resultados se procesaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) unifactorial; para comparar los niveles de significación de la diferencia entre las medias se realizó un test de Duncan de rango múltiple; para ello se utilizó el paquete informático SPSS/PC+TM versión 4.10 (SPSS Inc.). Los tratamien-

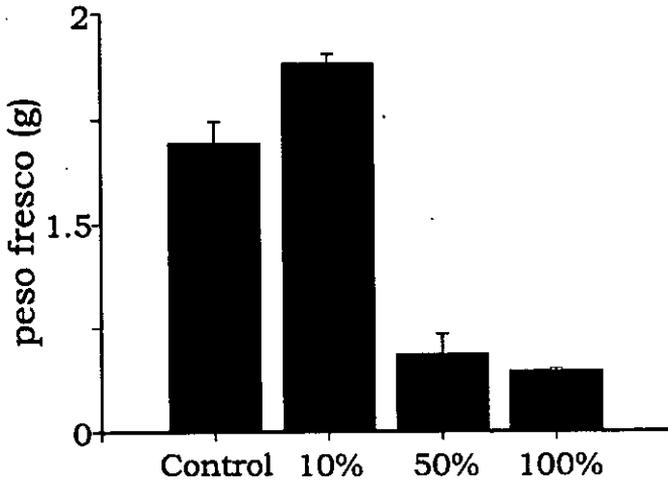


Figura 8. Pesos frescos de callos embriogénicos de orquídeas del género *Cattleya* obtenidos en las formulaciones con diferentes concentraciones de extracto acuoso de *Chlorella vulgaris* (10, 50 y 100%) en el medio basal. Control: medio basal Murashigue con reguladores del crecimiento.

tos fueron comparados entre sí y con el control, utilizando un nivel de significación $P = 0.05$.

Las formulaciones del medio basal con un 50 y 100% de extracto acuoso de *C. vulgaris* no son efectivas, obteniéndose valores de peso fresco de 0.29 ± 0.01 y 0.37 ± 0.1 g, respectivamente; éstos valores no difieren significativamente entre sí, sin embargo, difieren de los que se obtienen en los controles (1.39 ± 0.1 g) y en la formulación con un 10% de extracto acuoso (1.77 ± 0.04 g). Por otra parte, aunque la formulación del medio basal con un 10% de extracto permite obtener valores de peso fresco superiores a los que se obtienen en los controles, éstos no difieren significativamente entre sí (Fig. 8).

En cuanto a la organogénesis, no hubo diferencias visibles respecto al control en las formulaciones con 10 y 50% del extracto acuoso, mientras que en la formulación del 100% no hubo regeneración de las plántulas de orquídeas; en este caso no se realizó el trasplante de las mismas.

EVALUACION DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE CUPROCLOROFILINAS DE *Chlorella vulgaris*

COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA

A partir de la metodología propuesta se obtienen ocho lotes del extracto hidroalcohólico de cuproclorofilinas (EHC), con un pH entre 8.9-9.5, una salinidad de $18.8 \pm 1.5\%$, y un residuo sólido de $28.11 \pm 6.5 \text{ g l}^{-1}$. El espectro característico UV-visible presenta máximos de absorción a 244, 278, 407 y 626 nm, siendo muy similar al espectro del patrón comercial de la sal disódica de cuproclorofilinas suministrado por SIGMA Química (Fig. 9).

Se realizan los análisis de los iones metálicos por absorción atómica para determinar, fundamentalmente, la contaminación por metales pesados del extracto en estudio; el Cu libre se determinó según la metodología recomendada por la FAO/WHO (FAO/WHO, 1970) (Tabla IX).

El extracto hidroalcohólico de cuproclorofilinas tiene altas concentraciones de Na y Cu, ambos elementos forman parte de la estructura de las

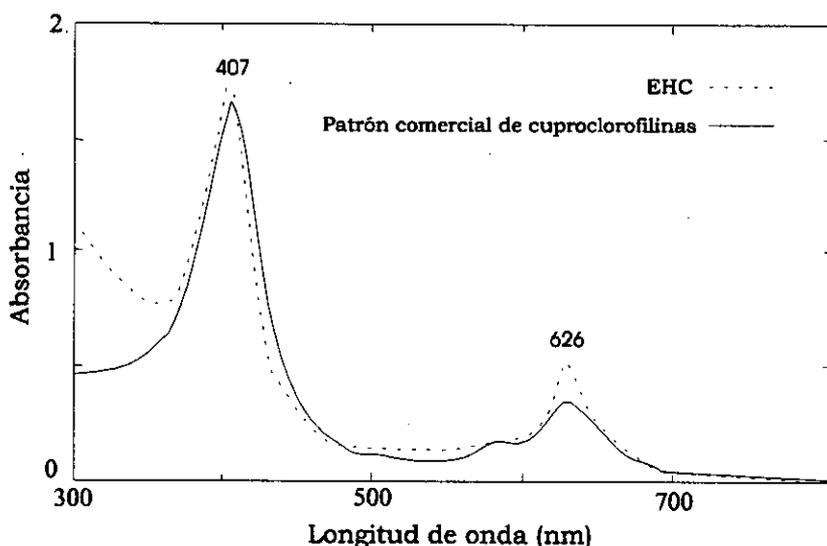


Figura 9. Espectro UV-visible del extracto hidroalcohólico de cuproclorofilinas obtenido a partir de *Chlorella vulgaris* (EHC) y del patrón comercial suministrado por SIGMA Química.

Tabla IX. Composición de elementos minerales del extracto hidroalcohólico de cuproclorofilinas determinados por absorción atómica.

Elemento	(mg l ⁻¹)
Na	2151±1079
K	30±6.53
Mg	0.32±0.23
Ca	T
Fe	0.93±0.70
Co	-
Ni	T
Cu	89±11.89
Cd	-
Hg	-
Zn	4±2.00
Al	-
Pb	T
Mn	T
Sn	-
As	-

cuproclorofilinas; así como K, bajas concentraciones de Mg, Fe, Zn, y trazas de Ca, Co, Ni, Mn, Pb y Cu libre; no se detectó Al, Sn, Cd, Hg ó As (Tabla IX).

Se realizó el análisis de la composición lipídica del EHC para determinar si existía contaminación de esta fracción en dicho extracto, teniendo en cuenta que la materia prima es un extracto alcohólico de pigmentos obtenido a partir de biomasa seca de *C. vulgaris*; para ello, el EHC se llevó a sequedad a 37°C. El contenido total de lípidos fue 17.7 mg l⁻¹, fracción que representa el 0.04% del peso seco del extracto, lo que no resulta significativo.

Se realizó, además, una cromatografía en capa fina (TLC) y un análisis por HPLC, según el protocolo descrito para determinación de pigmentos totales. En ambos casos se utilizó un patrón comercial de la sal disódica de cuproclorofilinas de SIGMA Química. En la TLC del patrón comercial aparecen

tres bandas con R_f 0.96; 0.87; 0.70; la primera banda es amarilla y las restantes son verde brillante; mientras que en la solución en estudio (EHC) sólo aparecen las dos bandas verdes, con idénticos valores de R_f . Según los resultados de los análisis por HPLC, en el preparado comercial aparecen siete picos, mientras que en el EHC se obtienen solamente tres (Fig. 10).

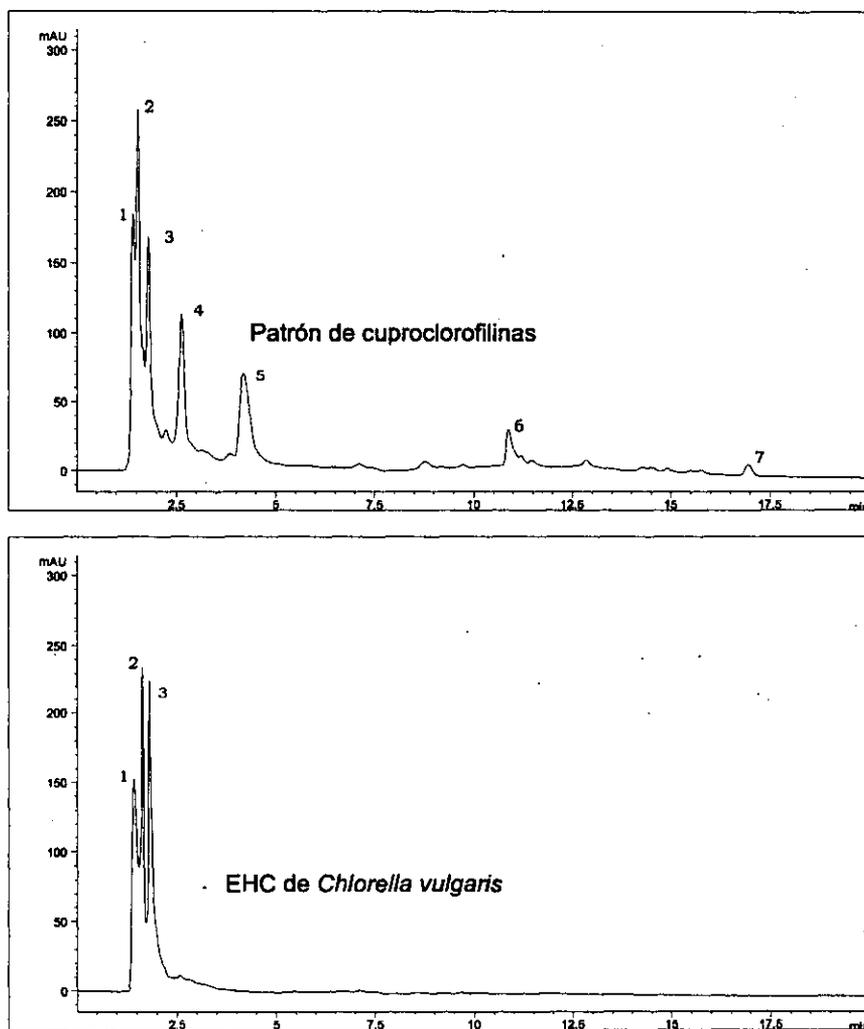


Figura 10. Resultados de los análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) del extracto hidroalcohólico de cuproclorofilinas obtenido a partir de *Chlorella vulgaris* y del patrón de cuproclorofilinas suministrado por SIGMA Química.

Los espectros de cada pico se analizaron tanto para el patrón comercial como para el EHC. En el patrón, los picos 1, 2, 3, 4 y 5 mostraron máximos de absorción alrededor de 410 nm; mientras que el pico 6 mostró un máximo alrededor de 430 nm. Por las características del espectro y el tiempo de retención del pico 7, éste es β -caroteno y sería la fracción detectada en la TLC como una banda amarilla, con R_f 0.96. Sin embargo, en la solución hidroalcohólica de cuproclorofilinas, los tres picos detectados tienen máximos de absorción alrededor de 410 nm. Se detecta, además, en el primer pico una fuerte absorción por debajo de los 320 nm.

EVALUACIÓN DEL EXTRACTO COMO DESINFECTANTE Y ANTISÉPTICO

El extracto hidroalcohólico de cuproclorofilinas fue evaluado como desinfectante y antiséptico. Previamente, se realizó el test de Kelsey-Maurer como control de calidad microbiológico. Este test fue negativo para todos los lotes; no se detectó crecimiento en ninguna de las diluciones ensayadas, por lo que procede realizar los ensayos microbiológicos.

TEST DE DILUCIÓN

El test de dilución se realizó con el extracto puro. Los resultados con las distintas diluciones de alcohol al 70%, fenol al 2% y la solución en estudio, para cada microorganismo de ensayo, aparecen en la tabla X.

La menor dilución de alcohol al 70% que inhibe el crecimiento de *S. aureus*, *S. typhimurium* y *P. aeruginosa* fue la dilución 1/2, que equivale a una concentración del 35%, mientras que la dilución 1/4 (17%) inhibió solamente el crecimiento de *E. coli*. La mínima dilución de fenol al 2% que inhibe el crecimiento de *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* es 1/8 (0.25%), mientras que para *S. typhimurium* es 1/16 (0.1%). En el caso del extracto hidroalcohólico de cuproclorofilinas al 2.81% la mínima concentración que inhibe el crecimiento de *S. typhimurium*, *E. coli* y *P. aeruginosa* es la dilución 1/4 (0.7%), mientras

Tabla X. Resultados del test de dilución del extracto hidroalcohólico de cuproclorofilinas (EHC), utilizando alcohol al 70% y fenol al 2% como controles positivos.

Microorganismos	Diluciones					
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
<i>Staphylococcus aureus</i> (control)	+	+	+	+	+	+
Alcohol 70%	-	+	+	+	+	+
Fenol 2%	-	-	-	+	+	+
EHC 2%	-	-	+	+	+	+
<i>Salmonella typhimurium</i> (control)	+	+	+	+	+	+
Alcohol 70%	-	+	+	+	+	+
Fenol 2%	-	-	-	-	+	+
EHC 2%	-	-	-	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> (control)	+	+	+	+	+	+
Alcohol 70%	-	-	+	+	+	+
Fenol 2%	-	-	-	+	+	+
EHC 2%	-	-	-	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (control)	+	+	+	+	+	+
Alcohol 70%	-	+	+	+	+	+
Fenol 2%	-	-	-	+	+	+
EHC 2%	-	-	-	+	+	+

(+) indica crecimiento, (-) ausencia de crecimiento.

que para *S. aureus* es la dilución 1/8 (0.35%) (Tabla X). Se hizo un control sin desinfectante para verificar la viabilidad de los microorganismos de ensayo, detectándose el crecimiento de éstos en todas las diluciones.

De forma general, el EHC fue más efectivo que el alcohol para todos los microorganismos de ensayo y tan activo como el fenol para *E. coli* y *P. aeruginosa*.

TEST DE SUSPENSIÓN

En el test de suspensión sin aditivos no hubo crecimiento en los subcultivos de los microorganismos ensayados a ninguna de las diluciones del extracto hidroalcohólico de cuproclorofilinas, en los diferentes tiempos de

ensayo, por lo que se verifica la acción desinfectante de éste para las dos concentraciones ensayadas en un tiempo de 1 min. Con este test se define, además, el margen de error que provocan interferencias como jabón y proteínas sobre la acción del desinfectante en estudio.

En presencia de jabón hay pérdida de efectividad de la solución; el tiempo de muerte de *P. aeruginosa* para las dos concentraciones de extracto ensayadas fue de 5 min; a la dilución 1/4 (0.7%) el tiempo de muerte de *S. typhimurium*, fue también de 5 min; sin embargo, se mantuvo en 1 min para *E. coli* y *S. aureus*. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, la presencia de proteínas se estudió con la mayor dilución del extracto, equivalente a la concentración 1.4%; en este ensayo el tiempo de muerte para *S. typhimurium* pasa a ser de 5 min, manteniéndose en 1 min para el resto de los microorganismos ensayados. De forma general, el tiempo mínimo de acción letal aumenta con la presencia de aditivos como jabón y proteínas, por lo que el extracto pierde efectividad.

TEST PORTAGÉRMENES

El test portagérmenes se realizó a los tiempos de exposición: 5, 15 y 30 min; 5 y 12 h, utilizando como objetos-test piezas de tejido textil de popelina blanca de 1 cm² secas y estériles. Los resultados fueron satisfactorios; no hubo crecimiento de ninguno de los microorganismos de ensayo en los subcultivos realizados a ninguno de los tiempos de exposición. Este ensayo permite deducir la posible aplicación del extracto en la desinfección química de las ropas.

ESPECTRO BACTERICIDA

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos microbiológicos se establece la concentración para el desarrollo de los ensayos preclínicos *in vivo*: dilución 1/2 (1.4%) y un tiempo de exposición de 5 min.

Previa realización de los ensayos *in vivo* se hizo un espectro bactericida del EHC. Para ello se trabajó con 11 microorganismos aislados de infecciones nosocomiales y 3 cepas estándar utilizadas en el control de calidad de los discos de antibióticos usados en los antibiogramas, recomendadas para el estudio de desinfectantes por las normas internacionales vigentes (Chiong *et al.*, 1985). Los microorganismos de ensayo, así como su procedencia y los resultados del antibiograma para cada una de ellos fueron:

MICROORGANISMO	PROCEDENCIA	RESULTADOS DEL ANTIBIOGRAMA
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	STA
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	STA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	STA
<i>Salmonella typhimurium</i>	Hemocultivo	S/ Cl, T, Es, K, Ap, Pi, G, Co, Ak I/ Ce
<i>Haemophilus influenzae</i>	Conjuntiva	STA
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Uretra	S/ Ak, Ap, Er, Cl, T, Ce, G, K I/ Pe R/ Es, N
<i>Neisseria meningitidis</i>	Líquido	S/ Ak, Pe, Er, Ap, Cl, T, Es, G, K, Ce
	cefalorraquideo	R/ N
<i>Escherichia coli</i>	Urocultivo	S/ Cl, K, Ce, Ak, G, Co, T, Es R/ Pe, Ap, Pi
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Líquido pleural	STA
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Ótico	STA
<i>Staphylococcus aureus</i>	Conjuntiva	STA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Secreción	S/ G, Ak, Co
	endotraquial	I/ Pi, Cl R/ T, Es, K, Ce, Ap
<i>Streptococcus</i> β-hemolítico	Faringe	S/ Pi, Ce, Pe, Er, Es, N, Cl R/ Es, T, K, Ap, Ak, G
<i>Streptococcus</i> β-hemolítico	Manos	STA

Amikacina (Ak), Ampicilina (Ap), Eritromicina (Er), Cloranfenicol (Cl), Tetraciclina (T), Ceforán (Ce), Gentamicina (G), Kanamicina (K), Penicilina (Pe), Estreptomina (Es), Novomicina (N), Piorán (Pi), Colimicina (Co).

S/Sensible; **I/**Sensibilidad intermedia; **R/**Resistente; **STA:** Sensible a todos los antibióticos ensayados

Las suspensiones de los microorganismos de ensayo se prepararon en caldo nutritivo, con una turbidez equivalente al tubo N° 9 de la escala de McFarland, que corresponde a una concentración de 10^9 ufc ml⁻¹.

La concentración de la solución en estudio se prepara diluyendo el EHC en caldo nutritivo y en caldo nutritivo con neutralizante (Tween 80 al 1%) hasta la dilución 1/2 (1.4%). Se distribuyen volúmenes adecuados en tubos de ensayo y se añade 1 ml de la suspensión bacteriana en cada uno. Para cada microorganismo de ensayo se preparan tres réplicas de la dilución del EHC con y sin neutralizante; transcurridos los 5 min de exposición, se hacen subcultivos en agar sangre y en los medios selectivos, dependiendo del microorganismo de ensayo.

En todos los casos se hizo un control negativo con agua destilada estéril para verificar la viabilidad de los microorganismos. Las lecturas se hacen a las 24 h y a los 7 días.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el extracto hidroalcohólico de cuproclorofilinas (EHC) tiene un efecto letal sobre todos los microorganismos de ensayo tras 5 min de exposición, incluso cuando el neutralizante está presente en solución. No hay crecimiento en los subcultivos ni a las 24 h, ni a los 7 días. Los controles de viabilidad fueron positivos para todos los microorganismos.

TEST PARA LA DESINFECCIÓN HIGIÉNICA DE LAS MANOS

El test para la desinfección higiénica de las manos se realizó utilizando la dilución 1/2 del extracto hidroalcohólico de cuproclorofilinas (1.4%). Para todos los test se realizaron más de ochenta ensayos con cada microorganismo.

Se hizo el recuento de colonias por placa inoculada y tinción de Gram a todas las colonias típicas, así como pruebas de verificación, según el

microorganismo de ensayo. Las colonias contaminantes fueron en todos los casos de *Staphylococcus epidermidis*, considerado flora epidérmica normal. Siguiendo las recomendaciones estrictas de las normas, estas colonias se tienen en cuenta para calcular el porcentaje de efectividad de la solución en estudio (Tabla XI).

Los resultados demuestran la utilidad práctica del extracto en la desinfección higiénica de las manos en un tiempo de 5 min, con una efectividad mayor del 94% para los microorganismos ensayados.

Tabla XI. Resultados del test de desinfección higiénica de las manos con el extracto hidroalcohólico de cuproclorofilinas.

Microorganismo	N° ensayos	N° de colonias por placa					% Efectividad
		0	1-10	11-50	51-100	101-	
<i>S. aureus</i>	86	59	22	5*	-	-	94.18
<i>E. coli</i>	80	63	17	-	-	-	100
<i>P. aeruginosa</i>	82	54	24	4*	-	-	95.12

TEST PARA LA DESINFECCIÓN QUIRÚRGICA DE LAS MANOS

Los resultados de este test demuestran la utilidad práctica del extracto en la desinfección quirúrgica de las manos, con una efectividad mayor del 98% a los 5 min de exposición para los microorganismos de ensayo (Tabla XII).

Tabla XII. Resultados del test de desinfección quirúrgica de las manos realizado con el extracto hidroalcohólico de cuproclorofilinas.

Microorganismo	N° ensayos	N° de colonias por placa					% Efectividad
		0	1-10	11-50	51-100	101-	
<i>S. aureus</i>	86	78	7	1	-	-	98.8
<i>E. coli</i>	85	84	1	-	-	-	100
<i>P. aeruginosa</i>	72	69	3	-	-	-	100

Tabla XIII. Resultados del test de desinfección de la piel sana realizado con extracto hidroalcohólico de cuproclorofilinas.

Microorganismo	Nº ensayos	Nº de colonias por placa					% Efectividad
		0	1-10	11-50	51-100	101-	
<i>S. aureus</i>	90	78	12	-	-	-	100
<i>E. coli</i>	90	64	26	-	-	-	100
<i>P. aeruginosa</i>	70	66	4	-	-	-	100

TEST DE DESINFECCIÓN DE LA PIEL SANA

Los resultados de este test demuestran la utilidad práctica del extracto en la desinfección de la piel sana, con un 100% de efectividad, en un tiempo de acción de 5 min para los tres microorganismos ensayados (Tabla XIII).

TEST DE DESINFECCIÓN DE SUPERFICIES

En ningún caso se detectó crecimiento en los subcultivos de los diferentes objetos-test, que fueron restos de material quirúrgico previamente contaminados con suspensiones de los microorganismos de ensayo; por lo que se verifica la utilidad práctica del extracto en la desinfección de superficies, garantizando un 100% de muerte tras 1 minuto de exposición.

De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos microbiológicos y los ensayos preclínicos *in vivo* (desinfección higiénica y quirúrgica de las manos, desinfección de la piel sana), se verifica la utilidad práctica del extracto hidroalcohólico de *C. vulgaris* como desinfectante y antiséptico.

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO, LA IRRADIANCIA ESPECTRAL Y LA LONGITUD DE ONDA SOBRE CÉLULAS EN CULTIVO DE *Dunaliella salina* A ESCALA DE LABORATORIO

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se hizo un diseño multifactorial para ensayar la influencia espectral de la radiación, a tres niveles de irradiancia (I) y diferentes concentraciones de nitrógeno, en cultivos de la microalga *Dunaliella salina*.

Se ensayó la influencia de la luz día, azul, verde, roja y del rojo lejano. La instalación se hizo con tres lámparas fluorescentes luz día SYLVANIA Standart F18/154-T8 Daylight GER para la luz día; tres lámparas F18/Blue NDL K 2M, para el azul; tres lámparas F18/Green NDL K 5F, para el verde y tres lámparas F18/Red NDL K 3A, para el rojo; el rojo lejano se logró mediante dos lámparas incandescentes lineales de opalina SYLVANIA/LINENLAMPE 35W/230V/Z7, S14S y tres lámparas fluorescentes luz día SYLVANIA Standart F18/154-T8 Daylight GER, dispuestas de forma alterna. Las curvas de distribución de la potencia espectral de cada una de ellas se presentan en la Figura 11.

Para cada intervalo de longitudes de onda se establecen tres series de cultivos con las irradiancias 35, 75 y 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La intensidad de la luz se ajustó y se verificó durante el curso de los experimentos, mediante un fotómetro SPER SCIENTIFIC con un fotosensor de silicona, en el punto medio de la base de cada recipiente de cultivo. Las conversiones de lux (lx) a $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se hicieron según el factor de conversión de Ginsburg (Ginzburg, 1987).

En cada una de las tres series se establecen las concentraciones de nitrato: 0, 0.5, 2.5, 5 y 7.5 mM, utilizando NaNO_3 como fuente de nitrógeno. La concentración del resto de los componentes del medio no se varió en

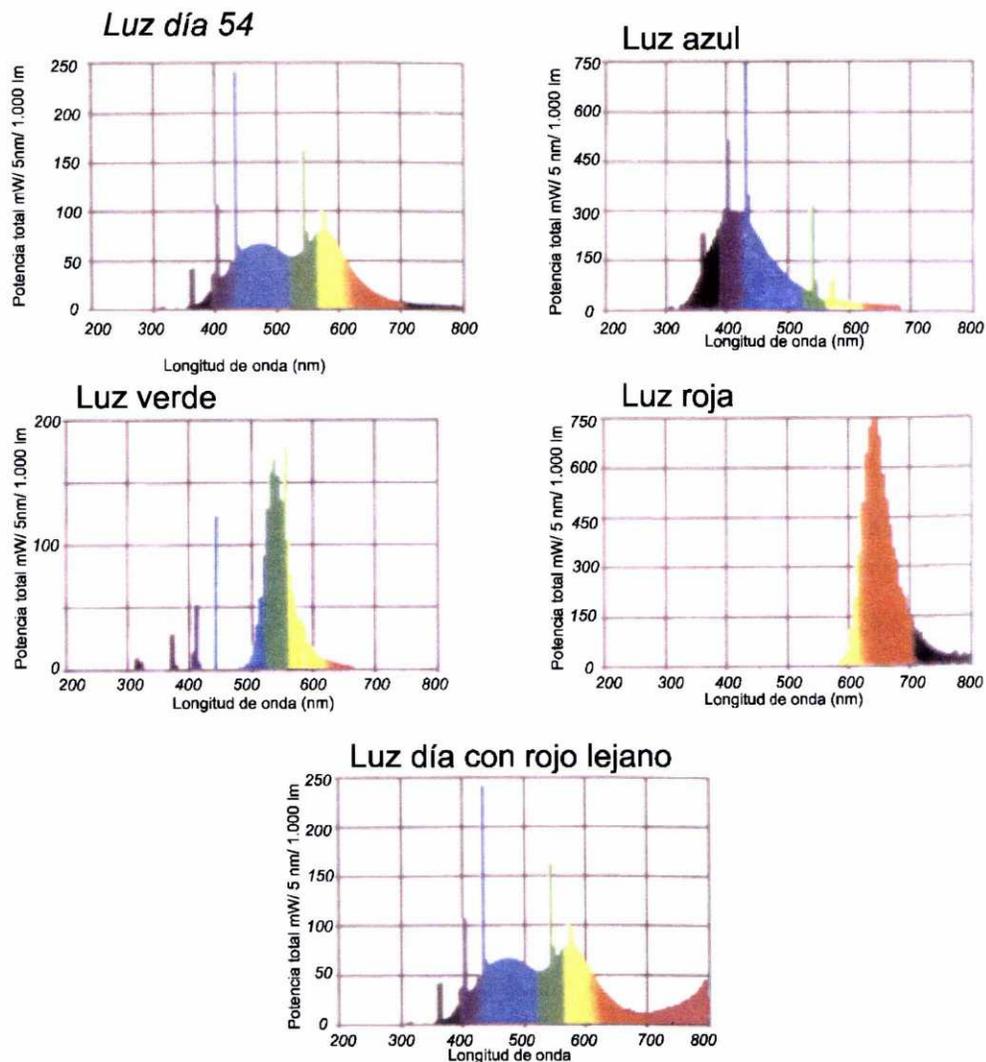


Figura 11. Distribución de la potencia espectral de las fuentes de luz utilizadas en los diferentes ensayos.

ningún ensayo. En total se realizaron 75 experiencias; éstas se llevaron a cabo por triplicado.

Los inóculos se prepararon a partir de un cultivo stock en fase exponencial, con una concentración de nitrato de 5 mM. Previamente, los cultivos fueron aclimatados a las condiciones de irradiancia espectral espe-

cificas de cada ensayo. Aunque la aclimatación a la sombra o a la luz requiere de uno a tres días (Darley, 1987), en todos los experimentos la aclimatación se realizó durante siete días para garantizar que el inóculo fuera recogido en la fase exponencial del crecimiento, minimizando así el contenido de nitrógeno residual.

Una vez fotoaclimatados los cultivos, las células fueron recogidas por centrifugación, lavadas con solución salina al 8% estéril y resuspendidas en medio BAM (Ben-Amotz modificado) sin nitrato, para utilizarlas como inóculo.

Los cultivos se realizan en botellas de 500 ml, con un volumen de 250 ml de medio, preparándose con las concentraciones de nitrato a ensayar. La densidad inicial en todos los casos fue de 25×10^4 cél. ml⁻¹. Los cultivos se mantienen aireados en una cámara de cultivo con temperatura controlada a $18 \pm 2^\circ\text{C}$, bajo régimen de luz continua durante toda la experiencia. El desarrollo de los cultivos se siguió hasta que aquellos con una concentración de nitrato de 5 mM alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento.

Las determinaciones de la densidad celular de cada cultivo y el análisis espectrofotométrico de pigmentos se realizaron en días alternos. La toma de muestras se realiza durante las primeras horas de la mañana.

RESULTADOS

CRECIMIENTO

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRATO

A partir de las curvas de crecimiento de los diferentes cultivos se hace el ajuste teórico de las cinéticas de crecimiento a la ecuación logística, calculando a partir de ésta la capacidad de carga de los cultivos y los coeficientes de regresión del ajuste a la ecuación (r^2) (Tabla XIV). En la Figura 12 se presenta el comportamiento de la capacidad de carga (K) con la

Tabla XIV. Valores medios del parámetro de la función logística K, y de r^2 a las diferentes concentraciones de nitrato y niveles de irradiancia, para cada intervalo de longitudes de onda ensayado. K: capacidad de carga de los cultivos; r^2 : coeficiente de regresión del ajuste a la función logística.

	35 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$		75 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$		150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$		K_{media}
LUZ DÍA							
Conc. nitrato	K	r^2	K	r^2	K	r^2	
0	47± 2.10	0.798	49± 1.31	0.801	49± 1.53	0.891	48± 1.15
0.5	67± 4.20	0.765	69± 5.02	0.960	119± 6.71	0.987	85± 29.5
2.5	121± 8.20	0.923	184± 7.90	0.976	238± 6.81	0.981	181± 58.5
5	150± 9.30	0.961	195± 6.64	0.991	256± 14.0	0.995	200± 53.2
7.5	154± 11.0	0.951	197± 7.36	0.991	247± 8.10	0.992	199± 46.5
K_{media}	108± 49		139± 73		182± 93		136± 72
LUZ AZUL							
Conc. nitrato	K	r^2	K	r^2	K	r^2	
0	45± 1.82	0.770	47± 2.60	0.879	48± 1.52	0.911	47± 1.52
0.5	57± 3.91	0.824	69± 10	0.888	78± 3.46	0.961	68± 10.53
2.5	78± 2.83	0.946	140± 12	0.991	179± 7.00	0.993	132± 51
5	89± 2.64	0.904	155± 12	0.989	215± 10.0	0.992	153± 63
7.5	71± 9.35	0.912	141± 10	0.986	213± 11.1	0.987	141± 71
K_{media}	68± 17		110± 49		147± 78		103± 60
LUZ VERDE							
Conc. nitrato	K	r^2	K	r^2	K	r^2	
0	36± 1.34	0.880	48± 1.00	0.964	62± 1.52	0.912	49± 13.02
0.5	43± 0.50	0.997	57± 2.03	0.958	70± 3.46	0.955	57± 13.52
2.5	64± 1.24	0.999	117± 4.06	0.994	129± 7.00	0.985	103± 35
5	68± 3.63	0.976	136± 8.91	0.995	156± 10.0	0.996	120± 46
7.5	74± 5.92	0.964	136± 11.0	0.996	170± 11.0	0.983	126± 49
K_{media}	57± 17		99± 43		117± 49		88± 45
LUZ ROJA							
Conc. nitrato	K	r^2	K	r^2	K	r^2	
0	33± 3.11	0.710	75± 1.91	0.974	80± 1.20	0.993	63± 26
0.5	38± 1.95	0.950	104± 3.50	0.989	120± 1.43	0.993	87± 43
2.5	46± 1.92	0.980	121± 5.67	0.987	162± 4.84	0.966	110± 59
5	54± 7.51	0.987	137± 5.84	0.985	186± 18.0	0.978	125± 67
7.5	59± 1.00	0.995	138± 6.72	0.987	193± 5.07	0.996	130± 67
K_{media}	46± 11		115± 26		148± 48		99± 53
LUZ DÍA CON ROJO LEJANO							
Conc. nitrato	K	r^2	K	r^2	K	r^2	
0	25± 1.41	0.504	70± 3.00	0.917	60± 4.32	0.927	52± 24
0.5	39± 2.21	0.763	91± 4.31	0.973	87± 1.40	0.980	72± 29
2.5	100± 7.00	0.910	115± 8.00	0.927	192± 4.91	0.994	136± 49
5	123± 6.02	0.953	174± 19.0	0.985	221± 7.75	0.990	172± 49
7.5	125± 6.00	0.954	170± 9.00	0.992	226± 8.64	0.984	173± 51
K_{media}	82± 47.0		124± 47		157± 78		116± 63
$K_{\text{media total}}$	72± 37		117± 48		150± 69		

irradiancia espectral y la concentración de nitrato, para cada intervalo de longitudes de onda ensayado.

El crecimiento varía en función de la concentración de la fuente de nitrógeno. El inóculo procede de un cultivo con una concentración de nitrato de 5 mM, por lo que los cultivos que crecen con una concentración mayor que 2.5 mM entran inmediatamente en crecimiento exponencial; los cultivos sin nitrato o con una concentración de nitrato baja (0.5 mM) tienen una fase de adaptación larga y alcanzan valores de densidad celular inferiores a los que se obtienen en los cultivos con 2.5, 5 y 7.5 mM de nitrato (Fig. 13-17). Por lo general, las cinéticas de crecimiento de los cultivos sin nitrato no se ajustan a una función logística, lo que se deduce a partir de los valores de los coeficientes de regresión del ajuste a la ecuación (r^2), que en los cultivos con luz día a $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 5 mM de nitrato, es de 0.991, frente a 0.801 en las mismas condiciones pero sin nitrato (Tabla XIV). En los cultivos con 0.5 mM, aunque los valores de r^2 se acercan más a 1, de forma general, las cinéticas de crecimiento no se ajustan a la función logística; mientras que en la mayoría de los ensayos, las cinéticas de crecimiento de los cultivos que crecen a 2.5, 5 y 7.5 mM, sí se ajustan a dicha función. Este comportamiento se mantiene para la mayoría de las longitudes de onda y los niveles de irradiancia espectral ensayados.

La concentración de nitrógeno afecta la capacidad de carga (K) de los cultivos (Tabla XIV), existiendo una fuerte correlación entre ambos. La K aumenta proporcionalmente con la concentración de nitrato hasta la concentración 5 mM; sin embargo, no se detectan diferencias significativas entre los valores alcanzados a 5 y 7.5 mM, mientras que sí se detectan entre los valores obtenidos a 0 y 0.5 mM entre sí, y respecto a 2.5, 5 y 7.5 mM, y entre 2.5 mM y las concentraciones 5 y 7.5 mM de nitrato.

En los cultivos con luz día a $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, los valores varían desde 49 ± 1.31 en ausencia de nitrato hasta 197 ± 7.36 a 7.5 mM. Si se comparan las medias obtenidas, independientemente de la irradiancia espectral, para

Tabla XV. Variación de las tasas de crecimiento μ (divisiones día⁻¹) con la concentración de nitrato, a diferentes longitudes de onda y niveles de irradiancia espectral.

LUZ DÍA				
Conc. nitrato	35 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	75 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	μ_{media}
0	0.117± 0.02	0.127± 0.09	0.163± 0.02	0.136± 0.02
0.5	0.191± 0.01	0.183± 0.12	0.234± 0.00	0.203± 0.03
2.5	0.183± 0.05	0.231± 0.02	0.360± 0.05	0.258± 0.09
5	0.195± 0.10	0.309± 0.01	0.366± 0.02	0.290± 0.09
7.5	0.186± 0.00	0.305± 0.05	0.349± 0.09	0.280± 0.08
μ_{media}	0.174± 0.03	0.231± 0.08	0.294± 0.09	0.224± 0.08

LUZ AZUL				
Conc. nitrato	35 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	75 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	μ_{media}
0	0.119± 0.01	0.174± 0.08	0.231± 0.00	0.175± 0.06
0.5	0.143± 0.15	0.196± 0.12	0.244± 0.00	0.194± 0.05
2.5	0.154± 0.02	0.210± 0.00	0.265± 0.15	0.210± 0.06
5	0.187± 0.13	0.272± 0.00	0.326± 0.03	0.262± 0.07
7.5	0.190± 0.02	0.289± 0.03	0.339± 0.01	0.273± 0.08
μ_{media}	0.159± 0.03	0.228± 0.05	0.281± 0.05	0.220± 0.07

LUZ VERDE				
Conc. nitrato	35 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	75 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	μ_{media}
0	0.152± 0.02	0.168± 0.00	0.215± 0.12	0.178± 0.03
0.5	0.151± 0.01	0.179± 0.00	0.230± 0.00	0.187± 0.04
2.5	0.181± 0.05	0.214± 0.00	0.221± 0.02	0.205± 0.02
5	0.183± 0.10	0.225± 0.09	0.238± 0.03	0.215± 0.03
7.5	0.191± 0.00	0.236± 0.04	0.253± 0.00	0.227± 0.03
μ_{media}	0.171± 0.02	0.204± 0.03	0.231± 0.01	0.201± 0.03

LUZ ROJA				
Conc. nitrato	35 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	75 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	μ_{media}
0	0.100± 0.01	0.107± 0.19	0.211± 0.02	0.139± 0.06
0.5	0.111± 0.01	0.132± 0.10	0.230± 0.00	0.158± 0.06
2.5	0.140± 0.15	0.169± 0.02	0.260± 0.00	0.190± 0.06
5	0.140± 0.00	0.178± 0.01	0.261± 0.09	0.193± 0.06
7.5	0.148± 0.05	0.178± 0.01	0.277± 0.02	0.201± 0.07
μ_{media}	0.127± 0.02	0.152± 0.03	0.247± 0.02	0.170± 0.06

LUZ DÍA CON ROJO LEJANO				
Conc. nitrato	35 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	75 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	μ_{media}
0	0.185± 0.00	0.186± 0.04	0.226± 0.01	0.199± 0.02
0.5	0.190± 0.00	0.297± 0.16	0.321± 0.00	0.269± 0.07
2.5	0.212± 0.00	0.410± 0.02	0.408± 0.02	0.343± 0.11
5	0.244± 0.01	0.477± 0.00	0.468± 0.00	0.396± 0.13
7.5	0.231± 0.11	0.487± 0.00	0.553± 0.05	0.424± 0.17
μ_{media}	0.212± 0.03	0.371± 0.13	0.395± 0.13	0.321± 0.13

cada concentración de nitrato a las longitudes de onda ensayadas, las variaciones de la K con la concentración de nitrato son: de 48 ± 1.15 a 199 ± 46.5 , en luz día; de 47 ± 1.52 a 141 ± 71 , en luz azul; de 49 ± 13.02 a 126 ± 49 , en luz verde; de 63 ± 26 a 130 ± 67 en luz roja, y de 52 ± 24 a 173 ± 51 en luz día con rojo lejano (Tabla XIV).

La concentración de nitrato afecta, además, a la tasa de crecimiento de los cultivos de forma significativa, existiendo correlación entre ambos para la mayoría de los ensayos (Tabla XV). Durante el crecimiento exponencial, los cultivos con una concentración de nitrato mayor o igual a 2.5 mM, crecen con tasas significativamente superiores respecto a los establecidos a 0 y 0.5 mM de nitrato; existen, además, diferencias significativas entre las tasas alcanzadas a 2.5 mM respecto a 5 y 7.5 mM, y entre 0 y 0.5 mM entre sí (Tabla XV). Por lo que, de forma general, la μ sigue el mismo comportamiento que la K . En luz día a $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, los valores de μ varían desde 0.127 ± 0.09 (divisiones día⁻¹) en ausencia de nitrato, hasta 0.305 ± 0.05 div. día⁻¹ a 7.5 mM; mientras que a 0.5 y 2.5 mM se obtienen valores de 0.183 ± 0.12 y 0.231 ± 0.02 div. día⁻¹, respectivamente (Tabla XV).

Teniendo en cuenta el comportamiento de las células en cultivo a las diferentes concentraciones de nitrato ensayadas, puede hablarse de cultivos con una inhibición total del crecimiento por ausencia de la fuente de nitrógeno; cultivos con una inhibición parcial del crecimiento por tener a una concentración de nitrato limitante, y cultivos con un crecimiento más o menos favorecido por concentraciones de nitrato aceptables o idóneas. Asimismo, las concentraciones 5 y 7.5 mM tienen efectos similares sobre el crecimiento de las células en cultivo de *D. salina*.

EFFECTO DE LA INTENSIDAD DE LUZ

El crecimiento difiere también en función de la irradiancia espectral. Los valores de K y μ obtenidos con las tres irradiancias ensayadas difieren significativamente entre sí. De forma general, un aumento de la irradiancia

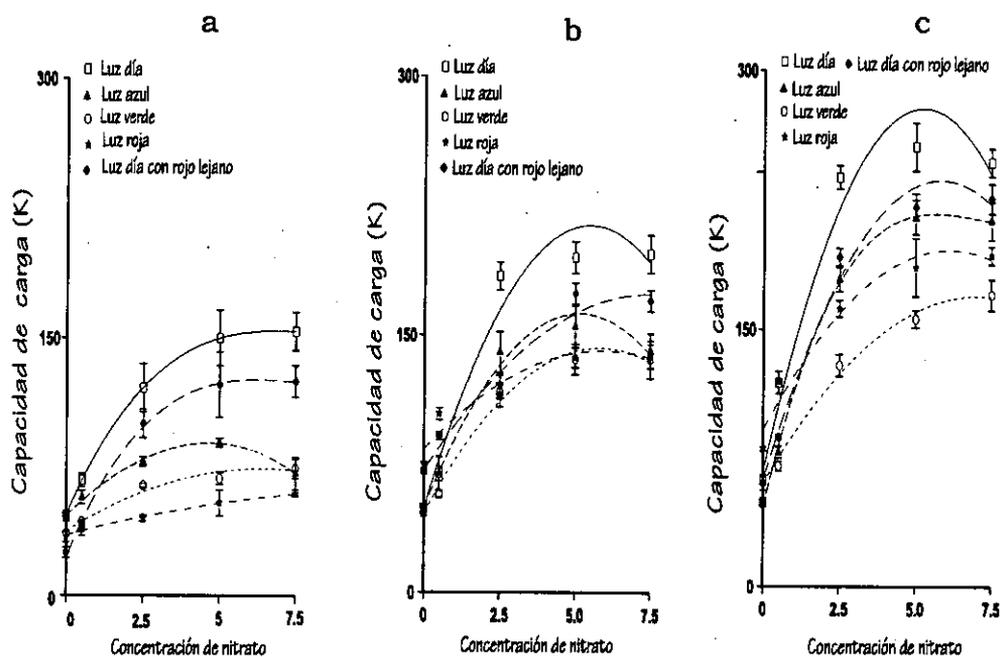


Figura 12. Comportamiento de la capacidad de carga (K) de los cultivos de *Dunaliella salina* en función de la concentración de nitrato, la longitud de onda y la irradiancia espectral a) 35 b) 75 y c) 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

hasta 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ favorece el crecimiento de los cultivos, existiendo una alta correlación entre este factor y los dos parámetros del crecimiento estudiados. Por otra parte, las cinéticas de crecimiento de los cultivos con 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ tienen un mejor ajuste a la función logística que los de 75 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; éstos a su vez, tienen valores de r^2 más próximos a 1 que los cultivos con 35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tabla XIV, Fig. 12).

