

2002B

093662075

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA  
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



CRECIMIENTO DE *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae) CULTIVADA EN  
MEDIO F/2 Y FERTILIZANTES AGRÍCOLAS EN LUZ FLUORESCENTE E  
INCANDESCENTE

TRABAJO DE TITULACION EN LA MODALIDAD DE  
TESIS  
PARA OBTENER EL TITULO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA  
JAIME ALBERTO GONZALEZ MUÑOZ  
Las Agujas, Zapopan, Jal. . Enero del 2004



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

**C. JAIME ALBERTO GONZÁLEZ MUÑOZ  
PRESENTE.**

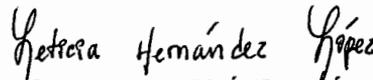
Manifiestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción **Tesis** con el título: "**Crecimiento de *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae) cultivada en medio f/2 y fertilizantes agrícolas en luz fluorescente e incandescente**", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado/a como Director de dicho trabajo el/la **M.C. ENRIQUE VALENZUELA ESPINOZA** y como Asesor el/la **OCEAN. SALVADOR VELÁZQUEZ MAGAÑA**.

**ATENTAMENTE  
"PIENSA Y TRABAJA"**

Las Agujas, Zapopan, Jal., 21 de julio del 2003

  
**DRA. MÓNICA ELIZABETH ROJAS LÓPEZ**  
**PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**  
COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

  
**M.C. LETICIA HERNÁNDEZ LÓPEZ**  
**SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

c.c.p. **M.C. ENRIQUE VALENZUELA ESPINOZA**.- Director del Trabajo  
c.c.p. **OCEAN. SALVADOR VELÁZQUEZ MAGAÑA**.- Asesor del Trabajo  
c.c.p. Expediente del alumno

MERL/LHL/mam

**C. DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ**  
**PRESIDENTE DEL COMITE DE TITULACIÓN DE LA**  
**LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**  
**P R E S E N T E.**

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de titulación que realizó el (la) pasante **Jaime Alberto González Muñoz**, con el titulo “Crecimiento de *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae) cultivada en medio f/2 y fertilizantes agrícolas en luz fluorescente e incandescente”, consideramos que ha quedado debidamente concluído, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y en su caso programación de fecha de presentación y defensa del mismo.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva dar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., Enero del 2004.

Director(a) del Trabajo



Asesor(a)

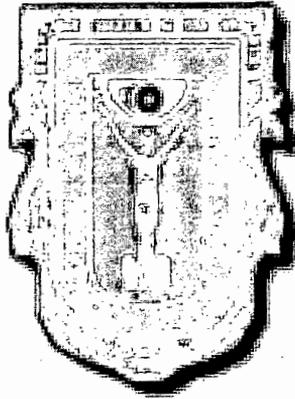
M. C. Enrique Valenzuela Espinoza  
COORDINADOR DE LA CARRERA DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA  
Director del trabajo

Oscar Salvador Velásquez Magaña  
Asesor

**SINODALES**

1. Mora Navarro Maria del Refugio
2. Cynthia Temores Ramírez
3. Luz Elena Claudio García
4. José Armando Arias García

Firma



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Director de tesis: M.C. Enrique Valenzuela Espinoza

## AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad de Guadalajara** y al Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias por haberme permitido culminar esta etapa de mi vida como estudiante.

**Al Instituto de Investigaciones Oceanológicas** de la Universidad Autónoma de Baja California y al proyecto 4020 Producción de microalgas por haberme dado la oportunidad de desarrollar este trabajo.

Al MC. **Enrique** Valenzuela Espinoza por compartir enseñanzas, criterios de trabajo y por todo el apoyo durante y en la culminación del presente trabajo.. Gracias Profe.....

A mis sinodales: **Luz Elena** Claudio, **Cinthia** Temores, **Maria del Refugio** Mora y **Armando** Arias, por las observaciones para la mejora del presente trabajo.

Al Dr. **Zaul** García Esquivel por su apoyo y disposición...muchas gracias.

Alas personas que me indujeron al mundo de las microalgas: **Maria del Refugio Mora**, **Salvador Velásquez**, **Ramón Reynoso** y a mi tutor **Eduardo lopez**, No se que hubiera hecho sin su orientación.

A la familia **Plancton**: **Enrique** Valenzuela, **Filiberto** Núñez, "**Maria**" Moreno . Silvia "**Sibebo**" y muy en especial a **Ruth** Montes gracias por aguantarme Chaparra.

A **Marina** Marmolejo, **Verónica** Pizano, **Moisés** y **Rogelio** Gudiño, A las "gemelas Brenan" Mis tías **Martha** y **Rosa** González, a las familias **Montes-Macias** y **Legazpi-Muñoz** y a mi **Abuelo Jaime** González .A todos ellos por el apoyo **indirectamente** brindado en la realización de este trabajo...**MUCHAS GRACIAS**.

Y sobre todo **Gracias Dios.....**

**DEDICATORIA**

**A mis padres:**

**Javier González Miramontes**

**Y**

**Maria del Carmen Muñoz Ceja**

**Por darme la vida , por que me dieron las bases para seguir adelante por buen camino y apoyarme en la formación de mis estudios .**

**A mis hermanos: Javier, Oscar y Sergio que tanto extraño y a como los quiero condenadotes.**

**A Ruth: Gracias por acompañarme y aguantarme durante y después de la realización de este trabajo.**

**A mi hermana Lace quien falleció durante la realización de este trabajo, siempre te recordaremos.**

## RESUMEN

Se evaluó el crecimiento y el contenido de clorofila *a* en cultivos estáticos de *Thalassiosira pseudonana* producidos con medio *f/2* y fertilizantes agrícolas en luz fluorescente e incandescente. En el cultivo la temperatura promedio en los experimentos fue de 23 y 24°C para los tratamientos bajo luz fluorescente e incandescente respectivamente, salinidad promedio de  $34 \pm 0.5$  ‰. En lo referente al pH esta variable se controló mediante la adición diaria de CO<sub>2</sub> y la irradiancia se fijó en 750  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Muestras diarias fueron tomadas de los cultivos para conocer la densidad celular y el contenido de clorofila *a* durante 7 días. El promedio de densidad celular y divisiones por día tanto en medio *f/2* y como en fertilizantes agrícolas en luz fluorescente e incandescente fueron similares ( $\alpha=0.05$ ). El contenido de clorofila *a* disminuyó durante el transcurso del cultivo y su concentración fue similar para ambos experimentos. En conclusión no existen diferencias en la densidad celular y el contenido de clorofila *a* en ambos medios cultivo con diferentes tipos de luz. Debido al bajo costo del medio con fertilizantes agrícolas y la luz fluorescente se recomienda su uso para el cultivo de *Thalassiosira pseudonana* empleada en la acuicultura.

