UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

ACTA BIOLÓGICA COLOMBIANA
http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN/RESEARCH ARTICLE

# MEDICIÓN DE LA FLUORESCENCIA DE LA CLOROFILA *a* EN ALGAS ENCAPSULADAS EN ALGINATO DE CALCIO

# Measuring of the Chlorophyll *a* Fluorescence in Calcium Alginate-Encapsulated Algae

**Ibeth Paola DELGADILLO RODRÍGUEZ[1], Luis Carlos MONTENEGRO RUÍZ[1], Gabriel Antonio PINILLA AGUDELO[1], Luz MARINA MELGAREJO[1].**

[1] Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Laboratorio de Cultivo de Algas, Laboratorio de Fisiología Vegetal. Carrera 30 n°. 45-03, edificio 421. Bogotá D.C., Colombia.

***For correspondence:*** gapinillaa@unal.edu.co

**Received**: 11st April 2016, **Returned for revision**: 7th July 2016, **Accepted**: 23th March 2017.
**Associate Editor:** Hernán Mauricio Romero.

**Citation/Citar este artículo como**: Delgadillo Rodríguez IP, Montenegro Ruíz LC, Pinilla Agudelo GA, Melgarejo LM. Medición de la fluorescencia de la clorofila a en algas encapsuladas en alginato de calcio. Acta biol. Colomb. 2017;22(2):199-208. DOI: http://dx.doi.org/10.15446/abc.v22n2.56166

## RESUMEN

La inmovilización de las algas tiene múltiples aplicaciones, tales como la biorremediación del agua y la producción de metabolitos. Una de las variables que se puede determinar en las algas inmovilizadas es la fluorescencia de la clorofila *a,* debido a que este parámetro está relacionado con la respuesta fisiológica de estos organismos. Por ello, el objetivo de este estudio fue explorar un método para la medición de la fluorescencia de la clorofila *a* en algas encapsuladas en esferas de alginato de calcio. Con este fin, se cultivaron dos especies de microalgas (*Scenedesmus ovalternus* LAUN 001 y *Parachlorella kessleri* LAUN 002) en monocultivos, tanto en condiciones de cultivo libres (10 mL de la preparación algal en 250 mL de Medio Básico de Bold), como encapsuladas (250 esferas de alginato de calcio en 250 mL de Medio Básico de Bold). Se realizaron diferentes protocolos de medición de la fluorescencia de la clorofila *a* del fotosistema II (PSII) variando a) el tiempo de preadaptación a la oscuridad (10, 15 y 30 min), b) la intensidad de luz generada por fluorómetro no modulado (entre 1000 y 3500 µmoles $m^{-2}$ $s^{-1}$), y c) el tiempo de exposición a la luz actínica (1, 2 y 5 s). Se lograron establecer como condiciones óptimas para la medición de la eficiencia cuántica potencial del fotosistema II ($F_v/F_m$) en las algas encapsuladas las siguientes: a) 30 min de preadaptación a la oscuridad; b) 3000 µmoles $m^{-2}$ $s^{-1}$, de intensidad lumínica generada desde el fluorómetro; y c) 1 o 2 s de exposición a la luz actínica. Se encontraron los siguientes valores en la $F_v/F_m$ en condiciones no estresantes: 0,760 a 0,764 para *S. ovalternus* y 0,732 a 0,748 para *P. kessleri*. Esta metodología permite observar algunos cambios en la actividad fotoquímica relacionados con variaciones de los factores bajo los cuales se encuentran las algas inmovilizadas.

**Palabras clave:** algas inmovilizadas, eficiencia cuántica potencial del fotosistema II, microalgas, *Parachlorella kessleri*, *Scenedesmus ovalternus*.

## ABSTRACT

Immobilization of algae has many applications, such as water bioremediation and production of metabolites. One of the variables that can be determined in the immobilized algae is chlorophyll *a* fluorescence, because this parameter is related to the physiological response of these organisms. Therefore, the objective of this study was to explore a method for measuring the chlorophyll *a* fluorescence in calcium alginate-encapsulated algae. To do this, two species of microalgae (*Scenedesmus ovalternus* LAUN 001 and *Parachlorella kessleri* LAUN 002) were grown in monocultures in both free culture conditions (10 mL of algae preparation in 250 mL of Basal Bold Medium) and encapsulated (250 spheres in 250 mL of Basal Bold Medium). Different measurement protocols of chlorophyll *a* fluorescence of photosystem II (PSII) were performed by varying a) the preadaptation time to darkness (10, 15 and 30 min), b) the light intensity of the non-modulated fluorometer (between 1000 and 3500 µmoles $m^{-2}s^{-1}$), and c) the time of exposure to actinic light (1, 2 and 5 s). The optimal conditions for the measurement of the maximum quantum yield of PSII ($F_v/F_m$) in encapsulated algae were established as follow: a) 30 min of preadaptation time; b) 3000 µmoles $m^{-2}s^{-1}$ of the fluorometer light intensity; and c) 1 to 2 s of exposure to actinic light. The following values in the photochemical activity of algae in non-stressful conditions were found: 0.760

Copyright © 2016 Author(s) retain the copyright of this article.
This article is published under the terms of the Creative Commons Attribution License 4.0

– 0.764 for *S. ovalternus*, and 0.732 – 0.748 for *P. kessleri*. This methodology allows to observe some changes in the photochemical activity related with variations in the factors under which are the immobilized algae.
**Keywords:** immobilized algae, maximum quantum yield of PSII, microalgae, *Parachlorella kessleri*, *Scenedesmus ovalternus*.

## INTRODUCCIÓN

El uso de microalgas inmovilizadas se ha incrementado en las últimas décadas. Las aplicaciones van desde la fabricación de biosensores que miden la toxicidad de sustancias contaminantes (Frense *et al*., 1998; Védrine *et al*. 2003; Shitanda *et al*., 2005), hasta el tratamiento de aguas residuales y la mineralización de contaminantes orgánicos e inorgánicos en medios acuáticos (Chen, 2001; Al-Rub *et al*., 2004; Abdel-Hameed, 2006; Luan *et al*., 2006; Abdel-Hameed y Hammouda, 2007; Akhtar *et al*., 2008; Katircioglu *et al*., 2008; Moreno-Garrido, 2008; Ruiz-Marin *et al*., 2010). Otros usos de las algas inmovilizadas son la producción de metabolitos, el manejo de ceparios como colecciones, la obtención de energía a través de la producción de hidrógeno (Hahn *et al*., 2007) o de electricidad (Kadam, 2002) y el mejoramiento de la absorción de nutrientes por parte del alga (de-Bashan *et al*., 2004; Hernandez *et al*., 2006; de-Bashan *et al*., 2008; Hernandez *et al*., 2009). Incluso se han utilizado en la enseñanza del proceso de fotosíntesis (Eldridge, 2004). Todos estos usos requieren medir en las algas encapsuladas sus respuestas fisiológicas ante los distintos tratamientos a que son sometidas y una de las variables que usualmente se utiliza es la fluorescencia de la clorofila *a* (González *et al*., 2008).