En condiciones de luz día, los valores medios de K obtenidos varían independientemente de la concentración de nitrato, desde 108 ± 49 hasta 182 ± 93 , cuando la irradiancia aumenta desde 35 hasta 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Para el resto de las longitudes de onda los valores varían desde 68 ± 17 hasta 147 ± 78 en luz azul; desde 57 ± 17 hasta 117 ± 49 en luz verde; desde 46 ± 11 hasta 148 ± 48 en luz roja, y desde 72 ± 37 hasta 150 ± 69 en luz día con rojo lejano (Tabla XIV).

EFECTO DE LA LONGITUD DE ONDA

La longitud de onda afecta significativamente la capacidad de carga de los cultivos, existiendo diferencias significativas entre la luz día ($K_{media} = 136 \pm 72$), donde se obtienen los máximos valores de este parámetro, y el resto de las longitudes de onda ensayadas; y entre los valores obtenidos en los cultivos con luz día más el componente rojo lejano ($K_{media} = 116 \pm 63$), y los que se obtienen en luz verde ($K_{media} = 88 \pm 45$) y luz roja ($K_{media} = 99 \pm 53$) (Tabla XIV). Los mayores valores de K se alcanzan en luz día, seguido por la luz día enriquecida con rojo lejano, la luz azul, roja y verde (DL > FR > BL > RL > GL) (Tabla XIV; Fig. 12).

Respecto a la tasa de crecimiento, existen diferencias significativas entre los valores que se alcanzan en luz día enriquecida con rojo lejano ($\mu_{media} = 0.321 \pm 0.13$ div. día⁻¹) y el resto de las longitudes de onda, detectándose los mínimos valores en condiciones de luz roja ($\mu_{media} = 0.170 \pm 0.06$ div. día⁻¹), éstos son a su vez, significativamente diferentes de los valores que se obtienen en el resto de los ensayos. Además, se detectan diferencias significativas entre los valores de μ que se alcanzan en luz día ($\mu_{media} = 0.224 \pm 0.08$ div. día⁻¹) y los cultivos con luz verde ($\mu_{media} = 0.201 \pm 0.03$ div. día⁻¹). Las mayores tasas de crecimiento se alcanzan en luz día enriquecida con rojo lejano, seguido por la luz día, la luz azul, la luz verde y la luz roja (FR > DL > BL > GL > RL) (Tabla XIV).

De forma general, los mayores valores de los parámetros del crecimiento estudiados se alcanzan a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, en los cultivos con 5 ó 7.5 mM de nitrato en condiciones de luz día.

Por otra parte, desde el punto de vista estadístico, existe interacción entre la longitud de onda y la concentración de nitrato, así como entre la irradiancia espectral y la concentración de nitrato ($P = 0.001$; $P = 0.07$), tanto para la K ($P = 0.07$) como para la μ ($P < 0.01$); mientras que la interacción entre la irradiancia y la longitud de onda sólo se manifiesta para la μ ($P = 0.001$). Sin

embargo, no hay interacción entre los tres factores analizados para ninguno de los parámetros del crecimiento.

Si se hace el análisis del efecto de los diferentes factores ensayados para cada longitud de onda se observa que, aunque existe un comportamiento general, hay particularidades para cada intervalo del espectro visible.

Luz día

La concentración de nitrato afecta por igual la capacidad de carga y las tasas de crecimiento en luz día. Existen diferencias significativas entre los cultivos con 0 y 0.5 mM entre sí, y respecto a los que tienen una concentración de nitrato mayor o igual a 2.5 mM (Tabla XIV-XV). Respecto a la irradiancia espectral, los valores de K que se alcanzan con 35 y 75 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, son significativamente menores que los alcanzados con 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Mientras que los valores de las tasas de crecimiento que se alcanzan a los tres niveles de irradiancia espectral difieren significativamente entre sí (Tabla XIV-XV).

Los cultivos con 0 y 0.5 mM entran en fase estacionaria entre el sexto y octavo día, obteniéndose en estas condiciones densidades celulares menores o iguales que $100 \times 10^4 \text{ cél. ml}^{-1}$ (Fig. 13). Con el aumento de la irradiancia, aumentan las diferencias en cuanto a densidad celular de los cultivos con la concentración de nitrato. Las máximas densidades celulares se alcanzan a 7.5 mM de nitrato con 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con valores mayores de $225 \times 10^4 \text{ cél. ml}^{-1}$. Sin embargo, no existen grandes diferencias entre los valores que se alcanzan con 2.5, 5 y 7.5 mM.

Luz azul

En condiciones de luz azul las diferencias son significativas entre los valores de K obtenidos en los cultivos con 0 y 0.5 mM de nitrato, respecto a 2.5, 5 y 7.5 mM; mientras que las tasas de crecimiento alcanzadas en los cultivos con 0, 0.5 y 2.5 mM, difieren significativamente de las que se alcanzan a 5

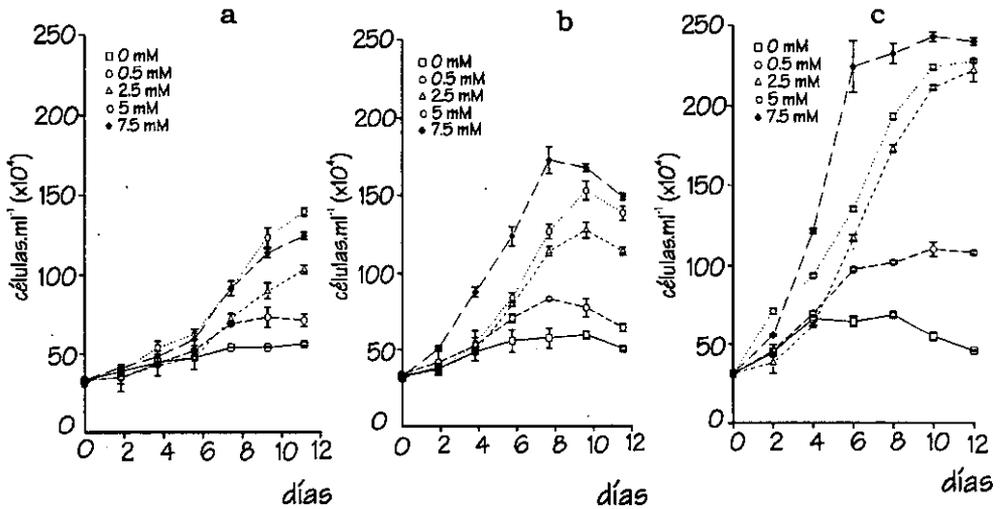


Figura 13. Curvas de crecimiento de los cultivos de *Dunaliella salina* establecidos en condiciones de luz día a las concentraciones de nitrato: 0, 0.5, 2.5, 5 y 7.5 mM, y los niveles de irradiancia espectral a) 35 b) 75 y c) 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

y 7.5 mM. Respecto a la irradiancia espectral, tanto los valores de K como de μ que se alcanzan con las diferentes irradiancias ensayadas difieren significativamente entre sí (Tabla XIV-XV).

Los cultivos con 0 y 0.5 mM de nitrato entran en fase estacionaria entre el cuarto y octavo día, obteniéndose en estas condiciones densidades celulares mínimas ($<100 \times 10^4 \text{ cél. ml}^{-1}$). Los valores de densidad celular que se obtienen a 5 y 7.5 mM son prácticamente idénticos, obteniéndose con estas concentraciones los máximos valores ($200 \times 10^4 \text{ cél. ml}^{-1}$) (Fig. 14). Con el aumento de la irradiancia se hace más evidente el efecto de la ausencia y el déficit de nitrato; sin embargo, se observa muy poca diferencia entre las densidades que se alcanzan con 2.5 mM, respecto a 5 y 7.5 mM.

Luz verde

En luz verde la K y la μ varían con la concentración de nitrato, existiendo diferencias significativas entre los valores obtenidos a 0 y 0.5 mM y el resto de las concentraciones ensayadas, además, entre los cultivos con

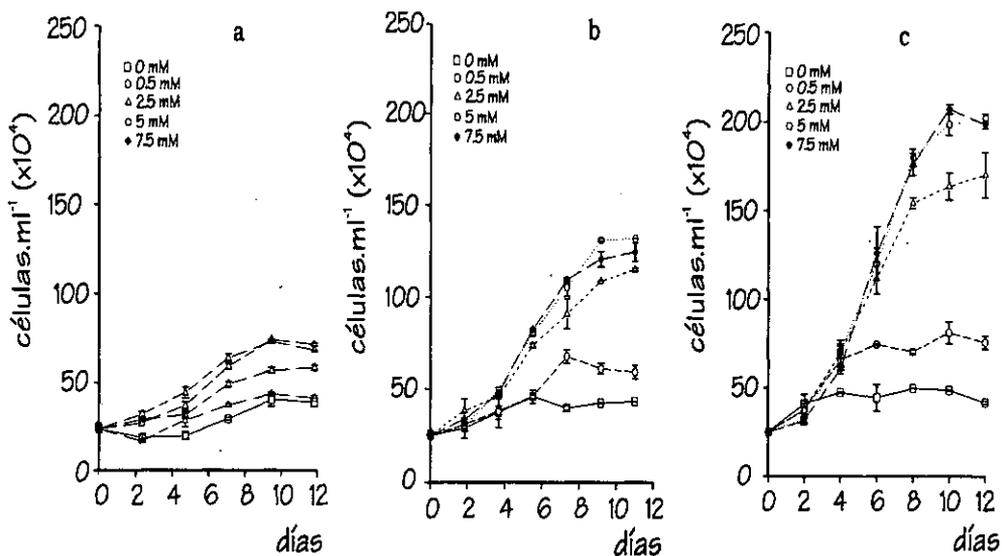


Figura 14. Curvas de crecimiento de los cultivos de *Dunaliella salina* establecidos en condiciones de luz azul a las concentraciones de nitrato: 0, 0.5, 2.5, 5 y 7.5 mM y los niveles de irradiancia espectral a) 35 b) 75 y c) 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.5 y 7.5 mM de nitrato. Respecto a la irradiancia espectral, existen diferencias entre los valores de K y μ alcanzados a los tres niveles ensayados.

Los cultivos con 0 y 0.5 mM entran en fase estacionaria entre el sexto y el octavo día. Las máximas densidades celulares se alcanzan a 7.5 mM en los cultivos con 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con valores alrededor de los 175 $\times 10^4$ cél. ml^{-1} . Asimismo, las densidades celulares alcanzadas a 0 y 0.5 mM son muy bajas (75 $\times 10^4$ cél. ml^{-1}). Con el aumento de la irradiancia aumentan las diferencias en cuanto a densidad celular entre los cultivos con una concentración de nitrato mayor o igual a 2.5 mM.

De forma general en luz verde se alcanzan densidades celulares bajas, respecto al resto de las longitudes de onda (Fig. 15).

Luz roja

En los cultivos establecidos en condiciones de luz roja existen diferencias significativas entre los valores de K que se alcanzan con 0 mM de nitrato,

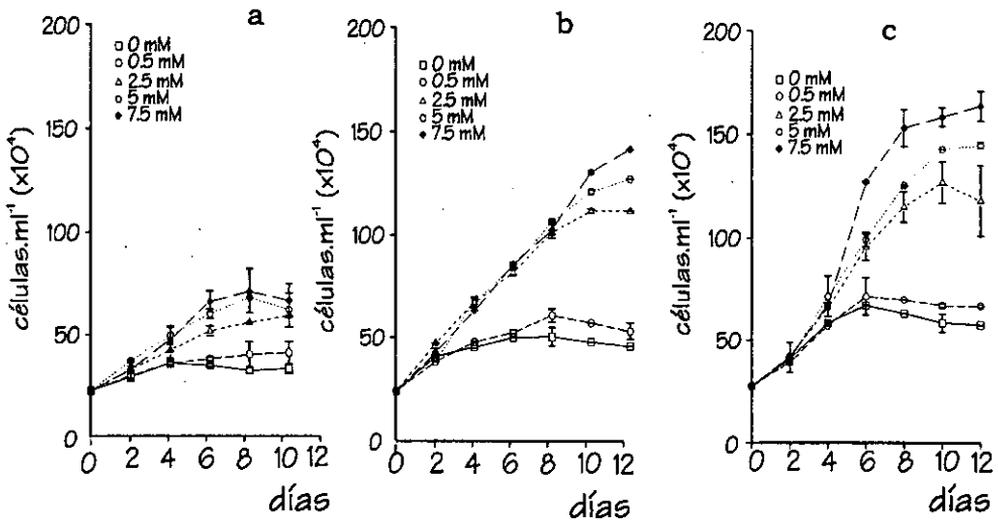


Figura 15. Curvas de crecimiento de los cultivos de *Dunaliella salina* establecidos en condiciones de luz verde a las concentraciones de nitrato: 0, 0.5, 2.5, 5 y 7.5 mM y los niveles de irradiancia espectral a) 35 b) 75 y c) 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

respecto al resto de las concentraciones ensayadas, y entre 0.5 mM, y las concentraciones 5 y 7.5 mM; por otra parte, existen diferencias significativas entre las tasas que se alcanzan a 0 mM, respecto a 2.5, 5 y 7.5 mM, además entre 0.5 mM y 7.5 mM. En relación con la irradiancia espectral existen diferencias significativas entre los valores de K y μ que se alcanzan con las tres irradiancias ensayadas (Tabla XIV-XV).

Los cultivos con 0 y 0.5 mM entran en fase estacionaria a partir del décimo día de cultivo cuando la irradiancia es mayor o igual que 75 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las máximas densidades celulares se alcanzan con 2.5, 5 y 7.5 mM de nitrato en los cultivos con 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (175×10^4 cél. ml^{-1}). En general, a partir de los 2.5 mM se alcanzan prácticamente los mismos valores de densidad celular en estas condiciones de luz (Fig. 16).

Con la menor irradiancia ensayada (35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) se obtienen valores de densidad celular muy bajos (Fig. 16); en estas condiciones la concentración de nitrato no tiene un efecto significativo. A medida que aumenta la irradiancia se hace más evidente el efecto de las bajas concen-

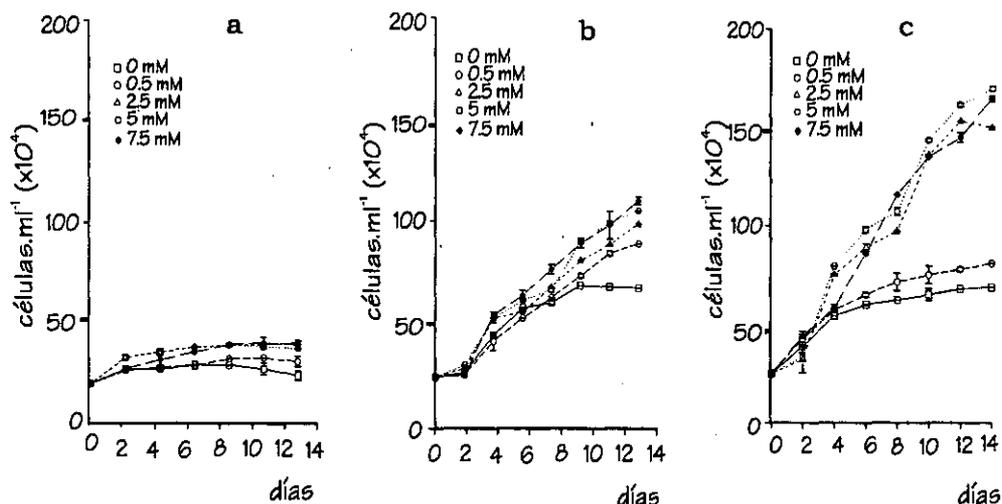


Figura 16. Curvas de crecimiento de los cultivos de *Dunaliella salina* establecidos en condiciones de luz roja a las concentraciones de nitrato: 0, 0.5, 2.5, 5 y 7.5 mM y los niveles de irradiancia espectral a) 35 b) 75 y c) 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

traciones o la ausencia de nitrato sobre la densidad celular de los cultivos; en estas condiciones se obtienen valores mínimos ($< 100 \times 10^4$ cél. ml⁻¹).

Luz día con rojo lejano

En luz día con rojo lejano existen diferencias significativas entre los valores de K obtenidos en los cultivos con 0 y 0.5 mM de nitrato, respecto a 2.5, 5 y 7.5 mM, y entre 2.5 mM, y las concentraciones de nitrato 5 y 7.5 mM. En estas condiciones existen diferencias significativas entre las tasas de crecimiento que se alcanzan en los cultivos con 0 y 0.5 mM de nitrato entre sí, y respecto al resto de las concentraciones ensayadas, además, entre 2.5 mM y 7.5 mM. Respecto a la irradiancia espectral, existen diferencias significativas entre los valores de K que se alcanzan a los tres niveles ensayados; mientras que las tasas alcanzadas a 35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ difieren significativamente del resto.

Los cultivos con 0 y 0.5 mM alcanzan la fase estacionaria entre el sexto y el octavo día; con estas concentraciones se obtienen densidades celulares mínimas, alrededor de 75×10^4 cél. ml⁻¹ (Fig. 17).

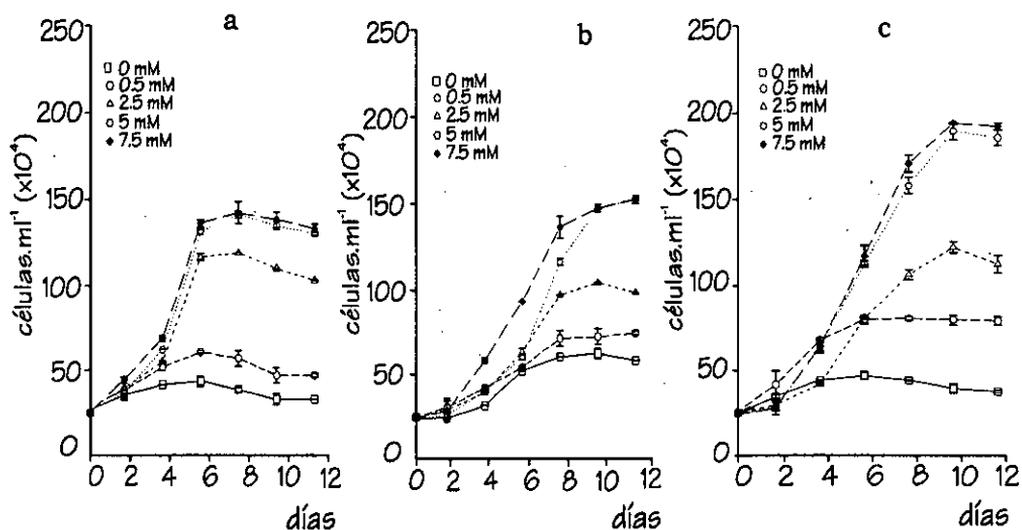


Figura 17. Curvas de crecimiento de los cultivos de *Dunaliella salina* establecidos en condiciones de luz día con rojo lejano a las concentraciones de nitrato: 0, 0.5, 2.5, 5 y 7.5 mM y los niveles de irradiancia espectral a) 35 b) 75 y c) 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

A medida que aumenta la irradiancia se hace más evidente el efecto de las bajas concentraciones o la ausencia de nitrato sobre la densidad celular de los cultivos. Por otra parte, la concentración 2.5 mM comienza a ser limitante para el crecimiento a partir de los $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las máximas densidades celulares se alcanzan indistintamente con 5 y 7.5 mM a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($200 \times 10^4 \text{ cél. ml}^{-1}$).

COMPOSICIÓN CELULAR

PIGMENTOS

Los valores de la concentración de pigmentos (carotenoides y clorofila a) por célula, al inicio de la fase estacionaria, se calculan a partir de los resultados del análisis espectrofotométrico (Tablas XVI-XVII). En cada caso se evaluó la evolución del contenido celular de carotenoides a lo largo del cultivo, para cada concentración de nitrato y nivel de irradiancia ensayados.

Tabla XVI. Concentración celular de carotenoides (Car) al inicio de la fase estacionaria en $\mu\text{g c\acute{e}l.}^{-1}$ a diferentes irradiancias y longitudes de onda en los cultivos de *Dunaliella salina*.

LUZ DIA				
Conc. nitrato	$35\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	$75\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	$150\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	Car _{media}
0	13.96± 0.06	19.26± 0.04	28.32± 0.06	20.51± 7.26
0.5	8.42± 0.16	15.43± 0.03	23.22± 1.31	15.69± 7.40
2.5	2.02± 0.05	5.60± 0.01	6.57± 0.22	4.73± 2.40
5	1.46± 0.00	3.30± 0.04	5.83± 0.11	3.53± 2.19
7.5	1.40± 0.00	3.73± 0.04	4.10± 0.67	3.07± 1.46
Car _{media}	5.45± 5.60	9.46± 7.37	13.61± 11.28	9.71± 8.53
LUZ AZUL				
Conc. nitrato	$35\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	$75\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	$150\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	Car _{media}
0	9.04± 0.92	16.50± 2.10	22.33± 0.06	15.95± 6.66
0.5	3.08± 0.14	13.88± 0.53	21.93± 1.31	12.96± 9.45
2.5	1.97± 0.11	3.08± 0.00	6.80± 0.22	3.95± 2.53
5	1.93± 0.00	1.70± 0.01	4.71± 0.11	2.78± 1.68
7.5	1.87± 0.00	1.65± 0.00	4.12± 0.67	2.55± 1.37
Car _{media}	3.58± 3.09	7.36± 7.23	11.98± 9.32	7.69± 7.43
LUZ VERDE				
Conc. nitrato	$35\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	$75\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	$150\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	Car _{media}
0	6.81± 0.63	21.15± 0.00	23.33± 0.00	17.13± 8.92
0.5	2.02± 1.02	9.83± 0.00	12.16± 2.29	8.00± 5.31
2.5	1.21± 0.55	3.92± 0.00	6.20± 0.70	3.77± 2.50
5	0.99± 1.32	1.92± 0.07	3.64± 0.36	2.18± 1.34
7.5	1.15± 0.05	1.77± 0.00	2.55± 0.22	1.82± 0.70
Car _{media}	2.44± 2.47	7.72± 8.19	9.58± 8.54	6.61± 7.18
LUZ ROJA				
Conc. nitrato	$35\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	$75\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	$150\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	Car _{media}
0	8.21± 0.19	11.61± 1.84	12.37± 2.23	10.73± 2.21
0.5	6.10± 0.21	6.39± 1.55	9.04± 1.85	7.17± 1.62
2.5	4.02± 0.37	4.09± 0.85	5.50± 0.00	4.53± 0.84
5	3.25± 0.00	3.81± 0.19	4.24± 0.26	3.76± 0.50
7.5	3.46± 0.00	3.79± 0.00	4.00± 0.00	3.75± 0.27
Car _{media}	5.00± 2.11	5.93± 3.35	7.03± 3.60	6.02± 2.99
LUZ DIA CON ROJO LEJANO				
Conc. nitrato	$35\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	$75\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	$150\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	Car _{media}
0	18.30± 0.05	24.13± 1.54	32.77± 0.28	25.06± 7.28
0.5	9.52± 0.02	16.38± 10.03	25.00± 0.20	16.97± 7.76
2.5	4.01± 0.02	5.43± 0.00	7.18± 0.12	5.54± 1.59
5	1.86± 0.00	4.14± 0.00	7.08± 0.05	4.36± 2.62
7.5	1.91± 0.04	4.13± 0.00	6.58± 0.02	4.20± 2.34
Car _{media}	7.12± 6.98	10.84± 9.03	15.72± 12.32	11.51± 9.69
Car _{media total}	4.72± 4.41	8.26± 6.89	11.58± 9.22	

CAROTENOIDES

EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRATO

La concentración de nitrato afecta significativamente el contenido celular de carotenoides, existiendo una correlación negativa entre ambos. En general, se alcanzan valores significativamente mayores con 0 y 0.5 mM, respecto al resto de las concentraciones ensayadas (Tabla XVI); se detectan, además, diferencias significativas entre los valores alcanzados en los cultivos sin nitrato, y los que se establecen a 0.5 mM.

En luz día a $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se alcanzan concentraciones de $3.73 \pm 0.04 \text{ pg c\acute{e}l.}^{-1}$ a 7.5 mM, mientras que en ausencia de nitrato se obtienen concentraciones celulares de carotenoides hasta de $19.26 \pm 0.04 \text{ pg c\acute{e}l.}^{-1}$; a 0.5 mM se obtienen concentraciones de $15.43 \pm 0.03 \text{ pg c\acute{e}l.}^{-1}$ (Tabla XVI).

El efecto de la concentración de nitrato sobre la composición celular de carotenoides tiene un comportamiento similar para los diferentes ensayos realizados. En luz día la variación de la concentración celular de carotenoides con la concentración de nitrato, de 7.5 a 0 mM, fue de 3.07 ± 1.46 a $20.51 \pm 7.26 \text{ pg c\acute{e}l.}^{-1}$; en condiciones de luz azul, de 2.55 ± 1.37 a $15.95 \pm 6.66 \text{ pg c\acute{e}l.}^{-1}$; en luz verde de 1.82 ± 0.70 a $17.13 \pm 8.92 \text{ pg c\acute{e}l.}^{-1}$; en luz roja de 3.75 ± 0.27 a $10.73 \pm 8.92 \text{ pg c\acute{e}l.}^{-1}$; y en luz día enriquecida con rojo lejano, de 4.20 ± 2.34 a $25.06 \pm 7.28 \text{ pg c\acute{e}l.}^{-1}$ (Tabla XVI).

En relación con el tiempo, la variación de la composición celular de carotenoides comienza a ser significativa entre el tercer y quinto día de cultivo, siendo máxima entre el décimo y el duodécimo día. Este efecto puede observarse a simple vista a partir del tercer día, por la coloración anaranjada de los cultivos con 0 y 0.5 mM de nitrato (Fig. 18). De forma general, hay un aumento significativo en la concentración de carotenoides al final de la fase exponencial del crecimiento.



Figura 18. Cultivos de *Dunaliella salina* con $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz día, a 0, 0.5, 2.5, 5 y 7.5 mM de nitrato. Tercer día de cultivo.

EFFECTO DE LA INTENSIDAD DE LUZ

La irradiancia afecta el contenido celular de carotenoides, detectándose diferencias significativas entre los valores que se obtienen a los tres niveles ensayados; Existe, además, una alta correlación entre ambos.

En condiciones de luz día la concentración de carotenoides varía desde 5.45 ± 5.60 hasta $13.61 \pm 9.32 \text{ pg c\acute{e}l.}^{-1}$, cuando la irradiancia aumenta desde 35 hasta $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tabla XVI). Este comportamiento se mantiene en el resto de las longitudes de onda para todas las concentraciones de nitrato ensayadas. En luz azul los valores varían desde 3.58 ± 3.09 hasta $11.98 \pm 9.32 \text{ pg c\acute{e}l.}^{-1}$; en luz verde, desde 2.44 ± 2.47 hasta $9.58 \pm 8.54 \pm 8.54 \text{ pg c\acute{e}l.}^{-1}$; en luz roja, desde 5.00 ± 2.11 hasta $7.03 \pm 3.60 \text{ pg c\acute{e}l.}^{-1}$; y en luz día enriquecida con rojo lejano, varía desde 7.12 ± 6.98 hasta $15.72 \pm 12.32 \text{ pg c\acute{e}l.}^{-1}$ (Tabla XVI).

EFECTO DE LA LONGITUD DE ONDA

De forma general, las mayores concentraciones celulares de carotenoides se obtienen en luz día con rojo lejano ($\text{Car}_{\text{media}} = 11.51 \pm 9.69 \text{ pg c\acute{e}l.}^{-1}$), valores que difieren significativamente de los que se obtienen en luz azul ($\text{Car}_{\text{media}} = 7.69 \pm 7.43 \text{ pg c\acute{e}l.}^{-1}$), luz verde ($\text{Car}_{\text{media}} = 6.61 \pm 7.18 \text{ pg c\acute{e}l.}^{-1}$), y luz roja ($\text{Car}_{\text{media}} = 6.02 \pm 2.29 \text{ pg c\acute{e}l.}^{-1}$). Por otra parte, existen diferencias significativas entre los valores que se alcanzan con luz día ($\text{Car}_{\text{media}} = 9.71 \pm 8.53 \text{ pg c\acute{e}l.}^{-1}$) y los obtenidos con luz verde y luz roja ($\text{FR} > \text{DL} > \text{BL} > \text{GL} > \text{RL}$) (Tabla XVI).

Los mayores valores en cuanto concentración de carotenoides por célula se obtienen normalmente en los cultivos sin nitrato y $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de luz día con rojo lejano. Sin embargo, si se analiza cada intervalo de longitudes de onda, los factores ensayados (concentración de nitrato e irradiancia) no afectan de igual forma este parámetro.

Luz día

En luz día existen diferencias significativas entre las concentraciones celulares de carotenoides alcanzadas a 0 y 0.5 mM entre sí, y respecto al resto de las concentraciones ensayadas. Respecto a la influencia de la irradiancia, existen diferencias significativas entre los valores obtenidos a los tres niveles ensayados (Fig. 19).

A medida que aumenta la irradiancia disminuyen las diferencias entre las concentraciones de carotenoides por célula en los cultivos con 0 y 0.5 mM de nitrato. La acumulación de carotenoides comienza a ser importante al final de la fase exponencial de crecimiento.

Luz azul

En luz azul existen diferencias significativas entre los cultivos establecidos a 0 y 0.5 mM, y las concentraciones 2.5, 5 y 7.5 mM de nitrato. Respecto a la influencia de la irradiancia, existen diferencias significativas

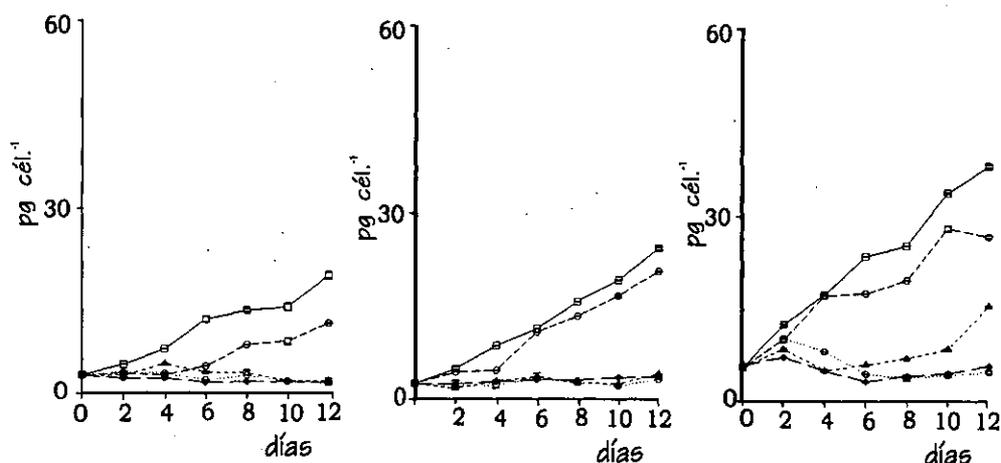


Figura 19. Evolución del contenido celular de carotenoides con el tiempo en los cultivos de *Dunaliella salina* con luz día a las concentraciones de nitrato: 0, 0.5, 2.5, 5 y 7.5 mM, y los niveles de irradiancia espectral a) 35 b) 75 c) 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

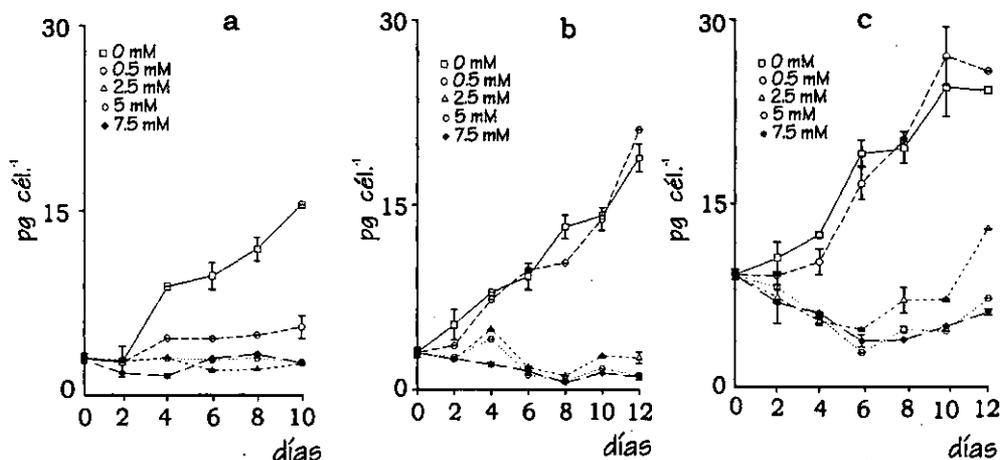


Figura 20. Evolución del contenido celular de carotenoides con el tiempo en los cultivos de *Dunaliella salina* con luz azul a las concentraciones de nitrato: 0, 0.5, 2.5, 5 y 7.5 mM, y los niveles de irradiancia espectral a) 35 b) 75 c) 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

entre los valores obtenidos a los tres niveles ensayados (Fig. 20). Los valores obtenidos con 0 y 0.5 mM de nitrato son prácticamente idénticos a partir de los 75 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Luz verde

En los cultivos con luz verde existen diferencias significativas entre los valores alcanzados a 0 y 0.5 mM de nitrato entre sí, y respecto al resto de

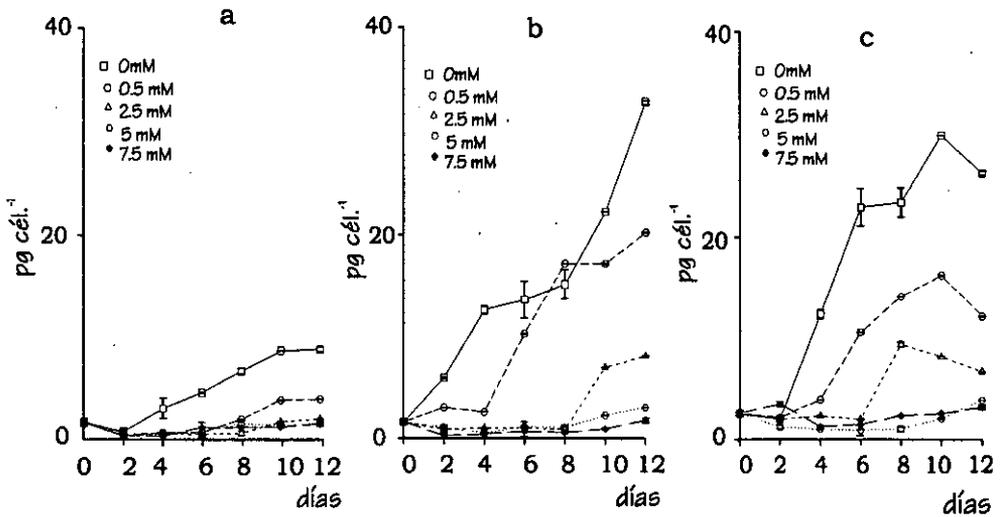


Figura 21. Evolución del contenido celular de carotenoides con el tiempo en los cultivos de *Dunaliella salina* con luz verde a las concentraciones de nitrato: 0, 0.5, 2.5, 5 y 7.5 mM, y los niveles de irradiancia espectral a) 35 b) 75 c) 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

las concentraciones ensayadas. Respecto a la irradiancia, las diferencias se detectan entre 35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y el resto de los niveles ensayados (Fig. 21). Las mayores concentraciones de carotenoides por célula se alcanzan en los cultivos sin nitrato.

Luz roja

En condiciones de luz roja se detectan diferencias significativas entre los cultivos con 0 y 0.5 mM, y las concentraciones 2.5, 5 y 7.5 mM de nitrato; además, entre los valores obtenidos en los cultivos con 2.5 mM, respecto a 5 y 7.5 mM. En relación con la irradiancia, existen diferencias significativas entre los valores alcanzados en el primer y último nivel ensayados (Fig. 22).

En estas condiciones se obtienen las menores concentraciones de carotenoides por célula.

Luz día con rojo lejano

Existen diferencias significativas entre los valores alcanzados a 0 y 0.5 mM de nitrato entre sí, y respecto al resto de las concentraciones

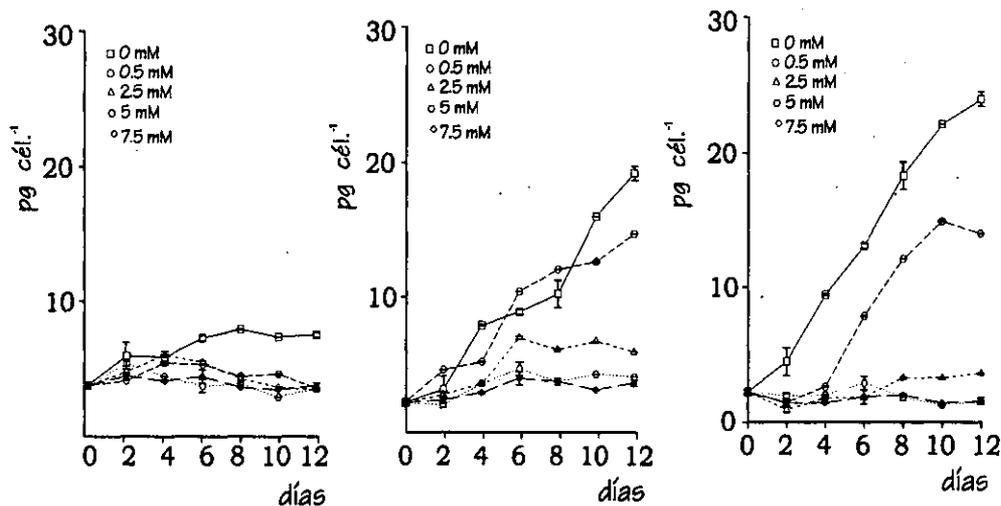


Figura 22. Evolución del contenido celular de carotenoides con el tiempo en los cultivos de *Dunaliella salina* con luz roja a las concentraciones de nitrato: 0, 0.5, 2.5, 5 y 7.5 mM, y los niveles de irradiancia espectral a) 35 b) 75 c) 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

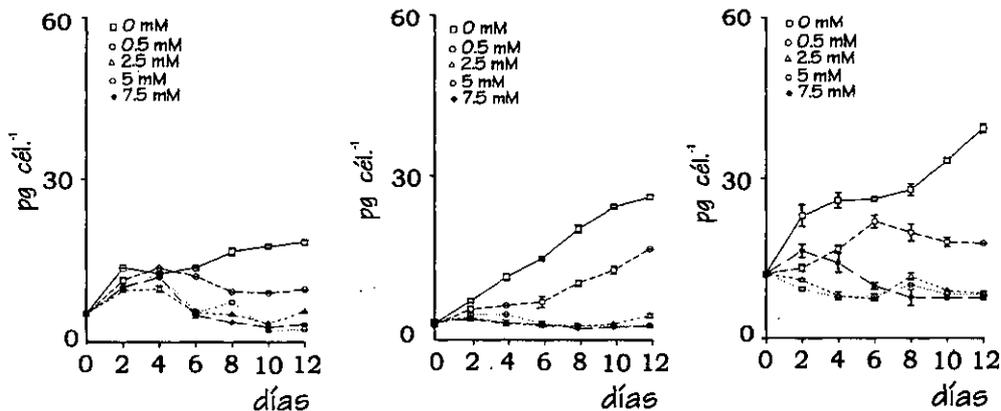


Figura 23. Evolución del contenido celular de carotenoides con el tiempo en los cultivos de *Dunaliella salina* con luz día con rojo lejano a las concentraciones de nitrato: 0, 0.5, 2.5, 5 y 7.5 mM, y los niveles de irradiancia espectral a) 35 b) 75 c) 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

ensayadas. En relación con la irradiancia, existen diferencias significativas entre las concentraciones que se alcanzan a 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y resto de las irradiancias ensayadas. Con esta longitud de onda se alcanza los mayores valores celulares de carotenoides.

CLOROFILAS

EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRATO

La concentración de nitrato afecta la concentración de clorofila a por célula, existiendo una correlación positiva entre ambos (Tabla XVII). De forma general, existen diferencias significativas entre los valores alcanzados en los cultivos con 0 y 0.5 mM entre sí, y respecto a los que tienen una concentración de nitrato mayor o igual a 2.5 mM, y entre los valores alcanzados a 2.5 mM, respecto a 5 y 7.5 mM.

En luz día a $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, los valores medios de la concentración celular de clorofila a varían con la concentración de nitrógeno, desde 0 a 7.5 mM, independientemente del nivel de irradiancia, desde 7.11 ± 2.39 hasta $9.59 \pm 1.02 \text{ pg cél.}^{-1}$; mientras que en luz azul las variaciones son desde 3.89 ± 0.89 hasta $7.27 \pm 3.34 \text{ pg cél.}^{-1}$; en luz verde de 6.51 ± 0.89 a 8.89 ± 1.44 ; en luz roja de 5.05 ± 2.12 a $7.74 \pm 2.64 \text{ pg cél.}^{-1}$; y en luz día con rojo lejano de 3.50 ± 1.83 a $6.94 \pm 2.46 \text{ pg cél.}^{-1}$ (Tabla XVII).

EFECTO DE LA INTENSIDAD DE LUZ

La irradiancia afecta el contenido de clorofila a por célula; se detectan diferencias significativas entre los valores obtenidos a los tres niveles ensayados observándose, de forma general, una alta correlación negativa entre ambos (Tabla XVII).

En los cultivos establecidos en condiciones luz día, el contenido celular de clorofila a varía desde 10.09 ± 0.70 hasta $6.92 \pm 1.77 \text{ pg cél.}^{-1}$, cuando la irradiancia aumenta de 35 a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En luz azul los valores varían desde 8.27 ± 3.21 hasta $3.98 \pm 0.65 \text{ pg cél.}^{-1}$; en luz verde, desde 8.13 ± 0.87 hasta $7.00 \pm 0.89 \text{ pg cél.}^{-1}$; en luz roja, desde 8.51 ± 0.90 hasta $4.26 \pm 0.70 \text{ pg cél.}^{-1}$; y en luz día enriquecida con rojo lejano, desde 6.86 ± 1.70 hasta $3.55 \pm 0.61 \text{ pg cél.}^{-1}$ (Tabla XVII).