**REPORTE DE ANOMALIAS**

**CUCBA**

**A LA TESIS:**

**LCUCBA00761**

**Autor:**

**Gonzalez Munoz Jaime Alberto**

**Tipo de Anomalia:**

**Errores de Origen: Indice dice 47 y son 33**

**ÍNDICE**  
**PÁGINA**

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES</b>	<b>5</b>
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>8</b>
<b>IV. HIPÓTESIS</b>	<b>10</b>
<b>V. OBJETIVO</b>	<b>11</b>
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>12</b>
VI.1 Cultivos de microalgas	12
VI. 2 Análisis de clorofila	15
VI. 3 Parámetros poblacionales	16
VI. 4 Análisis estadístico	19
<b>VII. RESULTADOS</b>	<b>20</b>
VII.1 Variables físicos-químicas	20
VII.1.1 Crecimiento a nivel Erlenmeyer	21
VII.1.2 Crecimiento a nivel Fernbach	24
VII.2 Contenido de clorofila <i>a</i>	29
<b>VIII. DISCUSIÓN</b>	<b>32</b>
VIII.1 Generalidades	32
VIII.2 Crecimiento microalgal	34
VIII.3 Contenido de Clorofila <i>a</i>	37
<b>IX. CONCLUSIONES</b>	<b>40</b>
<b>X. RECOMENDACIONES</b>	<b>41</b>
<b>XI. LITERARURA CITADA</b>	<b>42</b>
<b>XII. APENDICES</b>	<b>47</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

	PÁGINA
<b>CUADRO I.</b> Crecimiento promedio de <i>Thalassiosira pseudonana</i> cultivada en volumen de 200 ml en medio f/2 y fertilizantes agrícolas.	23
<b>CUADRO II.</b> Crecimiento promedio de <i>Thalassiosira pseudonana</i> cultivada en volumen de 2.3L con 750 $\mu\text{mol}$ quanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiancia en medio f/2 y fertilizantes agrícolas en luz fluorescente	27
<b>CUADRO III.</b> Crecimiento promedio de <i>Thalassiosira pseudonana</i> cultivada en volumen de 2.3 L con 750 $\mu\text{mol}$ quanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiancia en medio f/2 y fertilizantes agrícolas en luz incandescente	28
<b>CUADRO IV.</b> Concentración promedio de clorofila <i>a</i> por unidad celular $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$ en <i>Thalassiosira pseudonana</i> cultivada en un volumen de 2.3L con 750 $\mu\text{mol}$ quanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiancia en medio f/2 y fertilizantes agrícolas en luz fluorescente.	31
<b>CUADRO V.</b> Concentración promedio de clorofila <i>a</i> por unidad celular $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$ en <i>Thalassiosira pseudonana</i> cultivada en un volumen de 2.3 L con 750 $\mu\text{mol}$ quanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiancia en medio f/2 y fertilizantes agrícolas en luz incandescente.	31
<b>Cuadro VI.</b> Compuestos y concentración de nutrientes para preparar el medio f/2 de Guillard.1975.	46
<b>Cuadro VII.</b> Nombres comerciales de los fertilizantes agrícolas usados para preparar el medio de cultivo y la concentración de nutrientes que se le agregan al agua de mar.	48
<b>Cuadro VIII.</b> Nombres comerciales de los fertilizantes agrícolas usados para preparar el medio de cultivo y la concentración de nutrientes que se le agregan al agua de mar.	49
<b>Cuadro IX.</b> Variables físicas químicas en los cultivos de <i>Thalassiosira pseudonana</i> cultivados en 2.3 L con fertilizantes agrícolas.	49
<b>Cuadro X.</b> Análisis de varianza ANOVA de dos vías con $\alpha=0.05$	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
<b>FIGURA 1.</b> Crecimiento promedio de <i>Thalassiosira pseudonana</i> cultivada en 200 ml de medio f/2 y fertilizantes agrícolas.	22
<b>FIGURA 2.</b> Crecimiento promedio de <i>Thalassiosira pseudonana</i> cultivada en 2.3 L con $750\mu$ mol quanta $m^{-2} s^{-1}$ de irradiancia en medio f/2 y fertilizantes agrícolas con luz fluorescente.	26
<b>FIGURA 3.</b> Crecimiento promedio de <i>Thalassiosira pseudonana</i> cultivada en 2.3 L con $750\mu$ mol quanta $m^{-2} s^{-1}$ de irradiancia en medio f/2 y fertilizantes agrícolas con luz incandescente	26
<b>FIGURA 4.</b> Contenido promedio de clorofila <i>a</i> en <i>Thalassiosira pseudonana</i> cultivada en 2.3 L con $750\mu$ mol quanta $m^{-2} s^{-1}$ de irradiancia en medio f/2 y fertilizantes agrícolas con luz fluorescente.	30
<b>FIGURA 5.</b> Contenido promedio de clorofila <i>a</i> en <i>Thalassiosira pseudonana</i> cultivada en 2.3 L con $750\mu$ mol quanta $m^{-2} s^{-1}$ de irradiancia en medio f/2 y fertilizantes agrícolas con luz incandescente.	30

## I. INTRODUCCIÓN

La microalga marina *Thalassiosira pseudonana* es una diatomea céntrica que pertenece a la división Chrysophyta, clase Bacillariophyceae, es utilizada como fuente esencial de alimento en estadios larvales y postlarvales de moluscos bivalvos marinos (almejas, ostras, conchas de peregrino), así como en estadios larvales de algunos crustáceos como larvas de camarones peneidos (Cotteau y Sorgeloos, 1992).

Para el cultivo intensivo de *T. pseudonana*, las variables que influyen la producción de biomasa y composición bioquímica microalgal son temperatura, intensidad de luz, cantidad de nutrientes y el pH, ya que modifican las funciones metabólicas de las células en cultivo (Sánchez-Saavedra, 1994).

La luz además de su papel primario en el proceso fotosintético, puede actuar modificando los requerimientos nutritivos de las microalgas. Variaciones en la irradiancia suelen estar acompañadas de variaciones en la tasa de crecimiento (Kaplan et al., 1986), volumen celular (Falkowsky y Owens, 1980) y composición bioquímica (Dubinsky et al., 1986).

En las microalgas la influencia en la cantidad de luz (irradiancia) esta íntimamente ligada con la disponibilidad de energía para realizar sus funciones vitales. A bajas irradiancias la tasa de fotosíntesis esta limitada por las reacciones lumínicas de la fotosíntesis, esto es por las reacciones fotoquímicas que implican el número de quanta disponibles y la capacidad de las células para utilizar esta energía (Richmond, 1986).

La temperatura es otra variable importante que no solo afecta al crecimiento, sino también al metabolismo y la composición bioquímica de la microalgas. Existe una estrecha relación entre luz y temperatura, ya que en mayores temperaturas las microalgas toleran altas irradiancias que en temperaturas bajas (Lee et al., 1985).

Para un crecimiento óptimo, deben suministrarse al cultivo nutrientes en cantidades adecuadas, debido a que hay una gran variación entre los requerimientos nutritivos entre las especies y dentro de cada especie varían en forma distinta. el crecimiento y la incorporación de nutrientes no siguen una relación simple, dependen de factores tales como las concentraciones internas y externas o las tasas de difusión, a causa de la variabilidad de estos factores, las concentraciones de nutrientes y el desarrollo microalgal han variado considerablemente, por lo tanto el origen y la concentración de nutrientes en el medio de

cultivo, influyen directamente en el crecimiento, composición celular, el contenido de clorofila así como en el rendimiento final (Valenzuela-Espinoza, 1997).