La energía electromagnética absorbida por los complejos antena en los centros de reacción del fotosistema II puede tomar uno de los siguientes destinos: 1) transferencia de energía a otras moléculas para impulsar el proceso fotoquímico, 2) disipación de energía como calor, y 3) re-emisión de la energía como fluorescencia de la clorofila, en la que la longitud de emisión es más larga que la de absorción (Govindjee y Coleman, 1990; Maxwell y Johnson, 2000). La medición de la fluorescencia de la clorofila *a* es un método eficiente para identificar la influencia de factores externos en los organismos fotosintéticos, debido a que los diferentes elementos físicos o químicos del ambiente pueden provocarles estrés, el cual se refleja en cambios en la fluorescencia. Las altas temperaturas, las heladas, la sequía, los cambios en la intensidad luminosa, la salinidad, las deficiencias nutricionales, la presencia de metales pesados, detergentes, herbicidas y ozono, entre otros factores, afectan la función del fotosistema II (PSII) de manera directa o indirecta. Esto modifica la emisión de la fluorescencia (Solarte *et al.*, 2010), cuyos cambios pueden revelar mecanismos de respuesta de las plantas y permiten cuantificar los efectos del estrés. Inclusive, es posible identificar ciertos contaminantes y sus fuentes (González *et al.*, 2008).

Los fluorómetros de pulso continuo y los de pulso modulado permiten medir la fluorescencia de la clorofila *a*, y por tanto dan una idea de la actividad fotosintética de la planta a nivel del PSII (González *et al.*, 2008; Solarte *et al.*, 2010). El fluorómetro de pulso continuo o excitación continua, utilizado en el presente trabajo, funciona a partir de la programación de pulsos de luz saturantes que generan la consecuente respuesta fluorescente instantánea en la muestra, la cual es detectada por el equipo. Por medio de las diferentes respuestas de fluorescencia, producidas a partir de la aplicación de destellos de luz, se pueden obtener variados parámetros con los cuales se calcula la eficiencia del PSII. Los parámetros son fluorescencia mínima ($F_o$), dada cuando los centros de reacción del PSII están abiertos, la fluorescencia máxima ($F_m$), que ocurre cuando los centros de reacción están cerrados, y la fluorescencia variable ($F_v$), la cual es la diferencia entre $F_o$ y $F_m$ (Solarte *et al.*, 2010). Las mediciones de fluorescencia de la clorofila *a* en condiciones de adaptación a la oscuridad permiten determinar la eficiencia cuántica potencial del fotosistema II como la relación entre fluorescencia variable y fluorescencia máxima ($F_v/F_m$). El valor obtenido de $F_v/F_m$ es una medida potencial del desempeño fotosintético del PSII, que es de gran utilidad debido a que este fotosistema es muy sensible al estrés. De esta manera, al disminuir la $F_v/F_m$ se sospecha un posible estrés sobre el organismo fotosintético (Baker, 2008). Valores alrededor de 0,65 se han sugerido como indicativos de células sanas en algunos taxones de microalgas (Kolber *et al*., 1988; Parkhill *et al*., 2001; Wang *et al*., 2014); eficiencias inferiores indicarían estrés.

La medición de la fluorescencia de la clorofila *a* directamente en las algas inmovilizadas se ha estudiado poco. En la literatura disponible, solamente se cuenta con el trabajo de Antal *et al*. (2014), quienes evaluaron la respuesta de *Chlamydomonas reinhardtii* (P.A. Dangeard) utilizando láminas de alginato dispuestas como si fueran una hoja, a fin de realizar las mediciones de manera similar a como se hace en plantas terrestres. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue explorar el método de medición de la fluorescencia de la clorofila *a* directamente en las algas inmovilizadas dentro de esferas de alginato de calcio, con un fluorómetro no modulado acoplado con un adaptador de fase líquida (HPEA/LPA2). Está técnica permite determinar variaciones en el estado de estrés de los organismos fotosintéticos (Maxwell y Johnson, 2000), convirtiéndose en una herramienta útil para el seguimiento ante diferentes condiciones ambientales, aplicable a sistemas acuosos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Condiciones de cultivo

Se utilizaron las especies de microalgas *Scenedesmus ovalternus* (Chodat) (cepa LAUN-001) y *Parachlorella kessleri* (Fott &

Nováková) Krieniz *et a*l. (cepa LAUN-002). Las cepas, los materiales y los equipos necesarios fueron suministrados por el Laboratorio de Cultivo de Algas, el Laboratorio de Ecología y el Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Vegetal, pertenecientes al Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia, en donde se desarrolló este trabajo.

Con base en las condiciones utilizadas en trabajos previos (González, 2010; Forero-Cujiño *et al*., 2016), los cultivos se mantuvieron con iluminación artificial, con lámparas fluorescentes de 39 W, 1400 lux, con una intensidad lumínica de 60 µE $m^{-2}$ $s^{-1}$, a una temperatura de 22 °C en promedio, con un sistema de aireación y agitación continua con aire del ambiente y un fotoperiodo de 16:8 h luz-oscuridad. Para los experimentos se estableció un sistema de cultivo tipo "batch" en botellas de 500 mL, con un volumen de cultivo total de 250 mL y una duración de cada cultivo de diez días.