Tabla XVII. Concentración celular de clorofila a (Chl) a al inicio de la fase estacionaria en pg cél.⁻¹ a diferentes irradiancias y longitudes de onda en los cultivos de *Dunaliella salina*.

LUZ DIA				
Conc. nitrato	35µmol m ⁻² s ⁻¹	75µmol m ⁻² s ⁻¹	150µmol m ⁻² s ⁻¹	Chl _{media}
0	8.96± 0.00	7.96± 0.00	4.42± 0.04	7.11± 2.39
0.5	10.00± 0.00	8.00± 0.11	5.86± 0.15	7.95± 2.07
2.5	10.15± 0.16	8.53± 0.40	7.34± 0.51	8.67± 1.41
5	10.66± 0.01	8.89± 0.00	8.32± 0.31	9.29± 1.22
7.5	10.68± 0.01	9.45± 0.08	8.65± 0.60	9.59± 1.02
Chl _{media}	10.09± 0.70	8.57± 0.63	6.92± 1.77	8.52± 1.01
LUZ AZUL				
Conc. nitrato	35µmol m ⁻² s ⁻¹	75µmol m ⁻² s ⁻¹	150µmol m ⁻² s ⁻¹	Chl _{media}
0	4.55± 0.00	4.25± 0.25	2.88± 1.04	3.89± 0.89
0.5	5.03± 0.12	4.33± 0.11	3.92± 1.56	4.42± 0.56
2.5	9.90± 0.32	6.03± 0.00	4.51± 0.25	6.81± 2.78
5	11.01± 0.00	6.15± 0.04	4.27± 0.06	7.14± 3.48
7.5	10.88± 0.00	6.64± 0.00	4.30± 0.07	7.27± 3.34
Chl _{media}	8.27± 3.21	5.48± 1.11	3.98± 0.65	6.01± 2.61
LUZ VERDE				
Conc. nitrato	35µmol m ⁻² s ⁻¹	75µmol m ⁻² s ⁻¹	150µmol m ⁻² s ⁻¹	Chl _{media}
0	7.40± 0.87	6.53± 0.00	5.61± 0.02	6.51± 0.89
0.5	7.71± 1.56	8.00± 0.00	7.74± 0.00	7.81± 0.15
2.5	7.76± 2.16	8.87± 1.44	6.70± 0.00	7.78± 1.08
5	8.16± 2.24	9.89± 0.29	7.72± 1.60	8.59± 1.15
7.5	9.60± 1.39	9.84± 0.00	7.23± 0.62	8.89± 1.44
Chl _{media}	8.13± 0.87	8.63± 1.41	7.00± 0.89	8.00± 1.22
LUZ ROJA				
Conc. nitrato	35µmol m ⁻² s ⁻¹	75µmol m ⁻² s ⁻¹	150µmol m ⁻² s ⁻¹	Chl _{media}
0	7.44± 0.23	4.36± 2.86	3.37± 1.58	5.05± 2.12
0.5	8.00± 0.39	5.09± 0.16	3.65± 0.13	5.58± 2.21
2.5	8.25± 0.68	6.29± 0.00	4.69± 0.01	6.41± 1.78
5	9.40± 0.00	8.79± 0.12	4.89± 0.06	7.69± 2.45
7.5	9.50± 0.00	9.03± 0.00	4.71± 0.00	7.74± 2.64
Chl _{media}	8.51± 0.90	6.71± 2.12	4.26± 0.70	6.62± 2.22
LUZ DIA CON ROJO LEJANO				
Conc. nitrato	35µmol m ⁻² s ⁻¹	75µmol m ⁻² s ⁻¹	150µmol m ⁻² s ⁻¹	Chl _{media}
0	5.59± 0.09	2.22± 0.00	2.69± 0.07	3.50± 1.83
0.5	4.84± 0.07	4.00± 0.08	3.19± 0.08	4.01± 0.83
2.5	6.94± 0.16	6.25± 0.65	4.03± 0.04	5.74± 1.52
5	8.29± 0.49	6.62± 0.06	3.73± 0.00	6.21± 2.31
7.5	8.75± 0.14	7.94± 0.12	4.13± 0.00	6.94± 2.46
Chl _{media}	6.86± 1.70	5.40± 2.27	3.55± 0.61	5.37± 2.09
Chl _{media total}	8.13± 2.22	6.95± 2.09	5.14± 1.79	

EFECTO DE LA LONGITUD DE ONDA

La longitud de onda afecta el contenido celular de clorofila a. Las menores concentraciones se obtienen en luz día enriquecida con rojo lejano ($\text{Chl}_{\text{media}} = 5.37 \pm 2.09 \text{ pg c\acute{e}l.}^{-1}$) y en luz azul ($\text{Chl}_{\text{media}} = 6.01 \pm 2.61$); estos valores difieren significativamente entre sí, y respecto a los que se obtienen en luz día ($\text{Chl}_{\text{media}} = 8.52 \pm 1.01$), luz verde ($\text{Chl}_{\text{media}} = 8.00 \pm 1.22$) y luz roja ($\text{Chl}_{\text{media}} = 6.62 \pm 2.22$) (DL > GL > RL > BL > FR). Por otra parte, los valores obtenidos en luz roja son significativamente menores que los que se obtienen en los controles y en luz verde, que a su vez, difieren significativamente entre sí (Tabla XVII).

De forma general, las mayores concentraciones celulares de clorofila a se obtienen con la menor irradiancia ensayada, en los cultivos con 5 y 7.5 mM de nitrato, en luz verde.

Si se hace el análisis para cada intervalo de longitudes de onda, los factotes analizados influyen de forma diferente.

Luz día

En luz día existen diferencias significativas entre las concentraciones celulares de clorofila obtenidas en los cultivos sin nitrato y el resto de las concentraciones ensayadas, y entre 0.5 mM y las concentraciones 5 y 7.5 mM. Respecto a la irradiancia espectral existen diferencias significativas entre las concentraciones alcanzadas a los tres niveles ensayados.

Luz azul

En luz azul las diferencias son significativas entre los cultivos establecidos con 0 y 0.5 mM de nitrato y el resto de las concentraciones ensayadas. Respecto a la irradiancia espectral existen diferencias significativas entre las concentraciones alcanzadas a los tres niveles ensayados.

Luz verde

En luz verde existen diferencias significativas entre los cultivos establecidos a 0 mM y el resto de las concentraciones ensayadas, y entre los cultivos establecidos a 0.5 y 2.5 mM, y las concentraciones 5 y 7.5 mM de nitrato. Respecto a la irradiancia, existen diferencias significativas entre las concentraciones celulares de clorofila a que se alcanzan a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y el resto de los niveles ensayados.

Luz roja

En luz roja las diferencias son significativas entre 0 y 0.5 mM, y los cultivos establecidos a 5 y 7.5 mM. Respecto a la irradiancia espectral existen diferencias significativas entre los valores alcanzados a los tres niveles ensayados.

Luz día con rojo lejano

En estas condiciones las diferencias son significativas entre los cultivos con 0 y 0.5 mM de nitrato, y el resto de las concentraciones ensayadas. Respecto a la irradiancia espectral, existen diferencias significativas entre los valores alcanzados a los tres niveles ensayados.

RELACIÓN CLOROFILA A: CAROTENOS

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRATO

La relación clorofila a: carotenos decrece con el tiempo en los cultivos con 0 y 0.5 mM de nitrato, mientras que en el resto de las concentraciones aumenta hasta el cuarto o sexto día, y luego se mantiene relativamente constante. Los valores de esta relación al comienzo de la fase estacionaria aumentan con la concentración de nitrato (Fig. 24), existiendo diferencias significativas entre los valores obtenidos en los cultivos con 0 y 0.5 mM de nitrato, respecto a 2.5, 5 y 7.5 mM; además, se detectan diferencias signifi-

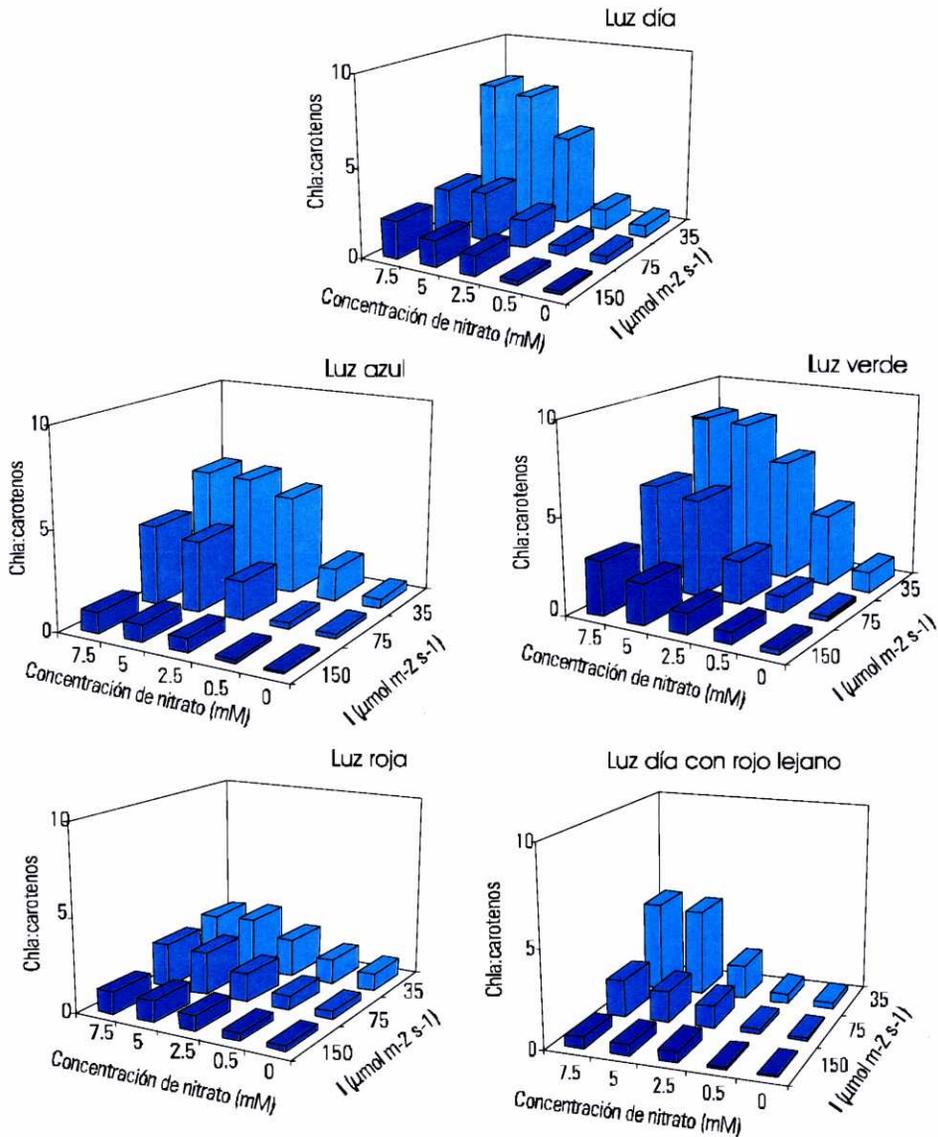


Figura 24. Relación clorofila a: carotenos al inicio de la fase estacionaria, en función de la concentración de nitrato y la irradiancia espectral para cada intervalo de longitudes de onda ensayado.

cativas entre los cultivos con 2.5 mM, respecto a 5 y 7.5 mM. En los cultivos con luz día a $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la relación aumenta con la concentración de nitrato desde 0.41 (0 mM) hasta 2.53 (7.5 mM).

Si se analiza individualmente la influencia la concentración de nitrato para cada intervalo de longitudes de onda, se observa en luz día, las diferencias son significativas entre los valores obtenidos en los cultivos con 0 y 0.5 mM de nitrato, respecto al resto concentraciones ensayadas, y entre 2.5 y 7.5 mM. Mientras que en luz azul las diferencias son significativas entre 0 y 0.5 mM y el resto de las concentraciones; este comportamiento se mantiene en luz verde, luz roja y luz día con rojo lejano, detectándose, además, diferencias significativas entre los cultivos establecidos a 2.5 mM y las concentraciones 5 y 7.5 mM.

EFFECTO DE LA INTENSIDAD DE LUZ

Por otra parte, la relación clorofila a: carotenos disminuye cuando la irradiancia espectral aumenta desde 35 hasta 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para todos los ensayos (Fig. 24), existiendo de forma general, diferencias significativas entre los valores que se obtienen a los tres niveles de irradiancia ensayados. En luz día los valores varían desde 7.63 hasta 2.1 cuando la irradiancia aumenta desde 35 a 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Si se hace el análisis del efecto de la irradiancia en cada intervalo de longitudes de onda, en luz día y la luz día con rojo lejano, existen diferencias significativas entre 35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y el resto de las irradiancias ensayadas; mientras que en luz azul, verde y roja las diferencias son significativas entre los valores alcanzados a los tres niveles ensayados.

EFFECTO DE LA LONGITUD DE ONDA

Respecto a la influencia de la longitud de onda, existen diferencias significativas entre los valores de la relación clorofila a: carotenos obtenidos en luz roja y luz día enriquecida con rojo lejano, respecto al resto de las longitudes de onda; así como entre la luz día y la luz azul, respecto a la luz verde.

Los valores más bajos se obtienen en luz día con rojo lejano (0.08-4.58); y en luz roja (0.4- 2.89); mientras que los valores más altos se alcanzan en condiciones de luz verde (0.24- 8.35) (GL > DL > BL > FR > RL) (Fig. 24).

Desde el punto de vista estadístico, existe interacción entre la concentración de nitrato y la longitud de onda ($P = 0.04$), así como entre ésta y el nivel de irradiancia espectral ($P = 0.000$) para la concentración celular de carotenoides; sin embargo, la interacción entre la irradiancia y la longitud de onda se manifiesta solamente para la concentración celular de clorofila a ($P = 0.02$).

De forma general, los factores analizados afectan significativamente la composición pigmentaria dentro de la radiación fotosintéticamente activa (400-700 nm) y en condiciones de rojo lejano ($\lambda > 700$ nm); sin embargo, no existe interacción entre los tres factores.

CONCENTRACIÓN PROTEICA

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRATO

La concentración de nitrato afecta el contenido proteico por célula (Tabla XVIII), existiendo correlación entre ambos. De forma general, existen diferencias significativas entre los valores alcanzados en los cultivos con 0 y 0.5 mM de nitrato entre sí, y respecto a 2.5, 5 y 7.5 mM, y entre los cultivos con 2.5 mM, y los de 5 y 7.5 mM.

En luz día a $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, el contenido proteico aumenta con la concentración de nitrato desde 11.87 ± 2.22 hasta 18.94 ± 5.46 pg cél.⁻¹. En condiciones de luz azul, las variaciones son desde 11.26 ± 3.07 hasta 21.82 ± 5.49 pg cél.⁻¹; en luz verde, desde 16.84 ± 2.65 hasta 27.41 ± 6.03 pg cél.⁻¹; en luz roja, desde 10.28 ± 3.04 hasta 19.77 ± 4.66 pg cél.⁻¹; y en luz día enriquecida con rojo lejano, desde 7.76 ± 1.81 hasta 14.53 ± 6.05 pg cél.⁻¹ (Tabla XVIII).

Tabla XVIII. Valores de la concentración celular de proteínaa (P) a al inicio de la fase estacionaria en pg cél.⁻¹ a diferentes longitudes de onda y niveles de irradiancia espectral en los cultivos de *Dunaliella salina*.

LUZ DIA				
Conc. nitrato	35 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	75 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	150 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	P _{media}
0	9.32± 0.00	12.97± 0.30	13.33± 0.00	11.87± 2.22
0.5	10.83± 0.09	13.53± 0.00	13.60± 0.03	12.65± 1.58
2.5	12.10± 0.01	15.75± 0.20	16.90± 0.01	14.91± 2.51
5	12.91± 0.09	18.89± 0.00	23.40± 0.00	18.40± 5.26
7.5	13.03± 0.42	20.00± 0.00	23.79± 0.00	18.94± 5.46
P _{media}	11.63± 1.56	16.23± 3.14	18.20± 5.12	15.24± 4.37
LUZ AZUL				
Conc. nitrato	35 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	75 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	150 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	P _{media}
0	7.89± 0.51	12.00± 0.00	13.90± 0.18	11.26± 3.07
0.5	9.25± 1.13	14.30± 0.52	15.37± 0.00	12.97± 3.27
2.5	12.22± 0.54	19.69± 0.81	20.66± 0.51	17.51± 4.63
5	13.38± 0.00	24.76± 1.02	26.46± 0.11	21.53± 7.11
7.5	15.61± 2.97	23.82± 0.00	26.03± 0.00	21.82± 5.49
P _{media}	11.67± 3.12	18.91± 5.65	20.48± 5.83	16.76± 6.12
LUZ VERDE				
Conc. nitrato	35 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	75 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	150 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	P _{media}
0	14.00± 0.00	17.29± 2.70	19.24± 0.00	16.84± 2.65
0.5	15.72± 0.69	22.17± 0.00	23.79± 0.00	20.56± 4.27
2.5	19.86± 0.00	23.10± 0.00	25.94± 0.00	22.97± 3.04
5	22.09± 0.00	24.92± 0.42	33.56± 1.24	26.86± 5.98
7.5	22.48± 0.00	25.62± 0.00	34.14± 2.11	27.41± 6.03
P _{media}	18.83± 3.80	22.62± 3.28	27.33± 6.42	22.71± 5.66
LUZ ROJA				
Conc. nitrato	35 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	75 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	150 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	P _{media}
0	7.41± 0.06	9.98± 2.53	11.50± 0.00	9.63± 2.07
0.5	11.20± 0.49	12.52± 0.51	14.30± 0.41	12.67± 1.56
2.5	12.47± 0.61	15.13± 0.35	17.51± 2.20	15.03± 2.52
5	14.72± 1.12	20.00± 0.00	22.04± 0.34	18.92± 3.78
7.5	14.91± 0.79	20.20± 2.78	24.21± 3.80	19.77± 4.66
P _{media}	12.14± 3.07	15.56± 4.52	17.91± 5.27	15.04± 4.74
LUZ DIA CON ROJO LEJANO				
Conc. nitrato	35 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	75 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	150 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	P _{media}
0	5.79± 0.04	7.14± 0.00	9.34± 0.00	7.42± 1.79
0.5	7.68± 0.05	12.18± 0.00	13.15± 0.08	11.00± 2.92
2.5	8.54± 0.00	12.88± 0.40	17.00± 0.00	12.80± 4.23
5	8.79± 0.01	12.91± 0.00	20.19± 0.00	13.96± 5.77
7.5	9.36± 0.00	13.04± 0.39	21.19± 0.04	14.53± 6.05
P _{media}	8.03± 1.39	11.63± 2.53	16.17± 4.42	11.58± 4.61
P _{media total}	12.46± 4.37	16.99± 5.21	20.02± 6.44	

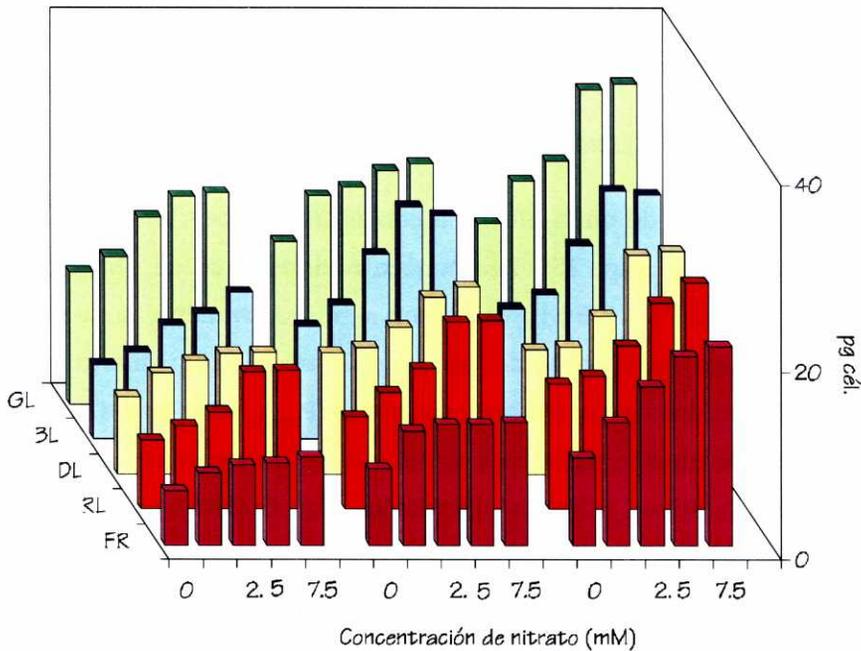


Figura 25. Variación de la concentración celular de proteínas en función de la longitud de onda, la concentración de nitrato y la irradiancia en los cultivos de *Dunaliella salina*. Luz día (DL), luz azul (BL), luz verde (GL), luz roja (RL) y luz día con rojo lejano (FR); a) 35 b) 75 y c) 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

EFFECTO DE LA INTENSIDAD DE LUZ

La concentración proteica aumenta proporcionalmente con la irradiancia espectral hasta $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en todas las longitudes de onda, existiendo diferencias significativas entre los valores alcanzados a los tres niveles ensayados (Tabla XVIII, Fig. 25). Existe, además, una alta correlación positiva entre ambos.

En los cultivos con luz día y 5 mM de nitrato, los valores varían desde 11.63 ± 1.56 hasta $18.20 \pm 5.12 \text{ pg cél.}^{-1}$, cuando la irradiancia aumenta de 35 a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En luz azul la concentración celular de proteínas varía desde 11.67 ± 3.12 hasta $20.48 \pm 5.83 \text{ pg cél.}^{-1}$; en luz verde, desde 18.83 ± 3.80 hasta $27.33 \pm 6.42 \text{ pg cél.}^{-1}$; en luz roja, desde 12.14 ± 3.07 hasta $17.91 \pm 5.27 \text{ pg cél.}^{-1}$. En luz día enriquecida con rojo lejano se obtienen los valores

mínimos; éstos varían con la irradiancia espectral desde 8.03 ± 1.39 hasta 16.17 ± 4.42 pg cél.⁻¹ (Tabla XVIII).

EFFECTO DE LA LONGITUD DE ONDA

La longitud de onda afecta la concentración celular de proteínas de forma significativa (Fig. 25). Las concentraciones que se obtienen en luz verde ($P_{\text{media}} = 22.71 \pm 5.66$ pg cél.⁻¹) son significativamente superiores a las que se alcanzan en el resto de las longitudes de onda; mientras que las menores, obtenidas en luz día con rojo lejano ($P_{\text{media}} = 11.58 \pm 4.61$ pg cél.⁻¹), son significativamente diferentes a las que se obtienen en el resto de los ensayos. Se detectan, además, diferencias significativas entre las concentraciones obtenidas en luz azul ($P_{\text{media}} = 16.76 \pm 6.12$ pg cél.⁻¹), respecto a la luz roja ($P_{\text{media}} = 15.04 \pm 4.74$ pg cél.⁻¹) y la luz día ($P_{\text{media}} = 15.24 \pm 4.37$ pg cél.⁻¹). De forma general, la concentración proteica varía con la longitud de onda, alcanzándose los mayores valores en luz verde, seguidos por la luz azul, la luz día, roja y por último, la luz día con rojo lejano (GL > BL > DL > RL > FR) (Fig. 25).

Respecto a la concentración celular de proteínas sólo hay interacción entre la irradiancia espectral y la concentración de nitrato.

De forma general, los mayores valores se obtienen a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en los cultivos con 5 y 7.5 mM de nitrato en luz verde.

Si se hace el análisis de la influencia de los diferentes factores ensayados sobre la concentración celular de proteínas en cada intervalo de longitudes de onda, éstos no afectan a todos por igual.

Luz día

En luz día se detectan diferencias significativas entre las concentraciones alcanzadas a 0 mM y los cultivos con 2.5, 5 y 7.5 mM de nitrato, y entre las que se alcanzan a 0.5 y 2.5 mM, respecto a 5 y 7.5 mM. En relación con la

irradiancia espectral, existen diferencias significativas entre las concentraciones celulares de proteínas que se alcanzan a los tres niveles ensayados.

Luz azul

En luz azul las diferencias son significativas entre las concentraciones alcanzadas en los cultivos con 0 y 0.5 mM de nitrato, respecto a 2.5, 5 y 7.5 mM; además, entre 2.5 mM, y 5 y 7.5 mM. Respecto a la irradiancia, en luz azul las diferencias son significativas entre las concentraciones que se alcanzan a $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, y en el resto de los niveles ensayados.

Luz verde

En luz verde las diferencias son significativas entre los valores que se alcanzan con 0, 0.5 y 2.5 mM y las concentraciones 5 y 7.5 mM de nitrato. Por otra parte, existen diferencias significativas entre los valores alcanzados a las diferentes irradiancias ensayadas.

Luz roja

En luz roja se detectan diferencias significativas entre las concentraciones alcanzadas a 0 mM, respecto a 2.5, 5 y 7.5 mM, y entre los valores que se alcanzan a 0.5 y 2.5 mM, y las concentraciones obtenidas con 5 y 7.5 mM. La concentración celular de proteínas varía con la irradiancia, detectándose diferencias significativas entre los tres niveles ensayados.

Luz día con rojo lejano

En luz día con rojo lejano existen diferencias significativas entre las concentraciones celulares de proteína alcanzadas en los cultivos con 0 y 0.5 mM de nitrato, respecto a 2.5, 5 y 7.5 mM, y entre 2.5 mM, y las concentraciones 5 y 7.5 mM. respecto a la irradiancia espectral existen diferencias significativas entre las concentraciones que se obtienen con las diferentes irradiancias ensayadas.

Tabla XIX. Relación Carbono: Nitrógeno (C:N) (x) a al inicio de la fase estacionaria en pg cél.⁻¹ a diferentes longitudes de onda y niveles de irradiancia espectral en los cultivos de *Dunaliella salina*.

LUZ DIA				
Conc. nitrato	35 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	75 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	150 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	x_{media}
0	9.97± 0.66	11.91± 0.33	17.23± 0.43	13.03± 3.76
0.5	6.37± 0.00	8.57± 0.00	9.54± 0.07	8.76± 1.62
2.5	3.70± 0.00	4.39± 0.19	4.50± 0.01	4.19± 0.43
5	3.69± 0.00	4.33± 0.00	4.57± 0.07	4.19± 0.45
7.5	3.37± 0.00	4.74± 0.00	4.91± 0.75	4.34± 0.84
x_{media}	5.42± 3.00	6.80± 3.36	8.15± 5.50	6.94± 3.94
LUZ AZUL				
Conc. nitrato	35 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	75 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	150 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	x_{media}
0	16.53± 0.61	19.50± 0.00	22.27± 0.08	19.43± 2.87
0.5	8.22± 0.56	15.09± 0.14	20.67± 0.00	14.66± 6.24
2.5	4.52± 0.08	6.81± 0.58	11.26± 0.01	7.53± 3.43
5	4.48± 0.00	4.39± 0.05	6.22± 0.12	5.03± 1.03
7.5	4.37± 0.18	4.63± 0.00	6.31± 0.00	5.11± 1.05
x_{media}	7.60± 5.20	10.11± 6.80	13.34± 7.71	10.28± 6.64
LUZ VERDE				
Conc. nitrato	35 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	75 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	150 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	x_{media}
0	8.61± 0.00	11.95± 0.73	15.67± 0.00	12.07± 3.53
0.5	4.37± 0.23	10.18± 0.00	11.43± 0.00	8.60± 3.77
2.5	3.53± 0.00	6.91± 0.00	8.61± 0.00	6.30± 2.59
5	3.60± 0.00	4.74± 0.20	5.86± 0.08	4.70± 1.13
7.5	3.91± 0.00	4.63± 0.00	5.79± 0.04	4.77± 0.95
x_{media}	4.80± 2.15	7.68± 3.27	9.47± 4.17	7.23± 3.65
LUZ ROJA				
Conc. nitrato	35 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	75 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	150 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	x_{media}
0	7.34± 0.01	16.52± 2.21	21.81± 0.00	15.22± 7.32
0.5	3.78± 0.41	11.07± 0.71	19.92± 0.00	11.59± 8.08
2.5	3.53± 0.00	3.66± 0.05	6.57± 0.20	4.59± 1.72
5	3.21± 0.00	3.32± 0.00	3.36± 0.74	3.29± 0.08
7.5	3.17± 0.00	3.14± 0.00	3.37± 0.30	3.22± 0.13
x_{media}	4.20± 1.76	7.54± 6.02	11.00± 9.11	7.65± 6.58
LUZ DIA CON ROJO LEJANO				
Conc. nitrato	35 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	75 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	150 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	x_{media}
0	18.57± 0.00	21.80± 1.10	22.84± 2.00	21.07± 2.23
0.5	13.10± 0.01	13.91± 0.00	19.86± 0.00	15.62± 3.69
2.5	6.47± 0.00	7.31± 0.00	8.89± 0.00	7.56± 1.23
5	4.91± 0.03	6.55± 0.00	6.85± 0.00	6.10± 1.04
7.5	4.90± 0.00	6.02± 0.14	6.15± 0.02	5.69± 0.69
x_{media}	9.59± 6.05	11.10± 6.76	12.92± 7.83	11.37± 6.56
$x_{\text{media total}}$	6.32± 4.17	8.64± 5.29	10.90± 6.78	

*RELACIÓN CARBONO: NITRÓGENO**EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRATO*

La concentración de nitrato afecta la relación C:N (Tabla XIX), existiendo entre ambas una correlación negativa. Existen diferencias significativas entre los valores alcanzados a 0 y 0.5 mM de nitrato entre sí, y respecto al resto de las concentraciones ensayadas, detectándose, además, diferencias significativas entre los cultivos con 2.5 mM respecto a 5 y 7.5 mM.

En luz día a $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ dicha relación varía desde 13.03 ± 3.76 hasta 4.34 ± 0.84 cuando la concentración aumenta desde 0 a 7.5 mM. Este comportamiento es similar en todas las longitudes de onda. En condiciones de luz azul las variaciones con la concentración de nitrato son de 19.43 ± 2.87 a 5.11 ± 1.05 ; en luz verde, de 12.07 ± 3.53 a 4.77 ± 0.95 ; en luz roja, de 15.22 ± 7.32 a 3.22 ± 0.13 ; y en luz día enriquecida con rojo lejano, de 21.07 ± 2.23 a 5.69 ± 0.69 (Tabla XIX).

EFFECTO DE LA INTENSIDAD DE LUZ

La relación C:N aumenta proporcionalmente con el nivel de irradiancia espectral, existiendo correlación entre ambos. De forma general, existen diferencias significativas entre los tres niveles de irradiancia espectral ensayados.

En luz día, la relación varía desde 5.42 ± 3.00 hasta 8.15 ± 5.50 , cuando el nivel de irradiancia aumenta desde 35 hasta $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En luz azul los valores varían desde 7.60 ± 5.20 hasta 13.34 ± 7.71 ; en luz verde, desde 4.80 ± 2.15 hasta 9.47 ± 4.17 ; en luz roja, desde 4.20 ± 1.76 hasta 11.00 ± 9.11 ; y en luz día con rojo lejano, desde 9.59 ± 6.05 hasta 12.92 ± 7.83 (Tabla XIX).

EFECTO DE LA LONGITUD DE ONDA

La longitud de onda afecta de forma significativa la relación C: N. Los valores más altos se obtienen en luz día enriquecida con rojo lejano ($x_{media} = 11.37 \pm 6.56$) y en luz azul ($x_{media} = 10.28 \pm 6.64$), valores que difieren significativamente de los que se obtienen en luz roja ($x_{media} = 7.65 \pm 6.58$), luz verde ($x_{media} = 7.23 \pm 3.25$) y luz día ($x_{media} = 6.94 \pm 3.94$) (Tabla XIX). Esta relación se correlaciona, además, con la concentración celular de carotenoides con un coeficiente de correlación de 0.84 ($P < 0.001$). Los mayores valores se obtienen en los cultivos sin nitrato a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en luz día con rojo lejano.

Desde el punto de vista estadístico existe interacción para dicha relación entre la longitud de onda y la concentración de nitrato ($P = 0.06$), y entre ésta y el nivel de irradiancia espectral ($P = 0.003$); no así entre los tres factores. Sin embargo, si se analiza el efecto para cada longitud de onda, éste es diferente.

Luz día

El efecto de la concentración de nitrato es significativo, existiendo diferencias entre los valores alcanzados en los cultivos con 0 y 0.5 mM de nitrato entre sí, y respecto a 2.5, 5 y 7.5 mM; mientras que respecto a la irradiancia, existen diferencias significativas entre los valores alcanzados en el primer y último nivel ensayado.

Luz azul

Existen diferencias entre los valores alcanzados en los cultivos con 0 y 0.5 mM de nitrato entre sí, y respecto a 2.5, 5 y 7.5 mM; se detectan, además, diferencias significativas entre los valores de la relación C: N a 2.5 mM y las concentraciones 5 y 7.5 mM. Respecto a la irradiancia, existen diferencias significativas entre los valores de la relación que se alcanzan en el primer y último nivel ensayados.

Luz verde

Las diferencias son significativas entre los cultivos con 0 y 0.5 mM de nitrato entre sí, y respecto a 2.5, 5 y 7.5 mM; en relación con la intensidad de la luz, las diferencias significativas se detectan entre los valores alcanzados a los tres niveles de irradiancia.

Luz roja

El efecto de la concentración de nitrato es significativo existiendo diferencias entre los valores alcanzados en los cultivos con 0 y 0.5 mM de nitrato entre sí, y respecto a 2.5, 5 y 7.5 mM; en relación con la irradiancia, existen diferencias significativas entre los valores que se alcanzan a $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y el resto de los niveles ensayados.

Luz día con rojo lejano

En estas condiciones de iluminación, existen diferencias significativas entre los valores alcanzados en los cultivos con 0 y 0.5 mM de nitrato entre sí, y respecto a 2.5, 5 y 7.5 mM; se detectan, además, diferencias significativas entre los valores de la relación a 2.5 mM y las concentraciones 5 y 7.5 mM; mientras que el efecto de la irradiancia no es significativo.

*PESO SECO CELULAR Y PESO SECO LIBRE DE CENIZAS**EFEECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRATO*

La concentración de nitrato influye de forma significativa sobre el peso celular. Los mayores rendimientos en cuanto a materia seca se obtienen en los cultivos con 0 y 0.5 mM de nitrato, con valores significativamente diferentes entre sí y respecto al resto de las concentraciones ensayadas. Por otra parte, existen diferencias significativas entre los valores de PSLC obtenidos a todas las concentraciones ensayadas. Se obser-

Tabla XX. Valores de peso seco celular (PS) y peso seco libre de cenizas (PSLC) en $\text{pg c\acute{e}l.}^{-1}$ al inicio de la fase estacionaria a diferentes longitudes de onda y niveles de irradiancia espectral en los cultivos de *Dunaliella salina*.

LUZ DIA

Conc. nitrato	$35\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$		$75\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$		$150\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	
	PS	PSLC	PS	PSLC	PS	PSLC
0	190± 0.00	120± 0.00	200± 0.10	180± 0.00	260± 0.00	250± 0.00
0.5	190± 10.0	110± 0.01	200± 0.00	170± 0.02	290± 0.00	260± 0.00
2.5	130± 0.20	73± 0.00	210± 0.20	130± 0.70	240± 0.00	200± 0.00
5	92± 0.00	50± 0.00	210± 0.00	130± 0.00	290± 0.05	190± 0.00
7.5	92± 0.20	50± 0.20	210± 0.00	120± 0.2	240± 0.00	150± 0.00

LUZ AZUL

Conc. nitrato	$35\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$		$75\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$		$150\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	
	PS	PSLC	PS	PSLC	PS	PSLC
0	170± 0.00	150± 0.20	260± 0.20	240± 2.00	290± 0.00	270± 3.00
0.5	150± 0.20	110± 0.20	240± 0.00	190± 0.00	290± 0.10	250± 2.00
2.5	120± 0.60	80± 6.00	140± 0.00	110± 0.00	160± 1.00	130± 2.00
5	120± 0.00	80± 0.70	130± 0.00	96± 0.00	100± 0.20	75± 0.00
7.5	100± 2.00	70± 2.00	130± 0.30	93± 1.00	100± 0.00	75± 0.00

LUZ VERDE

Conc. nitrato	$35\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$		$75\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$		$150\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	
	PS	PSLC	PS	PSLC	PS	PSLC
0	340± 0.00	250± 0.20	370± 0.10	300± 0.02	380± 0.00	330± 2.00
0.5	190± 10.0	130± 10.0	310± 0.00	240± 1.00	370± 0.00	300± 0.00
2.5	120± 10.0	80± 0.20	170± 0.00	120± 2.00	250± 2.00	190± 0.40
5	120± 0.00	80± 0.40	160± 10.0	115± 3.00	240± 1.00	180± 0.20
7.5	115± 0.00	75± 0.00	150± 4.00	105± 1.00	230± 0.00	170± 0.00

LUZ ROJA

Conc. nitrato	$35\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$		$75\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$		$150\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	
	PS	PSLC	PS	PSLC	PS	PSLC
0	150± 0.00	110± 0.30	160± 0.00	140± 0.00	150± 0.00	140± 0.00
0.5	120± 3.00	80± 0.00	120± 0.00	100± 0.00	150± 1.00	130± 10.0
2.5	120± 0.00	80± 0.00	120± 0.20	90± 2.00	120± 0.00	95± 2.00
5	100± 3.00	70± 0.00	100± 0.20	75± 0.20	110± 3.00	85± 2.00
7.5	100± 10.0	60± 2.00	80± 1.00	50± 2.00	100± 2.00	75± 10.0

LUZ DIA CON ROJO LEJANO

Conc. nitrato	$35\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$		$75\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$		$150\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	
	PS	PSLC	PS	PSLC	PS	PSLC
0	270± 0.00	230± 2.00	300± 20.0	260± 0.00	360± 0.02	340± 0.00
0.5	170± 2.10 ⁻⁴	130± 0.00	280± 1.00	220± 0.01	350± 0.00	310± 0.00
2.5	140± 0.00	100± 0.00	140± 0.00	100± 0.00	120± 3.00	100± 2.00
5	90± 2.10 ⁻⁴	60± 0.00	130± 0.00	90± 0.03	140± 2.00	100± 0.00
7.5	120± 2.10 ⁻⁴	60± 5.00	120± 0.30	80± 0.00	140± 0.00	100± 0.6

va, de forma general, una correlación negativa entre el peso celular (PS y PSLC) y la concentración de nitrato (Tabla XX).

EFEECTO DE LA INTENSIDAD DE LUZ

La irradiancia espectral afecta el peso celular de los cultivos detectándose diferencias significativas entre los valores obtenidos a los tres niveles de irradiancia ensayados. Ambos parámetros (PS y PSLC) están correlacionados con la irradiancia espectral, con coeficientes de correlación de 0.97 y 0.99, respectivamente ($P = 0.0001$). En los cultivos con luz día a 5 mM, los valores del PS aumentan desde 92 ± 0.00 a 290 ± 0.05 pg cél.⁻¹ cuando la irradiancia aumenta desde 35 a 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; mientras que el PSLC varía desde 50 ± 0.00 hasta 190 ± 0.00 pg cél.⁻¹.

EFEECTO DE LA LONGITUD DE ONDA

La longitud de onda afecta significativamente el peso seco celular; los menores valores se alcanzan en los cultivos con luz roja (120 ± 23 pg cél.⁻¹) y luz azul (166 ± 68 pg cél.⁻¹); éstos difieren significativamente entre sí y respecto al resto de las longitudes de onda. Se detectan, además, diferencias significativas entre los pesos secos obtenidos en luz verde (234 ± 98 pg cél.⁻¹), respecto a la luz día (230 ± 63 pg cél.⁻¹) y a la luz día con rojo lejano (191 ± 92 pg cél.⁻¹).

Respecto al PSLC, existen diferencias significativas entre la luz día (145 ± 64 pg cél.⁻¹) y el resto de las longitudes de onda, además, entre los valores obtenidos en luz azul (135 ± 70 pg cél.⁻¹) y luz verde (178 ± 87 pg cél.⁻¹). Los menores valores de peso orgánico se obtienen también en luz roja (91 ± 26 pg cél.⁻¹). De forma general, los valores más altos del peso celular (PS y PSLC) se obtienen en luz verde, seguidos por los valores que se obtienen en luz día y luz día con rojo lejano; siendo los valores del PSLC superiores en este último; en este orden le sigue la luz azul y por último la luz roja.

Desde el punto de vista estadístico, existe interacción entre la longitud de onda y la concentración de nitrato tanto para el PS ($P = 0.000$) como para el PSLC ($P = 0.04$); y entre la intensidad y la longitud de onda ($P = 0.001$; $P = 0.02$); sin embargo, no existe interacción entre los tres factores.

Si se analiza cada intervalo de longitudes de onda, el efecto de los diferentes factores ensayados no es el mismo.

Luz día

La concentración de nitrato no afecta significativamente los valores del PS en estas condiciones; sin embargo, el comportamiento del PSLC es diferente; existen diferencias significativas entre los valores obtenidos con 0 y 0.5 mM de nitrato, respecto al resto de las concentraciones, y entre 2.5 y 7.5 mM; se detectan, además, diferencias significativas entre los valores de PSLC que se obtienen con 2.5 y 5 mM de nitrato.

Por otra parte, el efecto de la irradiancia espectral sobre el peso seco y el peso orgánico es significativo en luz día, donde existen diferencias entre los tres niveles ensayados.

Luz azul

En estas condiciones de iluminación existen diferencias significativas entre los valores alcanzados con 0 y 0.5 mM, y el resto de las concentraciones ensayadas, y entre 2.5 y 7.5 mM de nitrato tanto para el PS y como para el PSLC.

El efecto de la irradiancia sobre el peso seco celular no es significativo, mientras que respecto al PSLC las diferencias son significativas entre los valores que se obtienen a $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y el resto de los niveles de irradiancia ensayados.

Luz verde

En luz verde existen diferencias significativas entre los valores que se alcanzan con 0 y 0.5 mM de nitrato entre sí, y respecto al resto de las concentraciones ensayadas tanto para el PS como para el PSLC. El efecto de la irradiancia espectral sobre el PS y el PSLC es también significativo, existiendo diferencias significativas entre los tres niveles ensayados.

Luz roja

En luz roja se detectan diferencias significativas entre los valores de PS obtenidos con todas las concentraciones de nitrato; mientras que existen diferencias significativas entre los pesos orgánicos obtenidos a 0 y 7.5 mM entre sí, y respecto al resto de las concentraciones ensayadas. El efecto de la irradiancia sobre el PS no es significativo; sin embargo, existen diferencias significativas entre los valores de los pesos orgánicos (PSLC) obtenidos a los tres niveles de irradiancia ensayados.