El pH es uno de los factores importantes en el cultivo permeables microalgal, las membranas de las células microalgales no son a los iones hidrógeno e hidroxilo, por lo tanto las concentraciones de hidrogeniones intracelular y extracelular no están equilibradas y existe un gradiente de concentración de hidrogeniones a través de la membrana, las microalgas muestran una clara dependencia al pH del medio de cultivo, cada especie de microalga presente un pH óptimo (7 y 8) (Richmond, 1986). El pH del medio de cultivo determina la solubilidad del CO<sub>2</sub> y de los minerales, así como la distribución relativa de las formas inorgánicas de carbono, e influye directa e indirectamente en el metabolismo de las microalgas (Fabregas et al., 1993).

La interacción entre luz y temperatura es marcada. para cada temperatura existe una irradiancia específica a la cual se alcanza la tasa máxima de fotosíntesis, en temperaturas bajas la saturación lumínica ocurre en irradiancias bajas (Collins y Boyen, 1982).

De todos los factores que controlan el crecimiento de las microalgas en el medio natural la luz y la temperatura son los que experimentan mayores variaciones, tanto diarias como estacionarias, puesto que la luz penetra de manera diferente en la columna de agua, por lo tanto, el éxito ecológico de cada especie dependerá de su habilidad para condicionarse a los cambios en el ambiente donde se desarrolle (Regan y Ivancic, 1984).

Un factor importante en el cultivo masivo de microalgas son las variaciones que hay en el tiempo requerido para adaptarse a una nueva intensidad de luz (irradiancia), algunas especies tienen poca capacidad para responder a cambios en la irradiancia y mueren rápidamente al exponerse a cambios pequeños a esta, dichas especies no son adecuadas para cultivos masivos exteriores donde la exposición a la luz aumenta después del cosechado (Richmond, 1986), la manipulación de las diferentes variables de importancia en el crecimiento de las microalgas tendrán como resultado la producción de microalgas con características bioquímicas y nutricionales bien definidas.

## II. ANTECEDENTES

En la actualidad el creciente interés en el cultivo de larvas y juveniles de invertebrados marinos de importancia comercial, han centrado su atención en reducir los altos costos de producción de microalgas y la simplificación de los sistemas de cultivo para la producción (Brown et al., 1997).

En años se han realizado diferentes investigaciones a cerca del cultivo de microalgas mediante el uso de medios preparados con fertilizantes agrícolas de bajo costo. (López-Elías y Voltolina, 1993; Bustillos-Hurtado y López Elías, 1994; Valenzuela-Espinoza et al., 1999; Simental-Trinidad et al., 2001), estas investigaciones concluyen que la producción de biomasa y la composición bioquímica es similar en diferentes especies de microalgas, cultivadas en un medio con fertilizantes agrícolas y en medio f/2, además indican que el uso del medio con fertilizantes agrícolas tienen un costo de elaboración alrededor de un 30% menor, que aquellas cultivadas en medio f/2.

Aunque las investigaciones citadas hacen referencia a la disminución de costos de elaboración de los medios de cultivo, sólo consideran la producción de biomasa como la variable de respuesta a las distintas fuentes de nutrientes. Sin embargo, otro de los factores importantes que puede modificar el crecimiento, composición celular y el contenido de pigmentos fotosintéticos es la irradiancia.

La cantidad de clorofila celular, es uno de los constituyentes, que indican el estado fisiológico de las células, y su respuesta bajo distintas irradiancias y condiciones de nutrientes puede variar significativamente durante el desarrollo del cultivo.

Trabajos recientes sobre cultivos en laboratorio, en diferentes especies de microalgas bajo distintas condiciones de luz, han sido llevados a cabo, por Sánchez-Saavedra (1994); Sánchez-Saavedra y Voltolina (1994); quienes encuentran cambios importantes en la composición bioquímica y el contenido de clorofila *a* de *Chaetoceros sp.*

Por otra parte, Correa-Reyes et al. (2001) estudió el crecimiento de ocho especies de diatomeas bentónicas bajo condiciones de luz azul y blanca, entre sus resultados no encontró efecto en la producción de biomasa y la composición bioquímica.

Otros trabajos se han centrado en el estudio de cambios importantes en la razón carbono-nitrógeno y el contenido de pigmentos fotosintéticos, variando la irradiancia, temperatura y disponibilidad de nutrientes (Thompson et al., 1993; Strzepek y Price, 2002; Berges et al., 2002; Staehr et al., 2002).

Aunque los estudios antes mencionados han encontrado que tanto la luz como los nutrientes modifican los componentes celulares, todavía existen preguntas esenciales, en relación al efecto que podría tener la alta irradiancia en el contenido de clorofila *a* y la producción de biomasa de *T. pseudonana*.

### III. JUSTIFICACIÓN

Los estudios antes citados, hacen referencia al uso de nutrientes económicos y la luz como factor que modifica el crecimiento algal en sistemas de cultivo, de manera similar en distintos laboratorios desarrollan cultivos con irradiancias que no aseguran el crecimiento óptimo de las especies en cultivo, utilizadas comúnmente como alimento en la acuicultura.

Por lo que, es importante realizar estudios, especialmente aquellos relacionados con aspectos nutricionales relevantes para la acuicultura, que tomen en cuenta el uso de altas irradiancias ( $750 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), para el cultivo de microalgas y el efecto en el contenido de pigmentos fotosintéticos, los cuales indican la calidad de la biomasa celular en cultivo.

Es por este motivo, es necesario conocer la densidad celular de *T. pseudonana* y los cambios en el contenido de clorofila *a* en cultivos estáticos a altas irradiancias, debido a que el efecto de la luz está íntimamente ligado con la producción de pigmentos, y variaciones importantes en la composición celular, tendrán efectos significativos en la calidad y cantidad de biomasa, la cual es fundamental para el desarrollo, crecimiento y sobrevivencia de organismos en acuicultura.

Con los resultados de este trabajo, se tendrá conocimiento a cerca del cultivo de *T. pseudonana* y del efecto de la luz en cultivos que se promueven al interior y exterior de laboratorios que se dedican a la producción de microalgas, las cuales son destinadas para la alimentación de invertebrados marinos de importancia comercial.

#### IV. HIPÓTESIS

IV.1. ¿Los fertilizantes agrícolas servirán como fuente de nutrientes para el cultivo de *Thalassiosira pseudonana* de igual forma que los nutrientes grado reactivo?

IV.2. ¿Habrá cambios en el contenido de clorofila *a* en *Thalassiosira pseudonana* al cultivarla con diferentes fuentes de nutrientes y distintos tipos de luz?