### Inmovilización de las algas en cápsulas de alginato de calcio

Las algas se inmovilizaron en cápsulas de alginato de calcio, siguiendo la metodología descrita por Forero-Cujiño *et al*. (2016). Con este fin, se preparó una mezcla 1:1 de alginato de sodio al 4% con una solución de algas (cada especie por separado) en Medio Básico de Bold (BBM), cuya concentración de células se determinó por conteo al microscopio en cámaras Neubauer (Wetzel y Likens, 2000). A esta mezcla se le denominó preparado algal. Paralelamente se elaboró una solución de 0,66 gr de cloruro de calcio ($CaCl_2.2H_2O$) en 200 mL de agua destilada y se conservó a 4 °C en una cama de hielo. Posteriormente, con una jeringa de 1 mL se tomó el preparado algal y se dejaron caer gotas dentro de la solución de cloruro de calcio, para conseguir 25 +/- 5 esferas por cada mL de preparado. El volumen aproximado de cada esfera fue de 0,04 +/- 0,01 mL. Las cápsulas se dejaron reposar en el cloruro de calcio durante 12 h, manteniendo la temperatura a 4 °C para permitir la estabilización y endurecimiento de las esferas. Las concentraciones iniciales de los inóculos de *S. ovalternus* y *P. kessleri* utilizados por separado para los experimentos fueron de $7{,}1x10^6$ y $26{,}3x10^6$ células por mL, respectivamente.

### Ensayos experimentales

Se realizaron dos tratamientos: monocultivos libres (células libres en medio líquido BBM) y monocultivos encapsulados (células en esferas de alginato de calcio en medio líquido BBM). La unidad experimental fue cada botella de 500 mL conteniendo 250 mL de medio. Para los montajes en condiciones libres, a cada botella se le agregaron 10 mL del inóculo en el medio de cultivo. Para la condición de encapsulamiento, se agregaron 250 esferas (preparadas como se indicó en el aparte anterior) por botella. Tanto en los montajes de algas libres como encapsuladas, los ensayos se realizaron por triplicado (tres botellas de 500 ml con 250 ml de medio líquido en cada tratamiento). El medio de cultivo BBM se preparó en las concentraciones que se muestran en la Tabla 1, manteniendo el pH en 6,6.

### Fluorescencia de la clorofila *a*

La adecuación de la metodología de medición de fluorescencia de la clorofila *a* en algas libres y encapsuladas se realizó con base en la técnica descrita para plantas superiores (Maxwell y Johnson, 2000; González *et al*., 2008; Solarte *et al*., 2010). Se utilizó un fluorómetro no modulado de pulsos continuos marca Handy PEA (Hansatech, Inglaterra), con un adaptador de fase líquida (HPEA/LPA2) que provee un haz de luz actínica (fotosintética) en LED de color rojo de 637 nm. Aunque el adaptador HPEA/LPA2 se utiliza con medios acuosos en los que las células están libres, se observó que en las algas inmovilizadas en cápsulas de alginato se registraron mediciones adecuadas, debido a que las cápsulas ocupan todo el espacio de la base del vial donde se recibe el haz de luz actínica. La concentración de clorofila se determinó por espectrofotometría de acuerdo a la metodología de Lichtenthaler y Buschmann (2001). La concentración de clorofila por esfera fue en promedio de 0,1464 µg $mL^{-1}$ (inicio de las mediciones) y 1,682 µg $mL^{-1}$ (final de las mediciones) para *S. ovalternus*, y de 0,0843 µg $mL^{-1}$ (inicio de las mediciones) y 1,9288 µg $mL^{-1}$ (final de las mediciones) para *P. kessleri*. La concentración del

**Tabla 1.** Medio Basal de Bold (BBM, Andersen, 2005) utilizado para cultivo de las algas *Scenedesmus ovalternus* (cepa LAUN-001) y *Parachlorella kessleri* (cepa LAUN-002) en estado libre y encapsuladas. M: molaridad.

| Compuesto | Concentración en el medio (M) |
|---|---|
| Macronutrientes | |
| $NaNO_3$ | $2{,}94 \times 10^{-3}$ |
| $CaCl_2.2H_2O$ | $1{,}70 \times 10^{-4}$ |
| $MgSO_4.7H_2O$ | $3{,}04 \times 10^{-4}$ |
| $K_2HPO_4$ | $4{,}31 \times 10^{-4}$ |
| $KH_2PO_4$ | $1{,}29 \times 10^{-3}$ |
| NaCl | $4{,}28 \times 10^{-4}$ |
| Solución EDTA alcalina | |
| EDTA | $1{,}71 \times 10^{-4}$ |
| KOH | $5{,}53 \times 10^{-4}$ |
| Solución ácida de hierro | |
| $FeSO_4.7H_2O$ | $1{,}79 \times 10^{-5}$ |
| $H_2SO_4$ | $3{,}6 \times 10^{-2}$ |
| Solución de boro | |
| $H_3BO_3$ | $1{,}85 \times 10^{-4}$ |
| Solución de metales traza | |
| $ZnSO_4.7H_2O$ | $3{,}07 \times 10^{-5}$ |
| $MnCl_2.4H_2O$ | $7{,}28 \times 10^{-6}$ |
| $MoO_3$ | $4{,}93 \times 10^{-6}$ |
| $CuSO_4.5H_2O$ | $6{,}29 \times 10^{-6}$ |
| $Co(NO_3)_2.6H_2O$ | $1{,}68 \times 10^{-6}$ |

pigmento fue baja al inicio del crecimiento y aumentó gradualmente a lo largo del experimento. Además, los viales del adaptador tuvieron cierre hermético, lo que permitió mantener las condiciones de las cápsulas estables durante la preadaptación a la oscuridad y durante la posterior medición, impidiendo la deshidratación de las cápsulas (Fig. 4).

Las mediciones de la fluorescencia de la clorofila *a* se realizaron entre los días 4 a 6 del cultivo, durante los cuales las algas se encontraban en crecimiento exponencial y sin factores causantes de estrés. Se variaron la intensidad de la luz del fluorómetro (entre 1000 y 3500 µmoles $m^{-2}s^{-1}$), el tiempo de exposición a la luz actínica (1, 2 y 5 s) y el tiempo de preadaptación a la oscuridad (10, 15 y 30 min), tanto para *S. ovalternus* como para *P. kessleri*, libres y encapsuladas. La temperatura de medición se mantuvo constante a 18 °C y la humedad relativa fue del 95 % (condiciones de laboratorio). Los valores puestos a prueba para cada variable permitieron tener un ámbito amplio de medición para explorar la respuesta de las algas encapsuladas a la técnica fluorométrica. La fluorescencia de la clorofila *a* de las algas en cultivos libres se midió directamente en el adaptador de fase líquida del fluorómetro. Para las mediciones fluorométricas de las algas inmovilizadas se colocaron diez esferas en el adaptador y se hicieron las determinaciones en las algas encapsuladas.