Luz día con rojo lejano

En luz día con rojo lejano existen diferencias significativas entre los valores de PS y PSLC que se alcanzan con 0 y 0.5 mM de nitrato entre sí, y respecto al resto de las concentraciones ensayadas. En relación con la irradiancia, las diferencias son significativas para el PS entre el primer y último nivel; mientras que, existen diferencias significativas entre los valores de PSLC obtenidos con $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respecto a 35 y $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Por otra parte, el PSLC representa un porcentaje significativo del PS en los cultivos de *Dunaliella salina*, donde ambos están correlacionados con la concentración celular de carotenoides, con coeficientes de correlación de 0.75 y 0.74, respectivamente ($P < 0.001$) y con la relación C:N ($r^2 = 0.63$ y 0.79 , $P < 0.001$). El porcentaje del peso orgánico respecto al peso seco celular varía desde un 50 a un 96% (Fig. 26).

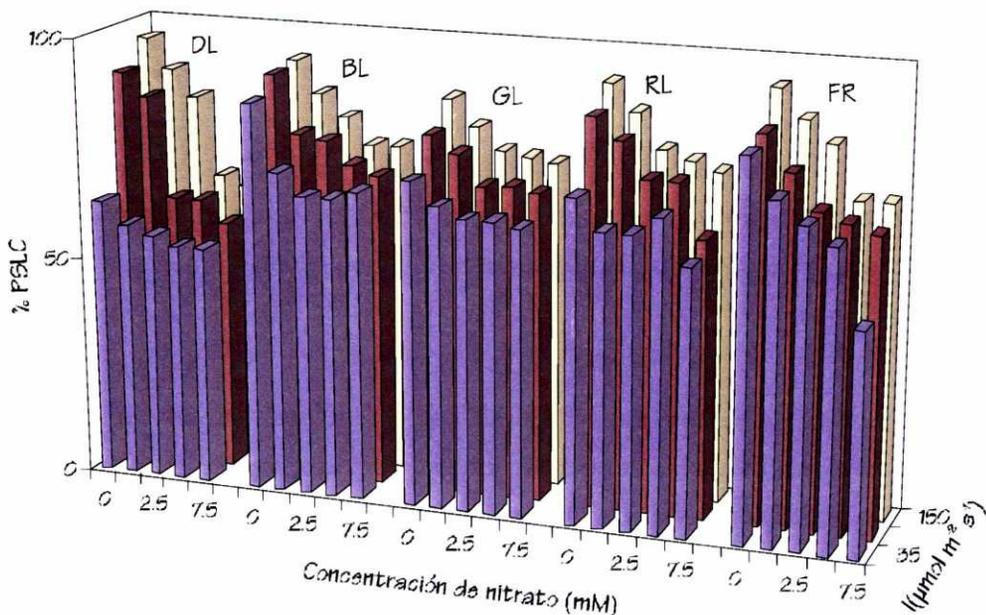


Figura 26. Variación del porcentaje de peso orgánico (PSLC) respecto al PS en los cultivos de *Dunaliella salina* en función de la longitud de onda, la concentración de nitrato y la irradiancia. Luz día (DL), luz azul (BL), luz verde (GL), luz roja (RL) y luz día con rojo lejano (FR). (I) irradiancia espectral $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

En ausencia de nitrato con 0.5 mM, el porcentaje de PSLC respecto al PS es significativamente mayor que en el resto de las concentraciones; existen, además, diferencias significativas entre 2.5 y 7.5 mM. Por otra parte, con el aumento de la irradiancia, aumenta el porcentaje del PSLC, existiendo diferencias significativas entre los tres niveles ensayados. Respecto a la longitud de onda, sólo se detectan diferencias significativas entre porcentaje del PSLC en el azul y en luz día, siendo menores en luz día (Fig. 26).

COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA RESPECTO AL PESO SECO

La composición bioquímica microalgal no se expresó en base al peso orgánico, aunque sería más indicativo de los cambios fisiológicos celulares (Brown *et al.*, 1993), debido a que en los controles de rutina de los sistemas de cultivo a gran escala es más común expresar el rendimiento en base al peso seco.

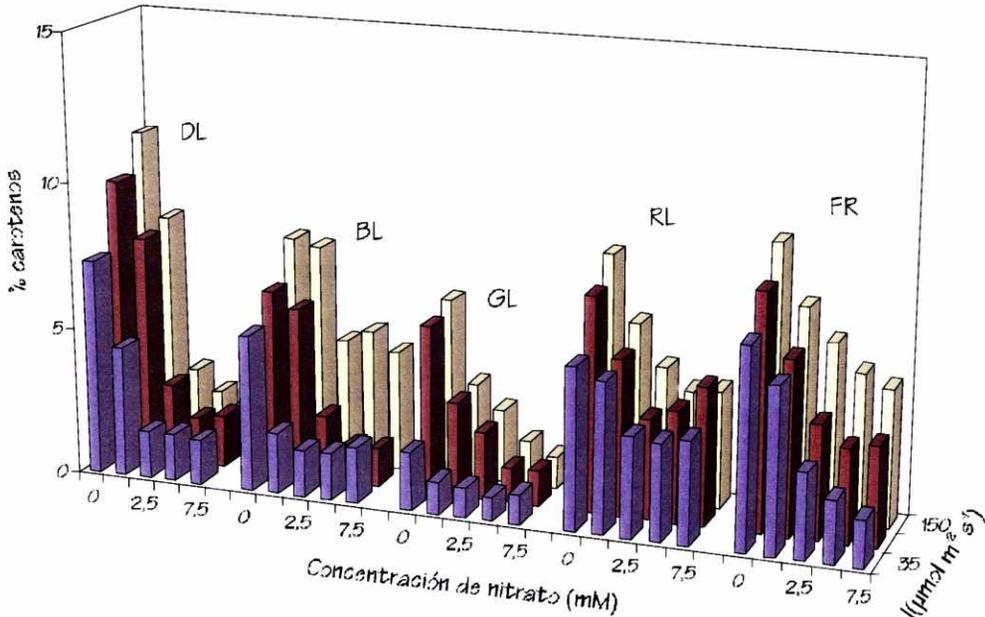


Figura 27. Variación del porcentaje de carotenoides en los cultivos de *Dunaliella salina* en función de la concentración de nitrato, la longitud de onda y la irradiancia espectral. Luz día (DL), luz azul (BL), luz verde (GL), luz roja (RL) y luz día con rojo lejano (FR). (I): 35, 75 y 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

CONCENTRACIÓN DE PIGMENTOS RESPECTO AL PESO SECO

CAROTENOIDES

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRATO

El porcentaje celular de carotenoides varía desde el 0.8%, en los cultivos con una concentración de nitrato mayor o igual a 2.5 mM de nitrato con 35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiancia, hasta 10.9% en ausencia de nitrato con 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; mientras que a 0 mM las variaciones son desde 7.3 a 10.9% (Fig. 27).

Se detectan diferencias significativas en los cultivos con 0 y 0.5 mM de nitrato entre sí, y respecto al resto de las concentraciones ensayadas, además, entre 2.5 mM y los cultivos con 5 y 7.5 mM. En luz día a 75 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ el porcentaje de carotenoides varía desde el 9.6 al 1.8%, cuando la

concentración de nitrato aumenta desde 0 a 7.5 mM. Por otra parte, ambos están negativamente correlacionados, con valores de $r^2 = -0.72$; $P < 0.001$.

EFFECTO DE LA INTENSIDAD DE LUZ

Respecto al nivel de irradiancia espectral se detectan diferencias significativas entre los tres niveles ensayados, alcanzándose los máximos valores a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En los cultivos con luz día a 5 mM, el porcentaje de carotenoides varía desde el 1.6 al 2% cuando el nivel de irradiancia varía desde 35 a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 27).

EFFECTO DE LA LONGITUD DE ONDA

La longitud de onda afecta también el porcentaje de carotenoides; se detectan diferencias significativas entre los bajos valores obtenidos en luz verde (0.8-6.1%) y los que se obtienen en el resto de las longitudes de onda, los valores que se obtienen en luz azul (1.3-7.7%) respecto a la luz roja (+8.2%) y la luz día con rojo lejano (1.6-9.1%).

CLOROFILAS

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRATO

El porcentaje de clorofilas varía desde 0.7 a 11.3% en todos los ensayos. Se detectan diferencias significativas entre los valores que se alcanzan en los cultivos con 0 y 0.5 mM de nitrato entre sí, y respecto al resto de las concentraciones ensayadas, además, entre 2.5 mM y las concentraciones 5 y 7.5 mM. En luz día con $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ los valores varían desde 3.4 a 4.5% cuando la concentración de nitrato aumenta de 0 a 7.5 mM (Fig. 28).

EFFECTO DE LA INTENSIDAD DE LUZ

Por otra parte, el porcentaje de clorofilas disminuye con la irradiancia espectral, existiendo, de forma general, diferencias significativas entre todos los niveles ensayados. Los mayores valores se obtienen a $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

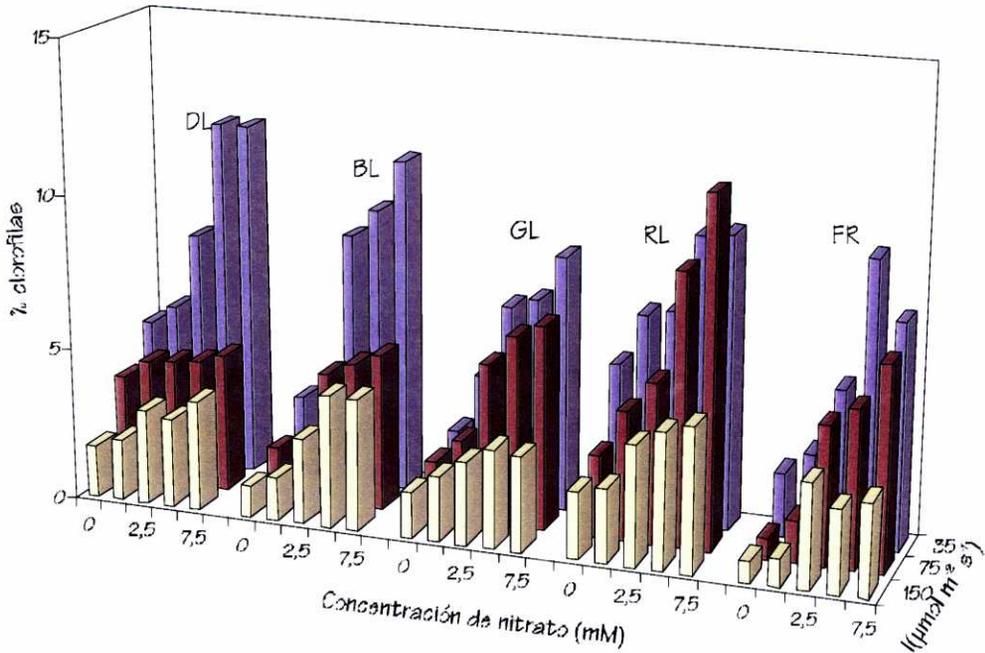


Figura 28. Variación del porcentaje de clorofilas en los cultivos de *Dunaliella salina* en función de la concentración de nitrato, la longitud de onda y la irradiancia espectral. Luz día (DL), luz azul (BL), luz verde (GL), luz roja (RL) y luz día con rojo lejano (FR). (I): 35, 75 y 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

En los cultivos con luz día a 5 mM los valores varían desde 11.6 a 2.9% cuando la irradiancia aumenta desde 35 hasta 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

EFEECTO DE LA LONGITUD DE ONDA

La longitud de onda tiene un efecto significativo sobre este parámetro; de forma general, existen diferencias significativas entre los valores obtenidos en luz roja (2.2-11.3%) y el resto de las longitudes de onda, y entre la luz día (1.7-11.6%) y la luz día con rojo lejano (0.7-7.3%). Los valores mínimos se obtienen en luz día con rojo lejano y los máximos en luz roja (Fig. 28).

Aunque desde el punto de vista estadístico, no existe interacción entre los tres factores analizados respecto al porcentaje de pigmentos, sí existe interacción entre la concentración de nitrato y la longitud de onda para

el porcentaje de carotenoides ($P = 0.001$); y entre la irradiancia y la longitud de onda ($P = 0.01$), y la concentración de nitrato y la irradiancia espectral ($P = 0.001$) para el porcentaje de clorofilas.

CONCENTRACIÓN PROTEICA RESPECTO AL PESO SECO

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRATO

El porcentaje de proteína está afectado por la concentración de nitrato, existiendo diferencias significativas entre los valores obtenidos en todas las concentraciones ensayadas. En luz día el aporte proteico varía desde 6.5 a 9.5% cuando la concentración de nitrato aumenta de 0 a 7.5 mM (Fig. 29).

Respecto al nivel de irradiancia espectral, existen diferencias significativas entre los valores alcanzados al primer y último nivel de irradiancia ensayados. En los cultivos establecidos en luz día a 5 mM, el porcentaje proteico varía desde el 14 al 8.1% cuando la irradiancia aumenta desde 35 a 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

EFFECTO DE LA LONGITUD DE ONDA

La longitud de onda afecta significativamente al porcentaje de proteína. De forma general, los valores que se alcanzan en luz día (4.9-14.2%) y luz día con rojo lejano (2.1-15.1%) son inferiores a los que se obtienen en el resto de las longitudes de onda. Existen, además, diferencias significativas entre los valores que se alcanzan en luz verde (4.1-19.5%) y luz roja (4.9-25.3%).

Los mayores valores de proteína respecto al peso seco celular se obtienen en luz azul a 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, en los cultivos establecidos con suficiencia de nitrato, en los que el porcentaje proteico llega a ser del 26%.

Para el porcentaje de proteína no existe interacción entre los tres factores analizados; sin embargo, existe interacción entre la concentración de nitrato y la longitud de onda ($P = 0.003$), y entre la irradiancia y la longitud de onda ($P = 0.000$).

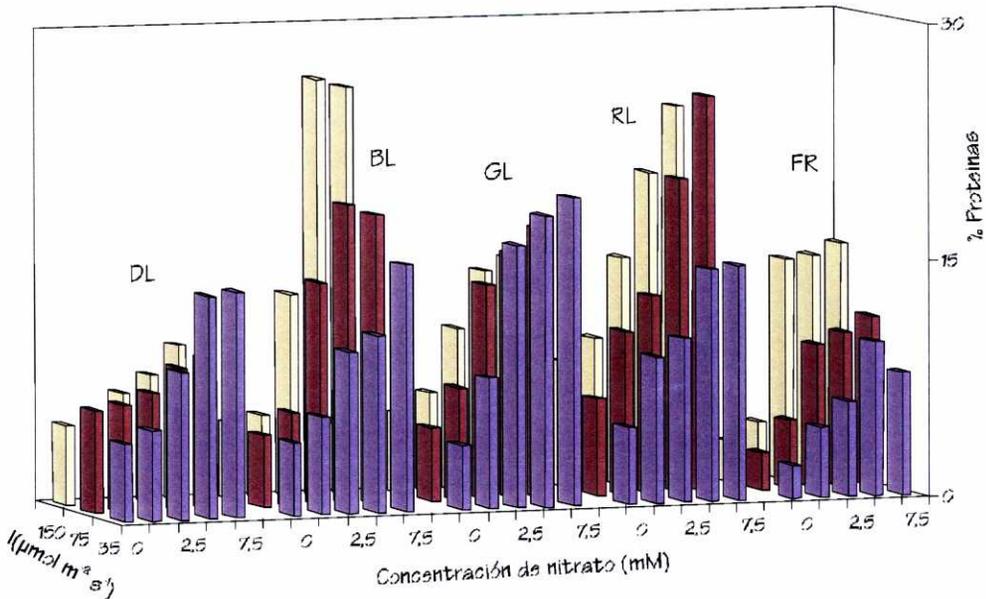


Figura 29. Variación del porcentaje de proteínas en los cultivos de *Dunaliella salina* en función de la concentración de nitrato, la longitud de onda y la irradiancia espectral. Luz día (DL), luz azul (BL), luz verde (GL), luz roja (RL) y luz día con rojo lejano (FR). (I): 35, 75 y 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

RELACIÓN CAROTENO: PROTEÍNA

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRATO

La relación caroteno: proteína varía significativamente con la concentración de nitrato; de forma general, los valores alcanzados en los cultivos con 0 y 0.5 mM de nitrato son significativamente superiores a los que se obtienen en el resto de las concentraciones ensayadas, además, difieren significativamente entre sí, obteniéndose los mayores valores a 0 mM. En luz día a $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ los valores de esta relación varían desde 1.49 hasta 0.19, cuando la concentración de nitrato aumenta desde 0 a 7.5 mM (Fig. 30).

Por otra parte, la irradiancia espectral tiene un efecto significativo sobre esta relación, existiendo diferencias significativas entre los valores obtenidos al primer y último nivel. En los cultivos que se establecen en luz día

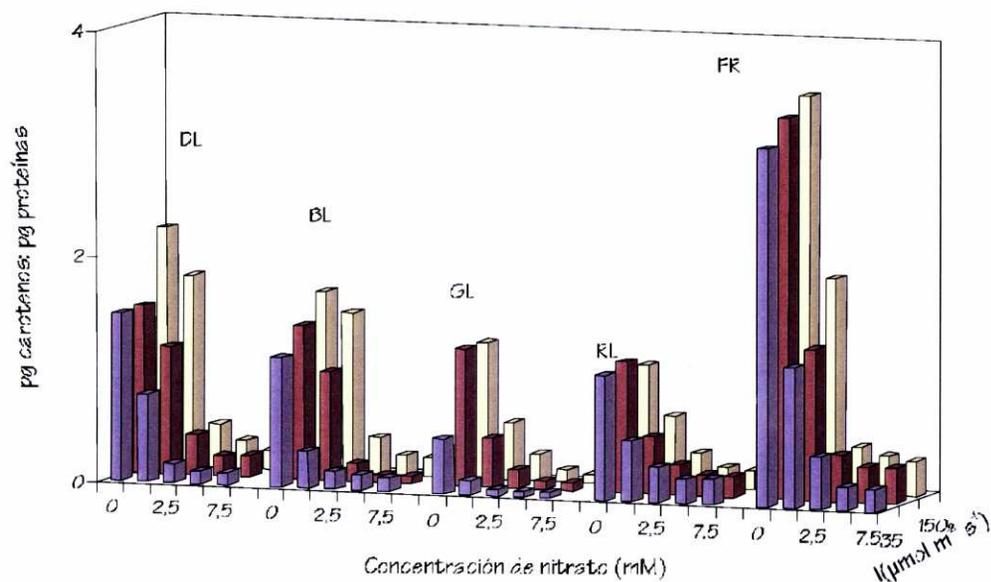


Figura 30. Variación de la relación caroteno: proteína en los cultivos de *Dunaliella salina* en función de la concentración de nitrato, la longitud de onda y la irradiancia espectral. Luz día (DL), luz azul (BL), luz verde (GL), luz roja (RL) y luz día con rojo lejano (FR). (I): 35, 75 y 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

a 5 mM los valores aumentan desde 0.11 a 0.25 cuando la irradiancia aumenta hasta 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Las mayores variaciones de esta relación son en función de la longitud de onda; ésta varía desde 0.05 hasta 3.51 en los diferentes ensayos realizados, detectándose valores significativamente mayores en condiciones de luz día con rojo lejano (0.2-3.51%); además, se detectan diferencias significativas entre la luz día (0.11-2.13%) y la luz verde (0.05-1.22) y luz roja (0.17-1.16%); y entre la luz verde y la luz azul (0.12-1.61%) (Fig. 30).

Por otra parte, existe correlación entre ésta relación y la del C: N ($r^2 = 0.82$, $P < 0.001$).

Para la relación caroteno: proteína no existe interacción entre los tres factores ensayados; sin embargo, sí existe interacción entre la longitud de onda y la concentración de nitrato ($P = 0.000$).

ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN PIGMENTARIA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Estos análisis se realizaron sobre muestras recogidas al inicio de la fase estacionaria de crecimiento. Según los resultados obtenidos, el carotenoide mayoritario en la microalga que se estudia (*Dunaliella salina*) es el β -caroteno. Se detecta además, la presencia de α -caroteno, clorofila a y su alómero, clorofila b, luteína y zeaxantina. La composición isomérica del β -caroteno mostró mayor contenido del 9-*cis*, respecto al *todo-trans* en todos los ensayos (Fig. 31). En los cultivos con $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz día, a 5 mM, se obtuvo una relación *todo-trans*: 9 *cis* de 0.07.

La influencia de los factores ensayados (concentración de nitrato e irradiancia espectral) sobre la composición pigmentaria se analizó por longitudes de onda, teniendo en cuenta las diferencias entre los cromatogramas obtenidos. En condiciones de luz verde, azul, y roja, se pudo determinar la relación luteína: clorofila a y luteína: β -caroteno, ya que en estas condiciones su contenido fue mayor que en luz día y en luz día con rojo lejano; sin embargo, en luz azul y luz verde no se ve favorecida la síntesis de α -caroteno (Fig. 32-34) (Tabla XXI-XXV).

Luz día

La relación *todo-trans*: 9-*cis* fue significativamente menor en los cultivos con 0 y 0.5 mM de nitrato y $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz día; sin embargo, fue prácticamente igual hasta 2.5 mM para el resto de las irradiancias (Tabla XXI).

Respecto al nivel de irradiancia espectral, existen diferencias significativas entre los valores obtenidos a $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ respecto a 75 y 150; de forma general, la relación entre los isómeros disminuye cuando la irradiancia aumenta, en los cultivos con una concentración mayor o igual a 2.5 mM; mientras que en los cultivos con 0 y 0.5 mM, ésta aumenta con la irradiancia. Como comportamiento general, la concentración de ambos isómeros aumen-

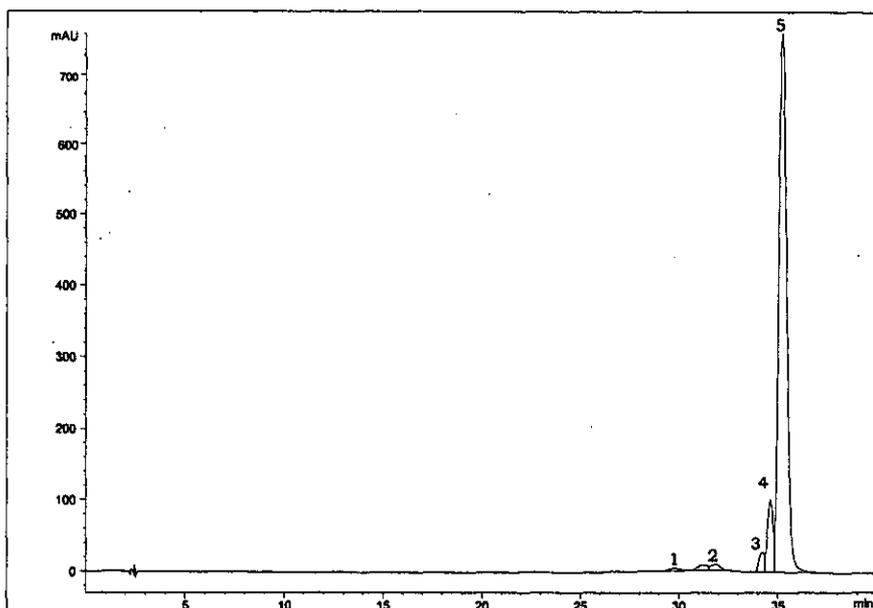


Figura 31. Composición isomérica del β,β -caroteno en *Dunaliella salina*. Cultivos establecidos en luz día a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 0 mM. (1) clorofila b, (2) clorofila a, (3) α -caroteno, (4) todo-*trans*- β,β -caroteno, (5) 9 *cis*- β,β -caroteno.

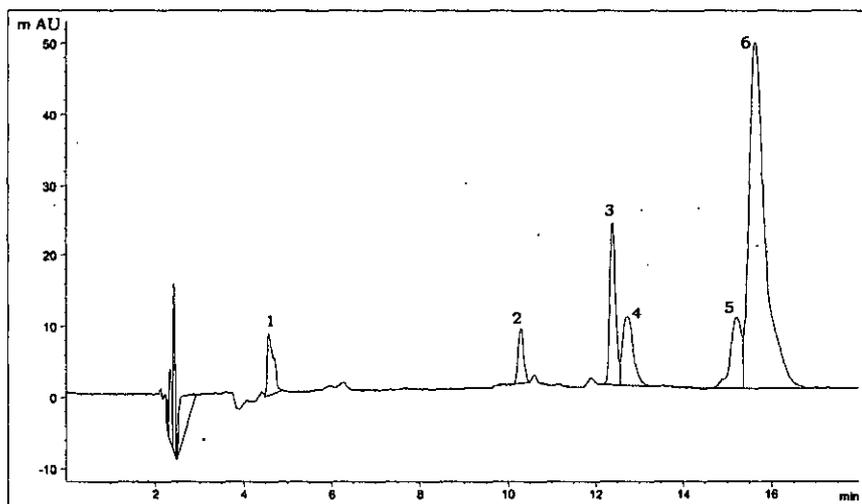


Figura 32. Composición pigmentaria de células de *Dunaliella salina* expuestas a condiciones de luz azul a $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 0 mM de nitrato. (1) luteína, (2) clorofila b, (3) clorofila a, (4) epímero de la clorofila a, (5) todo-*trans*- β,β -caroteno, (6) 9 *cis*- β,β -caroteno.

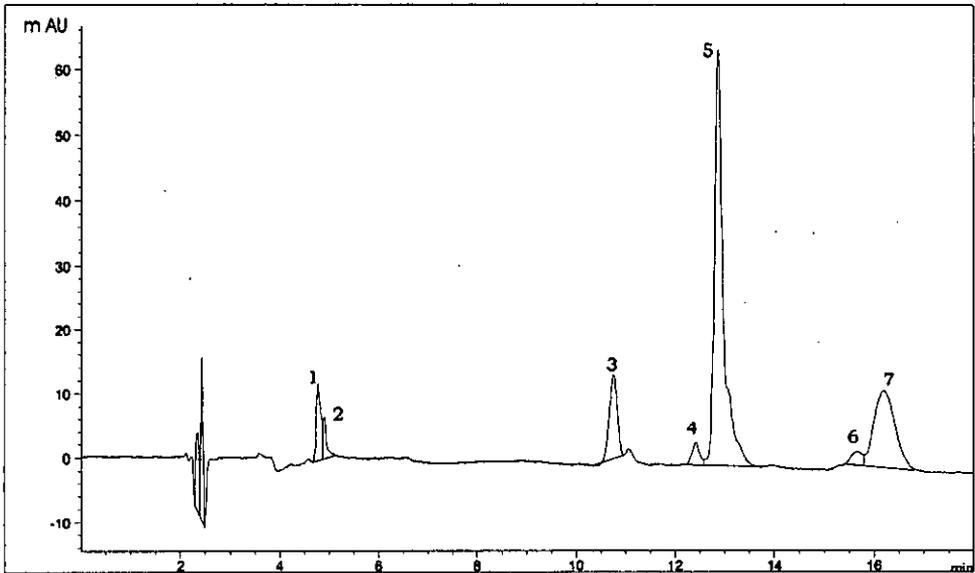


Figura 33. Composición pigmentaria de células de *Dunaliella salina* expuestas a condiciones de luz verde a $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 0 mM de nitrato. (1) luteína, (2) zeaxantina, (3) clorofila b, (4) alómero de la clorofila a, (5) clorofila a, (6) todo-*trans*- β,β -caroteno, (7) 9*cis*- β,β -caroteno.

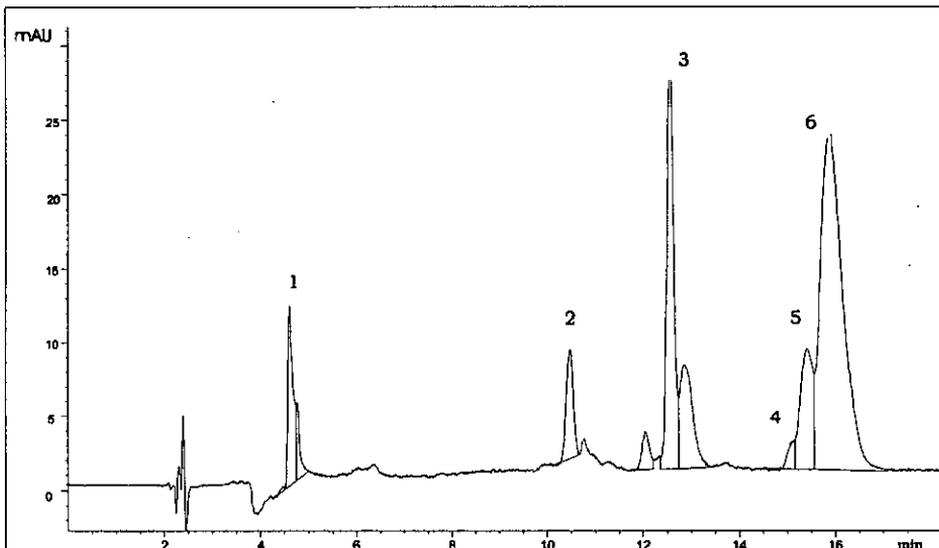


Figura 34. Composición pigmentaria de células de *Dunaliella salina* expuestas a condiciones de luz roja a $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 0 mM de nitrato. (1) luteína, (2) clorofila b, (3) clorofila a, (4) epímero de la clorofila a, (5) α -caroteno, (6) todo-*trans*- β,β -caroteno, (7) 9*cis*- β,β -caroteno.

ta con la irradiancia, siendo el incremento del 9-*cis* es mucho más significativo.

Por otra parte, la relación clorofila a: clorofila b varía significativamente con la concentración de nitrato en luz día, existiendo diferencias significativas entre los cultivos con 0 y 0.5 mM, y las concentraciones 2.5, 5 y 7.5 mM. Cuando la irradiancia aumenta desde 35 hasta 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ esta relación disminuye, existiendo diferencias significativas entre 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y el resto de los niveles ensayados.

La relación β -caroteno: clorofila a disminuyó con la concentración de nitrato, siendo significativamente diferentes los valores obtenidos a 0 mM, y el resto de las concentraciones ensayadas, y los que se obtienen a 0.5 mM, respecto a 7.5 mM. Esta relación aumentó con la irradiancia, existiendo diferencias significativas entre 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y el resto de las irradiancias ensayadas.

Luz azul

En condiciones de luz azul la relación todo-*trans*: 9-*cis* es significativamente menor en los cultivos con 0 y 0.5 mM de nitrato, respecto al resto de las concentraciones ensayadas, por lo que sigue el mismo comportamiento que para la luz día; siendo afectada fundamentalmente la concentración de 9-*cis*, la cual es mucho mayor a 0 y 0.5 mM (Tabla XXII).

Respecto a la irradiancia espectral, a 35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ los valores de esta relación entre isómeros son menores que los valores que se obtienen a 75 y 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; sin embargo, se da un comportamiento peculiar, éstos valores son mayores a 75 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ que a 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La concentración del 9-*cis* aumenta considerablemente con la irradiancia espectral; mientras que la del todo-*trans* aumenta hasta 75 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y luego disminuye.

Tabla XXI. Relación entre los diferentes pigmentos determinados por HPLC. Variación de la composición isomérica del b-caroteno con la concentración de nitrato en cultivos de *Dunaliella salina* establecidos en luz día a 35, 75 y 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

LUZ DÍA	CONCENTRACIONES DE NITRATO (mM)														
	0			0.5			2.5			5			7.5		
Niveles de irradiancia	35	75	150	35	75	150	35	75	150	35	75	150	35	75	150
todo-trans: 9-cis	0.05	0.07	0.08	0.04	0.07	0.09	0.26	0.07	0.07	0.09	0.15	0.07	0.05	0.23	0.09
β -caroteno: α -caroteno	16.01	44.63	50.45	23.10	0.1	41.85	36.50	-	25.54	32.33	-	24.10	45.99	14.48	27.85
β -caroteno: clorofila a	39.53	68.58	83.16	5.79	9.91	48.89	0.54	1.03	28.21	0.71	0.60	19.77	0.67	0.87	6.00
clorofila a: clorofila b	5.6	4.85	2.56	5.40	5.80	5.79	5.44	4.84	1.08	4.88	4.92	0.61	4.48	3.52	1.42

(-) no se pudo determinar por la baja concentración de α -caroteno.

Tabla XXII. Relación entre los diferentes pigmentos determinados por HPLC. Variación de la composición isomérica del b-caroteno con la concentración de nitrato en cultivos de *Dunaliella salina* establecidos en luz azul a 35, 75 y 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

LUZ AZUL	CONCENTRACIONES DE NITRATO (mM)														
	0			0.5			2.5			5			7.5		
Niveles de irradiancia	35	75	150	35	75	150	35	75	150	35	75	150	35	75	150
todo-trans: 9-cis	0.12	0.13	0.10	0.12	0.14	0.08	0.12	0.21	0.14	0.12	0.21	0.16	0.15	0.21	0.14
β -caroteno: α -caroteno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β -caroteno: clorofila a	5.9	10.00	20.00	7.14	14.28	14.28	0.34	3.23	10.30	0.48	2.70	14.00	0.45	2.70	9.09
clorofila a: clorofila b	4.01	2.65	1.79	4.64	2.60	1.41	4.58	3.93	2.66	3.61	3.43	2.52	3.45	3.46	2.78
luteína: β -caroteno	0.07	0.01	0.01	0.06	0.02	0.02	0.44	0.05	0.02	0.33	0.06	0.02	0.34	0.07	0.02
luteína: clorofila a	0.38	0.18	0.18	0.4	0.19	0.16	0.12	0.12	0.15	0.12	0.11	0.20	0.12	0.13	0.16

(-) no se pudo determinar por la baja concentración de α -caroteno.

Respecto a la concentración de nitrato la relación clorofila a: clorofila b se mantiene relativamente constante, no existiendo diferencias significativas entre ninguno de los valores obtenidos; sin embargo, ésta disminuye con el aumento del nivel de irradiancia espectral, existiendo diferencias significativas entre los tres niveles.

La relación β -caroteno: clorofila a, por su parte, varía con la concentración de nitrato, siendo significativamente mayor en los cultivos que se establecen a 0 y 0.5 mM; por otra parte, ésta aumenta con el nivel de irradiancia, existiendo diferencias entre los tres niveles ensayados.

La relación luteína: β -caroteno no varía con la concentración de nitrato de forma significativa; sin embargo ésta es mayor a $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ que en el resto de los niveles de irradiancia; mientras que la relación luteína: clorofila a es significativamente mayor en los cultivos con 0 y 0.5 mM respecto al resto de las concentraciones ensayadas, pero no varía con la irradiancia espectral.

Luz verde

Para la luz verde no se pudo hacer el análisis de la relación isomérica debido a la baja concentración del isómero todo-*trans* β -caroteno en la mayoría de los cultivos. aunque de forma general, hay un incremento del 9-cis con la irradiancia (Tabla XXIII).

Por otra parte, la relación clorofila a: clorofila b no varía con la concentración de nitrato, manteniéndose relativamente estable; sin embargo, disminuye con la irradiancia espectral, detectándose valores significativamente mayores al primer nivel ensayado.

La relación β -caroteno: clorofila a, aunque fue muy baja, respecto al resto de las longitudes de onda, varió con la concentración de nitrato, siendo significativamente mayor en los cultivos con 0 y 0.5 mM de nitrógeno, y con

Tabla XXIII. Relación entre los diferentes pigmentos determinados por HPLC. Variación de la composición isomérica del β -caroteno con la concentración de nitrato en cultivos de *Dunaliella salina* establecidos en luz verde a 35, 75 y 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

LUZ VERDE	CONCENTRACIONES DE NITRATO (mM)														
	0			0.5			2.5			5			7.5		
Niveles de irradiancia	35	75	150	35	75	150	35	75	150	35	75	150	35	75	150
<i>todo-trans: 9-cis</i>	0.03	0.05	0.05	-	-	0.04	-	-	0.07	-	-	0.05	-	-	0.06
β -caroteno: α -caroteno	-	-	-	-	-	-	-	-	92.60	-	-	138.21	-	-	97.25
β -caroteno: <i>clorofila a</i>	0.53	5.89	4.55	0.07	5.55	0.98	0.07	1.67	1.33	0.08	0.25	1.23	0.05	0.05	1.11
<i>clorofila a: clorofila b</i>	5.45	3.33	3.00	4.75	3.31	3.67	7.98	4.05	3.35	4.21	3.47	4.22	4.39	4.42	4.77
<i>luteína: β-caroteno</i>	0.25	0.03	0.07	1.06	0.04	0.10	1.27	0.07	0.10	0.73	0.4	0.09	1.88	1.62	0.05
<i>luteína: clorofila a</i>	0.13	0.12	0.24	0.08	0.16	0.08	0.09	0.10	0.10	0.06	0.08	0.09	0.09	0.06	0.05

(-) no se pudo determinar por la baja concentración de α -caroteno y del isómero *todo-trans*.

Tabla XXIV. Relación entre los diferentes pigmentos determinados por HPLC. Variación de la composición isomérica del β -caroteno con la concentración de nitrato en cultivos de *Dunaliella salina* establecidos en luz roja a 35, 75 y 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

LUZ ROJA	CONCENTRACIONES DE NITRATO (mM)														
	0			0.5			2.5			5			7.5		
Niveles de irradiancia	35	75	150	35	75	150	35	75	150	35	75	150	35	75	150
<i>todo-trans: 9-cis</i>	0.15	0.16	0.18	0.14	0.15	0.15	0.06	0.05	0.05	0.06	0.06	0.05	0.07	0.06	0.06
β -caroteno: α -caroteno	27.35	23.86	-	14.26	-	-	13.80	-	-	13.70	-	-	15.63	-	-
β -caroteno: <i>clorofila a</i>	5.75	4.11	8.06	2.87	0.46	6.51	2.98	0.12	0.09	2.95	0.11	0.07	3.17	0.12	0.11
<i>clorofila a: clorofila b</i>	5.26	4.81	3.16	5.69	5.71	2.93	5.89	4.92	4.73	5.79	4.93	4.84	6.66	5.36	2.09
<i>luteína: β-caroteno</i>	0.05	0.09	0.02	0.06	0.34	0.07	0.06	1.10	1.15	0.06	1.17	1.06	0.05	1.16	0.89
<i>luteína: clorofila a</i>	0.25	0.26	0.16	0.15	0.13	0.32	0.16	0.11	0.09	0.15	0.12	0.06	0.15	0.12	0.10

(-) no se pudo determinar por la baja concentración de α -caroteno.

la irradiancia espectral, siendo significativamente mayores los valores alcanzados a 75 y 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respecto 35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

La relación luteína: caroteno varía con la concentración de nitrato, detectándose valores significativamente mayores a 7.5 mM que en el resto de las concentraciones; y con la irradiancia, siendo mayores los valores obtenidos a 35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; mientras que la relación luteína: clorofila a fue significativamente mayor en los cultivos establecidos a 0 mM, detectándose, además, diferencias significativas entre los valores alcanzados a 0.5 mM y 7.5 mM; sin embargo, esta no varía significativamente con la irradiancia.

Luz roja

En condiciones de luz roja la relación entre los isómeros varió significativamente con la concentración de nitrato, alcanzándose los mayores valores en los cultivos con 0 y 0.5 mM, siendo éstos, además, diferentes entre sí. Cuando la concentración de nitrato aumenta se ve afectada la concentración de ambos isómeros, siendo más drástico el descenso en la concentración del todo-*trans*; sin embargo, la irradiancia espectral no afectó significativamente la relación todo-*trans*: 9-*cis* en el intervalo 35-150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tabla XXIV).

La relación clorofila a: clorofila b no varió significativamente con la concentración de nitrato; sin embargo, respecto a la irradiancia existen diferencias entre los valores alcanzados a los tres niveles ensayados; como comportamiento general, hay una disminución de ésta con el aumento de la irradiancia.

La relación β -caroteno: clorofila a obtenida en los cultivos con 0 y 0.5 mM fue significativamente diferente entre sí, y respecto al resto de las concentraciones; por otra parte, de forma general, ésta aumenta cuando la irradiancia varía desde 35 a 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Tabla XXV. Relación entre los diferentes pigmentos determinados por HPLC. Variación de la composición isomérica del β -caroteno con la concentración de nitrato en cultivos de *Dunaliella salina* establecidos en luz día con rojo lejano a 35, 75 y 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

ROJO LEJANO	CONCENTRACIONES DE NITRATO (mM)														
	0		0.5		2.5		5		7.5		7.5				
Niveles de irradiancia	35	75	150	35	75	150	35	75	150	35	75	150	35	75	150
todo-trans: 9-cis	0.17	0.11	0.09	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.06	0.13	0.13	0.06	0.13	0.06
β -caroteno: α -caroteno	20.09	28.66	47.94	24.50	28.82	41.81	-	14.93	19.01	-	15.18	18.66	-	12.12	16.97
β -caroteno: clorofila a	50.00	76.26	92.95	10.00	33.33	59.37	0.80	1.41	8.86	1.16	1.64	8.00	0.90	1.45	8.00
clorofila a: clorofila b	5.36	5.93	5.88	3.03	4.50	4.95	2.66	4.87	4.94	2.73	2.98	4.92	2.88	3.00	4.40

(-) no se pudo determinar por la baja concentración de α -caroteno.

La relación luteína: β -caroteno fue significativamente menor en los cultivos establecidos con 0 y 0.5 mM de nitrato respecto al resto de las concentraciones; ésta aumentó con el nivel de irradiancia espectral, existiendo diferencias significativas entre el primer nivel y el resto de los niveles ensayados.

La relación luteína: clorofila fue mayor en los cultivos con 0 y 0.5 mM de nitrato, respecto al resto de las concentraciones ensayadas; sin embargo, la irradiancia espectral no tiene un efecto significativo sobre esta relación.

Si se compara los valores de la relación luteína: β -caroteno con los que se obtienen en luz azul y verde el orden sería GL > RL > BL. Mientras que la relación luteína: clorofila es mayor sigue un orden creciente a la inversa, es decir, BL > RL > GL.

Luz día con rojo lejano

Respecto a la luz día con rojo lejano, los valores de la relación entre los isómeros *todo-trans*: *9-cis* obtenida con 0 y 0.5 mM de nitrato, fueron significativamente diferentes entre sí e inferiores al resto de las concentraciones ensayadas en los cultivos con $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Mientras que en el resto de las irradiancias la relación no varió significativamente con la concentración de nitrato. Por otra parte, la irradiancia espectral, no afecta significativamente esta relación hasta los $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sin embargo, a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ los valores disminuyen significativamente (Tabla XXV).

La relación clorofila a: clorofila b no está afectada significativamente por ninguno de los factores ensayados en condiciones de luz día con rojo lejano. La relación β -caroteno: clorofila a es mayor en los cultivos con 0 y 0.5 mM; mientras que la irradiancia no la afecta significativamente.