## V. OBJETIVO

V.1 Comparar el crecimiento y contenido de clorofila *a* en cultivos estáticos de *Thalassiosira pseudonana* cultivada en medio f/2 y fertilizantes agrícolas en luz fluorescente e incandescente.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### VI.1. Cultivo de microalgas

La microalga marina *Thalassiosira pseudonana*, empleada para este estudio fue adquirida de la colección de cultivos unialgales que se encuentran en el laboratorio de producción de microalgas del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California.

Los cultivos experimentales se realizaron en un cuarto con temperatura controlada a  $19 \pm 1$  °C mediante un sistema de aire acondicionado marca Carrier. El agua de mar utilizada para la preparación de los medios se trató mediante filtros cuno de  $1 \mu\text{m}$  y se irradió con lámparas de luz ultravioleta de 25 W. En lo referente al pH esta variable se controló mediante la adición diaria de  $\text{CO}_2$ .

Los nutrientes se prepararon de acuerdo al procedimiento descrito por Guillard (1975) para el medio f/2 y para la preparación de los fertilizantes se realizó en base a la formulación descrita por Valenzuela-Espinoza et al. (1999). De cada uno de los nutrientes se usó 1 ml para preparar un litro de medio de cultivo.

El cultivo de *Thalassiosira pseudonana* se efectuó en dos niveles escalonados entre sí. el primer nivel de cultivo fue en matraces Erlenmeyer, los cuales se prepararon por duplicado con 200 ml de medio basado en fertilizantes agrícolas y medio f/2 de Guillard (1975). Este material se esterilizó en autoclave a una temperatura de 121 °C.  $1.05 \text{ kg cm}^{-2}$  de presión durante 15 minutos, una vez esterilizados se trasladaron al cuarto de cultivo para su enfriamiento, posteriormente en una atmósfera aséptica generada por dos mecheros de alta temperatura, cada Erlenmeyer recibió cinco mililitros de *Thalassiosira pseudonana* usando para ello un pipeteador tipo eppendorf calibrado, el tiempo de cultivo en este nivel fue de cinco días con iluminación continua proporcionada por lámparas fluorescentes (Sylvania de 75 watts), suministrando una irradiancia de  $132 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . la cual se midió con un irradiómetro PAR modelo QSL-100 Biospherical Instruments Inc.  $4\pi$ .

Los cultivos obtenidos en Erlenmeyer fueron usados para continuar el siguiente nivel de cultivo en Fernbach, los cuales fueron preparados por duplicado, cada uno con 2.3 L de medio constituido por fertilizantes agrícolas y medio f/2 de Guillard (1975), se esterilizaron en autoclave a 121 °C,  $1.05 \text{ kg cm}^{-2}$  de presión durante 15 minutos, después. cada Fernbach recibió 200 ml de inóculo en condiciones asépticas, el tiempo de cultivo fue de

siete días con iluminación continua proporcionada por 8 lámparas fluorescentes de 75 watts y 3 lámparas incandescentes de 500 watts que suministraron una irradiancia de  $750 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , la cual se midió con un irradiómetro PAR modelo QSL-100 Biospherical Instruments Inc.  $4\pi$ .

En cada nivel de cultivo, muestras de 1 ml fueron cuantificadas cada día en un contador de partículas Beckman Coulter Multisizer 3 para conocer la densidad celular.

## **VI.2. Análisis de Clorofila *a***

La extracción de clorofila *a* se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Parson et al. (1985), se filtró un volumen diario de 10 ml de cultivo de cada unidad experimental, mediante filtros de fibra de vidrio GF/F de  $0.7 \mu\text{m}$  y 25 mm de diámetro, los cuales fueron envueltos en aluminio, etiquetados y almacenados en un contenedor con nitrógeno líquido, después el filtro que contenía la muestra, se colocó en un tubo para centrifuga tipo falcón, se le adicionó 10 ml de acetona al 90% previamente preparada.

La extracción de clorofila *a* se llevó a cabo en refrigeración a  $4^\circ\text{C}$  y en oscuridad por 24 horas. al termino de este tiempo, se homogenizaron las muestras con la ayuda de un agitador vortex y se centrifugaron a  $1190 \times g$  durante 10 minutos. el extracto clorofilico fue leído a longitudes de onda de 750, 665, 645 y 630 en un espectrofotómetro (Beckman Coulter Dv 530, Life Science uv/vis Spectrophotometer).

Para conocer la concentración de clorofila *a* se utilizaron las ecuaciones tricromáticas propuestas por Millán-Núñez y Álvarez-Borrego (1978).

### VI.3. Parámetros poblacionales

De los resultados obtenidos del número de células por ml se calculó la tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ) de cada condición de cultivo mediante las ecuaciones descritas por Guillard (1975).

$$\mu = \frac{\ln(N_2) - \ln(N_1)}{t_2 - t_1}$$

**Donde:**

$\mu$  = Tasa de crecimiento específica en días.

$N_1$  = Es el número de células al tiempo  $t_1$ .

$N_2$  = Es el número de células al tiempo  $t_2$ .

$t_1$  y  $t_2$  = Son el tiempo inicial y final en días.

Para convertir la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) calculada con la expresión anterior, a número de divisiones por día, se divide entre el logaritmo natural de 2.

$$D = \frac{\mu}{\ln(2)} = \frac{\mu}{0.693}$$

**Donde:**

$D$  = Número de divisiones por día.

$\mu$  = Tasa de crecimiento específica.

El **tiempo de duplicación (TD)** es el valor recíproco del número de divisiones por día y se calcula como sigue:

$$TD = \frac{1}{D}$$

**Donde:**

$TD$  = Tiempo de duplicación en días.

$D$  = Divisiones por día.

La **producción diaria (PD)** se calculó en base a la diferencia del número de células producidas entre el tiempo  $t_1$  y el tiempo  $t_2$ .

$$PD = \frac{(C_2 - C_1)}{(t_2 - t_1)}$$

**Donde:**

$C_2$  = Son concentración de células al tiempo  $t_2$ .

$C_1$  = Son concentración de células al tiempo  $t_1$ .

$t_1$  y  $t_2$  = Son el tiempo inicial y final en días.

El **valor porcentual (PV)**, se calculó en base a la variación de la concentración de células por unidad de tiempo.

$$PV = \frac{100 (C_2 - C_1)}{C_1 (t_2 - t_1)}$$

**Donde:**

$C_2$  = Son concentración de células al tiempo  $t_2$ .

$C_1$  = Son concentración de células al tiempo  $t_1$ .

$t_1$  y  $t_2$  = Son el tiempo inicial y final en días.

#### **VI.4 Análisis estadístico**

Se realizó previamente una prueba de normalidad con el objeto de determinar si correspondían o no a la distribución normal.

Como todos los datos tuvieron una distribución normal, se llevo a cabo el análisis paramétrico de ANOVA de dos vías y se realizó con el objeto de determinar diferencias entre tratamientos, el análisis se realizó con el paquete estadístico SPSS con  $\alpha = 0.05$ .