La determinación de los valores en cada uno de los parámetros mencionados se basó en el método de calibración que indica el instructivo del fluorómetro no modulado de pulso continuo Handy PEA (Hansatech Instruments, 2006), así como en la teoría sobre la medición de la eficiencia cuántica máxima potencial del PSII ($F_v/F_m$) (González *et al.*, 2008; Solarte *et al.*, 2010; Murchie y Lawson, 2013). Se tomó una muestra de cada réplica y se midió su fluorescencia mínima ($F_o$) y máxima ($F_m$) con los diferentes valores de cada parámetro a calibrar. Se tomaron como valores óptimos los que arrojaron la señal de $F_v/F_m$ más alta, indicativo de organismos sanos (Kolber *et al.*, 1988; Parkhill *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2014).

### Análisis estadísticos

Se utilizó un diseño completamente aleatorio con tres réplicas de cada tratamiento. Se describió y comparó estadísticamente el comportamiento de cada variable y cada especie mediante diagramas de caja. En ellos se representaron los cuartiles 25-75 %, la mediana y los valores mínimos y máximos ("bigotes"). Para este tipo de gráficos, se considera que existen diferencias significativas entre los conjuntos de datos analizados cuando las cajas y sus respectivos bigotes no se interceptan (McGill *et al.*, 1978). Para confirmar la significancia en las diferencias detectadas se realizó la prueba de Kruskal-Wallis, la cual es un análisis de varianza (ANOVA) no paramétrico que no asume una distribución normal ni supone la misma forma de distribución de todos los grupos (Zar, 1996). La hipótesis nula es que las muestras corresponden a poblaciones con la misma mediana. Los intervalos de los valores de eficiencia seleccionados como representativos para las algas libres y encapsuladas se definieron con base en los percentiles 25 y 75 del ensayo de tiempo de exposición a la luz actínica, dado que este tratamiento se hizo bajo las condiciones en las cuales las otras variables (tiempo de preadaptación a la oscuridad, intensidad de la luz del fluorómetro, intensidad de la señal de luz actínica) dieron los mejores resultados. Todos los análisis estadísticos se hicieron en el programa PAST versión 3.10 (Hammer *et al.*, 2001).

## RESULTADOS

### Respuestas de las algas al tiempo de preadaptación a la oscuridad

Tanto para *S. ovalternus* como para *P. kessleri* libres y encapsuladas, el promedio y la mediana de la relación $F_v/F_m$, con un tiempo de preadaptación a la oscuridad de 30 min, arrojaron valores entre 0,75 y 0,76 (Fig. 1). Para *P. kessleri* libre y con tiempo de preadaptación a oscuridad de 10 min, la respuesta fue similar, pero la dispersión de estos datos fue mayor. En este ensayo fue notable la alta dispersión de los datos de fluorescencia de la clorofila *a* de *S. ovalternus* encapsulada (Fig. 1). De todos los tratamientos analizados, la prueba de Kruskal-Wallis mostró que solamente la mediana de la $F_v/F_m$ de *P. kessleri*, encapsulada y preadaptada 30 min a la oscuridad, mostró diferencias significativas con respecto a los otros tiempos de preadaptación de la especie inmovilizada ($p$= 0,0341), lo que confirma lo mostrado por la Fig. 1. En general, se puede decir que con 30 min de preadaptación a la oscuridad la relación $F_v/F_m$ se mantuvo alta, incluso cuando se varió el tiempo de exposición a la luz actínica.

### Respuestas de las algas a la intensidad de luz del fluorómetro

La Fig. 2 muestra la respuesta promedio de la fluorescencia de la clorofila *a* de las dos especies de microalgas libres y encapsuladas a medida que se incrementa la intensidad de luz del fluorómetro. Se mantuvieron constantes el tiempo de exposición a la luz actínica en 2 s y el tiempo de preadaptación en 30 min. El registro más alto de $F_v/F_m$ se obtuvo con 3000 µmoles $m^{-2}$ $s^{-1}$. Después de este valor de intensidad se notó una ligera tendencia a la disminución de la relación $F_v/F_m$.

### Respuestas de las algas al tiempo de exposición a la luz actínica

En las especies cultivadas de manera libre la relación $F_v/F_m$ tuvo registros entre 0,73 y 0,74 con un tiempo de exposición a la luz actínica de 1 y 2 s (Fig. 3). En las especies encapsuladas los estadísticos de significancia más altos se registraron