Como comportamiento general, la longitud de onda afecta significativamente la relación entre los isómeros del β -caroteno en *D. salina*, existiendo de forma general, diferencias significativas entre la luz verde y el

resto de las longitudes de onda. Por otra parte, los mayores valores de esta relación se obtienen en luz azul, éstos varían entre 0.07 y 0.21 (Tabla XXII-XXVI). Además, existen diferencias entre los valores que se alcanzan en luz día con rojo lejano, que son significativamente mayores que los de la luz día y luz roja.

Desde el punto de vista estadístico es importante señalar que existe interacción entre los tres factores analizados ($P = 0.000$) respecto a la composición isomérica del β -caroteno y a la relación clorofila a: clorofila b.

RELACIÓN β -CAROTENO:CLOROFILA a

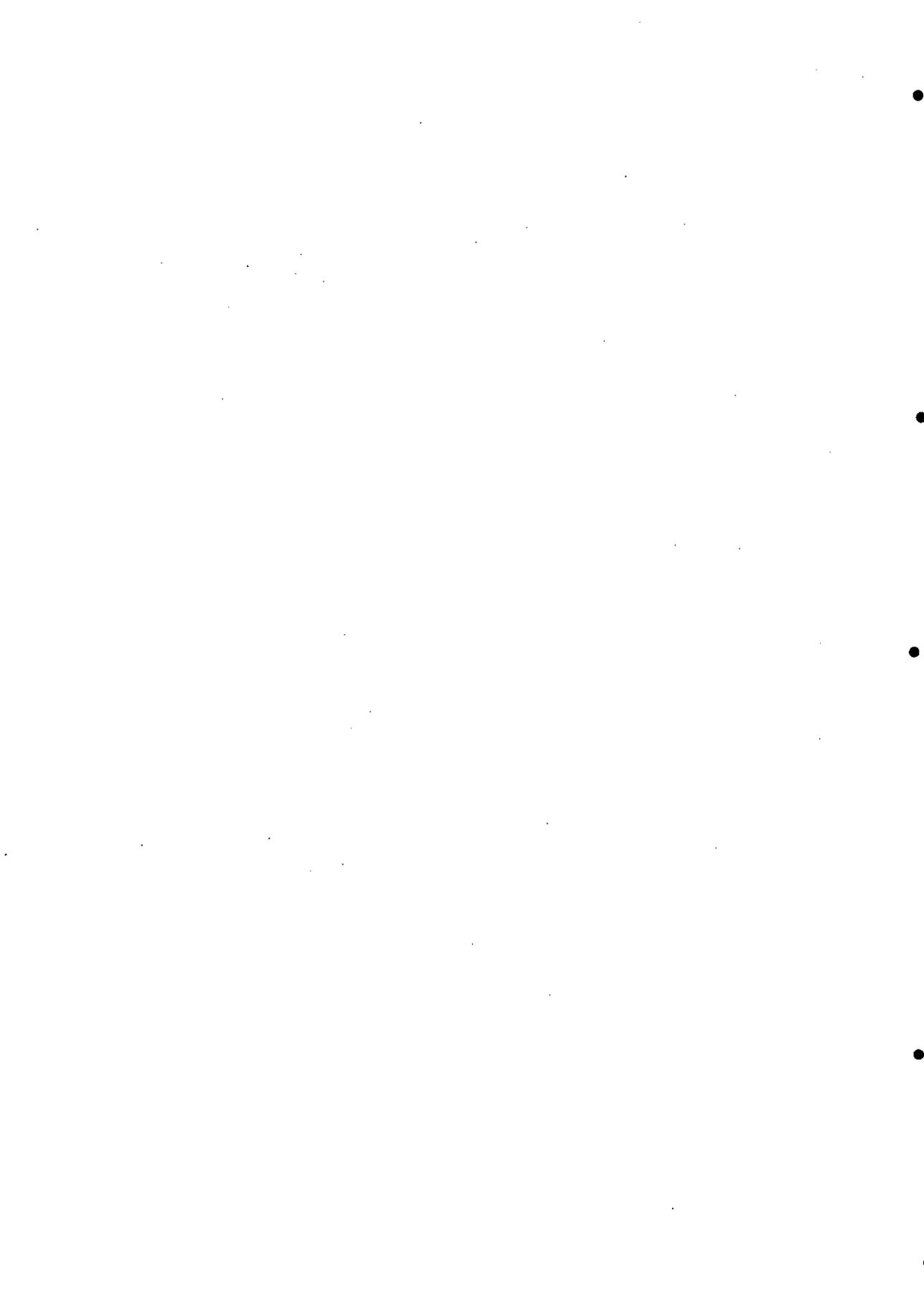
Aunque esta relación fue descrita para cada intervalo de longitudes de onda, existe una tendencia general de comportamiento; ésta difiere significativamente en los cultivos con 0 y 0.5 mM de nitrato entre sí, y respecto al resto de las concentraciones ensayadas, siendo mayor en los primeros. Además, aumenta con la irradiancia espectral, existiendo diferencias significativas entre los valores que se alcanzan a los tres niveles ensayados. En los cultivos con luz día a $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se obtienen valores desde 68.58, en ausencia de nitrato, hasta 0.87 en los cultivos con 7.5 mM; mientras que en estas mismas condiciones pero con 5 mM de nitrato, la relación varía con el nivel de irradiancia espectral desde 0.71 a 19.77 (Tabla XXI-XXV).

Respecto a la influencia de la longitud de onda, los mayores valores de esta relación se obtienen en los cultivos con luz día y luz día con rojo lejano, valores que difieren del resto de las longitudes de onda. Se detectan, además, diferencias significativas entre los valores alcanzados en luz azul, respecto a la luz verde y la luz roja (Tabla XXI-XXV).

Por otra parte, esta relación está correlacionada con la relación caroteno: proteína ($r^2 = 0.76$, $P < 0.001$).

Para la relación β -caroteno: clorofila existe interacción entre la longitud de onda y la concentración de nitrato ($P = 0.000$), entre la irradiancia y la longitud de onda ($P = 0.000$), y entre la irradiancia y la concentración de nitrato ($P = 0.01$).

5.- *Discusión*



Durante las últimas décadas la utilización de las microalgas ha ganado interés. Éstas han sido utilizadas como modelo biológico en la investigación fundamental por su flexibilidad metabólica y características fisiológicas. El desarrollo de la biotecnología microalgal ha permitido no sólo el desarrollo a escala comercial de cultivos de nuevas especies, sino la ampliación de la lista de aplicaciones de estos microorganismos y las sustancias de interés químico, farmacéutico e industrial que de ellas se extraen.

La microalga *Chlorella vulgaris* ha sido muy utilizada como materia prima para la obtención de bioderivados, sin embargo, su aplicación más generalizada es como SCP (Single Cell Protein). En los últimos años han aparecido trabajos sobre la aplicación en biomedicina de los extractos acuosos de esta microalga (Hasegawa, 1990; Ibusuki y Minamishima, 1990; Tanaka, 1990); mientras que la utilización de los pigmentos no ha sido de interés comercial, por el contrario, los feofórbidos presentes en la biomasa procesada constituyen una limitación para su utilización ya que éstos producen, después de su ingestión, irritaciones de la piel en humanos debido a fenómenos de fotosensibilización. El Ministerio de Salud de Japón ha fijado el límite de feofórbidos en productos de *Chlorella*, en 100 mg por 100 g de alga (Becker, 1988); de aquí que sea necesario despigmentar la biomasa destinada a la elaboración de tabletas, lo que además de minimizar el riesgo de exceder los límites de feofórbidos, mejora la aceptabilidad de las tabletas elaboradas a partir de esta microalga.

El secado por aspersion es el método más común de procesar la biomasa, con una eficiencia y un coste comparable al secado de tambor (0.5-1 dólares kg⁻¹) (Becker, 1994); la biomasa procesada es un polvo fino y uniforme con una humedad residual baja. Este tipo de secado permite tiempos cortos de exposición a temperaturas inferiores a las que se necesitan con un secador de tambor; sin embargo, puede causar deterioros significativos en la composición pigmentaria o de vitaminas, por lo que es recomen-

dable la adición previa de antioxidantes (Becker, 1994), lo que encarece el proceso de obtención de biomasa seca para su posterior utilización.

El aporte de pigmentos al peso seco de la biomasa seca de *C. vulgaris* obtenida a partir de los cultivos a gran escala (1.87-2.24%) (Tabla II) coinciden con los valores citados por Brown *et al.* (1989). Considerando los feopigmentos el aporte es mayor: 6.08-7.05%; por lo que se infiere que el procesamiento de la biomasa mediante el secado por aspersión ("spray dryer") afecta significativamente a sus cualidades, provocando la degradación de las clorofilas.

El extracto alcohólico que resulta de la despigmentación de la biomasa seca es, por tanto, una mezcla de productos de degradación de pigmentos, con un alto contenido de feofórbidos, por lo que constituye un subproducto en la fabricación de tabletas a partir de biomasa de *C. vulgaris*.

La obtención del EHC (Extracto Hidroalcohólico de Cuproclorofilinas) a partir de este extracto alcohólico de pigmentos que resulta de la despigmentación de la biomasa de *C. vulgaris* puede explicarse con las relaciones entre la clorofila y sus derivados (Fig. 35), propuestas por Moreno y Yusta (1967).

Desde el punto de vista químico la clorofila está constituida por un núcleo porfirínico formado por cuatro anillos pirrólicos (clorina), unidos covalentemente por un átomo central de magnesio, además de una larga cadena hidrófoba de 20 átomos de carbono, que no es más que el fitol, un alcohol terpénico con fórmula $C_{20}H_{40}O$, responsable de la liposolubilidad de la molécula.

Por hidrólisis ácida la clorofila pierde el átomo de magnesio, dando lugar a la feofitina; el tratamiento posterior con una sal de cualquier metal permite, nuevamente, la formación del enlace metalorgánico, siempre que se ajuste al hueco del anillo de clorina. La inserción del Mg en la molécula de

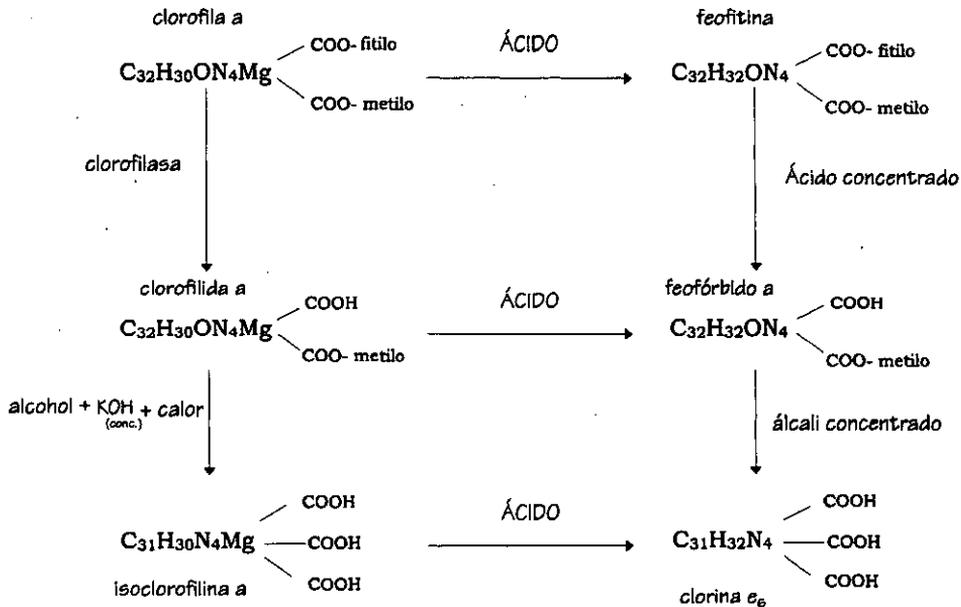


Figura 35. Relaciones entre la clorofila y sus derivados según Moreno y Yusta (1967).

clorofila se debe a una quelatasa, sin la cual este enlace no sería posible debido a la mayor afinidad del anillo por los iones de los metales de transición del primer grupo como: Zn^{2+} , Cu^{2+} y Fe^{2+} (Fráustico da Silva y Williams, 1991), de aquí que la inserción del Cu^{2+} en el anillo de clorina libre de Mg, sea un proceso relativamente rápido, manifestándose un cambio de color inmediato en la solución utilizada como materia prima, que pasa de un color pardo a un verde brillante.

Por acción de un álcali en frío, se libera una molécula de metanol proveniente del anillo de ciclopentanona y se libera, además, el fitol, formándose la sal del ácido clorofilínico. Esta sal que conserva el átomo metálico es la clorofilina que, a diferencia de la clorofila, es hidrosoluble. Si la hidrólisis no es completa el fitol no se libera y la molécula conserva la liposolubilidad. Una hidrólisis básica drástica puede provocar la ruptura del anillo de clorina con la consiguiente formación de derivados que carecen de interés tecnológico. El producto final puede estar contaminado con ceras, aceites, lecitinas

y carotenoides, los que pueden ser separados por su interés económico. En el EHC no se detecta contaminación por carotenoides, por el contrario, ésta aparece en el preparado comercial; dicha fracción se elimina después de la separación de fases incluida en la metodología de obtención.

A pesar de que la metodología propuesta no implica la aparición de productos contaminantes, en lo que a la aparición de derivados o productos de la degradación de pigmentos respecta (Fig. 9), la extracción alcohólica puede arrastrar otros componentes de la biomasa, por lo que se determinó la presencia de contaminantes lipídicos en el extracto; esta fracción representa un 0.04%, lo que puede estar relacionado con la presencia del fitol y productos de degradación, así como de ácidos grasos de la biomasa de *C. vulgaris*.

Se conoce la existencia de patentes en las que se obtiene sal disódica de cuproclorofilinas a partir de hojas de bambú, ortiga y plantas medicinales (Kilyén *et al.*, 1983; Gurinovish *et al.*, 1985; Utokiana y Tidzoko, 1985). En todos los casos la metodología de obtención implica calentamiento, lo que trae consigo la aparición de numerosos compuestos no deseados en los preparados comerciales; las metodologías propuestas tienen como desventajas la limitación de la materia prima, una fase de extracción primaria poco factible dependiendo de la materia prima utilizada, y un proceso final de recuperación del solvente de extracción, que en cierto modo quedan resueltas en la patente de Kilyén *et al.* (1983). Los preparados comerciales son, por tanto, una mezcla de diferentes productos de degradación de la clorofila, entre los que están la isoclorina e_4 , 2-a hidroximesoisoclorina e_4 , pirofeofórbido, rodoclorina, 2-a hidroximesorrodoclorina, purpurina₁₈ y concentraciones despreciables de clorina e_6 (Strell *et al.*, 1955).

La calidad del derivado clorofilico depende, fundamentalmente, de la prevención de alomerizaciones, es decir, hidrólisis y ruptura del anillo, las que no se producen en presencia de ácido oxálico ($C_2H_2O_4$) (Villar y Santos, 1970), de aquí que, a diferencia de las metodologías de obtención de los derivados cúpricos de clorofilinas descritas en las patentes revisadas (Kilyén

et al., 1983; Gurinovish *et al.*, 1985; Utokiama y Tidzoko, 1985), en la metodología propuesta se use este ácido orgánico en vez del HCl.

El extracto tiene una concentración importante de sodio, lo cual es lógico ya que se trata de una sal disódica de cuproclorofilinas cúpricas; además, puede haber cualquier exceso de NaOH, teniendo en cuenta el pH del extracto. Contiene además, cantidades significativas de Cu, del cual sólo trazas corresponden a Cu libre, por lo que está dentro de los límites aceptados por la FAO en caso de que el producto se ingiera: 200 mg kg⁻¹ de peso corporal (Bobbio y Guedes, 1990); por tanto, la presencia de Cu no implica riesgo alguno para la utilización del EHC como antiséptico tópico en la mucosa bucal o en preparaciones farmacéuticas como colutorios, gárgaras, cremas o geles dentales, referido ésto a cualquier ingestión accidental.

Además del Cu, otro de los metales que afectan los tejidos blandos es el Zn, el cual aparece en una concentración de 4 mg l⁻¹ (Tabla IX), lo que puede estar asociado a contaminación de los productos comerciales utilizados durante el proceso de obtención del EHC; el Fe, también aparece en pequeñas concentraciones. La presencia de Ni puede deberse a la contaminación de los reactivos comerciales, o bien a restos del medio de cultivo en la biomasa utilizada como materia prima, al igual que las trazas de Ca, Co y Mn. El Pb, perteneciente al segundo grupo de metales tóxicos, localizados generalmente en huesos y muy buscado en preparaciones farmacéuticas por los riesgos que ocasiona su presencia, aparece como traza en el EHC. El Al, As, Sn, Cd y Hg, no aparecen en el extracto, lo que constituye una ventaja teniendo en cuenta el efecto tóxico de éstos.

La pequeña concentración de Mg que se detecta en el extracto podría estar asociada a restos de clorofila sin transformar; sin embargo, no se detecta la clorofila en los análisis por HPLC por lo que la hipótesis no es válida; otra posibilidad es la presencia de restos de medio de cultivo en la biomasa utilizada para la extracción del extracto alcohólico de pigmentos, o bien que quede como contaminante del proceso de obtención. La presencia de Mg en

el extracto puede ser ventajosa teniendo en cuenta su papel como regulador biológico del ciclo celular y su acción en la prevención de la carcinogénesis (Mori *et al.*, 1992).

La sal disódica de cuproclorofilinas se usa en geriatría para reducir olores fecales, urinarios o corporales (Young y Beregi, 1980; Nahata *et al.*, 1983); existen evidencias de su utilidad en la cicatrización de heridas (Krasnikova, 1973) y en el tratamiento de cálculos de oxalato de calcio (Tawashi *et al.*, 1982). Además de estas propiedades, se cita su actividad antimutagénica en ensayos de genotoxicidad a corto plazo tanto *in vitro* como *in vivo* (Ong *et al.*, 1986), debido a que su interacción con agentes mutagénicos, disminuye la biodisponibilidad de éstos (Dashwood *et al.*, 1991).

Por otra parte, las clorofilas y cuproclorofilinas cúpricas son dos de los pigmentos porfirínicos aceptados como colorantes alimentarios (E140 y E141) (Coulson, 1980); sin embargo, la estabilidad de los complejos cúpricos es mayor (Bobbio y Guedes, 1990). El Cu, con un peso atómico de 63.54, 2.6 veces mayor que el del Mg, con 24.31, es un metal de transición; su utilización en forma Cu^{2+} implica la presencia de 9 electrones en los orbitales 3d, por lo que forma un enlace covalente más energético y, por tanto, mucho más estable que el del Mg. El EHC obtenido a partir de *C. vulgaris* mantiene un color estable a valores de pH entre 3 y 11, mantiene su color cuando se expone a altas intensidades de luz y temperaturas hasta 50°C.

El extracto fue evaluado como desinfectante y antiséptico; para ello se realizaron los ensayos microbiológicos recomendados por las normas del INHE (Chiong *et al.*, 1985), utilizando como microorganismos de ensayo: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. El EHC fue más efectivo que el alcohol al 70% frente a todos los microorganismos ensayados, y tan efectivo como el fenol al 2% para *E. coli* y *P. aeruginosa*.

El extracto es activo como desinfectante, garantizando la acción letal en 1 min de exposición; sin embargo, en presencia de interferencias como jabón y/o proteínas, contaminantes comunes en cualquier proceso de desinfección, hay pérdida de efectividad en el tiempo de acción letal del producto sobre los microorganismos ensayados y no se verifica hasta los 5 min de exposición.

El EHC es efectivo en la desinfección química de las ropas; sin embargo, el inconveniente fundamental es que además de su acción desinfectante, actúa como colorante, lo cual es importante a tener en cuenta para su posible aplicación.

El EHC al 0.7% en solución hidroalcohólica actúa como un desinfectante de amplio espectro con un tiempo de acción letal de 5 min, lo cual se deduce a partir de los resultados del espectro bactericida y de los resultados del test de desinfección de superficies, con el que se garantizó un 100% de muerte después de 1 min de exposición.

El extracto fue evaluado además como antiséptico; para ello se realizó el test de desinfección higiénica y quirúrgica de las manos, y el test de desinfección de la piel sana. De acuerdo con los resultados obtenidos el EHC actúa sobre los microorganismos ensayados con una efectividad mucho mayor que el límite establecido en la norma cubana (Chiong *et al.*, 1985), que es del 60%. En todos los experimentos la efectividad fue mayor que 94%.

Los resultados demuestran la utilidad práctica del EHC obtenido a partir de *C. vulgaris* como desinfectante y antiséptico.

La obtención de un extracto de cuproclorofilinas a partir de microalgas ofrece las ventajas inherentes de la materia prima, referido a productividad, rendimiento y fácil extracción. Por otra parte, el EHC se obtiene a través de un diagrama operativo relativamente sencillo (Fig. 5) que puede adaptarse a un diagrama integrado de extracción de bioderivados; además de valorizar la

biomasa, puesto que la materia prima para su obtención es un subproducto del proceso de obtención de tabletas a partir de *C. vulgaris*. Además de estas ventajas, es un antiséptico de origen natural, por lo que tiene ventajas sobre otros en el mercado, teniendo en cuenta que en los últimos años los productos naturales han desplazado a muchos productos sintéticos.

El extracto hidroalcohólico de cuproclorofilinas puede ser obtenido a partir de cualquier otra especie de microalga que tenga un contenido significativo de clorofilas.

La biomasa de *C. vulgaris* se utilizó, además, para la obtención del extracto acuoso (EC), del que se conocen numerosas aplicaciones; sin embargo, su caracterización no está tratada a fondo en la literatura. Por otra parte, se evalúa su utilización en el cultivo de células vegetales y microorganismos, aplicaciones que no están citadas hasta el momento. La microalga *C. vulgaris* ha sido una de las especies más estudiadas en investigaciones relacionadas con la extracción de sustancias biológicamente activas, por las cualidades de su biomasa y la versatilidad de sus cultivos. De forma particular, la industria de explotación de *Chlorella* se ha desarrollado en Japón y Taiwan, destinando la biomasa, fundamentalmente, a su uso como suplemento dietético y, en general, para la salud (Richmond, 1986c).

Los medios de cultivo naturales son ricos en compuestos solubles orgánicos e inorgánicos, y muy prácticos por su fácil obtención y aplicabilidad industrial, a pesar de su variable composición. Los extractos crudos pueden contener, según la especie de microalga y su composición específica: carbohidratos, aminoácidos, péptidos, proteínas, vitaminas y otros factores de crecimiento, en proporciones variables, lo que está estrechamente relacionado con la metodología de extracción y las condiciones de cultivo.

El extracto acuoso obtenido a partir de *C. vulgaris* (EC) con un rendimiento del 15.5% respecto a la biomasa seca, tiene una concentración proteica de 2.48 mg ml⁻¹, superior a la de carbohidratos (1.1mg ml⁻¹), de aquí

que se le dé mayor importancia. El espectro UV-visible mostró un máximo de absorción cercano a 280 nm (278 nm), lo que puede estar relacionado tanto con el aporte proteico, como con la presencia de bases purínicas o pirimidínicas de los ácidos nucleicos, que absorben fuertemente entre 260 y 280 nm, y que representan un 9% del residuo sólido del extracto. Por otra parte, el extracto no tiene una composición iónica equilibrada, referido al Na y el K. La presencia de Mg, Cu, Zn y trazas de Fe, Ni y Mn, puede deberse a restos del medio de cultivo empleado, no eliminados totalmente durante los lavados celulares, o bien a componentes celulares que pasan a la solución durante el proceso de obtención de dicho extracto.

A partir del extracto acuoso se purificó la fracción proteica, realizando precipitaciones con diferentes agentes. Se realizó una precipitación por salado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, una precipitación con etanol al 70%, una con acetona fría y por último se precipitó con TCA (ácido tricloroacético) al 10%, para comparar cuál de los métodos permitía una mejor purificación; obteniéndose los mejores resultados con etanol al 70%. Aunque se utiliza el término fracción proteica, la metodología de obtención no permite la recuperación de proteínas intactas, ya que implica calentamiento de las células hasta cerca de 100°C; por otra parte, debido a las características de la pared celular de *C. vulgaris*, el tratamiento no provoca ruptura celular, por lo que en última instancia, se pueden extraer solamente compuestos de bajo peso molecular.

Se obtienen tres péptidos con un peso molecular de 12.4, 16.6 y 18.6 kDa. Soong (1980) describe la presencia en el extracto de *C. vulgaris*, de un nucleopéptido de carácter ácido, con un peso molecular menor de 15 kDa, al que denomina CGF (*Chlorella* Growth Factor), en células que crecen en presencia de luz, que podría ser el péptido de menor peso molecular obtenido. El análisis de aminoácidos de esta fracción permite detectar un alto contenido de ácido aspártico y glutámico, lo que le daría un carácter ácido a la fracción; de aquí la descripción hecha por Soong, el que además refiere que precipita con sales de bario.

Por otra parte, el análisis de aminoácidos libres en el extracto crudo permite detectar la presencia de tres aminoácidos esenciales: lisina, histidina y leucina, además de una concentración importante de ácido glutámico, significativamente superior al resto de los aminoácidos presentes en el extracto; siendo importante además el contenido de alanina, prolina, aspártico y serina; sin embargo, existe un déficit del resto de los aminoácidos. En la biomasa de *C. vulgaris*, el aminoácido mayoritario es el ácido glutámico, seguido por la leucina, la alanina y el aspártico (Becker, 1988), por lo que es lógico que sea el ácido glutámico el aminoácido más importante en el EC. El carácter ácido del extracto puede estar relacionado con el alto contenido de este aminoácido. Por otra parte, la reacción de degradación del ácido glutámico a oxoglutarato es de vital importancia en la biosíntesis de cualquier aminoácido para cualquier especie. La transaminación de los α -oxoácidos con el glutámico como donador de grupos amino constituye la vía principal de introducción de éstos en la biosíntesis de la mayoría de los aminoácidos.

El extracto de *C. vulgaris* fue evaluado como medio de crecimiento para diferentes microorganismos con resultados satisfactorios. Las formulaciones preparadas a partir del EC, tanto sólidas como líquidas, tienen utilidad en la práctica microbiológica. Desde el punto de vista nutricional, el extracto permite el crecimiento de *Serratia sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y una levadura a altas diluciones, lo que podría justificarse por la presencia de sustancias reguladoras del crecimiento capaces de mantener su actividad biológica aún en pequeñas concentraciones.

En el caso del *P. mirabilis*, el medio formulado inhibe el crecimiento en velo característico, lo que resulta beneficioso para su aislamiento y diferenciación morfológica. Este efecto puede deberse a una deficiencia de electrolitos en el medio formulado, característica del medio C.L.E.D (Cystein Lactose Deficient Medium) recomendado para bacteriología urinaria, según descripciones que aparecen en el manual de OXOID (1992), lo cual se justifica con

los resultados de la composición elemental descritos con antelación para el extracto estudiado; además de la carencia en el medio de cisteína, lo cual es de esperar teniendo en cuenta que en la biomasa de *C. vulgaris* no se ha detectado la presencia de este aminoácido (Becker, 1988).

El extracto de *C. vulgaris* se compara con el hidrolizado ácido de caseína, preparado que proporciona el material nitrogenado necesario para numerosos medios de cultivo, y con peptona de soja, peptona vegetal preparada por digestión enzimática de la harina de soja, usado en los medios de cultivo de forma universal, incluyendo el cultivo de hongos. La composición de ambos preparados aparece en la tabla XXVI, según datos tomados del manual de OXOID.

El contenido de nitrógeno total es significativamente menor en el EC que en el hidrolizado de caseína y en la peptona de soja; sin embargo, el contenido de nitrógeno orgánico es mayor en el EC que en la peptona de soja y algo menor que en el hidrolizado de caseína. Por otra parte, la peptona de soja contiene un porcentaje importante de carbohidratos, de aquí que sea idónea para muchas finalidades, incluyendo el cultivo de microorganismos exigentes, cuando se requiere un crecimiento rápido y abundante. El EC contiene un porcentaje algo menor de carbohidratos, que no deja de ser importante en su composición, aunque el aporte proteico es mayoritario.

El EC contiene una mezcla de aminoácidos libres y tres péptidos de bajo peso molecular, capaces de permanecer en solución a pesar de las temperaturas alcanzadas durante el proceso de obtención, que le confieren valiosas cualidades nutritivas para los organismos organotróficos, ya que de forma general, el medio funcionaría como un material proteico parcialmente digerido; ésto, además de la contribución de los hidratos de carbono y el aporte de sales minerales. El contenido de ácido glutámico es mayor en todos los casos, respecto al resto de los aminoácidos.

Tabla XVI. Comparación del extracto de *Chlorella vulgaris* con preparados convencionales utilizados en la práctica microbiológica como fuentes de nitrógeno.

	Extracto de <i>Chlorella</i>	Hidrolizado ácido de caseína	Peptona de soja
Nitrógeno total	3.5	8.3	9.3
Nitrógeno orgánico	3.5	4.8	2.2
Carbohidratos (%)	9	-	13.9
Cenizas	38.16	36.6	13.7
pH de una sol. al 2% después de autoclavar	6.3	7.0	7.0
Aminoácidos		(%)	(%)
alanina	5.70	1.64	2.52
<i>arginina</i>		1.68	5.03
ácido aspártico	1.09	4.04	7.94
<i>cistina</i>		0.13	0.80
ácido glutámico	6.18	15.29	14.68
<i>glicina</i>		1.09	2.98
histidina	1.82	0.42	1.70
<i>isoleucina</i>		2.50	2.50
leucina	1.77	4.33	4.46
lisina	2.95	5.14	3.92
<i>metionina</i>		1.85	0.55
<i>fenilalanina</i>		2.89	3.01
prolina	5.52	5.54	3.64
serina	1	0.93	0.68
<i>treonina</i>		1.47	1.38
<i>triptófano</i>		-	0.69
<i>tirosina</i>		2.08	2.36
<i>valina</i>		3.54	3.10
Metales (%)			
<i>K</i>	0.28	0.27	2.90
<i>Na</i>	0.22	13.5	1.10
<i>Mg</i>	0.0001	0.0143	0.2630
<i>Cu</i>	0.00014	0.0001	0.0004
<i>Zn</i>	0.004	0.0025	0.0027
<i>Fe</i>	T	0.0056	0.0207
<i>Ni</i>	T	-	-
<i>Mn</i>	T	0.00003	0.00002
<i>Ca</i>		0.0243	0.0930
<i>Pb</i>	-	< 0.0002	< 0.0002
<i>Sn</i>	-	< 0.002	< 0.002

El contenido de potasio es similar al hidrolizado de caseína; sin embargo, no existe un balance entre el Na y el K en el EC, siendo el contenido de ambos elementos prácticamente idéntico, e inferior respecto al hidrolizado de caseína y la peptona de soja. Respecto al contenido de Mg, Fe y Mn, es mucho menor en el EC; mientras que el de Cu es prácticamente igual para los tres preparados. El Na, K, Mg, Fe y Mn fueron detectados en la biomasa seca de *C. vulagris*. El Pb y el Sn no se detectan en el EC, lo que constituye una ventaja, ya que estos metales pesados impedirían su utilización para otros fines comerciales; en la biomasa, estos metales aparecen en concentraciones ínfimas por lo que es lógico que no aparezcan en el extracto; el Ni, que no aparece en los preparados convencionales, pudiera ser un residuo del medio utilizado en los sistemas de cultivo a cielo abierto, ya que los productos comerciales empleados en el cultivo de microalgas son fabricados por una empresa que explota yacimientos de Ni, por lo que aparece en menor o mayor concentración como contaminante en sus preparados comerciales; de hecho aparece también en la biomasa aunque en pequeñas concentraciones.

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos, y las especificaciones de calidad de los medios de cultivo que se describen en la Norma Cubana 57-94-1 (1986) se verifica la utilidad del EC como medio de cultivo en la práctica microbiológica, para organismos Gram positivos y Gram negativos. Estos resultados fueron corroborados mediante la introducción del EC formulado como medio sólido y líquido, en la rutina de los servicios de microbiología clínica del Hospital Pediátrico Norte de Santiago de Cuba, donde fue utilizado tanto para la toma de muestras como en aislamientos, subcultivos y mantenimiento de microorganismos.

Se evaluó, además, la posible utilidad del extracto en el cultivo de células vegetales, específicamente en el desarrollo de callos embriogénicos de orquídeas del género *Catleya*.

Las orquídeas son plantas tropicales exóticas muy comercializadas que se propagan fácilmente por embriogénesis somática a partir de callos

sembrados en medios de cultivo enriquecidos con reguladores del crecimiento. La micropropagación de orquídeas permite la obtención de 100 plántulas por gramo de callo embriogénico (Morán, C.P.), además de las ventajas de la técnica en sí. Disminuir el coste del medio de cultivo sustituyendo los reguladores del crecimiento por un extracto de origen natural asequible y económico, constituye una excelente alternativa.

En las formulaciones con 50% y 100% de extracto, la concentración de hidratos de carbono podría ser limitante, ya que el medio basal contiene sacarosa al 3%; sin embargo, la diferencia respecto a los valores del peso fresco de los callos entre estas variantes debía ser mayor. Por otra parte, si la limitación fuera sólo por la fuente de carbono deberían existir diferencias significativas entre el control y la formulación con 10% de extracto, siendo menores los valores alcanzados con esta última. Sin embargo, los resultados no justifican que la diferencia entre los pesos frescos se deba solamente a una limitación por el carbono.

De acuerdo con los análisis realizados, el crecimiento puede estar también inhibido por un déficit de sales minerales, que de algún modo satisface las necesidades de la plántula en las formulaciones donde se sustituye sólo parte del medio basal, el cual aporta carbono y sales minerales. Teniendo en cuenta que el crecimiento de embriones somáticos se ve favorecido por una alta concentración de sales minerales (Ammirato, 1983), la limitación del extracto acuoso de *C. vulgaris* puede deberse a un déficit de éstas, lo que se confirma con los resultados obtenidos en su composición elemental por absorción atómica, unido al déficit de la fuente de carbono.

Además de las limitaciones explicadas, a las formulaciones del medio con EC no se les incorporó reguladores del crecimiento, lo que justifica la gran diferencia entre los valores de peso fresco obtenidos.

Según los resultados obtenidos el EC estimula el crecimiento de células vegetales y microorganismos. Su componente mayoritario son las

proteínas, cuya fracción soluble está compuesta por tres péptidos de los cuales el de menor peso molecular (12.4 kDa) coincide con las descripciones hechas por Soong (1980) del factor de crecimiento de *Chlorella* (CGF); sin embargo, los dos péptidos restantes, podrían formar parte de la fracción activa del EC. En la naturaleza existen muchos péptidos biológicamente activos, con actividad estimulante sobre el crecimiento, antibióticos, antioxidantes, inhibidores enzimáticos, entre otras funciones (Yamaguchii *et al.*, 1988), por lo que no se puede descartar la actividad biológica del resto de los péptidos presentes en la fracción proteica del EC.

La utilización del EC como medio de cultivo en la práctica microbiológica y en el cultivo de células vegetales ampliaría las posibilidades de aplicación de éste y contribuiría a valorizar la biomasa de *C. vulgaris*. Por otra parte, permitiría su obtención a partir de biomasa no apta para el consumo humano, ya que en este caso no se podría obtener EC para su utilización en hospitales; por lo que la cosecha no se perdería del todo; desde el punto de vista económico esta aplicación constituiría una alternativa.

En la figura 36 se presenta un diagrama operativo integrado para la producción de bioderivados de interés químico-farmacéutico a partir de *C. vulgaris*; en éste se incluyen la fabricación de tabletas, hidrolizado proteico, extracto de carotenoides, extracto acuoso y extracto hidroalcohólico de cuproclorofilinas. De forma general, se demuestra la versatilidad del cultivo de esta microalga y su potencial para la producción de diferentes sustancias en un único proceso tecnológico.

Sin embargo, la producción de β -caroteno a partir de *Chlorella vulgaris* sería solamente una alternativa, pero desde el punto de vista económico carece de interés, ya que es *Dunaliella salina* la microalga productora de este pigmento por excelencia. Teniendo en cuenta las ventajas de esta microalga para el desarrollo de su cultivo a gran escala se aisló a partir del medio natural y se establecieron cultivos con el objetivo de obtener biomasa rica en β -caroteno, la cual puede ser procesada para la extracción del pigmento o puede

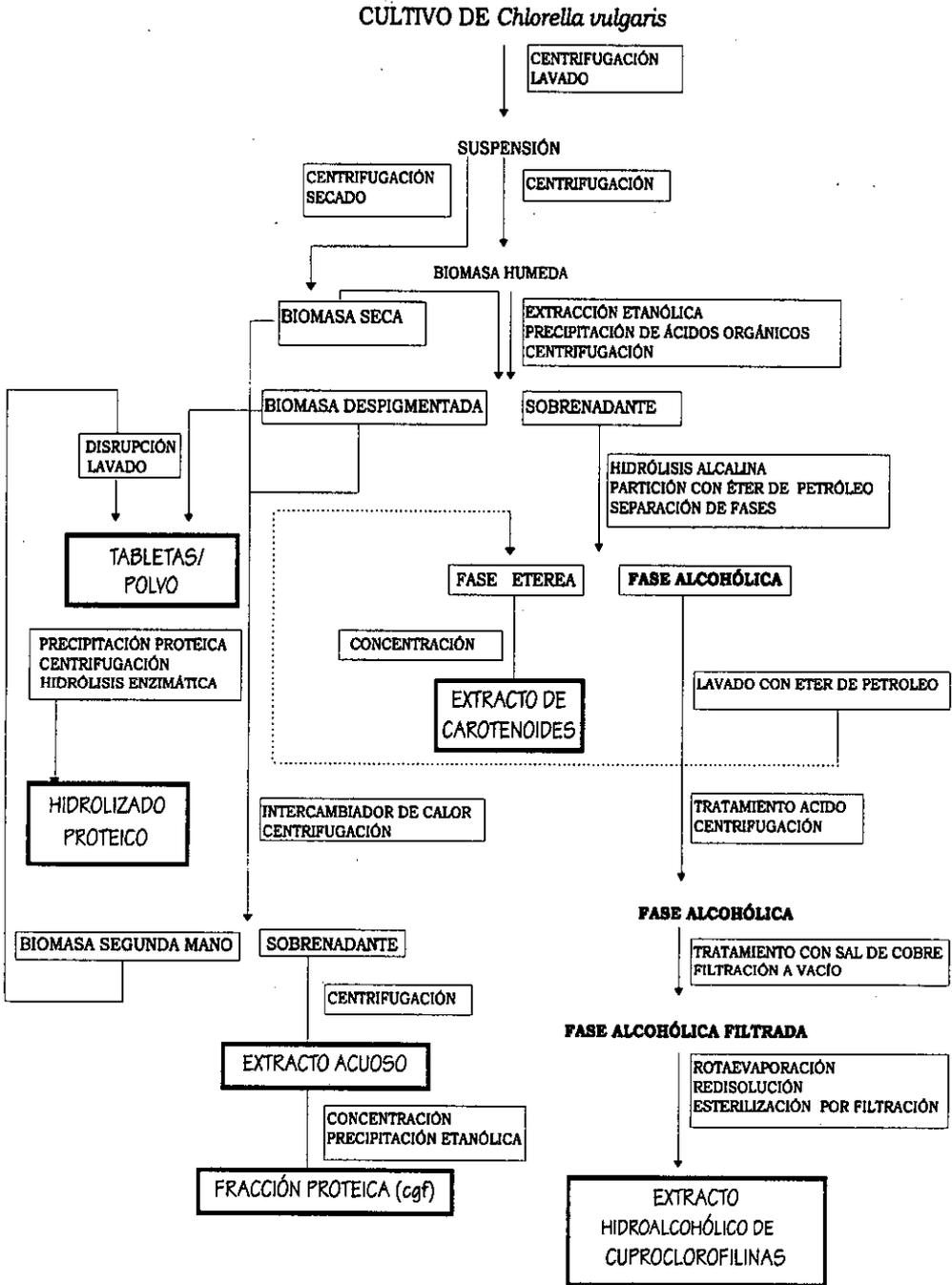


Figura 36. Diagrama operativo integrado para la extracción de productos de interés químico-farmacéutico a partir de *Chlorella vulgaris*.

ser usada directamente en la elaboración de cápsulas para el consumo humano.

La variabilidad bioquímica de numerosas especies de microalgas, en función de factores físicos y químicos, ha hecho posible la manipulación de éstos con el propósito de inducir en los cultivos masivos, la síntesis y acumulación de metabolitos de interés. Mediante la modificación cuantitativa de diferentes nutrientes a partir de un medio de crecimiento óptimo se han obtenido importantes variaciones en cuanto a productividad y composición bioquímica de las microalgas en cultivo. Usualmente, los factores que limitan el crecimiento son: la concentración de nitrógeno, fósforo (Fábregas *et al.*, 1984; Wikfors, 1986; Jiménez y Niell, 1990; Berges *et al.*, 1996), y dióxido de carbono; la luz y la temperatura (Borowitzka y Borowitzka, 1988b; Raven, 1988), además de la presencia de predadores y competidores, en el caso de los cultivos a cielo abierto (Richmond, 1986b). Por otra parte, las modificaciones cualitativas también dan lugar a sustanciales variaciones en cuanto a crecimiento, composición bioquímica (Herrero *et al.*, 1991; Flynn *et al.*, 1992) y actividad enzimática (Jiménez del Río *et al.*, 1994).

La determinación de los factores limitantes para el crecimiento y la productividad es de fundamental importancia en los cultivos comerciales de microalgas (Borowitzka y Borowitzka, 1988b); en estos cultivos el déficit de nutrientes es la causa fundamental de la detención del crecimiento, por lo que las variaciones en la composición bioquímica entre la fase exponencial y estacionaria son similares a las encontradas en células sometidas a deficiencia y suficiencia de nutrientes (Utting, 1985). Los cultivos microalgales limitados por nutrientes son de gran importancia en biotecnología desde el punto de vista de la producción de sustancias de interés químico-farmacéutico e industrial. Las condiciones que favorecen la síntesis y acumulación de algunos metabolitos, generalmente provocan un descenso sustancial en la productividad, por lo que la estrategia de producción a gran escala consiste, fundamentalmente, en cultivar por etapas: primero, es necesario obtener

cultivos con alta densidad celular y luego se induce la síntesis de los metabolitos de interés, bien por manipulación de factores físicos y químicos, realizando la cosecha en la fase estacionaria del crecimiento, o incluso utilizando ambas estrategias.

En el cultivo masivo la productividad aumenta con la concentración de nitrógeno hasta que, probablemente, ésta queda limitada por el aporte de luz (Fábregas *et al.*, 1985a). La luz es uno de los factores ambientales que ejerce mayor influencia sobre los sistemas acuáticos; tanto la intensidad como la longitud de onda pueden controlar la asimilación de nitrato por las células, modulando su incorporación o su reducción, mediante la regulación de la síntesis y actividad de la nitrato reductasa (NR) (Maldonado y Aparicio, 1987).