## VII. RESULTADOS

### VII.1. Variables físico-químicas

Las condiciones físico-químicas en que se desarrollaron los cultivos estáticos de *Thalassiosira pseudonana* fueron los siguientes: temperatura promedio de  $22 \pm 1$  °C, salinidad promedio de  $34 \pm 0.5$  ‰, el pH inicial de los cultivos fue de 8.1 y al final del experimento se registraron unidades de pH de 8.2 para el f/2 y de 8.0 para el medio con fertilizantes agrícolas. (Cuadros X y XI).

Debido a que el CO<sub>2</sub> actúa como un amortiguador del pH y es fuente de carbono asimilable por las microalgas, durante el desarrollo del experimento se le adicionó diariamente en intervalos de 10 a 15 segundos.

#### VII.1.1. Crecimiento a nivel Erlenmeyer (cepa)

Bajo las condiciones descritas anteriormente, el crecimiento promedio de *T. pseudonana* en cultivo de 200 ml se muestra en la figura 1, donde el crecimiento en ambos medios (f/2 y fertilizantes agrícolas) inician con una densidad celular promedio de  $7.84 \times 10^4$  células ml<sup>-1</sup>, en las primeras 24 horas. se observó una fase lag o de retardo, donde no hubo un incremento significativo en la biomasa celular (Cuadro I A-B). A partir de este período (día 1) inician su fase de crecimiento exponencial, la máxima densidad celular se presentó al quinto día de cultivo (Cuadro I A-B) con  $2.24 \times 10^6$  células ml<sup>-1</sup> y  $2.31 \times 10^6$  células ml<sup>-1</sup> para el medio f/2 y los fertilizantes agrícolas respectivamente. la tasa de crecimiento promedio ( $\mu$ ) para ambos cultivos fue de 0.74 y 0.67 con 0.97 divisiones por día.

La máxima producción diaria (PD) se obtuvo al segundo día tanto en el medio f/2 como en el cultivo con fertilizantes agrícolas.

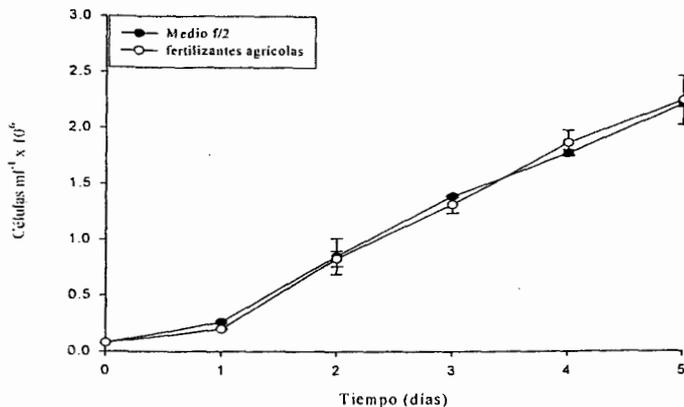


Figura 1. Crecimiento promedio de *Thalassiosira pseudonana* cultivada en 200 ml de medio f/2 y fertilizantes agrícolas. La barra vertical indica el error estándar. (n=2).

Cuadro. 1. Crecimiento promedio de *Thalassiosira pseudonana* cultivada en 200 ml con medio f/2 (A) y fertilizantes agrícolas (B).

A

Tiempo (días)	Concentración (cél/ml)	( $\mu$ ) (días)	(TD) (días)	(D) (div.día <sup>-1</sup> )	(PD) (cél/ml)	(VP) %
0	78 420	-	-	-	-	-
1	261 625	1.21	0.57	1.77	183 205	233.62
2	1 000 425	1.34	0.51	1.93	738 800	282.38
3	1 403 775	0.34	2.04	0.49	403 350	40.31
4	1 773 800	0.23	3.03	0.33	370 025	26.35
5	2 242 700	0.24	2.94	0.34	468 900	26.43
	<b>PROMEDIO</b>	<b>0.74</b>	<b>1.81</b>	<b>0.97</b>		

B

Tiempo (días)	Concentración (cél/ml)	( $\mu$ ) (días)	(TD) (días)	(D) (div.día <sup>-1</sup> )	(PD) (cél/ml)	(VP) %
0	78 420	-	-	-	-	-
1	199 450	0.94	0.74	1.35	121 030	154.33
2	828 350	1.42	0.49	2.04	628 900	315.31
3	1 316 425	0.47	1.49	0.67	488 075	58.92
4	1 868 050	0.35	2.00	0.50	551 625	41.90
5	2 312 300	0.21	3.33	0.30	444 250	23.78
	<b>PROMEDIO</b>	<b>0.67</b>	<b>1.61</b>	<b>0.97</b>		

$\mu$ = Tasa de crecimiento específica en días.

TD= Tiempo de duplicación. D= Divisiones por día.

PD= Producción diaria. VP= Valor Porcentual.

### VII.1.2 Crecimiento a nivel Fernbach

La producción de biomasa que se obtuvo en 2.3 L de cultivo en condiciones de luz fluorescente e incandescente se presentan en las figuras 2 y 3; cuadros II y III. los cultivos iniciaron con densidades celulares diferentes:  $1.96-1.93 \times 10^5$  y  $2.06-1.95 \times 10^5$  células  $\text{ml}^{-1}$  para medio f/2 y fertilizantes agrícolas en condiciones de luz fluorescente e incandescente, respectivamente.

Los cultivos de ambos tratamientos experimentales presentaron una fase de retardo de 24 horas, después de este tiempo se observó un incremento progresivo en su densidad celular que corresponde a la fase de crecimiento exponencial, la cual tuvo una duración de tres días.

Al séptimo día de cultivo la densidad celular (cuadros II y III), varió de  $5.66-6.07 \times 10^6$  células  $\text{ml}^{-1}$  y de  $4.70-4.73 \times 10^6$  células  $\text{ml}^{-1}$  para los cultivos con medio f/2 y fertilizantes agrícolas en luz fluorescente e incandescente, respectivamente.

En ambos tratamientos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con un  $\alpha = 0.05$ . (Apéndice 12.3).

Los parámetros poblacionales promedio fueron similares entre las dos condiciones de luz, la tasa de crecimiento promedio ( $\mu$ ) fue 0.46-0.49 y 0.44-0.45 con (D) divisiones por día 0.67-0.70 y 0.63-0.65 para el medio f/2 y fertilizantes agrícolas respectivamente.

La producción diaria (PD), presenta mayores variaciones en los cultivos con medio f/2 en comparación con aquellos realizados en fertilizantes agrícolas. (Cuadros II y III).

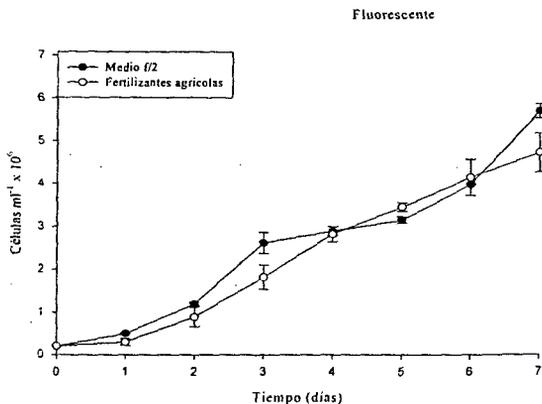


Figura 2. Crecimiento promedio de *Thalassiosira pseudonana* cultivada en 2.3 L con 750  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de irradiación en medio f/2 y fertilizantes agrícolas, con luz fluorescente. La barra vertical indica el error estándar (n=2.).