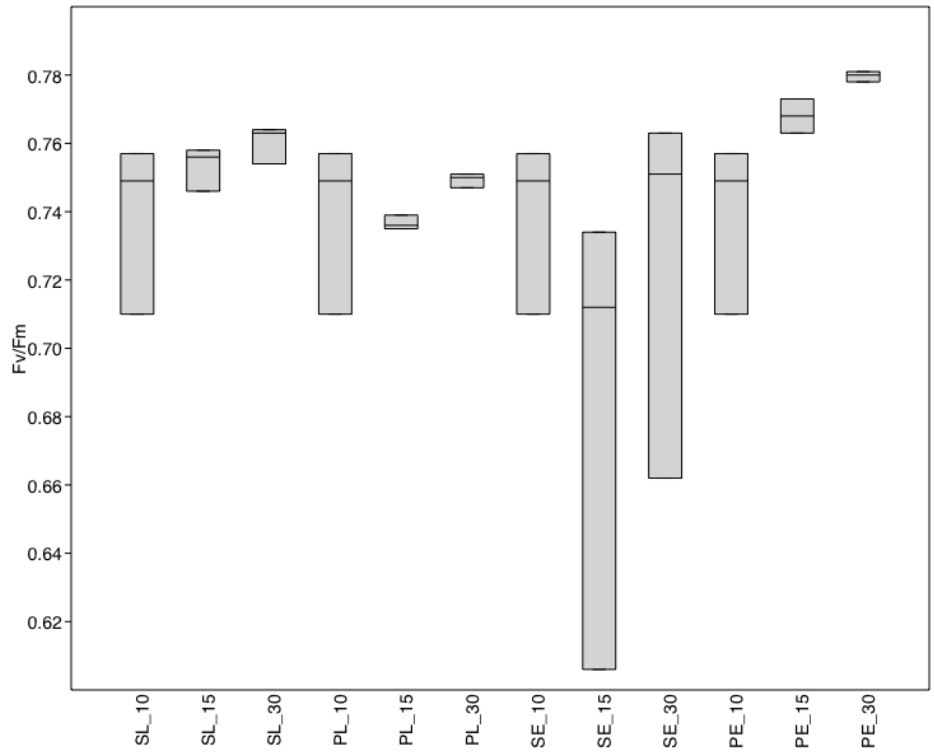


**Figura 1.** Diagramas de cajas para la fluorescencia de la clorofila *a* con tiempos de preadaptación a la oscuridad de 10, 15 y 30 min. Intensidad de 3000 µmoles $m^{-2}$ $s^{-1}$, tiempo de exposición de 2 s. Se indican los cuartiles 25-75 %, la mediana y los valores mínimos y máximos de $F_v/F^m$ (n = 3 para cada caso). S: *Scenedesmus ovalternus*, P: *Parachlorella kessleri*, L: libres, E: encapsuladas.

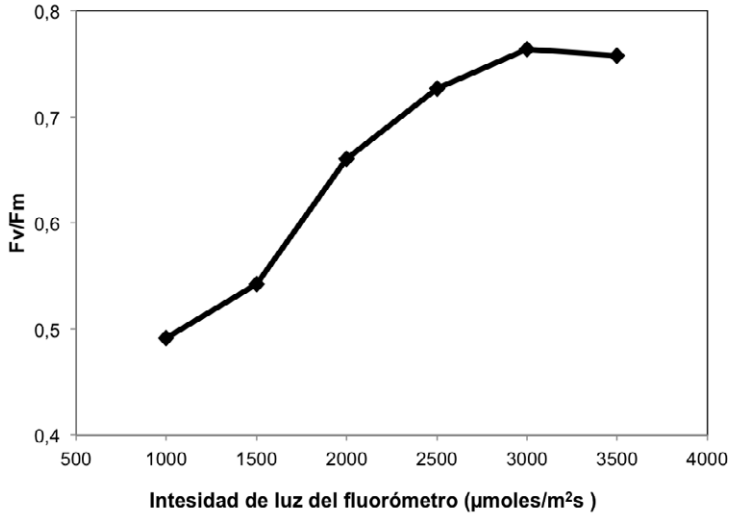


**Figura 2.** Incremento en la fluorescencia de la clorofila *a* con respecto a la variación de la intensidad de la luz del fluorómetro no modulado. Los datos corresponden a promedios de las dos especies libres y encapsuladas. Tiempo de exposición a la luz 2 s.

con un tiempo de exposición de 2 s para *S. ovalternus* y de 1 s para *P. kessleri*. Según el análisis de Kruskal-Wallis, no se presentaron diferencias estadísticas entre las medianas de un mismo tratamiento, pero sí en la fluorescencia de la clorofila *a* entre las algas libres y encapsuladas ($p$=0,002), siendo significativamente mayores en las algas inmovilizadas. Además, cuando se utilizaron exposiciones de 5 s, se notó una clara tendencia de *P. kessleri* a presentar menores valores de $F_v/F_m$, con una alta dispersión en los datos.

## DISCUSIÓN

El tiempo de preadaptación de las algas de 30 min de oscuridad, concuerda con lo que se establece como óptimo para las plantas superiores y para el fitoplancton (González *et al.*, 2008; Solarte *et al.*, 2010; Khalida *et al.*, 2012). Este periodo es relativamente largo, dado que se requiere lograr que todos los centros de reacción del PSII estén abiertos o en estado oxidado para lograr la medición de la fluorescencia mínima $F_o$ (Maxwell y Johnson, 2000; González *et al.*, 2008). Además, MacIntyre *et al*. (1997) reportaron que en oscuridad la desactivación de la proteína Rubisco (que cataliza la fijación de carbono) toma entre 12 y 18 min en las plantas vasculares y de 9 a 28 min en algunos organismos fitoplanctónicos. Existe una fase rápida y una fase lenta de la inducción de la fluorescencia, y es durante la fase de decaimiento, también llamada de extinción de la fluorescencia, que hay un aumento en la tasa a la cual los electrones son transportados lejos del PSII (González *et al.,* 2008). Esto obedece principalmente a que la luz activa las enzimas implicadas en el metabolismo del carbono. Tal declinación de la fluorescencia se conoce como "enfriamiento o apagamiento fotoquímico" (Buschmann, 1999). Al mismo tiempo, hay un aumento en la eficiencia con la cual la energía se convierte en calor. Este último proceso se denomina "extinción no fotoquímica". En un vegetal típico, los cambios en estos dos procesos se completan aproximadamente en 15 a 20 min, cuando se alcanza un estado estacionario (González *et al.,* 2008). Tiempos similares se requieren para las microalgas planctónicas (Quaas *et al*., 2015). No obstante, el tiempo necesario para alcanzar este estado puede variar significativamente entre especies (González *et al.,* 2008; Quaas *et al*., 2015). Para el caso de las algas encapsuladas en este trabajo, el tiempo de preadaptación a la oscuridad de 30 minutos mostró valores de $F_v/F_m$ cercanos a los de las algas libres. De esta manera, el presente estudio exploratorio sugiere que dicho periodo de preadaptación a la oscuridad es adecuado para medir las variables de fluorescencia en las algas inmovilizadas dentro de las esferas de alginato. En ensayos aislados (no mostrados en este estudio), se hicieron mediciones de la eficiencia cuántica máxima potencial del PSII ($F_v/F_m$) después de tiempos largos de oscuridad (más de 20 h) y no se presentaron registros de variaciones notables en la fluorescencia de la clorofila. Por otra parte, la dispersión observada en las respuestas de preadaptación puede deberse al número relativamente bajo de datos; una mayor cantidad de réplicas podría reducir este sesgo.