La iluminación puede cambiar considerablemente en el entorno celular, por lo que la aclimatación del aparato fotosintético a condiciones temporales, constituye la estrategia esencial para la supervivencia de los organismos fotosintéticos (Rüdiger y López-Figueroa, 1992), que pueden vivir con éxito dentro de un amplio intervalo de variaciones de este parámetro (Philips y Mitsui, 1982). Una de las características más importantes a tener en cuenta en las especies de interés comercial para su cultivo masivo es precisamente su capacidad de aclimatación y/o adaptación a las condiciones de iluminación.

Las especies del género *Dunaliella* han sido utilizadas con frecuencia en estudios sobre la variación de diferentes factores ambientales por su gran tolerancia y flexibilidad fisiológica (Ben-Amotz y Avron, 1989a; Jiménez y Niell, 1990). Por otra parte, es bien conocido el desarrollo de cultivos masivos a escala comercial de *D. salina* y *D. bardawil*, con el objetivo de producir β -caroteno (Borowitzka *et al.*, 1984; Ben-Amotz *et al.*, 1988b; Ben-Amotz y Avron, 1989b; Borowitzka y Borowitzka, 1990).

Se han llevado a cabo numerosas investigaciones para estudiar las estrategias adaptativas de especies del género *Dunaliella*, con el objetivo de

favorecer la acumulación masiva de este pigmento. Se conocen trabajos en los que se ha estudiado el efecto de la concentración de nitrógeno sobre las células en cultivo de *Dunaliella* (Ben-Amotz *et al.*, 1982; Ben-Amotz y Avron, 1983b), así como la influencia de la longitud de onda sobre el crecimiento y la composición pigmentaria de esta microalga (Ben-Amotz y Avron, 1989b). Por otra parte, se ha demostrado que el aumento de la irradiancia espectral produce la acumulación de grandes cantidades de β -caroteno (Borowitzka *et al.*, 1984; Lers *et al.*, 1990). Se ha estudiado además, la interacción entre factores como el déficit de nitrógeno y la irradiancia espectral (Ben-Amotz, 1987; Lers *et al.*, 1990; Tan *et al.*, 1993); la longitud de onda y la irradiancia (Ben-Amotz y Avron, 1989b) y la longitud de onda y la fuente de nitrógeno (Pirson y Kowallik, 1960); sin embargo, se ha prestado menor atención a la interacción entre los tres factores.

Dunaliella salina crece a concentraciones salinas hasta 5 M, siendo el crecimiento óptimo a 2 M; a esta concentración se detecta, además, la velocidad fotosintética máxima; sin embargo, a 1 M es mínima (Post *et al.*, 1983; Jiménez *et al.*, 1990). Los cultivos se establecieron a una concentración salina de 1.5 M, que es el término medio entre el crecimiento máximo y mínimo.

La luz continua se utilizó con el objetivo de evitar fenómenos de aclimatación a bajas intensidades, característicos de células cultivadas en ciclos nictimerales (Toro, 1989), lo que podría afectar la interpretación de los resultados en los experimentos donde se ensaya el efecto de los diferentes niveles de irradiancia espectral. Por otra parte, la luz continua es más efectiva en la formación de carotenoides que el ciclo nictimeral (Kobayashi *et al.*, 1992) o un ciclo de luz:oscuridad 10:14 (Ben-Amotz y Avron, 1983b). La mayoría de los trabajos sobre la interacción entre distintos nutrientes limitantes y entre éstos y la intensidad luminosa han sido realizados con luz continua. El efecto de la utilización de ciclos luz: oscuridad es aún un punto de debate.

En los cultivos de *D. salina* el número de células aumenta proporcionalmente con la concentración de nitrato dentro de la radiación fotosintéticamente activa (400-700 nm) y a longitudes de onda mayores que 700 nm, correspondientes al rojo lejano, al igual que las tasas de crecimiento. Las mayores densidades celulares se obtienen a partir de los 2.5 mM de nitrato, siendo óptimas las concentraciones 5 y 7.5 mM, indistintamente (Fig. 13-17). Existe, además, un efecto claro de la intensidad de la luz sobre los parámetros del crecimiento para todas las longitudes de onda; éstos mejoran con la irradiancia espectral dentro del intervalo ensayado ($35-150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), obteniéndose los mayores valores a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Similares resultados fueron citados para *D. bardawil* cultivada en condiciones de luz blanca (Ben-Amotz, 1986; Tan *et al.*, 1993).

El nitrógeno es necesario para la biosíntesis de proteínas y ácidos nucleicos; su déficit conduce, desde el punto de vista metabólico, a la acumulación de grandes cantidades de sustancias de reserva como lípidos y carbohidratos (Becker, 1994) y a una redistribución del nitrógeno celular, que conlleva la degradación de la reserva de aminoácidos y otros compuestos ricos en nitrógeno, como las clorofilas (Hipkin y Syrett, 1977); en ausencia de nitrato cesa la división celular (Ben-Amotz y Avron, 1983b; Levy y Gantt, 1990).

Se han descrito dos tipos de respuestas a factores limitantes relacionadas con la tasa de crecimiento: la de tipo I, en la que se reduce el rendimiento final manteniéndose constante la tasa de crecimiento, típica de plantas terrestres; y la de tipo II, en las que la reducción del nutriente limitante provoca una disminución de la tasa de crecimiento, acompañado o no de una reducción del producto final. Ambas respuestas han sido descritas para microalgas; sin embargo, en los sistemas acuáticos el modelo adecuado es el tipo II, ya que los nutrientes se reciclan rápidamente (O'Brien, 1972).

En los cultivos de *D. salina* las células responden a la deficiencia de nitrato según el modelo II, existiendo una fuerte correlación entre este factor

y la tasa de crecimiento. Droop (1968) y Caperon y Meyer (1972) demostraron que, bajo limitación de nutrientes, la tasa de crecimiento está altamente correlacionada con la concentración intracelular del nutriente limitante, dando lugar a lo que se conoce como modelo de crecimiento de cuota intracelular. El desarrollo de dicho modelo está relacionado con el desacoplamiento entre la absorción del nutriente limitante y el crecimiento, en condiciones de fuerte limitación (McCarthy y Goldman, 1979).

Cuando una población microalgal es privada de nitrógeno la tasa de división celular decrece y el carbono fijado fotosintéticamente es desviado hacia la síntesis de productos de reserva a expensas de la síntesis proteica, la cual decrece debido a la baja disponibilidad de nitrógeno (Mykkestad, 1988). La baja concentración celular de proteínas se ha asociado fundamentalmente con el déficit de nitrógeno (Healey, 1975; Ben-Amotz, 1987), tanto en cultivos experimentales como en condiciones naturales, especialmente en los "blooms" (Barlow, 1984), con el aumento de la concentración de carbohidratos y la disminución de la relación clorofila: carotenos (Ben-Amotz, 1987).

Como respuesta general, la concentración proteica aumenta con la concentración de nitrato y el nivel de irradiancia espectral en los cultivos de *D. salina*. Los máximos valores se obtuvieron a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en los cultivos con 5 y 7.5 mM de nitrato (Tabla XVIII). Respecto a la irradiancia espectral, resultados similares fueron encontrados por Sánchez-Saavedra y Voltolina (1996). Por otra parte, la disminución de la luz desde 100 hasta $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en *Isochysis sp.* (clon T-ISO) (Prymnesiophyceae), causó una disminución del contenido proteico celular (Brown *et al.*, 1993), resultados que coinciden con los obtenidos en estos experimentos. La cuantificación de la proteína soluble total revela una fotorregulación de la acumulación proteica, relacionado con la incorporación y asimilación del nitrato y/o amonio del medio y la actividad de la nitrato reductasa (López-Figueroa y Rüdiger, 1991). Por otra parte, se sabe que a niveles altos de irradiancia no sólo aumenta la concentración proteica, sino que cambia significativamente el patrón protei-

co de *D. salina* y *D. bardawil*, por lo que se sugiere que gran parte de la fracción proteica puede tener funciones relacionadas con la carotenogénesis (Cowan *et al.*, 1992). Lo que explicaría, además, el comportamiento de la relación caroteno:proteína con la irradiancia en los cultivos de *D. salina*. Esta relación aumenta con la irradiancia espectral, mientras que disminuye con el aumento de la concentración de nitrato.

Respecto al contenido proteico se sabe que en los cultivos de *D. bardawil* el contenido máximo encontrado es del 36% respecto al peso seco (Ben-Amotz *et al.*, 1985); en *D. salina* se encontraron valores desde 2.1% en luz día con rojo lejano a 0 mM de nitrato y $35 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, condiciones no favorables para la síntesis proteica, hasta 26% en condiciones de luz azul, en cultivos establecidos con suficiencia de nitrato a $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

La irradiancia es una de las variables más importantes en la regulación de la velocidad de división en algas unicelulares (Hobson, 1974). Sin embargo, aunque las tasas de crecimiento aumentan proporcionalmente con el nivel de irradiancia espectral y la concentración de nitrato, en los cultivos a gran escala se observa una disminución de éstas debido, probablemente, a fenómenos de autoensombrecimiento que limitan la disponibilidad de la luz en el interior de los mismos, acompañado del agotamiento de nutrientes.

En la mayoría de las algas verdes la asimilación de nitrato es un proceso estrictamente fotodependiente (Tischner y Lorenzen, 1979; Ninnemann, 1987; Quiñones y Aparicio, 1990). La luz, en presencia de nitrato y CO_2 , promueve la síntesis del enzima NR; una disminución en la actividad de este enzima resulta en una disminución de la asimilación de nitrato por la célula (Huppe y Turpin, 1994). En los cultivos de *D. salina* el efecto de la concentración de nitrato sobre el crecimiento está influenciado tanto por el nivel de irradiancia espectral como por la longitud de onda.

Además de la irradiancia, se ha demostrado que en las algas, la longitud de onda tiene una fuerte influencia sobre el crecimiento vegetativo,

la inducción de la reproducción, la velocidad de crecimiento (Dring, 1988; López-Figueroa *et al.*, 1995) y la composición química (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 1996). Sin embargo, Ginzburg (1987) plantea que la longitud de onda no tiene un efecto importante sobre el crecimiento de *Dunaliella*, observándose, de forma general, que la luz azul promueve ligeramente el crecimiento, mientras que la luz roja tiene un efecto opuesto.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la longitud de onda afecta significativamente los parámetros de crecimiento estudiados en los cultivos de *D. salina*. En los cultivos con luz día se obtuvieron las máximas densidades celulares. La luz día tiene el aporte de todos los intervalos de longitudes de onda del espectro visible, con máximos de emisión a 425 y 550 nm (Fig. 11), de aquí que los mejores resultados se obtuvieran en estas condiciones.

La luz azul, con un máximo de emisión alrededor de los 425 nm, fue tan efectiva como la luz roja pero menos que la luz día, sobre el crecimiento de *D. salina*. En condiciones de luz azul el crecimiento está favorecido tanto por la concentración de nitrato como por el nivel de irradiancia espectral, obteniéndose los máximos valores de densidad celular a 5 mM y $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; sin embargo, a 7.5 mM hay un efecto ligeramente inhibitorio; éste puede deberse a la correlación que existe entre las altas concentraciones de nitrato y la fotoinhibición, como consecuencia de la inhibición de la actividad del enzima NR, que conllevaría la acumulación de nitrito debido a la pérdida del equilibrio entre la actividad reductasa y los mecanismos de extrusión de éste, provocando cierto efecto inhibitorio sobre la maquinaria fotosintética (Jiménez y Niell, 1990).

La fotoinhibición, al igual que la fotoinactivación son fenómenos fisiológicos que pueden vincularse a un descenso de la capacidad fotosintética a intensidades de luz por encima de los valores de saturación, o sea, superiores a las requeridas para obtener la tasa máxima de fotosíntesis (Powles, 1984); se vinculan, fundamentalmente, a daños por sobresaturación del PS II (Anderson y Styring, 1991; Jegerschöld y Styring, 1992; Vass *et al.*,

1992). La fotoinhibición se manifiesta como una disminución de la actividad fotosintética y un aumento de la fluorescencia, seguido por fotooxidación de la clorofila; puede resultar también de la fotooxidación de componentes del aparato fotosintético, retardando el flujo energético de los PS I y II, lo que trae consigo una reducción de la concentración del NADPH requerido para la fijación de CO₂. La fotoinhibición no está claramente definida para ningún sistema y, probablemente, esté afectada por varios factores (Gantt, 1990), depende de la irradiación incidente tanto como de la longitud de onda. El aceptor secundario (Q_B ó D1), que media el flujo electrónico entre el aceptor primario y la plastoquinona, es el primer sitio afectado por la fotoinhibición; el recambio de esta proteína permite una recuperación rápida del estado fotoinhibido, a menos que haya ocurrido la fotooxidación de algún otro componente. La fotorrespiración puede ser un mecanismo para contrarrestar la fotoinhibición, manteniendo el transporte electrónico entre los sistemas y permitiendo así la generación de energía para la fijación del CO₂ (Gantt, 1990).

La fotoinhibición parece ser responsable, en parte, de la disminución del crecimiento en cultivos de *Spirulina*, no sólo en condiciones de laboratorio, sino también en cultivos a gran escala, causando pérdidas hasta de un 30% de la productividad (Vonshak y Guy, 1988).

La fotoinactivación se relaciona más bien con la actividad de la RuBisCo, enzima clave en la fotoautotrofia, inactivada fundamentalmente por longitudes de onda correspondientes a la región del azul. El hecho de que este enzima sea sensible a distintas especies reactivas del oxígeno, incluyendo el peróxido de hidrógeno y, posiblemente, los superóxidos es de gran significado para los efectos de las altas intensidades de luz en cultivos a gran escala (Richmond, 1986b). La fotoinactivación también puede involucrar al enzima nitrato reductasa (NR); sin embargo, su actividad puede ser reactivada a partir de la forma inactiva mediante la luz, por lo que se introduce el término fotorreactivación (Senger, 1984).

En presencia de luz azul se alcanzan altos valores de proteína por célula. Se sabe que en estas condiciones el contenido de aminoácidos y proteínas de la biomasa algal es mayor que en luz blanca, y que, de forma general, la luz azul (400-525 nm) tiende a incrementar el contenido proteico, con un efecto positivo sobre la formación de serina y alanina, además de los ácidos aspártico, glutámico, málico y fumárico (Kowallik, 1987). La luz azul induce un incremento de la carboxilación del fosfoenol piruvato (PEP) con el aumento consecuente de la producción de oxalacetato. Este incremento de la disponibilidad de sustratos para el ciclo de Krebs acelera la síntesis de aminoácidos y proteínas, lo que conlleva a un incremento de sus niveles celulares (Voskresenskaya, 1972; Senger y Bauer, 1987; Falkowsky y La Roche, 1991). Por otra parte, estimula la asimilación de nitrógeno inorgánico (Aparicio *et al.*, 1976), aumenta la respiración y con ello la síntesis de *novoo* enzimas catalizadoras de rutas limitantes relacionadas con la respiración y la fotosíntesis (Ruyters, 1984); aumenta la síntesis de ácidos nucleicos y, consecuentemente, la velocidad de división celular (Wallen y Geen, 1971).

Al igual que la luz azul, la luz verde incrementa la síntesis de proteínas (Wallen y Geen, 1971); por otra parte, Sánchez-Saavedra y Voltolina (1996) obtuvo una concentración proteica mayor con luz verde-azul que con la luz blanca. Sin embargo, el crecimiento es menor en este intervalo de longitudes de onda, de aquí que la concentración de proteínas por célula sea aún mayor que en luz azul. Existen evidencias a favor de una dependencia de la concentración proteica con la longitud de onda, que es máxima entre 370 y 460 nm (Kowallick y Schürman, 1984), lo cual no entra en contradicción los resultados obtenidos. Por otra parte, se ha propuesto que la síntesis de clorofilas, biliproteínas y proteínas totales está controlada por el fitocromo y un fotorreceptor de luz verde en algas nitrógeno-deficientes (López-Figueroa, 1993).

Excepto para las cianobacterias y las algas rojas, existen escasos estudios sobre los efectos de la luz verde en algas. Se sabe que pulsos cortos

de luz a una longitud de onda de 550 nm activan la germinación de los quistes de *Scrippsiella trochoidea* (Klein, 1992). Recientemente, se ha demostrado que la luz verde a muy bajas intensidades ($0.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) es mucho más efectiva que la luz roja o la azul sobre el crecimiento de algunas algas rojas (Leukart y Lünning, 1994); sin embargo, para las células de *D. salina* dentro del intervalo de niveles de irradiancia espectral ensayado, la luz verde es la menos efectiva en cuanto al crecimiento, alcanzándose densidades celulares y tasas de división significativamente inferiores respecto a la luz día. Este comportamiento es lógico si se tiene en cuenta el patrón de absorción de los pigmentos fotosintéticos.

La luz roja, con un máximo alrededor de 650 nm (Fig. 11), es prácticamente tan efectiva como la azul sobre el crecimiento de las células en cultivo de *D. salina*. Sin embargo, al menor nivel de irradiancia ensayado ($35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) la luz roja resultó ser mucho menos efectiva que el resto de los intervalos de longitudes de onda. Este comportamiento puede estar relacionado con una fuerte fotodependencia de la asimilación del nitrato en este intervalo del espectro.

López-Figueroa (1993) encontró que la asimilación de nitrato está afectada por la longitud de onda en el alga roja *Corallina elongata*. Pulsos de luz roja de 5 min, con una densidad del flujo fotónico (PFD) de $16.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ producen un incremento significativo en la actividad de la NR, después de añadir a células nitrato deficientes una concentración de KNO_3 equivalente a $45 \mu\text{M}$; este efecto ha sido encontrado también en *Porphyra perforata* y *Ulva rígida* (López-Figueroa, 1993). Aunque en muchas algas la actividad de la NR está regulada por fotorreceptores de luz azul (Ninnemann, 1987), en la mayoría de los casos la estimulación con períodos cortos de luz azul resultan inefectivos si se comparan con la luz roja; sin embargo, este efecto cambia si se utiliza la luz continua, en este caso es más efectiva la luz azul, provocando un incremento significativo en la reducción del nitrato (López-Figueroa, 1993). Un efecto similar se produce sobre la actividad de la GS (glutamina

sintetasa), que es significativamente mayor en células nitrato deficientes (López-Figueroa, 1993).

Por otra parte, la luz roja favorece la gluconeogénesis más que la proteogénesis (Voskresenskaya, 1972; Kowallik y Grotjoham, 1988); el metabolismo del nitrógeno no se ve favorecido y consecuentemente el crecimiento puede verse algo limitado en este intervalo de longitudes de onda, respecto a los controles, lo que se verifica con las bajas tasas de crecimiento obtenidas, y los bajos valores de proteína celular, que fueron significativamente menores respecto a la luz día, la luz azul y la verde.

En condiciones de luz día con rojo lejano el crecimiento se ve afectado respecto a la luz día, detectándose una disminución de la densidad celular. Respecto al resto de las longitudes de onda ensayadas, en este intervalo se obtiene mejor crecimiento que en luz verde y luz roja, posiblemente por el aporte de la luz día; sin embargo, los valores de capacidad de carga obtenidos no difieren significativamente de los que se obtienen con luz azul. Por otra parte, se detectan tasas de crecimiento significativamente superiores a las alcanzadas en el resto de los intervalos de longitudes de onda ensayados, lo que indica que el rojo lejano acelera el proceso de división celular pero reduce la densidad celular máxima. Por otra parte, la fase exponencial de crecimiento se alcanza antes que en los controles y la fase lag es más corta (Fig. 13-17). La exposición continua al rojo lejano podría acelerar el envejecimiento de los cultivos, lo que explicaría, además, las variaciones en cuanto a la composición pigmentaria, que se discutirán posteriormente. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Sánchez-Saavedra *et al.* (1996a) en *D. salina*. En estas condiciones se obtienen, además, los valores mínimos de proteína por célula. En plantas superiores, algunas proteínas son movilizadas en situaciones de estrés o deficiencia de nutrientes, fenómeno que se ha propuesto para explicar la continuación de la división celular en microalgas transferidas a medios carentes de nitrógeno o fósforo.

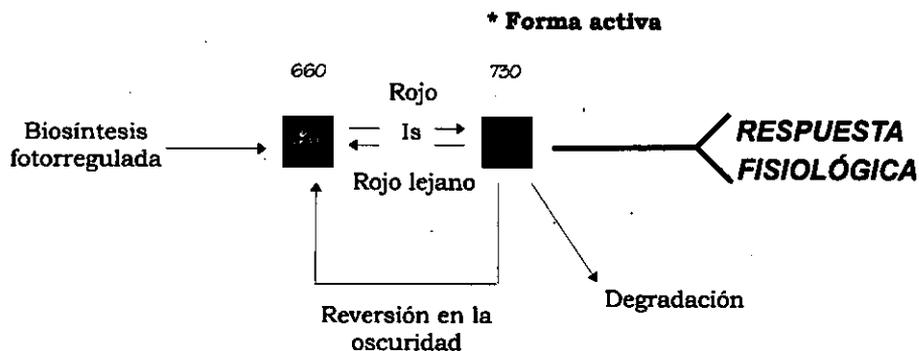


Figura 37. Síntesis y fotoconversión del sistema fitocromo. Diagrama modificado a partir del propuesto por Hall y Rao (1994).

Lipps (1973) estudió la influencia del rojo lejano sobre el crecimiento de algunas diatomeas y demostró que en este intervalo de longitudes de onda se reduce significativamente el crecimiento de *D. tertiolecta*. Después de investigar los efectos del rojo lejano sobre las microalgas marinas, propone que el fitocromo ejerce un control sobre el crecimiento.

El fitocromo es un pigmento fotocromático verde-azul que controla gran cantidad de procesos metabólicos y de desarrollo en células vegetales. Existe en dos formas estables interconvertibles: Pr, con un máximo de absorción en el rojo del espectro (660 nm) y Pfr, con un máximo en la región del rojo lejano (730 nm) (Häder y Tevini, 1987). El Pfr se considera la forma activa, ya que pulsos cortos de luz roja de baja intensidad inducen fotomorfogénesis. Después de una irradiación con luz roja o blanca existe un equilibrio entre las dos formas, lo que depende también de la composición espectral de la fuente de luz (Häder y Tevini, 1987). En la oscuridad, el fitocromo está presente como un pigmento azul que absorbe luz roja (Pr); si se expone a la luz roja se convierte en un pigmento verde-azul que absorbe en el rojo lejano (Pfr). Una característica del fitocromo es la formación de intermediarios (Is), durante ambas fotoconversiones (Rüdiger y Thümmeler, 1994) (Fig. 37). A diferencia de los pigmentos fotosintéticos el fitocromo no está involucrado en los procesos de transferencia y almacenamiento de energía. Estructuralmente,

es un tetrapirrol unido covalentemente a una proteína; la absorción de la luz provocaría cambios isoméricos en los dobles enlaces, lo que conduciría a cambios conformacionales de la proteína, resultando en la interconversión entre las dos formas presentes en el fotoequilibrio (Hall y Rao, 1994).

Se sabe que al incorporar el rojo lejano (FR), la razón R:FR disminuye drásticamente respecto a la luz día, desde 2.96 a 0.98 (Sánchez-Saavedra *et al.*, 1996a), por lo que las condiciones espectrales son similares al campo de luz en el interior de un cultivo denso, donde la luz roja es absorbida por las clorofilas, además de los fenómenos de dispersión y reflexión. En estas condiciones la densidad celular disminuye ya que se produce un efecto similar al del autoensombrecimiento; sin embargo, las tasas de crecimiento, que debían ser menores en estas condiciones, son significativamente mayores, lo que demuestra que el metabolismo celular está alterado, existiendo una compleja respuesta en estas condiciones de iluminación. En *D. salina* la relación R:FR podría estar involucrada en la regulación del crecimiento, a través del sistema fitocromo.

Según Smith (1994), en los sistemas acuáticos, grandes variaciones de la razón R:FR sólo causan pequeños cambios en el fotoequilibrio del fitocromo. Sin embargo, López-Figueroa (1992) observó que las razones R:FR; B:R y G:R, cambian drásticamente en aguas costeras durante el crepúsculo, sugiriendo que pueden ser señales fotomorfogénicas que controlan la síntesis de pigmentos en ambientes naturales (Rüdiger y López-Figueroa, 1992). La relación R:FR está íntimamente relacionada con las propiedades espectrales del fitocromo; éste puede determinarse mediante la relación entre la irradiancia a 655-665 nm, y la irradiancia a 725-735 nm. Esta razón puede transformarse en una medida de las proporciones relativas de Pr y Pfr presentes en el fotoequilibrio (Smith, 1994).

Los resultados obtenidos en luz día con rojo lejano y luz roja, no serían comparables, teniendo en cuenta que al efecto del rojo lejano se sumarían los efectos del resto de las longitudes de onda que aporta la luz día; sin embargo,

en condiciones de luz roja la relación R:FR sería muy alta, lo que provocaría efectos similares a los que ocurren en un cultivo muy poco denso expuesto a alta intensidad de luz, donde tiene lugar una fotoinhibición severa.

De forma general, respecto al crecimiento se obtienen mejores resultados en luz día que en luz día con rojo lejano, y en luz día respecto al resto de los intervalos de longitud de onda ensayados, siendo la luz verde la menos efectiva.

Por otra parte, en los cultivos de *D. salina* la concentración celular de clorofila a aumenta proporcionalmente con la concentración de nitrato, resultados similares a los obtenidos por Ben-Amotz y Avron (1983b); mientras que la concentración de carotenoides disminuye, independientemente del nivel de irradiancia y la longitud de onda. Los mayores valores de carotenoides por célula se alcanzan en los cultivos sin nitrato, mientras que la concentración de clorofilas fue mayor en los cultivos con 5 y 7.5 mM.

La deficiencia de nitrógeno incrementa la síntesis de materia orgánica carente de este elemento como lípidos y carbohidratos, y la degradación de compuestos nitrogenados como las clorofilas (Hipkin y Syrett, 1977), por lo que en estas condiciones se favorece la acumulación de carotenoides. La limitación por nitrógeno provoca la disminución del contenido celular de clorofilas y moléculas proteicas del aparato fotosintético (Prézelin, 1982; Roy, 1988; Falkowski *et al.*, 1989; Sukenik y Wahnnon, 1991); disminución que se atribuye a la utilización de los complejos pigmento-proteína cuando disminuyen las reservas celulares de nitrógeno (Prézelin, 1982). La limitación de nitrógeno afecta directamente la conversión de energía fotoquímica debido a una disminución de la síntesis proteica (Geider *et al.*, 1993; Berges *et al.*, 1996), lo que afecta las proteínas del cloroplasto y, por tanto, involucra los centros de reacción de los PS I y II (Falkowski *et al.*, 1989; Geider *et al.*, 1993); por lo que la captación de energía disminuye, como consecuencia de las pérdidas en el contenido de clorofila a y el incremento de los pigmentos carotenoides, afectando notablemente la fotosíntesis (Berges *et al.*, 1996).

Las variaciones en cuanto a la intensidad de la luz, inducen cambios en la composición, estructura y función del aparato fotosintético. Estos cambios afectan al tamaño y composición de las clorofilas antenas del PSI y el PSII, así como a la estequiometría PSII/PSI en la membrana del tilacoide. Está aceptado como comportamiento general que bajas intensidades de luz promueven un incremento del tamaño de la clorofila antena en ambos PS, efecto contrario al que se produce a altas intensidades de luz (Smith *et al.*, 1990).

La concentración celular de clorofila a mostró una relación inversa con el nivel de irradiancia espectral, independientemente de la concentración de nitrato y la longitud de onda (Tabla VI); resultados similares fueron obtenidos por Berner *et al.* (1989) y Sánchez-Saavedra *et al.* (1996a) en *D. tertiolecta* y *D. salina*, respectivamente. Se sabe que la respuesta del aparato fotosintético de *D. salina* a altas intensidades de luz implica fenómenos distintos pero interrelacionados. La irradiancia excesiva durante el crecimiento provoca una disminución del tamaño del PSI, que contiene sólo unas 105 moléculas de clorofila a, lo que sugiere la ausencia selectiva del LHCI (Light Harvesting Complex). En condiciones normales, el PSI contiene 210 moléculas de clorofilas a + b (Smith *et al.*, 1990). La respuesta del PSII es similar; en los controles la forma predominante fue el PSII _{α} , con más de 250 moléculas de clorofila a + b, mientras que en células que crecen a altas irradiancias esta forma está ausente y sólo hay unos pocos centros del PSII _{β} , el cual contiene unas 140 ± 10 moléculas de clorofila a + b, detectándose solamente unas 60 moléculas de clorofila a (PSII _{γ}). Por tanto, la irradiancia modula los niveles de LHCI y LHCII presentes en la membrana del tilacoide (Smith *et al.*, 1990). En condiciones de alta irradiación un alto contenido de pigmentos antena podría aumentar la disipación no fotoquímica, o bien la excitación de los centros de reacción, lo que conduciría a la fotoinhibición y/o algún otro fotodaño. La síntesis de más moléculas de clorofilas sería metabólicamente contraproducente para la célula, por lo que la regulación de estos procesos por el nivel de irradiancia espectral permite a la célula

conservar una cantidad significativa de energía para otros procesos celulares y para minimizar los efectos adversos debido a los fenómenos de disipación y excitación no fotoquímica (Smith *et al.*, 1990).

Por otra parte, la eficiencia fotosintética disminuye en los cultivos de *D. bardawil* con el incremento de la irradiancia, así como la máxima velocidad fotosintética, el rendimiento fotosintético óptimo y el efectivo (Sánchez-Saavedra *et al.*, 1996b).

En las especies carotenogénicas de *Dunaliella* hay un patrón general en cuanto a la variación de la composición pigmentaria con los cambios de luz, temperatura y salinidad. De forma general, hay un aumento de la clorofila *a* con la salinidad y la temperatura, y un descenso con el aumento de la intensidad de luz (Loeblich, 1982; Ben-Amotz y Avron, 1983b). Por otra parte, la fotoaclimatación a bajas intensidades de luz implica un incremento significativo en la concentración de clorofila por célula, puesto que la célula crecerá lentamente pero el sistema de captura de la luz tiene que ser más eficiente (Richmond, 1986a), de aquí que según los resultados obtenidos, a $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se alcanzan los mayores valores de clorofila *a* por célula, teniendo en cuenta que *D. salina* necesita para un crecimiento máximo niveles de irradiancia entre $100\text{-}200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Ginzburg, 1987).

A altas intensidades la fotoaclimatación hace que el crecimiento celular esté limitado, fundamentalmente, por la tasa de fijación del carbono, por lo que las células responden desviando su metabolismo, más hacia la síntesis de RuBisCo u otra enzima de la reacción no fotoquímica que hacia la producción de clorofilas; como resultado dichas células se caracterizan por tener menos clorofila por célula, en ocasiones correlacionado con una disminución del tamaño del cloroplasto. Estas células, por lo general, son menos sensibles a la fotoinhibición a altas intensidades de luz (Lips y Avissar, 1986).

La concentración celular de carotenoides aumentó proporcionalmente con el nivel de irradiancia espectral, resultados que coinciden con los obtenidos por Loeblich (1982) y Ben-Amotz y Avron (1983a) en *D. bardawil*. Los organismos acuáticos que provienen de un medio natural en el que está expuestos a altas intensidades de luz, generalmente contienen menos clorofila que los organismos que crecen a bajas intensidades de luz; éstos tienden a absorber un bajo porcentaje de la luz incidente, además, contienen altas concentraciones de carotenoides, así como enzimas y transportadores electrónicos involucrados en las reacciones no fotoquímicas de la fotosíntesis (Philips y Mitsui, 1982). La microalga en estudio (*D. salina*) fue aislada de su medio natural, donde estaba expuesta a altos niveles de irradiancia, salinidad y temperatura.

Por otra parte, la relación clorofila a: carotenos aumenta significativamente con la concentración de nitrato y disminuye con el nivel de irradiancia espectral, lo que refleja una reducción en el LHC (Light Harvesting Complex) (Sukenik *et al.*, 1987); similar comportamiento fue descrito por Berner *et al.* (1989) y Sánchez-Saavedra *et al.* (1996a) en *D. tertiolecta* y *D. salina*, respectivamente. En condiciones de luz día a 5 mM, los valores disminuyeron desde 5.5 hasta 1.43 cuando la irradiancia varió desde 35 hasta 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 17-19); un patrón de comportamiento similar fue obtenido por Smith *et al.* (1990) en cultivos de *D. salina* expuestos a altas intensidades de luz, con la consecuente disminución del contenido celular de clorofilas y el incremento de la relación clorofila: P_{700} ; siendo ésta última una medida estadística que refleja el contenido total de clorofilas y de PSI en la muestra, pero no ofrece información sobre la distribución de clorofilas entre los dos PS.

La estrategia de fotoaclimatación de *D. salina*, teniendo en cuenta las variaciones en la composición pigmentaria en relación con la intensidad de luz, se ajusta al patrón de *Chlorella* explicado por Soeder y Stenguel (Richmond, 1986a).

Los efectos de la fotoaclimatación se expresan usualmente en términos de composición pigmentaria. La mayoría de las algas utilizan un espectro de luz limitado, que es el que está disponible en el medio natural (Richardson *et al.*, 1983). El espectro de acción de muchas algas verdes indica que la resolución fotosintética es mayor en la región azul del espectro (Richardson *et al.*, 1983); sin embargo, la concentración celular de clorofilas fue ligeramente menor en luz azul que en luz día; estas diferencias aumentan proporcionalmente con el nivel de irradiancia espectral, siendo el incremento prácticamente el doble en luz azul, donde el efecto de la irradiancia espectral es mayor.

En presencia de luz azul hay un incremento de la asimilación de nitrato, de la fotorreducción enzimática del nitrato catalizada por la riboflavina y un aumento de la síntesis de nitrato reductasa (NR) (Ninnemann, 1987). La fotorregulación de los pigmentos y la síntesis de proteínas se relaciona con el fotocontrol del metabolismo del nitrógeno (López-Figueroa, 1993). Por otra parte, en microalgas verdes como *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella vulgaris* enzimas de la ruta biosintética de las clorofilas como la ALA sintetasa (Senger *et al.*, 1980) y ALA dehidratasa (Conradt, 1980), están controladas por un fotorreceptor de luz azul. Por lo que la intensidad de la luz debe tener un mayor efecto sobre las células cultivadas en este intervalo de longitudes de onda.

Sin embargo, la concentración de clorofilas fue menor respecto a la luz día, probablemente por el efecto del componente UV de la fuente de luz azul utilizada, que es más importante que en la luz día (Fig. 11). La radiación ultravioleta reduce la fotosíntesis, el crecimiento, la supervivencia, absorción de nutrientes, actividad enzimática, asimilación de nitrógeno y la concentración de pigmentos fotosintéticos, tiene efectos mutagénicos sobre el DNA, produce daños a nivel proteico (Van Donk y Hessen, 1996) y afecta la movilidad y la orientación (Härder, 1993). Los efectos de la radiación UVA (315-40 nm) aumentan significativamente con el tiempo de exposición (Forster y Lüning, 1996); éste debe tenerse en cuenta considerando que en

condiciones naturales, particularmente en ambiente acuáticos, la radiación UVB es atenuada por la materia orgánica disuelta y que el aporte de la radiación UVA es mayor en condiciones naturales que en cualquier fuente de iluminación utilizada a nivel de laboratorio (Forster y Lüning, 1996). La radiación UVA puede causar daños directos sobre la plastoquinona o la clorofila, e indirectos *via* generación de oxígeno en singlete (Forster y Lüning, 1996). En los sistemas acuáticos la luz ultravioleta puede provocar efectos negativos sobre la producción primaria (Smith *et al.*, 1992). Las algas flageladas son más susceptibles que las no flageladas al estrés por luz UV (Härder, 1993).

La luz azul, como se explicó anteriormente, es menos efectiva que la luz día sobre el crecimiento y la síntesis de pigmentos fotosintéticos de *Dunaliella salina*; de forma general, en este intervalo de longitudes de onda se ve más estimulada la síntesis de carotenoides que la de clorofilas.

En luz verde, la cual tiene un componente azul (Fig. 11), la concentración de clorofilas fue menor que en luz día, pero mayor que en el resto de las longitudes de onda. Las diferencias fueron mayores entre las células nitrato deficientes; mientras que en los cultivos con luz verde en ausencia de nitrato se alcanzó una concentración celular de clorofilas de 6.51 ± 0.89 pg cél.⁻¹, en luz azul, por ejemplo, se alcanzó una concentración de 3.89 ± 0.89 pg cél.⁻¹; en células con suficiencia de nitrato los valores fueron de 8.59 ± 1.15 , en luz verde, frente a 7.14 ± 3.48 pg cél.⁻¹ en luz azul (Tabla XVIII). En este caso los resultados podrían estar afectados por la baja densidad celular que se obtiene en este intervalo de longitudes de onda. No obstante, se ha propuesto que la síntesis de clorofilas, biliproteínas y proteínas totales están controladas por fitocromos, específicamente por un fotorreceptor de luz azul y uno de luz verde en algas deficientes de nitrógeno (Senger y Bauer, 1987), lo cual podría explicar los resultados obtenidos. Respecto a la concentración de carotenoides, en luz verde fue menor que en luz azul y luz día; de forma general, en este intervalo de longitudes de onda se ve favorecida la síntesis de clorofilas. En

los análisis por cromatografía líquida de alta resolución, se observa un aumento de la luteína en las células cultivadas en estas condiciones de iluminación.

Se sabe que la luz verde estimula la carotenogénesis en *Cyclotella nana* y *Dunaliella tertiolecta* (Goodwin, 1980); sin embargo, en *Dunaliella salina*, la concentración celular de clorofilas es mayor que la de carotenos en este intervalo del espectro.

En muchas algas verdes los primeros pasos de la biosíntesis de clorofilas pueden estar regulados por la luz azul, citándose que en algunas especies se ha producido un incremento drástico de las clorofilas debido a su exposición a luz verde-azul de baja intensidad (Senger, 1982; Richardson *et al.*, 1983), o bien se ha visto estimulada la síntesis de clorofilas y biliproteínas (Rüdiger y López-Figueroa, 1992). Se sabe, además, que la luz azul y verde regulan la síntesis de clorofila a en algas marinas verdes (Senger, 1987).

En luz roja la concentración celular de clorofila fue mayor que en luz azul; sin embargo, fue menor que en luz día y en luz verde. La clorofila es el pigmento mayoritario que absorbe luz roja; sin embargo, esta no puede ser considerada como un fotorreceptor en el sentido estricto de la palabra. El rojo estimula la síntesis de clorofilas, mientras que el rojo lejano tiene un efecto contrario, según experimentos llevados a cabo en *Porphyra umbilicalis*, *Corallina elongata*, *Chondrus crispus*, *Desmarestia aculeata* y *Ulva rigida* (López-Figueroa y Niell, 1989; López-Figueroa y Rüdiger, 1991; Rüdiger y López-Figueroa, 1992). En general, respecto a los controles, la luz roja es menos efectiva en lo que a síntesis de clorofila se refiere, lo que puede explicarse teniendo en cuenta que la luz roja provoca una disminución del contenido celular de clorofila b, siendo la longitud de onda más efectiva para el aumento de su concentración en la célula alrededor de los 460 nm (Kowallick y Schürman, 1984), la cual está ausente en la fuente de luz roja utilizada (Fig. 11), además, la luz día tiene el aporte del resto de las longitudes de onda donde absorben las clorofilas y el resto de los pigmentos fotosintéticos.

Respecto a la concentración celular de carotenoides, en luz roja fue inferior comparada con el resto de las longitudes de onda. En general, con luz roja se ve más favorecida la síntesis de clorofila que la de carotenoides; resultados similares fueron encontrados en *Haematococcus pluvialis* por Kobayashi *et al.* (1992); éstos pueden explicarse teniendo en cuenta la función protectora de estos pigmentos. El β -caroteno, que es el carotenoide mayoritario en *D. salina*, se acumula en condiciones de estrés y protege a la célula contra daños por exceso de irradiación, actuando como una pantalla (Ben-Amotz *et al.*, 1982); en estas condiciones no forma parte del sistema fotosintético como tal, sino que actúa como un filtro; consecuentemente la actividad fotosintética de las células disminuye en la región azul del espectro (Kirk, 1994).

El contenido celular de clorofila a fue menor en luz día enriquecida con rojo lejano, respecto al resto de los ensayos; consecuentemente, la concentración de carotenoides fue mucho mayor; resultados similares a los obtenidos por Sánchez-Saavedra *et al.* (1996a) en *D. salina*. Estos resultados eran de esperar teniendo en cuenta que en *Dunaliella* ha sido citada la presencia del fitocromo (Ruyters, 1988), el cual está involucrado en los procesos de adaptación de la maquinaria fotosintética (Kasperbauer y Peaslee, 1973), detectando de inmediato los cambios en la relación R:FR, para regular, entre otros procesos, la concentración de clorofilas (Kasperbauer y Peaslee, 1973; Bradburne *et al.*, 1989) y la carotenogénesis en organismos fotosintéticos (Harding y Shropshire, 1980).

La relación R:FR ha sido asociada con la eficiencia fotosintética (Kasperbauer y Peaslee, 1973); además, es una medida de las proporciones relativas de Pr y Pfr presentes en el equilibrio, entre los que existe una relación hiperbólica (Smith, 1994). En *D. bardawil* la eficiencia fotosintética disminuye con el incremento de la irradiancia espectral, siendo mayor en luz día que en luz día enriquecida con rojo lejano en condiciones de baja o media

irradiancia; sin embargo, es similar para altos niveles de irradiancia (225 y $300 \mu \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) en ambos (Sánchez-Saavedra *et al.*, 1996b).

A los niveles de irradiancia ensayados (35 - $150 \mu \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) Sánchez-Saavedra *et al.* (1996b) obtuvo rendimientos cuánticos óptimos similares para la luz día y la luz día enriquecida con rojo lejano; mientras que el rendimiento cuántico efectivo fue mucho menor en luz día con rojo lejano; este comportamiento se relaciona con las diferencias obtenidas en cuanto a composición pigmentaria para ambos casos, referido fundamentalmente a la concentración de carotenoides. Por otra parte, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en referencia a las tasas de crecimiento, se confirma el efecto fotoprotector de los carotenoides.

La acumulación de carotenoides fue mayor al final de la fase exponencial (Fig. 19-23), lo que podría estar relacionado con el agotamiento de los nutrientes. A partir del comienzo de la fase estacionaria las diferencias entre los valores de carotenoides por célula obtenidos en luz día y luz día con rojo lejano comienzan a ser significativos, alcanzándose los máximos valores en este último. La luz ejerce un control sobre la biogénesis de carotenoides a través de dos mecanismos independientes: una "regulación por empuje" mediante el fitocromo, que conduce a un importante aumento de la capacidad carotenogénica, y una "regulación por arrastre" mediante la clorofila, debido al agotamiento del pool de carotenoides plastidiales para la formación del complejo clorofila-caroteno-proteína (Malhotra *et al.*, 1982).