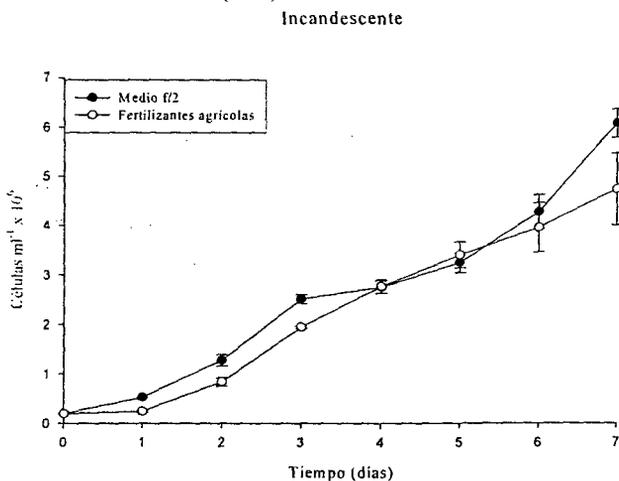


Figura 3. Crecimiento promedio de *Thalassiosira pseudonana* cultivada en 2.3 L con 750  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de irradiación en medio f/2 y fertilizantes agrícolas, con luz incandescente. La barra vertical indica el error estándar (n=2.).

Cuadro. II Crecimiento promedio de *Thalassiosira pseudonana* cultivada en 2.3 L con 750  $\mu\text{mol}$  quanta  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de irradiación en medio f/2 (A) y fertilizantes agrícolas (B). En luz fluorescente.

A

Tiempo (días)	Concentración (cél/ml)	( $\mu$ ) (días)	(TD) (días)	(D) (div.día <sup>-1</sup> )	(PD) (cél/ml)	(VP) %
0	196 169	-	-	-	-	-
1	501 700	0.94	0.74	1.35	305 531	155.74
2	1 195 550	0.87	0.80	1.18	693 850	138.29
3	2 619 600	0.78	0.89	1.12	1 424 050	119.11
4	2 885 400	0.01	7.14	0.14	265 800	10.14
5	3 144 050	0.09	8.33	0.12	258 650	8.96
6	3 978 700	0.23	3.03	0.33	834 650	26.54
7	5 665 450	0.35	2.00	0.50	1 686 750	42.39
	<b>PROMEDIO</b>	<b>0.46</b>	<b>3.27</b>	<b>0.67</b>		

B

Tiempo (días)	Concentración (cél/ml)	( $\mu$ ) (días)	(TD) (días)	(D) (div.día <sup>-1</sup> )	(PD) (cél/ml)	(VP) %
0	206 152	-	-	-	-	-
1	300 450	0.38	1.85	0.54	94 298	45.74
2	890 350	1.08	0.64	1.55	589 900	196.33
3	1 817 750	0.72	0.97	1.03	927 400	104.16
4	2 817 750	0.44	1.58	0.63	999 500	54.98
5	3 452 050	0.20	3.57	0.28	634 800	22.53
6	4 144 500	0.18	4.00	0.25	692 450	20.05
7	4 702 450	0.13	5.55	0.18	557 950	13.46
	<b>PROMEDIO</b>	<b>0.44</b>	<b>2.59</b>	<b>0.63</b>		

Cuadro. III Crecimiento promedio de *Thalassiosira pseudonana* cultivada en 2.3 L con 750  $\mu\text{mol}$  quanta  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de irradiación en medio f/2 (A) y fertilizantes agrícolas (B). En luz Incandescente.

## A

Tiempo (días)	Concentración (cél/ml)	( $\mu$ ) (días)	(TD) (días)	(D) (div.día <sup>-1</sup> )	(PD) (cél/ml)	(VP) %
0	193 864	-	-	-	-	-
1	528 000	1.00	0.69	1.44	334 136	172.35
2	1 278 250	0.89	0.78	1.28	750 050	142.09
3	2 513 000	0.67	1.04	0.96	1 234 750	96.59
4	2 753 650	0.09	8.33	0.12	240 650	9.57
5	3 248 050	0.17	4.16	0.24	494 400	17.95
6	4 271 850	0.27	2.63	0.38	1 023 800	31.52
7	6 072 300	0.35	2.00	0.50	1 800 450	42.14
	<b>PROMEDIO</b>	<b>0.49</b>	<b>2.80</b>	<b>0.70</b>		

## B

Tiempo (días)	Concentración (cél/ml)	( $\mu$ ) (días)	(TD) (días)	(D) (div.día <sup>-1</sup> )	(PD) (cél/ml)	(VP) %
0	195 986	-	-	-	-	-
1	242 950	0.22	3.22	0.31	46 964	23.96
2	841 150	1.24	0.56	1.78	598 200	246.22
3	1 947 800	0.84	0.82	1.21	1 106 650	131.56
4	2 764 950	0.35	2.00	0.50	817 150	41.95
5	3 405 550	0.21	3.33	0.30	640 600	23.16
6	3 957 350	0.15	4.76	0.21	551 800	16.20
7	4 734 800	0.18	4.00	0.25	777 450	19.64
	<b>PROMEDIO</b>	<b>0.45</b>	<b>2.67</b>	<b>0.65</b>		

## VII.2 Contenido de Clorofila *a*

El contenido de clorofila *a* por célula se muestra en las figuras 4, 5 y cuadros IV y V, durante el período de cultivo, la concentración de clorofila *a* varió de 0.029 pg cél<sup>-1</sup> hasta 0.008 pg cél<sup>-1</sup> en el medio f/2 , mientras que en el cultivo con fertilizantes agrícolas presentó valores de 0.034 pg cél<sup>-1</sup> a 0.007 pg cél<sup>-1</sup>.

Los resultados del análisis al inicio del experimento indican que la mayor concentración de este pigmento (0.029- 0.034 pg cél<sup>-1</sup>) en el cultivo tanto en medio f/2 y fertilizantes agrícolas se presentaron al primer día de cultivo, a partir de este día y durante el resto del cultivo, el contenido de clorofila *a* disminuyó conforme aumentó la densidad celular, hasta llegar a valores mínimos de 0.008 pg cél<sup>-1</sup> y 0.007 pg cél<sup>-1</sup> al séptimo día de cultivo tanto en medio f/2 y fertilizantes agrícolas.

En general se observó que en ambos tratamientos (medio f/2 y fertilizantes agrícolas) el contenido de clorofila *a* disminuyó notablemente al inicio de la fase exponencial. Posteriormente, la disminución de este pigmento fue de manera gradual hasta obtenerse los valores mínimos en el último día de cultivo (Figuras 4,5 y cuadros IV y V).