De acuerdo a los datos de $F_v/F_m$ obtenidos, se estableció una intensidad de 3000 µmoles $m^{-2}$ $s^{-1}$ como valor óptimo para el parámetro de intensidad de la luz calibrada directamente en el fluorómetro. Por debajo de esta intensidad se reduce la $F_v/F_m$ debido a que la iluminación no es lo suficientemente intensa para activar todos los centros de reacción del PSII de las respectivas algas evaluadas en el presente estudio. En plantas superiores se ha visto que intensidades de 2000 µmoles $m^{-2}s^{-1}$ son suficientes cuando las hojas se han preadaptado a la oscuridad, pero pueden ser muy bajas para proporcionar una adecuada respuesta de la fluorescencia cuando la iluminación actínica es alta (Murchie y Lawson, 2013). En el presente estudio, las algas se preadaptaron a la oscuridad con un tiempo óptimo de 30 min, después de lo cual requirió una intensidad de 3000 µmoles $m^{-2}$ $s^{-1}$ para provocar la $F_v/F_m$ más alta. Posiblemente el medio líquido en las algas libres o el alginato de las cápsulas en las algas inmovilizadas, pueden tener un efecto de atenuación.

Los valores de tiempo de exposición a la luz actínica encontrados (Fig. 3) concuerdan con lo que se establece en la teoría sobre el proceso de fluorescencia o cinética de Kautsky (González *et al.,* 2008). Según esta dinámica, la fluorescencia aumenta rápidamente en el primer segundo de iluminación, lo que se conoce como "fase rápida", que se relaciona principalmente con eventos primarios del PSII. Sigue una fase de declive durante varios minutos, denominada "fase lenta", que está asociada especialmente con interacciones entre procesos de las membranas de los tilacoides y procesos metabólicos en el estroma del cloroplasto. Esta fase lenta corresponde a un incremento en la asimilación de $CO_2$ (González *et al.,* 2008). De acuerdo con la cinética de Kautsky, el tiempo de exposición a la luz actínica no puede ser inferior a 1 s, debido a que este es el lapso mínimo necesario para que se pueda medir la fluorescencia máxima. Sin embargo, la $F_m$ varía de acuerdo a la especie. Los resultados del presente estudio mostraron que entre 1 y 2 s de exposición a la luz actínica son adecuados, en especial en las algas inmovilizadas, cuyos resultados de fluorescencia fueron significativamente más elevados a los de las algas libres. *S. ovalternus* tiende a mostrar registros de $F_v/F_m$ más altos cuando está inmovilizada (Fig. 3), pero al parecer requiere más de tiempo de exposición a la luz actínica (2 a 5 s). Es posible que la forma cenobial de esta especie haga que no todas las células de la colonia reciban la luz de igual manera, lo que explicaría este resultado. Esta hipótesis requerirá posteriores comprobaciones experimentales. En el ensayo en el que se emplearon los valores óptimos de todas las variables (Fig. 3) se comprobó una $F_v/F_m$ de magnitud más elevada en las algas inmovilizadas, lo que sugiere que el encapsulamiento no causa efectos negativos para la medición de la fluorescencia de la clorofila *a*.

Desde el punto de vista metodológico es probable que, durante el proceso de formación de las esferas, su permanencia por largo tiempo en la solución de calcio (12 h) permita que este ion penetre en exceso hacia el interior de las perlas de alginato, alterando la salinidad del medio. En consecuencia, es factible suponer que hay una concentración alta de calcio al interior de las esferas, la cual podría generar algún grado de estrés en las algas. Este probable efecto deberá medirse y valorarse en futuros experimentos. Al

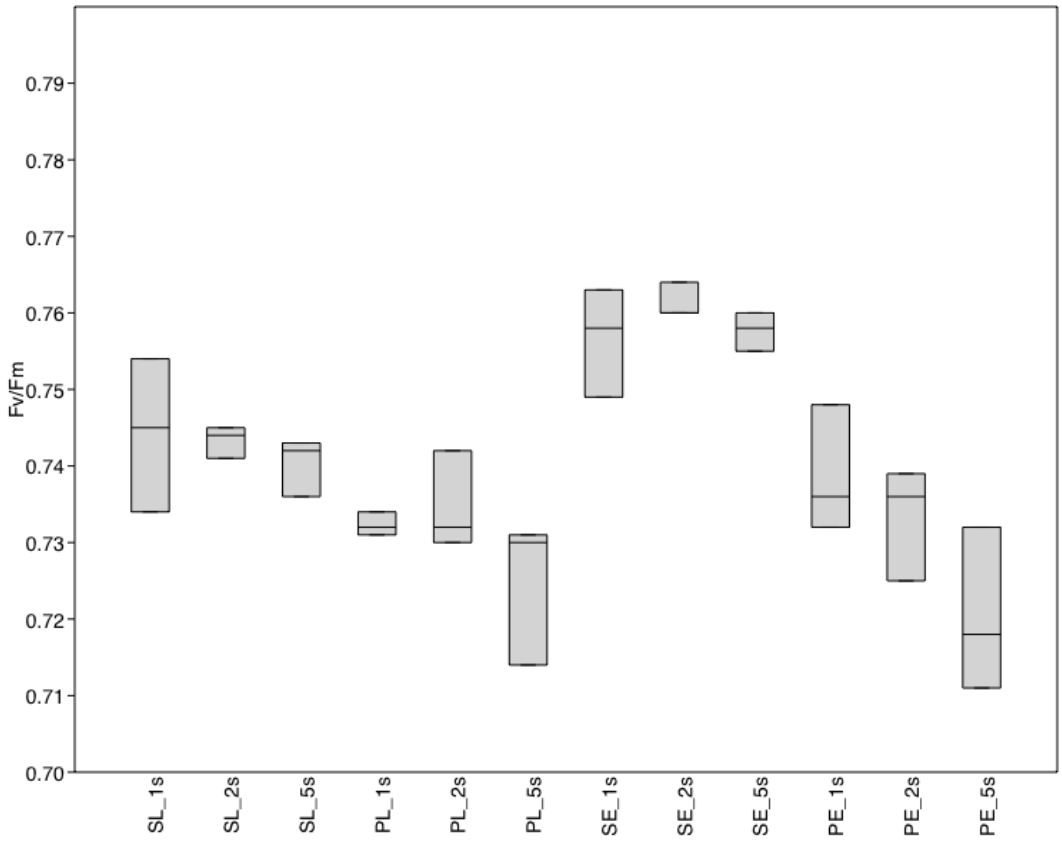


**Figura 3.** Diagramas de cajas para la fluorescencia de la clorofila *a* con variación del tiempo de exposición a la luz actínica de 1, 2 y 5 s. Se indican los cuartiles 25-75 %, la mediana y los valores mínimos y máximos de $F_v/F_m$ (n = 3 para cada caso). S: *Scenedesmus ovalternus*, P: *Parachlorella kessleri*, L: libres, E: encapsuladas.