El carotenoide mayoritario en la microalga en estudio es el β -caroteno, según los resultados obtenidos en los análisis por HPLC, específicamente el isómero 9-*cis*; se detecta, además, la presencia del α -caroteno en células cultivadas en condiciones de luz día a $75 \mu \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ con 5 mM . Si bien es el β -caroteno el carotenoide de mayor importancia, fundamentalmente por su función como pro-vitamina A, hay que considerar que el α -caroteno tiene un 50% de actividad (Rodríguez-Amaya, 1989). Por otra parte, la composición isomérica es importante teniendo en cuenta los beneficios en cuanto a

biodisponibilidad que implica la presencia de ambos isómeros, aunque se considera que el todo-*trans* β,β -caroteno tiene mayor actividad como provitamina A que el 9-*cis*- β,β -caroteno (Rodríguez-Amaya, 1989).

El β -caroteno es un cetoderivado que se puede acumular en muchas algas bajo condiciones desfavorables, particularmente en déficit de nitrógeno (Goodwin, 1980). Un exceso de irradiación conduce también a la acumulación masiva de este pigmento, como un mecanismo de protección contra daños fotooxidativos (Ben-Amotz, 1987; Ben-Amotz *et al.*, 1989). El β -caroteno es precursor de zeaxantina, carotenoide que se detectó en *D. salina*, la cual tiene un efecto fotoprotector al disipar el exceso de energía acumulada en forma de calor dentro de los fotosistemas, debido a un desequilibrio entre la absorción de la luz y su utilización para la fotosíntesis (Demmig-Adams, 1990). *D. salina* acumula grandes cantidades de β -caroteno cuando crece en condiciones de alta irradiación, temperaturas extremas, alta salinidad y deficiencia de nitrato (Ben-Amotz *et al.*, 1982). Existen evidencias de que la sobreproducción a expensas del fitoeno es la mayor causa de la acumulación de β -caroteno en *Dunaliella bardawil* (Zamir, 1992). La acumulación de β -caroteno depende de la cantidad integral de luz a la cual el alga está expuesta durante el ciclo de división (Ben-Amotz y Avron, 1983), lo que sugiere que la acción del β -caroteno se vincula a la fotoprotección de la célula contra altos niveles de irradiancia espectral (Ben-Amotz y Avron, 1983a) y explicaría, desde el punto de vista ecológico, el dominio de las especies carotenogénicas sobre las no carotenogénicas en la naturaleza (Ben-Amotz y Avron, 1983a).

La microalga en estudio (*D. salina*) acumula grandes cantidades de β -caroteno como respuesta al déficit de nitrato y al aumento de irradiancia espectral. La luz es el requisito primario para el desarrollo del cloroplasto y la síntesis de carotenoides (Britton, 1988). Además de su función como pigmentos accesorios para incrementar el potencial de captura de la luz (Krinsky, 1971), los carotenoides actúan como protectores celulares (Harding y Shropshire, 1980) contra posibles daños causados por la luz y el oxígeno (fotoprotección)

sobre la maquinaria fotosintética (Krinsky, 1971). La cinética de inducción de la síntesis acelerada de β -caroteno a altas intensidades de luz ocurre en dos etapas: inmediatamente después de haber sido expuesta a alta irradiación y al final de la fase exponencial de crecimiento (Zamir, 1992). Sin embargo, existen otros mecanismos que explican el incremento de los niveles celulares de β -caroteno: la velocidad acelerada de biosíntesis debido al incremento de la actividad o de la síntesis de *novo* de enzimas carotenogénicas, la síntesis continua de β -caroteno en células que han cesado de dividirse, o bien una disminución de su velocidad de degradación (Zamir, 1992).

La acumulación de β -caroteno en *D. bardawil* está asociada con un retardo de la división celular (Ben-Amotz y Avron, 1983b). Sin embargo, aunque, generalmente, los parámetros del crecimiento tienen una relación inversa con la acumulación de β -caroteno en *D. salina*, como puede observarse en el efecto de la concentración de nitrato sobre las células en cultivo; dentro del intervalo de irradiancias ensayado, ésta favorece tanto la acumulación de β -caroteno como la velocidad de crecimiento, por lo que la intensidad de la luz juega un papel muy importante e independiente en el control de la acumulación de este pigmento en la microalga en estudio.

La presencia de grandes cantidades del 9-*cis*- β , β -caroteno indica que, presumiblemente, la acumulación de este pigmento en la microalga en estudio debe ser fundamentalmente en forma de glóbulos en la periferia del cloroplasto, ya que este isómero contribuye a mantener la estructura oleosa de los mismos. La distribución del β -caroteno en forma de glóbulos en la periferia del cloroplasto indica que no sólo funciona como pigmento accesorio, sino como una barrera protectora reduciendo la cantidad de luz incidente en el tilacoide (Borowitzka *et al.*, 1984). La combinación de la estructura oleosa del 9-*cis* y la cristalina del *todo-trans* provee a la célula de un mecanismo de fotoprotección más eficiente (Ben-Amotz *et al.*, 1988a).

En condiciones de alta irradiación *D. salina* acumula además gran cantidad de luteína (Cowan *et al.*, 1995); sin embargo, en los experimentos realizados, dentro el intervalo de niveles de irradiancia ensayados, ésta no influye significativamente sobre la relación luteína: clorofila; en este caso, el efecto de la longitud de onda es mucho más importante.

Por otra parte, de forma general la relación clorofila: clorofila b disminuye con el aumento de la intensidad de la luz, resultados que coinciden con las generalizaciones hechas por Kirk (1994a); sin embargo, respecto a la concentración de nitrato, ésta no se ve afectada significativamente excepto en condiciones de luz día, donde se obtienen valores mucho menores en los cultivos establecidos en ausencia o déficit de nitrato.

Respecto a la composición isomérica, la concentración del isómero 9-*cis* fue significativamente superior a la del todo-*trans*. De acuerdo con los resultados obtenidos la concentración de nitrato, el nivel de irradiancia espectral y la longitud de onda juegan un importante papel en la síntesis del β -caroteno, y en especial del isómero 9-*cis*. La interacción entre los factores estudiados es evidente tanto para la relación entre los isómeros como para la relación entre las clorofilas a y b, por lo que funcionaría como un mecanismo de regulación o ajuste fino dentro de la célula para adaptarse a las variaciones del entorno. Existen evidencias de que la luz, tanto en plantas como en algas, induce la formación del 9-*cis* β -caroteno; las raíces de la zanahoria, por ejemplo, contienen sólo el isómero todo-*trans*; en contraste, los frutos, hojas y flores contienen ambos isómeros (Ben-Amotz *et al.*, 1988a).

Según los resultados obtenidos, la concentración de 9-*cis* es proporcional a la cantidad integral de luz a la cual está expuesta el alga durante el ciclo de división en el intervalo de irradiancias ensayado; sin embargo, la relación entre los isómeros no tiene un comportamiento similar en los diferentes intervalos de longitudes de onda, lo que demuestra la interacción entre los tres factores estudiados.

Por otra parte, tanto en luz verde como en luz azul se ve afectada la concentración del isómero *todo-trans*, lo que puede deberse a daños por fotooxidación; sin embargo, el *9-cis* es más sensible a daños por fotooxidación que el *todo-trans* (Jiménez y Pick, 1994), por lo que también puede relacionarse con un efecto fotoprotector a estas longitudes de onda, viéndose estimulada la formación de *9-cis*. La luz es el factor principal que influye en la síntesis del isómero *9-cis*, por lo que la longitud de onda puede tener una función importante en la estimulación de las reacciones de isomerización a *9-cis*; Ben-Amotz *et al.* (1988a) sugieren que las reacciones de isomerización que conllevan a la formación del isómero *9-cis* ocurren durante o antes de la formación del *todo-trans* fitoeno, es decir, al comienzo de la ruta biosintética del β -caroteno.

En luz roja la irradiancia no afecta significativamente a esta relación, probablemente porque a esta longitud de onda se ve más estimulada la síntesis de clorofilas, como se explicó anteriormente.

Las longitudes de onda por encima de los 700 nm estimulan la acumulación de β -caroteno, tanto de *9-cis* como de *todo-trans*. En condiciones de rojo lejano se obtienen valores de la relación entre los isómeros mayores que con luz día, pero menores que con luz azul, éstas diferencias se deben, fundamentalmente, a que en el rojo lejano la concentración del *9-cis* aumenta considerablemente respecto a la luz azul.

Por otra parte, la relación C:N mostró una correlación negativa con la concentración de nitrato, lo cual puede explicarse teniendo en cuenta que el efecto más importante de la deficiencia de nitrógeno es la degradación, por parte de la célula, de macromoléculas nitrogenadas, lo que se traduce en una disminución significativa del contenido celular de nitrógeno y en una acumulación de sustancias de reserva como lípidos y carbohidratos (Kaplan *et al.*, 1986), por lo que la relación C:N aumenta. De aquí que la concentración celular de proteínas tenga una relación proporcional con la concentración de nitrato, al igual que la concentración celular de clorofila a, mientras que la

concentración de carotenoides por célula tiene una correlación negativa con este factor.

De forma general, los cultivos de microalgas limitados por nutrientes experimentan cambios predecibles en cuanto a su composición bioquímica, por lo que la relación entre varios componentes celulares se han propuesto para estimar el estado, desde el punto de vista nutricional, de las poblaciones microalgales (Healey, 1975; Ganf *et al.*, 1986). En condiciones de estrés *D. salina* reduce su velocidad de crecimiento, la tasa de fijación de carbono, acumula grandes cantidades de carotenos y se estimula el metabolismo del ácido abscísico (ABA). Estas respuestas son claros mecanismos de regulación que permiten al organismo tolerar dichas condiciones (Cowan *et al.*, 1992).

La deficiencia de nitrógeno promueve en cultivos de *D. salina*, dentro de la radiación fotosintéticamente activa y a longitudes de onda mayores de 700 nm, la disminución de la tasa de crecimiento, la concentración celular de proteínas y clorofilas, y el aumento de la concentración celular de carotenoides, respuestas todas esperadas bajo limitación de nutrientes; es decir, un aumento de las sustancias de reserva y una movilización de las fuentes de nitrógeno endógenas como la RuBisCO y los LHC (Light Harvesting Complex).

Por otra parte, la relación C:N aumenta proporcionalmente con el nivel de irradiancia espectral dentro del intervalo ensayado ($35-75 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), lo que está relacionado con el aumento de la tasa de fotosíntesis. La intensidad de la luz influye sobre el patrón de síntesis macromolecular de las células en cultivo. Los componentes del aparato fotosintético: los complejos pigmento-proteína, los transportadores de la cadena de transporte electrónico y las enzimas del ciclo de reducción del carbono, forman parte de la fracción nitrogenada en algas (Geider y Osborne, 1992). La asimilación del nitrógeno, por tanto, interacciona fuertemente con la fotosíntesis y la respiración (Turpin *et al.*, 1988); estas interacciones se producen básicamente a través de la oxidación del poder reductor fotogenerado, la fijación fotosintética del

carbono, el suministro de esqueletos carbonados para la biosíntesis de aminoácidos y la oxidación del poder reductor del ciclo de los ácidos tricarbónicos. Proporcional al aumento del nivel de irradiación espectral hay un aumento de la concentración celular de proteínas, un aumento de los carotenoides y una disminución del contenido de clorofila a.

La relación entre el incremento de carbono interno en relación con el de nitrógeno está claramente afectado por la longitud de onda, resultados que coinciden con los de López-Figueroa (1993); esta relación fue menor en luz roja y azul, respecto al rojo lejano. De forma general, la relación C:N está fuertemente correlacionada con la concentración celular de carotenos y negativamente correlacionada con la de clorofila a, y por tanto con la relación clorofila a: carotenos en los cultivos de *D. salina*; por lo que su variación con los distintos factores ensayados está muy relacionada con la respuesta del aparato fotosintético.

Laws y Chalup (1990) explica que la relación C:N está correlacionada con la tasa de crecimiento; sin embargo, en los cultivos de *D. salina* establecidos en luz continua esta relación no presentó una relación lineal con la tasa de crecimiento y/o la capacidad de carga de los cultivos, lo que apoyaría la hipótesis de que el nitrógeno no es el único factor que limita el crecimiento (Laws y Bannister, 1980), existiendo interacción entre los distintos factores estudiados.

El peso seco celular varía en función de la fuente de nitrógeno y la fase de crecimiento. Aunque no se pueden establecer patrones comunes para las diferentes especies (Fidalgo, 1995), para la mayoría, éste aumenta con el tiempo de cultivo, independientemente de la fuente de nitrógeno empleada, comportamiento que de forma general se observó en todos los cultivos establecidos en estos experimentos. En los cultivos de *D. salina* se obtienen mayores pesos secos en condiciones de ausencia o déficit de nitrato. En *D. tertiolecta* y *D. primolecta* se ha encontrado un aumento significativo del peso seco con la reducción del contenido de nutrientes en el medio de cultivo

(Wikfors *et al.*, 1984; Uriarte *et al.*, 1993). Estos resultados están relacionados con el aumento de la concentración de carotenoides en células nitrato deficientes.

Los resultados indican que existe una compleja relación entre los factores ensayados y la biosíntesis y acumulación de carotenoides; según los resultados de los análisis estadísticos ésta no es precisamente una relación inversa entre la tasa de crecimiento o la capacidad de máxima carga de los cultivos y la carotenogénesis. Lo que indica que existe activación o inducción de enzimas o mecanismos de síntesis con la consiguiente acumulación de carotenoides.

La relación entre fotosíntesis y crecimiento ha sido fijada para cualquier especie en condiciones de saturación de nutrientes y crecimiento continuo; sin embargo, las respuestas pueden variar entre las diferentes especies (Laws y Bannister, 1980). De forma general, se pueden formular varias hipótesis para explicar las variaciones en cuanto a la relación entre estos factores: diferencias en las propiedades de los sistemas de captación de la luz entre las especies; variaciones en la maquinaria fotosintética que producen cambios en los requerimientos de luz para la fotosíntesis; diferencias en la relación fotosíntesis: respiración; diferencias en la proporción del carbono fijado que es excretado y, por último, la influencia de la composición celular sobre el coeficiente fotosintético (Falkowski y Kiefer, 1985).

Teniendo en cuenta la respuesta del aparato fotosintético de esta microalga, el análisis espectrofotométrico constituye un método rápido para determinar el estado nutricional de las células en cultivo, de aquí que en los cultivos a gran escala la relación clorofila a: carotenos sea un criterio útil para decidir el momento óptimo para la cosecha, o bien la estrategia más conveniente para inducir la síntesis de β -caroteno en *D. salina*. Esta relación fue propuesta por Flynn *et al.* (1992) para caracterizar la situación nutricional de los cultivos de microalgas.

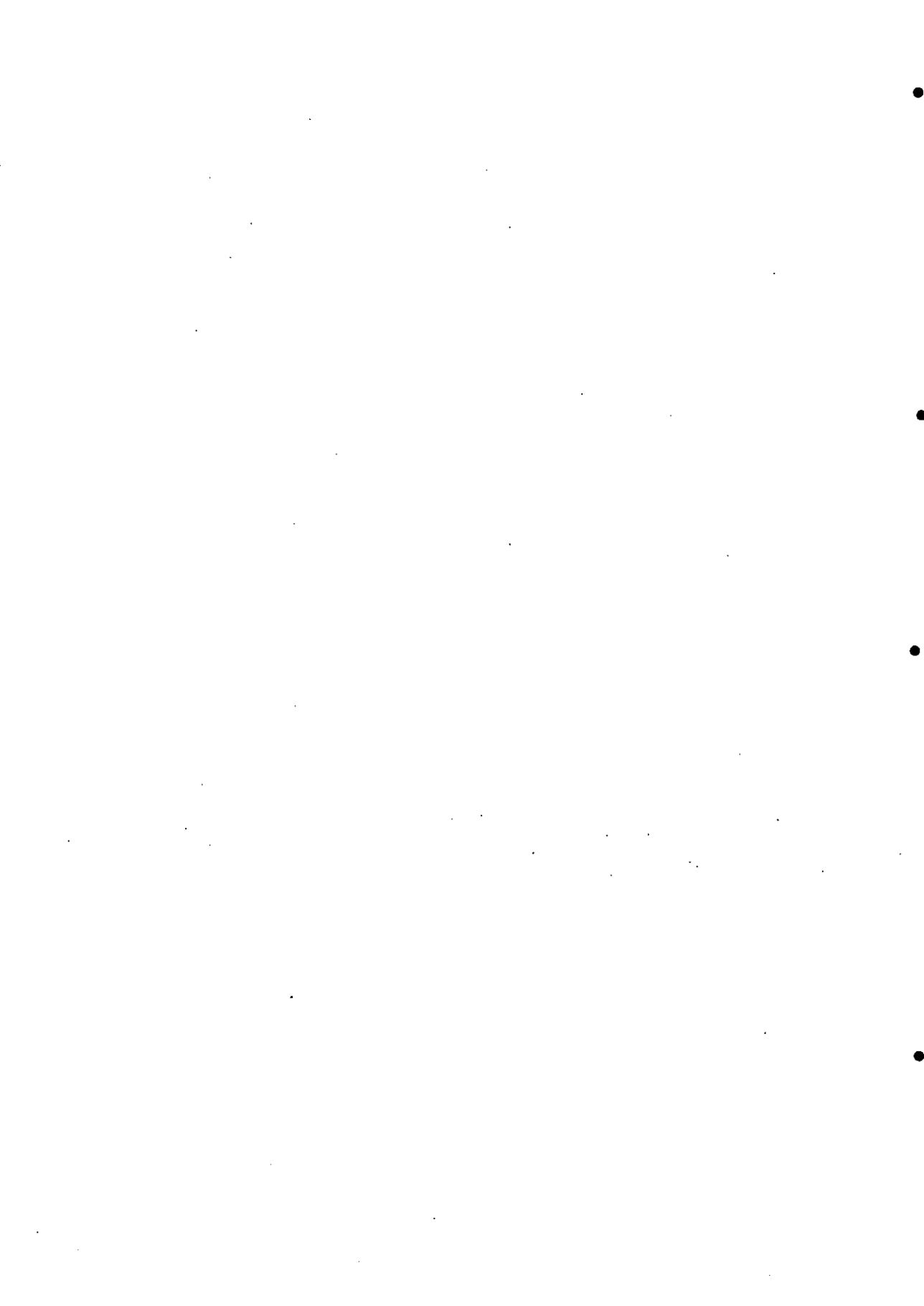
El análisis de pigmentos es importante para el control, normalización y optimización de los cultivos masivos. Su estimación diaria permite una evaluación rápida y sencilla del estado de las células en cultivo. De forma general, la variación en cuanto a composición pigmentaria puede ser usada en la modelización del crecimiento microalgal; no obstante, debido a la complejidad en la respuesta a los factores que intervienen en el crecimiento y las diferencias interespecificas en cuanto a las respuestas a factores limitantes (Droop, 1983; Laws y Chalup, 1990), la modelización del proceso seguirá siendo problemática, sobre todo en los procesos productivos a gran escala.

Aunque es muy importante conocer la fisiología de *Dunaliella* y los factores que influyen sobre la carotenogénesis, es necesario dominar desde el punto de vista ecológico los sistemas de cultivo a cielo abierto, y por tanto, la ecología de los ecosistemas naturales donde *Dunaliella* es la especie que predomina. La microalga en estudio fue aislada del medio natural donde colonizaba lagunas saladas cuando la evaporación era máxima, por lo que tolera un amplio rango de temperaturas (18- 32°C) con un crecimiento aceptable, y una salinidad hasta del 32%. En estas condiciones la existencia de predadores fue casi nula, sin embargo los cultivos estuvieron contaminados con *D. viridis*, la cual fue fácil de eliminar con el aumento de la salinidad. En los cultivos a cielo abierto la especie suele coincidir con un ciliado y con *Pseudomonas alcaligenes*, pero ambos desaparecen inmediatamente cuando se induce la carotenogénesis, ya que el shock osmótico sólo lo tolera *D. salina*. Esta microalga se cultiva normalmente con un 12% de salinidad y en condiciones de inducción de β -caroteno, ésta se aumenta hasta el 24 ó 32%. Por la extrema salinidad de los cultivos es fácil el mantenimiento de cultivos unialgales con esta especie, relativamente libre de competidores, predadores y patógenos.

La biomasa obtenida se procesaría en una planta piloto para la extracción del β -caroteno, que generalmente, se hace directamente en

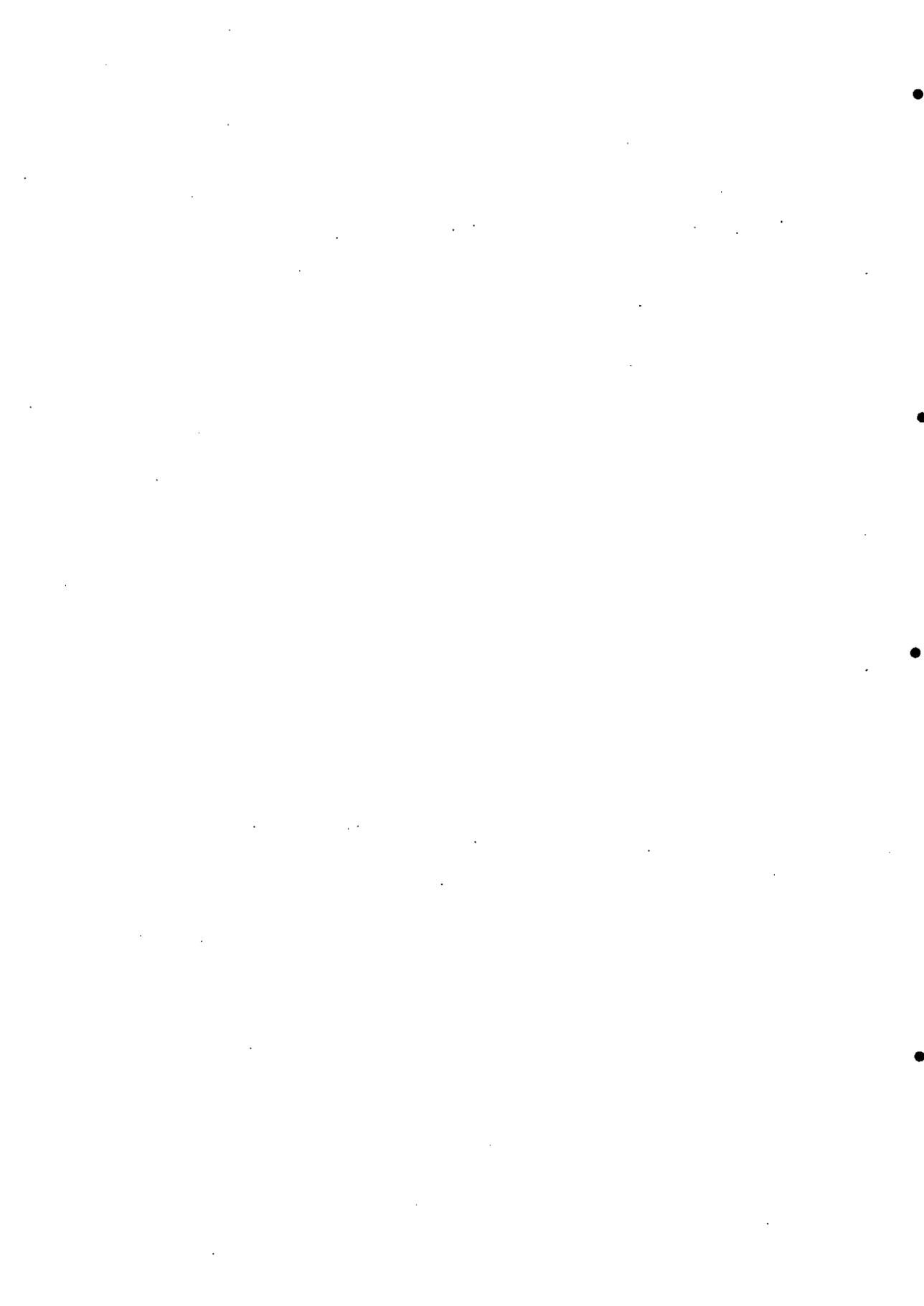
aceite enriquecido con lecitinas; aunque existen otros métodos de extracción (Ben-Amotz *et al.*, 1982; Borowitzka *et al.*, 1984). El diseño de las plantas piloto para la explotación comercial de microalgas debe integrar varios procesos tecnológico; la flexibilidad de éstas no sólo permitirá obtener varios bioproductos sino procesar al mismo tiempo biomasa de diferentes especies.

6.- Conclusiones



- 1.- La biomasa de *Chlorella vulgaris* tiene un amplio campo de aplicaciones en la bioindustria, permitiendo la extracción de sustancias de interés químico-farmacéutico e industrial como el extracto hidroalcohólico de cuproclorofilinas (EHC) con propiedades antisépticas y desinfectantes de amplio espectro, y el extracto acuoso (EC), que puede ser utilizado como medio de cultivo para el crecimiento de microorganismos y células vegetales. La fracción proteica de dicho extracto consiste en tres péptidos de bajo peso molecular: 12.4, 16.6 y 18.6 kDa, compuestos fundamentalmente por histidina, ácido aspártico y ácido glutámico, que podrían tener actividad como reguladores del crecimiento.
- 2.- La concentración de nitrato, la irradiancia espectral y la longitud de onda tienen una influencia significativa sobre el crecimiento y la composición pigmentaria de *Dunaliella salina*. Existe interacción entre estos tres factores para la composición isomérica del β -caroteno, siendo éste el carotenoide mayoritario con una proporción mayor del isómero 9-*cis*. Las mayores concentraciones celulares de β -caroteno se alcanzan en los cultivos sin nitrato o con una concentración limitante (0.5 mM), a la mayor irradiancia ensayada, en luz día con rojo lejano. El rojo lejano ($\lambda > 700$ nm) estimula la acumulación de β -caroteno en *Dunaliella salina*, obteniéndose mayores concentraciones celulares que en luz día y el resto de los intervalos de longitudes de onda de la región fotosintéticamente activa (400-700 nm).
- 3.-Dentro de la radiación fotosintéticamente activa la luz día es la que permite mayor acumulación de β -caroteno. Respecto al resto de los intervalos de longitudes de onda ensayados, la luz azul aumenta la síntesis y acumulación de β -caroteno en la célula, pero no favorece la biosíntesis de α -caroteno, mientras que las luces verde, azul y roja favorecen la acumulación de luteína, si bien la irradiancia y la concentración de nitrato inducen un comportamiento similar en cuanto a la acumulación de β -caroteno.

7.- Bibliografía



- Abalde, J., Cid, A., Fidalgo, P., Torres, E. & Herrero, C. 1995. **Microalgas: Cultivo y Aplicaciones**. Universidade da Coruña, A Coruña. 210 pp.
- Aldave-Pajares, A. 1969. Cushuro, algas azul-verdes como alimento en la región alta andina peruana. *Bol. Soc. Bot.* (1): 5-43.
- Algarra, P. & Rüdiger, W. 1993. Acclimation processes in the light harvesting complex of the red alga *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew et Ross, according to irradiance and nutrient availability. *Plant Cell Environm.* (16): 149.
- Ammirato, P.V. 1983. Embryogenesis. En: **Handbook of Plant Cell Culture**. vol. 1. Mac Millan Publishing. New York. pp: 82-123.
- Anderson, B. & Styring, S. 1991. Photosystem II-molecular organization, function and acclimation. En: **Current Topics in Bioenergetics**. vol. 16. Lee, C.P. (ed.). Academic Press. Orlando, California. pp: 1-81.
- Anderson, J.M. 1986. Photoregulation of the composition, function and structure of thylacoid membranes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **37** : 93-136.
- Aparicio, P.J., Roldán, J.M. & Calero, F. 1976. Blue light photoreactivation of nitrate reductase from green algae and higher plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **70** : 1071-1077.
- Barkholt, V. & Jensen, A.L. 1989. Amino acid analysis: determination of cysteine plus half-cystine in proteins after hydrochloric acid hydrolysis with a disulfide compound as additive. *Anal. Biochem.* **177** : 318-322.
- Barlow, R.G. 1984. Dynamics of the decline of a phytoplankton bloom after an upwelling event. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* (16): 121-126.
- Becker, E.W. 1988. Micro-algae for human and animal consumption. En: **Micro-algal Biotechnology**. Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. (eds.). Cambridge Univ. Press. Cambridge. pp: 222-256.

- Becker, E.W. (ed.) 1994. **Microalgae. Biotechnology and Microbiology.** Cambridge Univ. Press, Cambridge. 293 pp.
- Ben-Amotz, A. 1986. β -carotene enhancement and its role in protecting *Dunaliella bardawil* against injury by high irradiance. *Nova Hedwigia* (83): 132-135.
- Ben-Amotz, A. 1987. Effect of irradiance and nutrient deficiency on the chemical composition of *Dunaliella bardawil* Ben-Amotz & Avron (Volvocales, Chlorophyta). *J. Plant. Physiol.* **131** : 479-487.
- Ben-Amotz, A. 1995. New mode of *Dunaliella* biotechnology: two-phase growth for β -carotene production. *J. Appl. Phycol.* (7): 65-68.
- Ben-Amotz, A. & Avron, M. 1983a. Accumulation of metabolites by halotolerant algae and its industrial potential. *Ann. Rev. Microbiol.* **37** : 95-119.
- Ben-Amotz, A. & Avron, M. 1983b. On the factors which determine massive-carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol.* **72** : 593-597.
- Ben-Amotz, A. & Avron, M. 1989a. The biotechnology of mass culturing *Dunaliella* for products of commercial interest. En: **Algal and Cyanobacterial Biotechnology.** Cresswell, R.C., Rees, T.A.V. & Shah, N. (eds.). Longman Scientific and Technical Press. London. pp: 90-114.
- Ben-Amotz, A. & Avron, M. 1989b. The wavelength dependence of massive carotene synthesis in *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* **25** : 175-178.
- Ben-Amotz, A. & Avron, M. 1990. The biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella*. *Trends Biotech.* **8** : 121-126.
- Ben-Amotz, A., Edelstein, S. & Avron, M. 1986. Use of the β -carotene rich alga *Dunaliella bardawil* as a source of retinol. *Br. Poultry Sci.* **27** : 613-619.

- Ben-Amotz, A., Katz, A. & Avron, M. 1982. Accumulation of β -carotene in halotolerant algae: purification and characterization of β -carotene-rich globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* **18** : 529-537.
- Ben-Amotz, A., Lers, A. & Avron, M. 1988a. Stereoisomers of β -carotene and phytoene in the alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol.* **86** : 1286-1291.
- Ben-Amotz, A., Mokady, S. & Avron, M. 1988b. The β -carotene-rich alga *Dunaliella bardawil* as a source of retinol in a rat diet. *Br. J. Nutr.* **59** : 443-449.
- Ben-Amotz, A. & Shaish, A. 1992. β -carotene biosynthesis. En: ***Dunaliella: Physiology, Biochemistry and Biotechnology***. Avron, M. & Ben-Amotz, A. (eds.). CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. pp: 205-214.
- Ben-Amotz, A., Shaish, A. & Avron, M. 1989. Mode of action of the massively accumulated β -carotene of *Dunaliella bardawil* in protecting the alga against damage by excess irradiation. *Plant Physiol.* **91** : 1040-1043.
- Ben-Amotz, A., Tornabene, T.G. & Thomas, W.H. 1985. Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. *J. Phycol.* **21** : 72-81.
- Benemann, J.R. & Weissman, J.C. 1984. Chemicals from microalgae. En: ***Bioconversion Systems***. Wise, D.L. (ed.). CRC Press. Boca Raton, Florida. pp: 59-70.
- Benemann, J.R., Weissman, J.C., Koophan, B.L. & Oswald, W.J. 1977. Energy production by microbial photosynthesis. *Nature* **268** : 19-23.
- Berges, J.A., Charlebois, D.O., Mauzerall, D.C. & Falkowsky, P.G. 1996. Differential effects of nitrogen limitation on photosynthetic efficiency of photosystems I and II in microalgae. *Plant. Physiol.* **110** : 689-696.

- Berner, T. 1993. Ultrastructural characterization of eukariotic algal groups. En: **Ultrastructure of Microalgae**. Berner, T. (ed.). CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. pp: 2-6.
- Berner, T., Dubinsky, Z., Wyman, K. & Falkowski, P.G. 1989. Photoadaptation and the «package» effect in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* **25** : 70-78.
- Bobbio, P.A. & Guedes, M.C. 1990. Stability of cooper and magnesium chlorophylls. *Food Chem.* **36** : 165-168.
- Booth, W.A. & Beardall, J. 1991. Effects of salinity on inorganic carbon utilization and carbonic anhydrase activity in the halotolerant alga *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *Phycologia* **30** : 220-225.
- Borowitzka, L.J. & Borowitzka, M.A. 1990. Commercial production of β -carotene by *Dunaliella salina* in open ponds. *Bull. Mar. Sci.* **47** : 244-252.
- Borowitzka, L.J., Borowitzka, M.A. & Moulton, T.P. 1984. The mass culture of *Dunaliella salina* for fine chemicals: from laboratory to pilot plant. *Hydrobiologia* **116-117** : 115-134.
- Borowitzka, M.A. 1988. Vitamins and fine chemicals from micro-algae. En: **Micro-algal Biotechnology**. Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. (eds.). Cambridge Univ. Press. Cambridge. pp: 153-196.
- Borowitzka, M.A. 1992a. Algal biotechnology products and processes-matching science and economics. *J. Appl. Phycol.* **4** : 267-279.
- Borowitzka, M.A. 1992b. Comparing carotenogenesis in *Dunaliella* and *Haematococcus*: implications for commercial production strategies. En: **Profiles on Biotechnology**. Villa, T.G. & Abalde, J. (eds.). Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela. pp: 301-310.

- Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. 1988a. *Dunaliella*. En: **Micro-algal Biotechnology**. Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. (eds.). Cambridge Univ. Press. Cambridge. pp: 27-58.
- Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. 1988b. Limits to growth and carotenogenesis in laboratory and large-scale outdoor cultures of *Dunaliella salina*. En: **Algal Biotechnology**. Stadler, J., Mollion, J., Verdus, M.C., Karamanos, Y., Morvan, H. & Christiaen, D. (eds.). Elsevier Applied Science Publisher. Amsterdam. pp: 371-381.
- Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. (eds.) 1988c. **Micro-algal Biotechnology**. Cambridge University Press, Cambridge. 477 pp.
- Bourrelly, P. 1990. **Les algues d'eau douce. Initiation à la systématique. I. Les Algues vertes**. Boubée, N. & Cie, Paris. 572 pp.
- Bradburne, J.A., Kasperbauer, M.J. & Mathis, J.N. 1989. Reflected Far-Red light effects on chlorophyll and light-harvesting chlorophyll protein (LCH-II) contents under field conditions. *Plant. Physiol.* (91): 800-803.
- Braune, W. & Ekelund, N.G.A. 1990. Phototactic responses in *Haematococcus lacustris* and its modification by light intensity and the carotenoid biosynthesis inhibitor Norflurazon. *Arch. Microbiol.* **154** : 448-452.
- Britton, G. 1988. Biosynthesis of carotenoids. En: **Plant Pigments**. Goodwin, T.W. (ed.). Academic Press. Padstow, Cornwall. pp: 133-177.
- Brown, M.R., Dunstan, G.A., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K., Barret, S.M. & Leroi, J.M. 1993. The influence of irradiance on the biochemical composition of the prymnesiophyte *Isochrysis* sp. (clone t-iso). *J. Phycol.* **29** : 601-612.
- Brown, M.R., Jeffrey, S.W. & Garland, C.D. 1989. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture; a literature review. *Rep. CSIRO Mar. Lab.*, (205): 50.

- Brown, M.R. & Miller, K.A. 1992. The ascorbic acid content of eleven species of microalgae used in mariculture. *J. Appl. Phycol.* **4** : 205-215.
- Brown, T.E., Richardson, F.L. & Vaughn, M.L. 1967. Development of red pigmentation in *C. winmeri* (Chlorophyta, Chlorococcales). *Phycologia* **6** (4): 12.
- Burkiewicz, K. 1987. Active substances in the media after algae cultivation. *Acta Physiol. Plant.* (9): 211-217.
- Burlew, J.S. 1953. Current status of the large-scale culture of algae. En: **Algal Culture from Laboratory to Pilot Plant**. Publ. N°. 600. Burlew, J.S. (ed.). Carnegie Institution of Washington. Washington, D.C. pp: 3-23.
- Caperon, J. & Meyer, J. 1972. Nitrogen limiting growth of marine phytoplankton. I. Changes in population characteristics with steady-state growth rate. *Deep Sea Res.* (19): 601-618.
- Castelfranco, P.A. & Beale, S.I. 1983. Chlorophyll biosynthesis: Recent advances and areas of current interest. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **34** : 241-278.
- Chapman, D.J. & Gellenbeck, K.W. 1989. An historical perspective of algal biotechnology. En: **Algal and Cyanobacterial Biotechnology**. Cresswell, R.C., Rees, T.A.V. & Shah, N. (eds.). Longman Scientific Technical Press. New York. pp: 1-23.
- Chiong, R.M., Betancourt, A., Cuza, C. & Rojas, M.C. 1985. Pruebas Microbiológicas para Evaluar la Efectividad Bactericida de Desinfectantes Químicos. INHE. La Habana, Cuba.
- Cohen, Z. 1986. Products of microalgae. En: **Handbook of Microalgae Mass Culture**. Richmond, A. (ed.). C.R.C. Press Inc. Boca Raton, Florida. pp: 421-454.

- Conradt, W. 1980. Über die Wirkung kurzweilig-sicht-barer Strahlung auf Plastidäre und Cytoplasmatische Enzyme einer Chlorophyllfreien *Chlorella* Mutante. *Tesis Doctoral*, University of Bielfeld.
- Cook, E.F. & Martin, E.W. 1953. **Farmacia Práctica de Remington**. UTEHA, México. 3216 pp.
- Coulson, J. 1980. Naturally occurring colouring materials for foods. En: **Developments in Food Colours**. Walford, J. (ed.). Applied Science Publishers. London. pp: 212.
- Cowan, A.K., Logie, M.R.R., Rose, P.D. & Phillips, L.G. 1995. Stress induction of zeaxanthin formation in the β -carotene-accumulating alga *Dunaliella salina* Teod. *J. Plant Physiol.* **146** : 554-562.
- Cowan, A.R., Rose, P.D. & Horne, L.G. 1992. *Dunaliella salina*: A model system for studying the response of plant cells to stress. *J. Exp. Bot.* **43** : 1535-1547.
- Crossett, R.N., Drew, E.A. & Larkum, A.W.D. 1965. Chromatic adaptation in benthic marine algae. *Nature* (207): 547- 548.
- Dam, R., Lee, L., Fry, P.L. & Fox, H. 1965. Utilization of algae as protein source of humans. *J. Nutr.* **86** : 376-382.
- Darley, W.M. 1987. **Biología de las Algas. II. Enfoque Fisiológico**. Limusa, S.A., Méjico. 236 pp.
- Dashwood, R.H., Breinholt, V. & Bailey, G.S. 1991. Chemopreventive properties of chlorophyllin: Inhibition of aflatoxin B1 (AFB1)-DNA binding *in vivo* and anti-mutagenic activity against AFB1 and two heterocyclic amines in the *Salmonella* mutagenicity assay. *Carcinogenesis* **12** : 939-942.
- De la Rosa, M.A., Hervás, M., Serrano, A. & Losada, M. 1990. **Fotobioquímica**. Ediciones Síntesis, Madrid. 266 pp.

- De Pauw, N. & De la Noüe, J. 1988. A review of production and use of microalgae: The potential of microalgal biotechnology. *Biotech. Adv.* **6** : 725-770.
- De Pauw, N. & Persoone, G. 1988. Microalgae for aquaculture. En: **Micro - algal Biotechnology**. Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. (eds.). Cambridge Univ. Press. Cambridge. pp: 197-221.
- Demmig-Adams, B. 1990. Carotenoids and photoprotection in plants: A role for the xantophyll zeaxanthin. *Biochim. Biophys. Acta* (1020): 1-24.
- Dodge, J.D. 1973. **The Fine Structure of Algal Cells**. Academic Press Inc., New York. 261 pp.
- Dring, M.J. 1987. Marine plants and blue light. En: **Blue Light Responses: Phenomena and Occurrence in Plants and Microorganisms**. Senger, H. (ed.). CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. pp: 121-140.
- Dring, M.J. 1988. Photocontrol of development in algae. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* (39): 157-174.
- Droop, M.R. 1968. Vitamin B₁₂ and marine ecology. 4. The kinetics of uptake, growth and inhibition of *Monochrysis lutheri*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* **48** : 689-733.
- Droop, M.R. 1983. 25 years of algal growth kinetics. A personal view. *Bot. Mar.* **26** : 99-112.
- Dubinsky, Z. & Aaronson, S. 1979. Increase of lipid yields from some algae by acid extraction. *Phytochemistry* **18** : 51-52.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Annal. Chem* **28** : 350-356.

- Fábregas, J., Abalde, J., Cabezas, B. & Herrero, C. 1989a. Changes in protein, carbohydrates and gross energy in the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) by nitrogen concentrations as nitrate, nitrite and urea. *Aquacult. Eng.* **8** : 223-239.
- Fábregas, J., Abalde, J. & Herrero, C. 1989b. Biochemical composition and growth of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with different ammonium nitrogen concentrations as chloride, sulphate, nitrate and carbonate. *Aquaculture* **83** : 289-304.
- Fábregas, J., Abalde, J., Herrero, C., Cabezas, B. & Veiga, M. 1984. Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture* **42** : 207-245.
- Fábregas, J., Herrero, C., Abalde, J. & Cabezas, B. 1985a. Growth, chlorophyll a and protein of the marine microalga *Isochrysis galbana* in batch cultures with different salinities and high nutrient concentrations. *Aquaculture* **50** : 1-11.
- Fábregas, J., Herrero, C., Cabezas, B. & Abalde, J. 1985b. Mass culture and biochemical variability of the marine microalga *Tetraselmis suecica* Kylin (Butch) with high nutrient concentrations. *Aquaculture* **49** : 231-244.
- Fábregas, J., Herrero, C., Cabezas, B., Liaño, R. & Abalde, J. 1986. Response of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* to nutrient concentration and salinity variations in batch cultures. *J. Plant Physiol.* **125** : 475-484.
- Falkowski, P. & Kiefer, D.A. 1985. Chlorophyll a fluorescence in phytoplankton: relationships to photosynthesis and biomass. *J. Plankton Res.* **7** : 715-731.