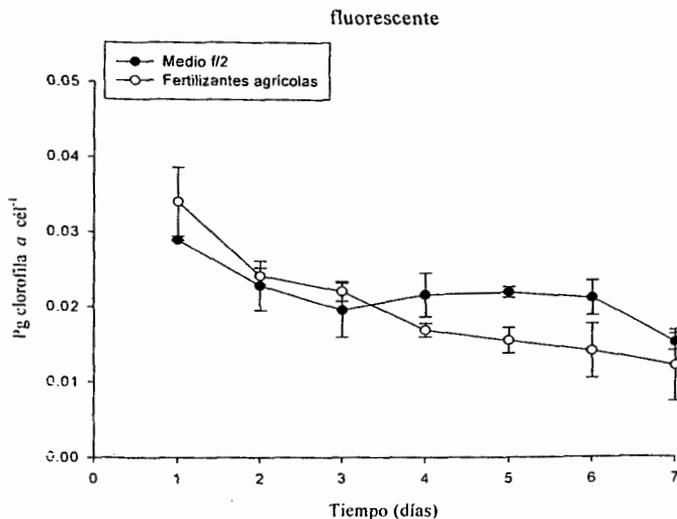


Figura 4. Contenido promedio de clorofila *a* en *Thalassiosira pseudonana* cultivada en 2.3 L con  $750 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de irradiancia en medio f/2 y fertilizantes agrícolas, con luz fluorescente. La barra vertical indica el error estándar. (n=2).

Cuadro. IV Concentración promedio de clorofila *a* por unidad celular  $\text{pg cél}^{-1}$  en *Thalassiosira pseudonana* cultivada en volumen de 2.3 L con  $750 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de irradiancia con medio f/2 y fertilizantes agrícolas. en luz fluorescente.

Tiempo (días)	Medio f/2	Fertilizantes agrícolas		
	Concentración cél/ml	Clorofila <i>a</i> (pg cél <sup>-1</sup> )	Concentración cél/ml	Clorofila <i>a</i> (pg cél <sup>-1</sup> )
1	501 700	0.029	300 450	0.034
2	1 195 550	0.022	890 350	0.024
3	2 619 600	0.019	1 817 750	0.022
4	2 885 400	0.021	2 817 750	0.016
5	3 144 050	0.021	3 452 050	0.007
6	3 978 700	0.021	4 144 500	0.014
7	5 665 450	0.015	4 702 450	0.012

## Incandescente

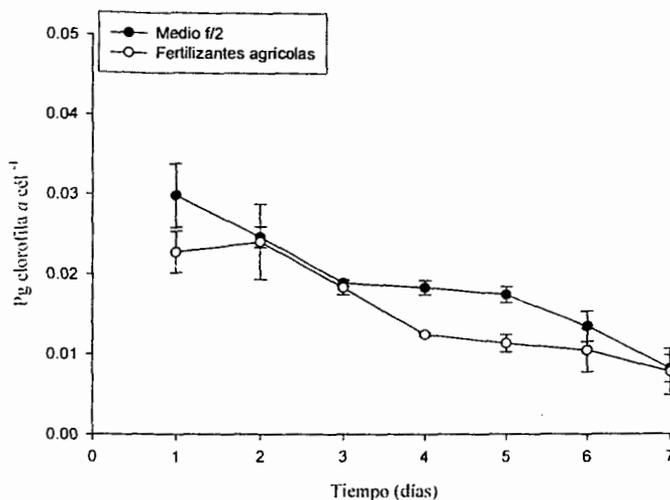


Figura 5. Contenido promedio de clorofila *a* en *Thalassiosira pseudonana* cultivada en 2.3 L con 750  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de irradiancia en medio f/2 y fertilizantes agrícolas, con luz incandescente. La barra vertical indica el error estándar. (n=2).

Cuadro. V Concentración promedio de clorofila *a* por unidad celular  $\text{pg cél}^{-1}$  en *Thalassiosira pseudonana* cultivada en volumen de 2.3 L con 750  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de irradiancia con medio f/2 y fertilizantes agrícolas en luz incandescente.

Tiempo (días)	Medio f/2	Fertilizantes agrícolas		
	Concentración cél/ml	Clorofila <i>a</i> (pg cél <sup>-1</sup> )	Concentración cél/ml	Clorofila <i>a</i> (pg cél <sup>-1</sup> )
1	528 000	0.029	242 950	0.022
2	1 278 250	0.024	841 150	0.024
3	2 513 000	0.018	1 947 800	0.018
4	2 753 650	0.018	2 764 950	0.012
5	3 248 050	0.017	3 405 550	0.008
6	4 271 850	0.013	3 957 350	0.008
7	6 072 300	0.008	4 734 800	0.007

## VIII. DISCUSIÓN

### VIII.1. Generalidades

Las principales variables que influyen en el cultivo y crecimiento de *Thalassiosira pseudonana* son temperatura, luz, cantidad y calidad de nutrientes, salinidad y pH.

Durante el desarrollo del presente trabajo la temperatura promedio en los experimentos fue de 23 y 24°C para luz fluorescente e incandescente respectivamente, estos valores están dentro del intervalo de temperaturas promedio (21°-24.5°), que han sido reportadas como óptimo para el cultivo de especies de este genero (Strzepek y Price, 2000; Berges et al., 2000), por lo cual se considera que la temperatura no tuvo una influencia directa en el cultivo de *T. pseudonana*, en las condiciones antes mencionadas.

De la misma manera, la salinidad se mantuvo en 34 ‰ y el pH en el intervalo óptimo (7.7-8.4) que ha sido reportado para el cultivo de especies de este genero (Thompson et al., 1993; Strzepek y Price, 2002; Berges et al., 2002; Staehr et al., 2002), el pH se controló mediante la adición diaria de CO<sub>2</sub>.

La adición de CO<sub>2</sub>, actúa como fuente de carbono inorgánico y actúa como tampón en las variaciones de pH. Conforme aumenta la densidad celular, se incrementa la actividad fotosintética, lo que origina un aumento en el consumo de carbono inorgánico y a su vez hay un incremento en el pH del medio de cultivo, estos cambios en la concentración de CO<sub>2</sub> afecta la actividad fotosintética y disminuye la producción celular del cultivo (Laing y Ayala, 1990).

## VIII.2 Crecimiento microalgal

Al inicio ambos cultivos, presentan una fase lag o de retardo, la cual puede deberse a que, las células con las que se inoculó pierden actividad enzimática y hasta que los procesos enzimáticos no se activan, el crecimiento no toma lugar por lo cual probablemente la progenie de dichas células no fue capaz de dividirse hasta alcanzar un número comparable con la del inóculo, es decir, esta fase de retardo, es cuando la mayoría de las células inoculadas son viables, pero no están en condiciones para dividirse inmediatamente, especialmente si provienen de un cultivo viejo, donde los procesos enzimáticos pueden estar inactivados. además la concentración de metabolitos disminuyen a niveles insuficientes para la división celular, esta fase de acondicionamiento es necesaria antes de que se inicie el crecimiento ( Foog y Take, 1987).