**Figura 4.** Viales del adaptador HANDY-LPA 2 con las cápsulas de alginato conteniendo *Parachlorella kessleri*.

respecto, Hertzberg y Jensen (1989) indican que después de 30 minutos de inmersión de las cápsulas en la solución de cloruro de calcio, no se produce un incremento de la dureza de las esferas, con lo cual no sería necesario dejarlas tiempos tan prolongados.

**Tabla 2.** Intervalos de $F_v/F_m$ propuestos para las condiciones de no estrés de las algas *Scenedesmus ovalternus* (cepa LAUN-001) y *Parachlorella kessleri* (cepa LAUN-002) cultivadas en estado libre y encapsuladas en alginato de calcio.

| Condición de cultivo | *Scenedesmus ovalternus* $F_v/F_m$ | *Parachlorella kessleri* $F_v/F_m$ |
|---|---|---|
| Libres | 0,739 – 0,747 | 0,730 – 0,736 |
| Encapsuladas | 0,760 – 0,764 | 0,732 – 0,748 |

## CONCLUSIONES

Para la medición de la eficiencia cuántica máxima potencial del PSII en *S. ovalternus* y *P. kessleri* encapsuladas en alginato de calcio se establecieron los siguientes valores como óptimos para las condiciones de experimentación utilizadas: a) 30 min de preadaptación a la oscuridad; b) 3000 µmoles $m^{-2}$ $s^{-1}$ de intensidad de la luz del fluorómetro no modulado; y c) 1 o 2 s de tiempo de exposición a la luz actínica con el fluorómetro. De acuerdo a lo anterior, en la Tabla 2 se proponen los intervalos de valores de $F_v/F_m$ que podría asociarse con un estado sano y de no estrés para *Parachlorella kessleri* (LAUN 002) y *Scenedesmus ovalternus* (LAUN 001), con y sin inmovilización. Estos valores de referencia permitirán analizar en el futuro algunos aspectos fisiológicos de estas especies de algas inmovilizadas en alginato de calcio, al utilizarlas en estudios de biorremediación, bioindicación, producción de metabolitos, fotosíntesis, etc. De esta manera se podrá valorar la respuesta fisiológica ante cambios particulares o globales. El método es no invasivo y no destructivo, es rápido y sensible y se podría aplicar a algas intactas *in vivo*, libres o embebidas en cápsulas de alginato de calcio.

## AGRADECIMIENTOS

Este estudio hizo parte de la tesis de maestría de Ibeth P. Delgadillo y contó con el apoyo financiero del proyecto de investigación "Biomonitoreo del estado trófico de ecosistemas acuáticos lénticos con microalgas inmovilizadas", cofinanciado por COLCIENCIAS y la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, contrato 462-2011. También se contó con el soporte económico de la Dirección de Investigaciones Sede Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia. Los autores agradecen a los grupos de investigación "Biodiversidad, biotecnología y conservación de ecosistemas" y "Fisiología del estrés y biodiversidad en plantas y microorganismos" del Departamento de Biología y a los laboratorios de Ecología, de Cultivo de Algas, y de Fisiología y Bioquímica Vegetal del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia, donde se desarrollaron todos los experimentos y mediciones. Se agradecen las sugerencias de los evaluadores anónimos que permitieron mejorar sustancialmente el manuscrito.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

## REFERENCIAS

Abdel-Hameed MS. Continuous removal and recovery of lead by alginate beads, free and alginate-immobilized *Chlorella vulgaris*. Afr J Biotechnol. 2006;5(19):1819-1823. Doi:10.5897/AJB2006.000-5070.

Abdel-Hameed MS, Hammouda E. Biotechnological potential uses of immobilized algae. Int J Agr Biol. 2007;9(1):183-192.

Akhtar N, Iqbal M, Zafar S, Iqbal J. Biosorption characteristics of unicellular green alga *Chlorella sorokiniana* immobilized in loofa sponge for removal of Cr (III). J Environ Sci. 2008;20:231-239. Doi:10.1016/S1001-0742(08)60036-4.

Al-Rub A, El-Naas M, Benyahia F, Ashour I. Biosorption of nickel on blank alginate beads, free and immobilized algal cells. Process Biochem. 2004;39:1767-1773. Doi:10.1016/j.procbio.2003.08.002.

Antal T, Matorin D, Kukarskikh G, Lambreva M, Tyystjärvi, Krendeleva T, Tsygankov A, Rubin A. Pathways of hydrogen photoproduction by immobilized *Chlamydomonas reinhardtii* cells deprived of sulfur. Int J Hydrogen Energy. 2014;39:18194-18203. Doi:10.1016/j.ijhydene.2014.08.135.

Andersen R. Algal culturing techniques. USA: Elsevier Academic Press; 2005. p. 437-438.

Baker N. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. Ann Rev Plant Biol. 2008;59:89-113. Doi:10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759.

Buschmann C. Photochemical and non-photochemical quenching coefficients of the chlorophyll fluorescence: comparison of variation and limits. Photosynthetica. 1999;37(2):217-224. Doi:10.1023/A:1007003921135.

Chen Y. Immobilized microalga *Scenedesmus quadricauda* Chlorophyta, Chlorococcales for long-term storage and for application for water quality control in fish culture. Aquaculture. 2001;195:71-80. Doi:10.1016/S0044-8486(00)00540-8.

de-Bashan L, Hernandez J, MoreyT, Bashan Y. Microalgae growth-promoting bacteria as "helpers" for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater. Water Res. 2004;38:466-474. Doi: 10.1016/j.watres.2003.09.022.

de-Bashan L, Trejo A, Huss V, Hernandez J, Bashan Y. *Chlorella sorokiniana* UTEX 2805, a heat and intense, sunlight-

tolerant microalga with potential for removing ammonium from wastewater. Bioresour Technol. 2008;99:4980-4989. Doi:10.1016/j.biortech.2007.09.065.

Eldridge D. A novel approach to photosynthesis practicals. Sch Sci Rev. 2004;85(312):37-45.

Forero-Cujiño M, Montenegro-Ruíz LC, Pinilla-Agudelo G, Melgarejo LM. Inmovilización de las microalgas *Scenedesmus ovalternus* (Scenedesmaceae) y *Chlorella vulgaris* (Chlorellaceae) en esferas de alginato de calcio. Acta biol Col. 2016; 21(2):437-442. Doi:10.15446/abc.v21n2.51253.