- Falkowski, P.G., Sukenik, A. & Herzig, R. 1989. Nitrogen limitation in *Isochrysis galbana* (Haptophyceae). II. Relative abundance of chloroplast proteins. *J. Phycol.* **25** : 471-478.
- Falkowsky, P.G. & La Roche, J. 1991. Acclimation to spectral irradiance in alga. *J. Phycol.* **27** : 8-24.
- FAO/WHO 1970. Specifications for identity and purity of some food colours, emulsifiers, stabilizers, anti-caking agents and certain other substances. WHO/FOOD/Add. Report Series 46B. 70/73. Roma.
- Fernández, E. & Cárdenas, J. 1989. Genetics and regulatory aspects of nitrate assimilation in algae. En: **Molecular and Genetics Aspects of Nitrate Assimilation**. Wray, J.L. & Kinghorn, J.R. (eds.). Oxford Scientific Press. Oxford. pp: 88-100.
- Fidalgo, P. 1995. Variabilidad Bioquímica de Microalgas Marinas en Cultivo en Función de la Fuente de Nitrógeno. *Tesis Doctoral*, Universidade da Coruña.
- Fingerhut, U., Weebs, L.E. & Soeder, C.J. 1984. Increased yields of *Rizhobium japonicum* by an extract of the green alga *Scenedesmus obliquus* (276-3a). *Microbiol. Biotechnol.* **19** : 358-360.
- Flynn, K.J., Garrido, J.L., Zapata, M., Pik, H. & Hipkin, C.R. 1992. Changes in fatty acids, amino acids and carbon/nitrogen biomass during nitrogen starvation of ammonium and nitrate-grown *Isochrysis galbana*. *J. Appl. Phycol.* **4** : 95-104.
- Fogg, E. 1988. The flexibility and variety of algal metabolism. En: **Biochemistry of the Algae and Cyanobacteria**. Rogers, L.J. & Gallon, J.R. (eds.). Clarendon Press. Oxford. pp: 3-12.
- Fookes, J.R. & Jeffrey, S.W. 1989. The structure of chlorophyll c_3 , a novel marine photosynthetic pigment. *J. Chem. Soc. (Chem. Commun.)*: 1827-1828.

- Forster, R.M. & Lüning, K. 1996. Photosynthetic response of *Laminaria digitata* to ultraviolet A and B radiation. *Sci. Mar.* **60 (Supl. 1)** : 65-71.
- Fráustico da Silva, J.J.R. & Williams, R.J.P. 1991. **The Biological Chemistry of the Elements: The Inorganic Chemistry of Life**. Clarendon Press, Oxford. 568 pp.
- Ganf, G., Stone, S. & Oliver, R. 1986. Use of protein to carbohydrate ratios to analyse for nutrient deficiency in phytoplankton. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.* **37** : 183-197.
- Gantt, E. 1990. Pigmentation and fotoacclimation. En: **Biology of Red Algae**. Cole, K.M. & Sheet, R.G. (eds.). Cambridge Univ. Press. Cambridge. pp: 203.
- Geider, R.J., La Roche, J., Greene, R.M. & Olaizola, M. 1993. Response of the photosynthetic apparatus of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) to nitrate, phosphate, or iron starvation. *J. Phycol.* **29** : 755-766.
- Geider, R.J. & Osborne, B.A. 1992. **Algal Photosynthesis. The Measurement of Algal Gas Exchange**. Chapman and Hall, Inc., New York. 256 pp.
- Ginzburg, M. 1987. *Dunaliella*: a green alga adapted to salt. *Adv. Bot. Res.* **14** : 95-184.
- Ginzburg, M. & Ginsburg, B.Z. 1993. Effect of light intensity on adaptation of *Dunaliella* to very high salt concentrations. *J. Exp. Bot.* **44** (267): 1561-1567.
- Gnaiger, E. & Bitterlich, G. 1984. Proximate biochemical composition and caloric content calculated from elemental CHN analysis: a stoichiometric concept. *Oecologia* **62** : 289-298.
- Golueke, C.G., Oswald, W.J. & McGauhey, P.H. 1959. The biological control of enclosed environment. *Seawage Ind. Wastes* **31** : 1125.

- Goodwin, T. & Britton, G. 1988. Distribution and analysis of carotenoids. En: **Plant Pigments**. Goodwin, T.W. (ed.). Academic Press. Padstow, Cornwall. pp: 61-132.
- Goodwin, T.W. (ed.) 1980. **The Biochemistry of Carotenoids**. Chapman Hall, London. 377 pp.
- Grant, B.R. 1968. Effect of carbon dioxide concentration and buffer system on nitrate and nitrite assimilation in *Dunaliella teriolecta*. *J. Gen. Microbiol.* (54): 444-445.
- Gudin, C. 1988. Why brother with microalgae? En: **Algal Biotechnology**. Sandler, S., Mollion, J., Verdus, M.C., Karamanos, Y., Morvan, H. & Christiasen, D. (eds.). Elsevier Applied Science Publisher. Amsterdam. pp: 33-40.
- Guerrero, M.G., Vega, J.M. & Losada, M. 1981. The assimilatory nitrate reducing system and its regulation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **32** : 169-204.
- Gurinovich, L.K., Kustova, C.D., Matorina, Z.A., Filipenkova, V.C., Savchenko, V.V., Pshizov, M.B., Konovalov, A.I., Nazarov, Y.F. & Andreievich, N.N. 1985. Métodos de Obtención de Derivados de la Clorofila. Patente N° 2999158/ 28- 13. Rusia.
- Häder, D.P. & Tevini, M. Pergamon Book, L. 1987. **General Photobiology**. Pergamon Press, Oxford. 323 pp.
- Hall, D.O. 1986. The production of biomass: a challenge to our society. En: **Handbook of Microalgal Mass Culture**. Richmond, A. (ed.). CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. pp: 1-23.
- Hall, D.O. & Rao, K.K. (eds.) 1994. **Photosynthesis**. Cambridge Univ. Press, Cambridge. 211 pp.

- Hansen, J., Packard, J. & Doyle, W. 1981. Mariculture of red seaweeds. A California Sea Grant College Program Publication. TCSGCP-002. California.
- Harder, R. & von Witsch, H. 1942. Über Massenkultur von diatomeen. *Ber. Bot. Ges.* (60): 142.
- Härder, D.P. 1993. Risks of enhanced solar ultraviolet radiation for aquatic ecosystems. En: **Progress in Phycological Research**. 9. Round, F.E. & Chapman, D.J. (eds.). Biopress, Ltd., Bristol
- Harding, R.W. & Shropshire, W.J. 1980. Photocontrol of carotenoid biosynthesis. *Ann. Rev. Physiol.* **3** : 217-238.
- Harris, E.L.V. & Angal, S. Rickwood, D. & Hames, B.D. 1993. **Protein Purification Methods. A Practical Approach**. Oxford University Press, Oxford. 317 pp.
- Hasegawa, T. 1990. Accelerated restoration of the leucocyte number and augmented resistance against *E. coli* in cyclophosphamide-treated rats orally administered with a hot water extract of *Chlorella vulgaris*. *Int. J. Immunopharm.* **12** (8): 883-891.
- Healey, F.P. 1975. Physiological indicators of nutrient deficiency in algae. *Can. Fish. Mar. Ser. Res. Dev. Tech. Rep.* (585): 30.
- Herbert, D., Phipps, P.J. & Strage, R.E. 1971. Chemical analysis of microbial cells. En: **Method of Enzimology**. Norris, J.R. & Ribbons, D.W. (eds.). Academic Press. New York. pp: 333.
- Herrero, C., Cid, A., Fábregas, J. & Abalde, J. 1991. Yields in biomass and chemical constituents of four commercially important marine microalgae with different culture media. *Aquacult. Eng.* **10** : 99-110.

- Hipkin, C.R. & Syrett, P.J. 1977. Some effects of nitrogen-starvation on nitrogen and carbohydrate metabolism in *Ankistrodesmus braunii*. *Planta* **133** : 209-214.
- Hobson, L.A. 1974. Effects of interactions of irradiance, daylength and temperature on division rates of three species of marine unicellular algae. *J. Fish. Res. Board Can.* **31** : 391-395.
- Holland, D.L. & Gabbott, P.A. 1971. A micro-analytical scheme for the determination of protein, carbohydrate, lipid and RNA levels in marine invertebrate larvae. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* **51** : 659-668.
- Huppe, H.C. & Turpin, D.H. 1994. Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45** : 577-607.
- Ibusuki, K. & Minamishima, Y. 1990. Effect of *Chlorella vulgaris* extracts on murine cytomegalovirus infections. *Nat. Immun. and Cell Growth Regul.* (9): 121-128.
- Ijima, N., Fujii, I., Shimatsu, H. & Katoh, S. 1982. Antitumor Agent and Method of Treatment Therewith. Patente N° P 1150-726-A82679. USA.
- Jegerschöld, C. & Stying, S. 1992. Photoinhibition of Cl⁻-depleted thylakoid membranes: Effects of illumination under anaerobic condition. En: **Trends in Photosynthesis Research**. Barber, J., Guerrero, M.G. & Medrano, H. (eds.). Intercept. Andover, Hampshire. pp: 59-70.
- Jiménez, C. & Niell, F.X. 1990. Influence of temperature and nitrogen concentration on photosynthesis of *Dunaliella viridis* Teodoresco. *J. Appl. Phycol.* **2** : 309-317.
- Jiménez, C., Niell, F.X. & Fernández, J.A. 1990. The photosynthesis of *Dunaliella parva* Lerche as a function of temperature, light and salinity. *Hydrobiologia* **197** : 165-172.

- Jiménez, C. & Pick, U. 1994. Differential stereoisomer compositions of b,b-carotene in thylakoids and in pigment globules in *Dunaliella*. *J. Plant Physiol.* **143** : 257-263.
- Jiménez del Río, M., Ramazanov, Z. & García-Reina, G. 1994. Dark induction of nitrate reductase in the halophilic alga *Dunaliella salina*. *Planta* **192** : 40-45.
- Johnston, H.W. 1970. The biological and economic importance of algae. 3. Edible algae of fresh and brackish waters. *Tuatora* **18** : 19-35.
- Jorgesen, J. & Convit, J. 1953. Cultivation of complexes with other freshwater microorganisms in the tropics. En: **Algal Culture from Laboratory to Pilot Plant**. Burlew, J.S. (ed.). Carnegie Inst. Washington, D.C. pp: 190-196.
- Kaplan, D., Cohen, Z. & Abeliovich, A. 1986a. Optimal growth conditions for *Isochrysis galbana*. *Biomass* **9** : 37-48.
- Kaplan, D., Richmond, A.E., Dubinsky, Z. & Aaronson, S. 1986b. Algal nutrition. En: **Handbook of Microalgal Mass Culture**. Richmond, A. (ed.). CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. pp: 43-67.
- Kasperbauer, M.J. & Peaslee, D.E. 1973. Morphology and photosynthetic efficiency of tobacco leaves that received end-of-day red or far red light during development. *Plant. Physiol.* **52** : 440-442.
- Kay, R. 1991. Microalgae as food and supplement. *Crit. Rev. Food Sc. and Nutr.* **30** (6): 555-573.
- Kelsey, J. & Maurer, I. 1966. An used test for hospital disinfectants. *Month Bull. Minist. Health and Pub. Health Lab. Service. London* **1** : 25-180.
- Kessler, E. 1986. Limits of growth of five *Chlorella* species in the presence of toxic heavy metals. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* **73** : 123-128.

- Ketchum, B.H. & Redfield, A.C. 1938. A method for maintaining a continuous supply of marine diatoms by culture. *Biol. Bull. Mar.* (75): 165-169.
- Keto, M.E. 1983. Algal resources, exploitation and use in East Africa. En: **Progress in Phycological Research**. Round, F.E. & Chapman, D.J. (eds.). Elsevier Science Publisher. Amsterdam. pp: 388-415.
- Kilyén, E., Itamza, O., Oltean, A. & Mures, T. 1983. Procedimiento de Preparación de un Colorante Natural Verde. Patente N° 110505. Rumania.
- Kirk, J.T. 1992. The nature and measurement of the light environment in the ocean. En: **Primary Productivity and Biogeochemical Cycles in the Sea**. Falkowsky, P.G. & Woodhead, A.D. (eds.). Plenum Press. New York. pp: 455.
- Kirk, J.T. 1994a. Ecological strategies. Cap. 12. En: **Light and Photosynthesis in Acuatic Ecosystems**. Kirk, J.T. (ed.). Cambridge University Press. Cambridge. pp: 360-431.
- Kirk, J.T. (ed.) 1994b. **Light and Photosynthesis in Acuatic Ecosystem**. Cambridge Univ. Press, Cambridge. 509 pp.
- Klein, R.M. 1992. Effects of green light on biological system. *Biol. Rev*(67): 199-284.
- Klockare, B. & Hemming, V.I. 1984. Chlorophyll b formation in darkness after phototransformation of protochlorophyllide and during a period of intermitent light. *Israel J. of Bot.* **33** : 175-183.
- Kobayashi, M., Kakizono, T., Nishio, N. & Nagai, S. 1992. Effects of light intensity, light quality and illumination cycle on axtaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis*. *J. Ferment. Bioeng.* **74** (1): 61-63.

- Kochert, G. 1978a. Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric method.
En: **Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods**. Hellebust, J. & Craigie, J. (eds.). Cambridge University Press. Cambridge. pp: 95-97.
- Kochert, G. 1978b. Quantitation of macromolecular components of microalgae.
En: **Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods**. Hellebust, J.A. & Craigie, J.S. (eds.). Cambridge Univ. Press. Cambridge. pp: 189-195.
- Kofrani, E. 1978. The nutritional value of green algae *Scenedesmus acutus* for humans. *Arch. Hydrobiol. Ergegn. Limnol.* **11** : 150-160.
- Kowallick, W. & Schürman, R. 1984. Chlorophyll a/ chlorophyll b ratios in *Chlorella vulgaris* in blue or red light. En: **Blue Light Effects in Biological System**. Senger, H. (ed.). Springer-Verlag. Berlin. pp: 352-358.
- Kowallick, W. 1987. Blue light effects on carbohydrate and protein metabolism.
En: **Blue Light Responses: Phenomena and Occurrence in Plants and Microorganisms**. Senger, H. (ed.). CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. pp: 8-13.
- Kowallick, W. & Grotjoham, N. 1988. Influence of red light on the activity of phosphofructokinase in *Chlorella kessleri*. *Physiol. Plant.* **74** : 101-106.
- Krasnikova, N.A. 1973. Proliferation of the epitelium surrounding a skin wound in hairless mice exposed to sodium chlorophyllin. *Byul. Eksp. Biol. Med.* **76** : 99-102.
- Krinsky, N.I. 1971. Function. En: **Carotenoids**. Isler, O. (ed.). Birkhäuser Verlag. Berlin. pp: 669-716.
- Laemmli, U.K. 1970. Reagent and gel preparation for SDS-PAGE slab gel. *Nature* **227** : 680.

- Larkum, A.W. & Barret, J. 1983. Light harvesting processes in algae. *Adv. Bot. Res.* **10** : 1-219.
- Laws, E.A. & Bannister, T.T. 1980. Nutrient and light growth of *Thalassiosira fluvialis* in continuous culture, with implications for phytoplankton growth in the ocean. *Limnol. Oceanograph.* (25): 457-473.
- Laws, E.A. & Chalup, M.S. 1990. A microalgal growth model. *Limnol. Oceanogr.* **35** : 597-608.
- Lee, S.K., Fox, H.M., Kies, C. & Dam, R. 1967. The supplementary value of algae in human diets. *J. Nutr.* **92** : 281-285.
- Lers, A., Biener, Y. & Zamir, A. 1990. Photoinduction of massive-carotene accumulation by the alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol.* **93** : 389-395.
- Leukart, P. & Lünning, K. 1994. Minimum spectral light requirements and maximal light levels for long term germling growth for several red algae from different water depths and a green alga. *Eur. J. Phycol.* **29** : 103-112.
- Levy, I. & Gantt, E. 1988. Light acclimation in *Porphyridium purpureum* (Rhodophyta): growth, photosynthesis and phycobilisomes. *J. Phycol.* **24** : 452-458.
- Levy, I. & Gantt, E. 1990. Development of photosynthetic activity in *Porphyridium purpureum* (Rhodophyta) following nitrogen starvation. *J. Phycol.* **26** : 62-68.
- Liaaen-Jensen, S. 1977. Algal carotenoids and chemosystematics. En: **Marine Natural Products Chemistry**. Faulkner, D.J. & Fenical, W.H. (eds.). Academic Press. New York. pp: 521.
- Lin, R.I. & Schjeide, O.A. 1969. Microestimation of RNA by the cupric catalyzed orcinol reaction. *Anal. Biochem* **27** : 473-483.

- Lincoln, E.P. & Earle, J.F.K. 1990. Wastewater treatment with microalgae. En: **Introduction to Applied Phycology**. Akatsuka, I. (ed.). SPB Academic Publishing. The Hague. pp: 429-446.
- Lipps, M.J. 1973. The determination of the far-red effect in marine phytoplankton. *J. Phycol.* **9** : 237-242.
- Lips, S.H. & Avissar, Y.J. 1986. Photosynthesis and ultrastructure in microalgae. En: **Handbook of Microalgal Mass Culture**. Richmond, A. (ed.). CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. pp: 45-69.
- Loeblich, L.L. 1982. Photosynthesis and pigments influenced by light intensity and salinity in the halotolerant alga *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* **62** : 493-508.
- López-Figueroa 1992. Diurnal variation in pigment content in *Porphyra laciniata* and *Chondrus crispus* and its relation to the diurnal changes of underwater light quality and quantity. *Mar. Ecol.* **13** (4): 285-305.
- López-Figueroa, F. 1991. Red, green, and blue light photoreceptors controlling chlorophyll a, biliprotein and total protein synthesis in the red alga *Chondrus crispus*. *Br. Phycol. J.* **26** : 383-393.
- López-Figueroa, F. 1993. Photoregulation of nitrogen metabolism and protein accumulation in the red alga *Corallina elongata* Ellis et Soland. *Z. Naturforsch* **48c** : 788-794.
- López-Figueroa, F., Aguilera, J. & Niell, X. 1995. Red and blue light regulation of growth and photosynthetic metabolism in *Porphyra umbilicalis* (Bangiales, Rhodophyta). *Eur. J. Phycol.* **30** : 11-18.
- López-Figueroa, F. & Niell, J. 1989. A possible control by a phytochrome-like photoreceptor of chlorophyll synthesis in the green alga *Ulva rigida*. *Photochem. Photobiol.* **50** (2): 263-266.

- López-Figueroa, F. & Rüdiger, W. 1991. Stimulation of nitrate net uptake and reduction by red and blue light and reversion by far-red light in the green alga *Ulva rigida*. *J. Phycol.* **27** : 389- 394.
- Losada, M., Hervás, M. & Ortega, J.M. 1987. Photosynthetic assimilation of the primordial bioelements. En: **Inorganic Nitrogen Metabolism**. Urlich, W.R., Aparicio, P.J., Syrett, P.J. & Castillo, F. (eds.). Springer-Verlag. Berlin. pp: 3-15.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., A.L., F. & Randall, R.J. 1951. Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** (1): 265-275.
- Lüning, K. 1992. Day and night-kinetics of growth rate in green, brown and red seaweeds. *J. Phycol.* (87): 119-129.
- Maestrini, S.Y., Robert, J.M. & Truquet, I. 1982. Simultaneous uptake of ammonium and nitrate by oyster-pond algae. *Mar. Biol. Lett.* **3** : 143-153.
- Maldonado, J.M. & Aparicio, P.J. 1987. Photoregulation of nitrate assimilation in eukariotic organisms. En: **Inorganic Nitrogen Metabolism**. Urlich, W.R., Aparicio, P.J., Syrett, P.J. & Castillo, F. (eds.). Springer-Verlag. Berlin. pp: 295.
- Malhotra, K., Oelze-Karow, H. & Mohr, H. 1982. Action of light on accumulation of carotenoids and chlorophylls in the milo shoot (*Sorghum vulgare* Pers.). *Planta* **154** : 361-370.
- Maloney, M.A., Hooper, J.K. & Mark, D.B. 1989. Kinetics of chlorophyll accumulation and formation of chlorophyll-protein complexes during greening of *Chlamydomonas reinhardtii* y-1 at 38°C. *Plant. Physiol.* **91** : 1100-1106.

- Marusich, W.L. & Bauerfeind, J.C. 1981. Oxycarotenoids in poultry feed. En: **Carotenoids as Colorants and Retinol Precursors**. Bauerfeind, J.C. (ed.). Academic Press. New York. pp: 320-462.
- Mathews, C.K. & Van Holde, K.E. 1990. **Biochemistry**. B. C. Publisher Co. Inc, California. 638-641 pp.
- Matsueda, S., Nagaki, M. & Shimpo, K. 1976. Isolation and purification of the human erythrocyte cholinesterase and the enzyme effect of *Chlorella* components to the activity. *Sci. Rep. Hiroshi. Univ.* **23** : 17.
- McCarthy, J.J. & Goldman, J.C. 1979. Nitrogenous nutrition of marine phytoplankton in nutrient-depleted waters. *Science* **203** : 670-672.
- Micliane, S.C., Rodríguez, A.C., Lara, E.C. & Brizzio, A. 1992. Comparación de tres métodos empleados para el control de la calidad de medios de cultivo sólidos utilizados en microbiología de alimentos. *Rev. Cubana Alim. Nutr.* **6** (2): 79-86.
- McCarthy, J.J., Taylor, W.R. & Taft, J.L. 1977. Nitrogenous nutrition of the plankton on the Chesapeake Bay. I. Nutrient availability and phytoplankton preferences. *Limnol. Oceanograph.* **22** : 996-1011.
- Mokady, S. 1992. Nutritional, toxicological and therapeutic aspects. En: **Dunaliella: Physiology, Biochemistry and Biotechnology**. Avron, M. & Ben-Amotz, A. (eds.). CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. pp: 217-230.
- Moreno, J.C. & Yusta, A.A. 1967. **Tratado de Química Fisiológica**. Editorial Pueblo y Educación, La Habana. 570 pp.
- Mori, H., Morishita, Y., Mori, Y., Yoshimi, N., Sugie, S. & Tanaka, T. 1992. Effect of $Mg(OH)_2$ on MAM-induced epithelial proliferation in large bowels of rats. *Cancer Letters* **62** : 43-48.

- Murashigue, T. & Skoog, S. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* **15** : 473-497.
- Myklestad, S. 1988. Production, chemical structure, metabolism, and biological function of the (1-3)-linked, B-D-glucans in diatoms. *Biol. Oceanogr.* **6** : 313-326.
- Nagasawa, H., Konishi, R., Yamamoto, K. & Ben-Amotz, A. 1989. Effects of carotene rich algae *Dunaliella* on reproduction and body growth in mice. *In vivo* **3** : 79-82.
- Nahata, M.C., Slencsak, C.A. & Kanp, J. 1983. Effect of chlorophyllin on urinary odor in incontinent geriatric patients. *Drug Intell. Clin. Pharm.* **17** : 732-734.
- Nichiporovich, A.A., Semenenko, V.E., Vladimirova, M.G. & Spektorov, K.S. 1962. Some principles of intensification of photosynthetic productivity in unicellular algae. *Istvesia Acad. Sci. USSR Ser. Biol.* **2** : 163.
- Ninnemann, H. 1987. Photoregulation of Eukariotic Nitrate Reductase. En: **Blue Light Responses: Phenomena and Occurrence in Plants and Microorganisms**. Senger, H. (ed.). CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. pp: 17-30.
- Norma 1986. Métodos y Medios Auxiliares Clínicos. Medios de Cultivo. Especificaciones Generales de Calidad. INHE. 57-91/94-1. La Habana, Cuba.
- O'Brien, W.J. 1972. Limiting factors in phytoplankton algae: their meaning and measurements. *Science* (178): 616-617.
- Oh-Hama, T. & Miyashi, S. 1988. *Chlorella*. En: **Micro-algal Biotechnology**. Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. (eds.). Cambridge Univ. Press. Cambridge. pp: 3-26.

- Ong, T., Whong, W.Z., Steward, J.D. & Brockman, H.E. 1986. Chlorophyllin: a potent antimutagen against environmental and dietary complex mixtures. *Mutant. Res.* **173** : 111-115.
- Oswald, W.J. & Golueke, C.G. 1960. Biological transformation of solar energy. *Adv. Appl. Microbiol.* (2): 223.
- Oswald, W.J. 1975. Experiences with new pond designs in California. En: **Ponds as a Wastewater Treatment Alternative**. Water Resources Symp. N° 9., Univ. Texas, Austin. pp:
- Oswald, W.J. 1988. Large scale algal culture systems. En: **Microalgal Biotechnology**. Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. (eds.). Cambridge Univ. Press. Cambridge. pp: 357-394.
- OXOID 1992. **OXOID Manual**. PICA Design Print Ltd. 292 pp.
- Philips, E.J. & Mitsui, A. 1982. Light intensity preference and tolerance of aquatic photosynthetic microorganisms. En: **Handbook of Biosolar Resources. Basic Principles**. vol. 1 (Part 2). Mitsui, A. & Black, C.C. (eds.). CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. pp: 257-308.
- Piorreck, M., Baasch, K.H. & Pohl, P. 1984. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue green algae under different nitrogen regimes. *Phytochem* **23** (2): 207-216.
- Pirson, A. & Kowallik, W. 1960. Wirkung des blauen und roten spectralbereiches auf die zusammensetzung von *Chlorella* bei anzucht im Licht-Dunkel-Wechel. *Naturwissenschaften* **47** : 476.
- Post, F.J., Borowitzka, L.J., Borowitzka, M.A., Mackay, B. & Moulton, T. 1983. The protozoa of a Western Australian hypersaline lagoon. *Hydrobiologia* **105** : 95-113.
- Powles, S.B. 1984. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* **35** : 15-44.

- Preisling, H.R. 1992. Morphology and taxonomy. En: ***Dunaliella: Physiology, Biochemistry and Biotechnology***. M., A. & Ben-Amotz, A. (eds.). CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. pp: 1—15.
- Prézelin, B.B. 1982. Effects of light intensity on aging of the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Mar. Biol.* **69** : 129-135.
- Quiñones, M.A. & Aparicio, P.J. 1990. Flavin type action spectrum of nitrate utilization by *Monoraphidium braunii*. *Photochem. Photobiol.* **51** : 689-692.
- Ramus, J. 1981. The capture and transduction of light energy. En: ***The Biology of Seaweed***. Lobban, C.S. & Wynne, M.J. (eds.). Blackwell Science Publications. Oxford. pp: 458-492.
- Ramus, J. 1983. A physiological test of the theory of complementary chromatic adaptation. II. Brown, green and red seaweeds. *Phycologia* (19): 173-178.
- Raven, J.A. 1988. Limits to growth. En: ***Micro-algal Biotechnology***. Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. (eds.). Cambridge Univ. Press. Cambridge. pp: 331-356.
- Raven, J.A. & Geider, R.J. 1988. Temperature and algal growth. *New Phytol.* **110** : 441-461.
- Richardson, K., Beardall, J. & Raven, J.A. 1983. Adaptation of unicellular algae to irradiance: an analysis of strategies. *New Phytol.* **93** : 157-191.
- Richmond, A. 1986a. Cell response to environmental factors. En: ***Handbook of Microalgal Mass Culture***. A., R. (ed.). CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. pp: 69-99.
- Richmond, A. 1986b. Outdoor mass cultures of microalgae. Biological principles. En: ***Handbook of Microalgal Mass Culture***. Richmond, A. (ed.). CRC Press. Boca Raton, Florida. pp: 285-330.

- Richmond, A. 1988. *Spirulina*. En: **Microalgal-Biotechnology**. Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. (eds.). Cambridge Univ. Press. Cambridge. pp: 85-121.
- Richmond, A.E. 1986c. Microalgal Culture. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* **4** : 369-438.
- Rodríguez, H. & Guerrero, M.G. 1992. Products and uses of cyanobacteria (blue-green algae). En: **Profiles on Biotechnology**. Villa, T.G. & Abalde, J. (eds.). Servicio de Publicaciones de la Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela. pp: 247-260.
- Rodríguez-Amaya, D.B. 1989. Critical review of provitamin A determination in plant foods. *J. Micronutr. Anal.* **5** : 191-225.
- Rowan, K.S. 1989. **Photosynthetic Pigments of Algae**. Cambridge Univ. Press, Cambridge. 334 pp.
- Roy, S. 1988. Effects of changes in physiological condition on HPLC-defined chloropigment composition of *Phaeodactylum tricorutum* (Bohlin) in batch and turbidostat cultures. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **118** : 137-149.
- Rüdiger, W. & López-Figueroa, F. 1992. Photoreceptor in algae. *Photochem. Photobiol.* (55): 949-954.
- Rüdiger, W. & Schoch, S. 1988. Chlorophylls. En: **Plant Pigments**. Goodwin, T.W. (ed.). Academic Press. Padstow, Cornwall. pp: 1-50.
- Rüdiger, W. & Thümmel, F. 1994. The phytochrome chromophore. En: **Photomorphogenesis in Plants**. Kendrick, R.E. & Kronenberg, G.H.M. (eds.). Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp: 51-69.
- Ruyters, G. 1984. Effects of blue light on enzymes. En: **Blue Light Effects in Biological Systems**. Senger, H. (ed.). Springer-Verlag. Berlin. pp: 293-301.

- Ruyters, G. 1988. Light-stimulated respiration in the green alga *Dunaliella tertiolecta*: Involvement of the ultraviolet/ blue-light photoreceptor(s) and phytochrome? *Planta* **174** : 422-425.
- Saila, S.B., Recksiek, C.W. & Prager, M.H. 1988. Basic fishery science programs. A compendium of microcomputer programs and manual operation. *Dev. Aquacult. Fish. Sci* **18** : 346.
- Sánchez-Saavedra, M.P., Jiménez, C. & Figueroa, F.L. 1996a. Far-red light inhibits growth but promotes carotenoid accumulation in the green microalga *Dunaliella bardawil*. *Physiologia Plantarum* **98** : 419-423.
- Sánchez-Saavedra, M.P., Jiménez, C. & López-Figueroa, F. 1996b. Variable fluorescence of chlorophyll a in *Dunaliella bardawil* with different β -carotene content. *Sci. Mar.* **60** (Supl. 1): 227-231.
- Sánchez-Saavedra, M.P. & Voltolina, D. 1996. Effect of blue-green light on growth rate and chemical composition of three diatoms. *J. Appl. Phycol.* **8** : 131-136.
- Sant'Anna, L. 1984. **Chlorococcales (Chlorophyceae)**. J. Cramer, Germany. 348 pp.
- Schmid, R. & Dring, M.J. 1992. Circadian rhythm and fast responses to blue light of photosynthesis in *Ectocarpus* (Phaeophyta, Ectocarpales). Characterization of the rhythm and the blue light response. *Planta* **187** : 332-335.
- Schwartz, J., Shklar, G., Reid, S. & Trickler, D. 1988. Prevention of experimental oral cancer by extracts of *Spirulina-Dunaliella* algae. *Nutr. Cancer* **11** : 127.

- Semenenko, V.E., Vladimirova, M.G., Soglin, L.N., Tauts, M.I., Phillipovskiy, L.N., Klyachko-Gurvich, G.L., Kuznetsov, E.D., Kovanova, E.S. & Rajikov, N.I. 1966. Prolonged continuous directed cultivation of algae and physiological and chemical characteristics of the productivity and efficiency of light energy utilization by *Chlorella*. *Upr.Biosynthes.* **128** : 136.
- Senger, H. 1982. Introduction. En: **Blue light responses**. 1. Senger, H. (ed.). CRC Press. Boca de ratón, Florida. pp: 3-6.
- Senger, H. 1984. The nitrate reductase system. En: **Blue Light Effects in Biological Systems**. Senger, H. (ed.). Springer-Verlag. Berlin. pp: 92-104.
- Senger, H. 1987. Blue light control of pigment biosynthesis. Chlorophyll biosynthesis. En: **Blue Light Responses: Phenomena and Occurrence in Plants and Microorganisms**. Senger, H. (ed.). CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. pp: 75-86.
- Senger, H. & Bauer, B. 1987. The influence of light on adaptation and function of photosynthetic apparatus. *Photochem. Photobiol.* **45** : 939-946.
- Senger, H., Klein, O., Dörnemann, D. & Porra, R.J. 1980. The action of blue light on aminolevulinic acid formation. En: **Blue Light Syndrome**. Senger, H. (ed.). Springer-Verlag. Berlin. pp: 541-555.
- Shelef, G. & Soeder, C.J. (eds.) 1980. **Algae Biomass. Production and Use**. Elsevier/ North Holland Biomedical Press, Amsterdam. 265 pp.
- Shubert, L.E. 1988. The use of *Spirulina* (Cyanophyceae) and *Chlorella* (Chlorophyceae) as food sources for animals and humans. En: **Progress in Phycological Research**. vol. 6. Round, F.E. & Chapman, D.J. (eds.). Biopress, Ltd. England. pp: 237-255.

- Smith, B.M., Morrissey, P.J., Guenther, J.E., Nemson, J.A., Harrison, M.A., Allen, J.F. & Melis, A. 1990. Response of the photosynthetic apparatus in *Dunaliella salina* (green algae) to irradiance stress. *Plant Physiol.* **93** : 1433-1440.
- Smith, H. 1994. Sensing the light environment: the functions of the phytochrome family. En: **Photomorphogenesis in Plants**. Kendrick, R.E. & Kronenberg, G.H.M. (eds.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. pp: 384- 386.
- Smith, R.C., Prézelin, B.B., Baker, R.R., Bidgare, N.P., Boucher, T., Coley, D., Karentz, D., Macintyre, S., Matlick, H.A., Menzies, D., Ondruzek, M., Wan, Z. & Waters, K.J. 1992. Ozone depletion: Ultraviolet radiation and phytoplankton biology in Antarctic waters. *Science* **255** : 952-959.
- Soeder, C.J. & Hegewald, E. 1988. Scenedesmus. En: **Micro-algal Biotechnology**. Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. (eds.). Cambridge Univ. Press. Cambridge. pp: 59-84.
- Soong, P. 1980. Production and development of *Chlorella* and *Spirulina* in Taiwan. En: **Algae Biomass. Production and Use**. Shelef, G. & Soeder, C.J. (eds.). . pp: 97-113.
- Sournia, A. 1974. Circadian periodicities in natural populations of marine phytoplankton. *Adv. Mar. Biol* **12** : 325-389.
- Spoehr, H.A. & Milner, H.W. 1949. The chemical composition of *Chlorella*; effect of environmental conditions. *Plant Physiol.* **24** : 120-149.
- Sriharan, S., Bagga, D. & Sriharan, T.P. 1989. Enviromental control of lipids and fatty acid production in the diatom *Navicula saprophila*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **20** (21): 281-291.
- Strell, M.A., Kalojanoff, A. & Zuther, F. 1955. Zür analytik von chlorophyllpräparaten. *Arzneimittell Forschung.* (11): 640-642.

- Strickland, J.D. & Parsons, T.R. 1972. A Practical Handbook of Seawater Analysis. Fisheries Research Board of Canada. Bull. N° 167. Ottawa.
- Stryer, L., Glazer, A. & Vernon, T. 1985. Fluorescent Immunoassay Employing a Phycobiliprotein Labeled Ligand or Receptor. Patente N° 520-110. USA.
- Sukenik, A., Bennet, J., Mortain-Bertrand, A. & Falkowski, P.G. 1990. Adaptation of the photosynthetic apparatus to irradiance in *Dunaliella tertiolecta*. *Plant Physiol.* **92** : 891-898.
- Sukenik, A., Bennett, J. & Falkowsky, P.G. 1987. Light-saturated photosynthesis limitation by electron transport of carbon fixation. *Biochim. Biophys. Acta* **891** : 205-215.
- Sukenik, A. & Wahnnon, R. 1991. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. I. *Isochrysis galbana*. *Aquaculture* **97** : 61-72.
- Syrett, P.J. 1981. Nitrogen metabolism of microalgae. *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci.* **210** : 182-210.
- Syrett, P.J. 1987. Nitrogen assimilation by eukariotic algae. En: **Inorganic Nitrogen Metabolism**. Urlich, W.R., Aparicio, P.J., Syrett, P.J. & Castillo, F. (eds.). Springer-Verlag. Berlin. pp: 25-31.
- Tan, C.K., Lee, Y.K. & Ho, K.K. 1993. Effect of light intensity and ammonium-N in carotenogenesis of *Trentepohlia odorata* and *Dunaliella bardawil*. *J. Appl. Phycol.* **5** : 547-549.
- Tanaka, K. 1990. Oral administration of *Chlorella vulgaris* augments concomitant antitumor immunity. *Immunopharm. Immunotoxicol* **12** (2): 277-291.

- Tawashi, R., Cousineau, M. & Denis, G. 1982. Crystalization of calcium oxalate dihydrate in normal urine in the presence of sodium copper chlorophyllin. *Urol. Res.* **10** : 173-176.
- Terlizzi, D.E.J. & Karlander, E.P. 1980. Growth of a coccoid nanoplankter (Eustigmatophyceae) from the Chesapeake Bay as influenced by light, temperature, salinity and nitrogen source in factorial combination. *J. Phycol.* **16** : 364-368.
- Terry, K.L. 1986. Photosynthesis in modulated light: quantitative dependence of photosynthetic enhancement of flashing rate. *Biotechnol. Bioeng.* **28** : 988-995.
- Thepenier, C., Chaumont, D. & Gudin, C. 1988. Mass culture of *Porphyridium cruentum*: A multiproduct strategy for the biomass valorisation. En: **Algal Biotechnology**. Standler, S., Mollion, J., Verdus, M.C., Karamanos, Y., Morvan, H. & Christiaen, D. (eds.). Elsevier Applied Science Publisher. Amsterdam. pp: 413-420.
- Thomas, R.J., Hipkin, C.R. & Syret, P.J. 1976. The interaction of nitrogen assimilation with photosynthesis in nitrogen deficient cells of *Chlorella*. *Planta* **133** : 9.
- Thomas, W.H., Siebert, D.L.R., Alden, M., Neori, A. & Eldridge, P. 1984. Yields, photosynthetic efficiencies and proximate composition of dense marine culture. *Biomass* (5): 181-209.
- Tirso, J. & Vadjlha, P. 1988. **Las Biotecnologías**. Ediciones Revolucionarias, La Habana, Cuba. 207 pp.
- Tischner, R. & Lorenzen, H. 1979. Nitrate uptake and nitrate reduction in synchronous *Chlorella*. *Planta* **146** : 287.
- Toro, J.E. 1989. The growth rate of two species of microalgae used in shellfish hatcheries cultured under two light regimes. *Aquacult. Fish. Manag.* **20** : 249-254.

- Torres, M., Niell, J. & López-Figueroa, F. 1995. Photosynthetic metabolism and cell-wall polysaccharide accumulation in *Gelidium sesquipedale* (Clem.) Born. et Thur. under different light qualities.
- Turpin, D.H., Elrifi, I.R., Birch, D.G., Weger, H.G. & Holmes, J.J. 1988. Interactions between photosynthesis, respiration, and nitrogen assimilation in microalgae. *Can. J. Bot.* **66** : 2083-2097.
- Uriarte, I., Faras, A., Hawkins, A.J.S.H. & Bayne, B.L. 1993. Cell characteristics and biochemical composition of *Dunaliella primolecta* Butcher conditioned at different concentrations of dissolved nitrogen. *J. Appl. Phycol.* **5** : 447-453.
- Utokiama, K. & Tidzoko, K. 1985. Método de Obtención de Clorofilinas Cúpricas a partir de Hojas de Bambú. Patente N° 60- 39097. Japón.
- Utting, S.D. 1985. Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular marine algae of commercial importance. *Aquacult. Eng.* **4** : 175-190.
- Van den Hoek, C., Mann, D.G. & Jans, H.M. 1995. **Algae. An Introduction to Phycology**. Cambridge Univ. Press, Cambridge. 623 pp.
- Van Donk, E. & Hessen, D.O. 1996. Loss of flagella in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* due to in situ UV-exposure. *Sci. Mar.* **60** (Supl. 1) : 107-112.
- Vass, I., Styring, S., Hundal, T., Koivuniemi, A., Aro, E.M. & Anderson, B. 1992. Reversible and irreversible intermediates during photoinhibition of PS II: stable reduced Q_A species promote chlorophyll triplet formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** : 1408-1412.
- Villar, V.P. & Santos, A.R.(1970) Tratado de Bioquímica. , vol. I. Instituto Cubano del Libro, La Habana, Cuba, pp: 457.

- Vonshak, A. 1986. Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. En: **Handbook of Microalgal Mass Culture**. Richmond, A. (ed.). CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. pp: 117-145.
- Vonshak, A. 1988. *Porphyridium*. En: **Micro-algal Biotechnology**. Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. (eds.). Cambridge Univ. Press. Cambridge. pp: 120-150.
- Vonshak, A. & Guy, R. 1988. Photoinhibition as a limiting factor in outdoor cultivation of *Spirulina platensis*. En: **Algal Biotechnology**. Stadler, T., Mollion, J., Verdus, M.C., Karamanos, Y., Morvan, H. & Christiaen, D. (eds.). Elsevier Applied Science Publisher. Amsterdam. pp: 365-370.
- Voskresenskaya, N.P. 1972. Blue light and carbon metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **23** : 219-234.
- Wallen, D.G. & Geen, G.H. 1971. Light quality in relation to growth, photosynthetic rates and carbon metabolism in two species of marine plankton algae. *Mar. Biol.* **10** : 34-43.
- Waterborg, J.H. & Matthews, H.R. 1996. The Lowry method for protein quantitation. En: **The Protein Protocols Handbook**. Walker, J.M. (ed.). Human Press. New Jersey. pp: 7-11.
- Wellburn, A.R. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* **144** : 307-313.
- Whitelam, G. & Smith, H. 1988. Phytochrome. En: **Plant Pigments**. Goodwin, T.W. (ed.). Academic Press. Padstow, Cornwall. pp: 257-298.
- Wikfors, G.H. 1986. Altering growth and gross chemical composition of two microalgal molluscan food species by varying nitrate and phosphate. *Aquaculture* **59** : 4-14.

- Wikfors, G.H., Twarog, J.J. & Ukeles, R. 1984. Influence of chemical composition of algal food sources on growth of juvenile oysters, *Crassostrea virginica*. *Biol. Bull.* **167** : 251-263.
- Wright, S.W., Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C., Llewellyn, C.A., Bjornland, T., Repeta, D. & Welschmeyer, N. 1991. Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **77** : 183-196.
- Yamaguchi, T. 1981. Strong Deodorant. Patente N° 116131. Japan.
- Yamaguchii, K., Kawamata, M., Murakami, M., Konosu, S. & Ben-Amotz, A. 1988. Extractive nitrogenous components of the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. *Nip. Suis. Gak.* **54** : 239-243.
- Young, R.W. & Beregi, J.S. 1980. Use of chlorophyllin in the care of geriatric patients. *J. Am. Geriat. Soc.* **28** : 46-47.
- Zamir, A. 1992. Molecular Biology of *Dunaliella*. En: ***Dunaliella: Physiology, Biochemistry and Biotechnology***. Ben-Amotz, A. & Avron, M. (eds.). CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. pp: 198-200.
- Zielke, H., Kneifel, H., Weebs, L.E. & Soeder, C.J. 1978. Stimulation of *Lactobacilli* by an aqueous extract of the green alga *Scenedesmus acutus* (276-3a). *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **6** : 79-86.

UNIVERSIDADE DA CORUÑA
Servicio de Bibliotecas



1700744400