Frense D, Müller A, Beckmann D. Detection of environmental pollutants using optical biosensor with immobilized algae cells. Sens Actuators B Chem. 1998;51(1-3):256-260. Doi:10.1016/S0925-4005(98)00203-2.

González L. Influencia de la deficiencia de nitrógeno y fósforo en las interacciones competitivas entre *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* (tesis de maestría). Bogotá: Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia; 2010. p. 65.

González S, Perales H, Salcedo M. La fluorescencia de la clorofila *a* como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. Rev Educ Bioquim. 2008;27(4):119-129.

Govindjee, Coleman W. How plants make oxygen. Sci Am. 1990;262(2):50-58. Doi:10.1038/scientificamerican0290-50.

Hahn J, Ghirardi M, Jacoby W. Immobilized algal cells used for hydrogen production. Biochem Eng J. 2007;37:75-79. Doi:10.1016/j.bej.2007.03.010.

Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontol Electron. 2001;4(1):1-9.

Hansatech Instruments. Operations manual setup, installation & maintenance. England: Hansatech Instruments Ltd.; 2006. 85 p.

Hernandez J, de-Bashan L, Bashan Y. Starvation enhances phosphorus removal from wastewater by the microalga *Chlorella* spp. co-immobilized with *Azospirillum brasilense*. Enzyme Microb Technol. 2006;38:190-198. Doi:10.1016/j.enzmictec.2005.06.005.

Hernandez J, de-Bashan L, Bashan Y. Growth promotion of the freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by the nitrogen-fixing, plant growth-promoting bacterium *Bacillus pumilus* from arid zone soils. Eur J Soil Sci. 2009;45:88-93. Doi:10.1016/j.ejsobi.2008.08.004.

Hertzberg S, Jensen A. Studies of alginate-immobilized marine microalgae. Bot Mar. 1989;32:267-273. Doi:10.1515/botm.1989.32.4.267.

Kadam K. Environmental implications of power generation via coal-microalgae cofiring. Energy 2002;27:905-922. Doi:10.1016/S0360-5442(02)00025-7.

Katircioglu H, Aslim B, Türker A, Atici A, Beyatli Y. Removal of cadmium (II) ion from aqueous system by dry biomass, immobilized live and heat-inactivated *Oscillatoria* sp. H1 isolated from freshwater (Mogan Lake). Bioresour Technol. 2008;99:4185-4191. Doi:10.1016/j.biortech.2007.08.068.

Khalida Z, Youcef A, Zitouni B, Mohammed Z, Radovan P. Use of chlorophyll fluorescence to evaluate the effect of chromium on activity Photosystem II at the alga *Scenedesmus obliquus*. Int J Res Rev Appl Sci. 2012;12(2):304-314.

Kolber ZS, Zehr J, Falkowski PG. Effects of growth irradiance and nitrogen limitation on photosynthetic energy conversion in Photosystem II. Plant Physiol. 1988;88(3):923-929. Doi:10.1104/pp.88.3.923.

Lichtenthaler HK, Buschmann C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS. Curr Protoc Food Analyt Chem. 2001;F4.3.1–F4.3.8. Doi: 10.1002/0471142913.faf0403s01.

Luan T, Jin J, Chan S, Wong Y, Tam N. Biosorption and biodegradation of tributyltin (TBT) by alginate immobilized *Chlorella vulgaris* beads in several treatment cycles. Process Biochem. 2006;41:1560-1565. Doi:10.1016/j. procbio.2006.02.020.

MacIntyre HL, Sharkey TD, Geider RJ. Activation and deactivation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) in three marine microalgae. Photosynth Res. 1997;51(2):93-106. Doi:10.1023/A:1005755621305.

Maxwell K, Johnson G. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. J Exp Bot. 2000;51(345):659-668. Doi:10.1093/jexbot/51.345.659.

McGill R, Tukey JW, Larsen WA. Variations of box plots. Am Stat. 1978;32(1):12-16. Doi:10.2307/2683468.

Moreno-Garrido I. Microalgae immobilization: current techniques and uses. Bioresour Technol. 2008;99:3949-3964. Doi:10.1016/j.biortech.2007.05.040.

Murchie EH, Lawson T. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. J Exp Bot. 2013;64(13):3983-3998. Doi:10.1093/jxb/ert208.

Parkhill JP, Maillet G, Cullen JJ. Fluorescence-based maximal quantum yield for PSII as a diagnostic of nutrient stress. J Phycol. 2001;37(4):517-529. Doi:10.1046/j.1529-8817.2001.037004517.x.

Quaas T, Berteotti S, Ballottari M, Flieger K, Bassi R, Wilhelm C, Goss R. Non-photochemical quenching and xanthophyll cycle activities in six green algal species suggest mechanistic differences in the process of excess energy dissipation. J Plant Physiol. 2015;172:92-103. Doi:10.1016/j.jplph.2014.07.023.

Ruiz-Marin A, Mendoza-Espinosa L, Stephenson T. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. Bioresour Technol. 2010;101:58-64. Doi:10.1016/j.biortech.2009.02.076.

Solarte ME, Moreno L, Melgarejo LM. Fotosíntesis y pigmentos vegetales. In: Melgarejo LM, editor. Experimentos en fisiología vegetal. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2010. p. 107-122.

Shitanda I, Takada K, Sakai Y, Tatsuma T. Compact amperometric algal biosensors for the evaluation of water toxicity. Anal Chim Acta. 2005;530:191-197. Doi:10.1016/j.aca.2004.09.073.

Védrine C, Leclerc J, Durrieu C, Tran-Minh C. Optical whole-cell biosensor using *Chlorella vulgaris* designed for monitoring herbicides. Biosens Bioelectron. 2003;18(4):457-463. Doi:10.1016/S0956-5663(02)00157-4.

Wang Z, Wang J, Qi H. Responses of maximum photosystem II photochemical efficiency of phytoplankton communities to nutrient limitation in the coastal sea of Qingdao, China. J Ocean Univ China. 2014;13(1):83-90. Doi:10.1007/s11802-014-2236-y.

Wetzel R, Likens G. Limnological analyses. 3rd ed. New York: Springer; 2000. 429 p.

Zar JH. Biostatistical analysis. 3rd ed. London: Prentice Hall; 1996. 662 p.