En cultivos estáticos, el aumento en el número de células de *Thalassiosira pseudonana* sigue un patrón característico, en el cual se observan diferentes fases con relación al tiempo y condiciones de cultivo. En el presente trabajo al comparar el crecimiento de los cultivos entre los medios (fertilizantes agrícolas y medio f/2). con dos tipos de luz en volumen de 150 ml (Erlenmeyer) y 2.3 L (Fernbach) se encontró que no existen diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) (Apéndice 12.3) en la densidad celular. Observaciones similares en el ciclo de crecimiento han sido reportadas en cultivos de *Rhodomonas* sp por Lafarga de la Cruz (2000) y en diatomeas bentónicas reportadas por Rojo-Salazar (2002), en donde a pesar de que el inóculo provenía con las mismas condiciones de cultivo presentó una fase de retardo durante las primeras 48 horas, seguido de una fase de crecimiento exponencial, en la cual se observó que las células se duplican sucesivamente en intervalos iguales de tiempo, debido a que los factores ambientales y los nutrientes disueltos en el medio eran óptimos, es en esta fase de crecimiento exponencial donde se registraron las mayores tasas de crecimiento ( $\mu$ ) así como las mayores divisiones por día (D) (Cuadro 2 y 3).

Las divisiones por día (D) presentan valores similares en cultivos con medio f/2 y fertilizantes agrícolas en ambas condiciones de luz (Cuadro 2 y 3). No obstante, estos valores son superiores a los obtenidos por Strzepek y Price (2000), quienes reportan valores entre 0.7 y 1.65 divisiones por día (D) para *Thalassiosira weissflogii* con irradiancias de 6 a 150  $\mu$  mol photon  $m^{-2}s^{-1}$ , así mismo Milligan y Harrison (2000) encuentran valores de

divisiones por día (D) de 0.47 y 0.85 en *Thalassiosira weissflogii* bajo condiciones de irradiancia de  $150 \mu \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

En contraste, Thompson et al. (1990) obtienen resultados superiores solo en la condición de  $225 \mu \text{ E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , de irradiancia con divisiones por día de 0.39 y 1.84 en *Thalassiosira pseudonana*.

En general se observó, que las fases de crecimiento de *Thalassiosira pseudonana* coinciden en tiempo, obteniendo concentraciones celulares similares durante los siete días de cultivo (figuras 1, 2 y 3), siendo sus tasas de crecimiento promedio ( $\mu$ ) y divisiones por día (D) similares en ambos tratamientos. (Cuadro I A-B; cuadro II A-B; cuadro III A-B).

Las diferencias en el crecimiento, pueden estar relacionadas con características propias de la especie, así como su composición pigmentaria, debido a que el contenido y composición de los pigmentos accesorios influyen en la capacidad de captación de energía luminosa en un determinado intervalo de longitudes de onda.

### VIII.3. Contenido de clorofila *a*

La concentración total de pigmentos puede ser modificada por variables ambientales como la irradiancia, la longitud de onda de la luz y la concentración de nitrógeno, (Kirk, 1994). En el presente estudio, ambos tratamientos (medio f/2 y fertilizantes agrícolas) sometidos a altas irradiancias presentan los valores máximos de clorofila *a* 0.029 y 0.034  $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$  al primer día de cultivo, a partir de este momento y durante el resto del cultivo el contenido de este pigmento disminuyó (Cuadro IV y V).

La tendencia a disminuir el contenido de clorofila *a* puede ser explicado debido a que, en altas irradiancias los cloroplastos reducen su tamaño y su sistema de transferencia de electrones se ve saturado, la energía ya no es transferida lo que genera una disminución en el número de tilacoides por cloroplasto, por consiguiente se modifica la concentración de clorofila.

La reducción en el contenido de los pigmentos celulares, se considera un proceso de regulación del aparato fotosintético para obtener un balance entre la ganancia de luz y la demanda de energía necesaria para mantener el crecimiento algal (Kirk, 1994).

La reducción en el contenido de clorofila *a* debido a altas irradiancias ha sido descrita para otras especies de fitoplancton marino (Claustre y Gostan, 1987; López-Muñoz et al., 1992).

Los resultados en el contenido de clorofila *a*, de *Thalassiosira pseudonana*, con una irradiancia de  $750 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  obtenidos en el presente estudio tanto con medio f/2 y fertilizantes agrícolas (Cuadro IV y V), son inferiores a las registrados por Claustre y Gostan (1987) quienes cultivaron *Hymenomonas elongata* e *Isochrysis galbana* bajo  $400 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y obtienen  $2.95 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$  y  $3.28 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$ . Thompson et al. (1990) encuentra para *Chaetoceros calcitrans*  $5.96 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$ , *C. gracilis*  $4.90 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$ , *Isochrysis galbana*  $3.28 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$ , *Phaeodactylum tricorutum*  $3.15 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$ , *Pavlova lutheri*  $3.43 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$  y *Thalassiosira pseudonana*  $6.24 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$  bajo irradiancias de  $225 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Por su parte, Sánchez Saavedra y Voltolina (1994) reportan para *Chaetoceros sp.*  $0.047 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$  en irradiancias de  $565 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Del análisis de la información antes expuesta, es claro observar que diferentes especies en distintas condiciones de luz, tiene distinta concentración de clorofila *a*, pero también es cierto, que estas especies cultivadas en altas irradiancias tiene bajo contenido de clorofila *a*.

Por lo cual se debe de tener en cuenta que además de las diferencias entre las especies, la respuesta fisiológica de una misma especie puede ser modificada por la composición química del medio y el nivel de la irradiancia empleada.

## IX. CONCLUSIONES

La biomasa microalgal obtenida en el medio constituido por fertilizantes agrícolas es similar a la producida en medio *f/2* en ambas condiciones de luz para el mismo período de cultivo.

El contenido de clorofila *a* en el cultivo basado en fertilizantes agrícolas es similar al obtenido en medio *f/2* en ambas condiciones de luz para el mismo período de cultivo.

El costo de producción se reduce al utilizar el medio con fertilizantes agrícolas.

Los cultivos de *T. pseudonana* no presentaron fotoinhibición al ser expuestos a altas irradiancias

## X. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar estudios en los cuales se analice la composición proximal de *T. pseudonana* para determinar si su valor nutricional varía significativamente en altas irradiancias.

Se recomienda realizar análisis de nutrientes para conocer si un aumento en la irradiancia no disminuye la tasa reconsumo de nutrientes en *T. pseudonana*.

## XI. LITERATURA CITADA

- Berges. John., D. Varela. and P. Harrison. 2000. Effects of temperature on growth rate, cell composition and nitrogen metabolism in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae). *Marine Ecol. Prog. Ser.* Vol. 225: 139-146.
- Brown. M. R., S. W. Jeffrey, J. K. Volkman and G. A. Duntans. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151: 315-331.
- Bustillos-Hurtado, C.A. y J. A. López-Eliás. 1994. Composición química de dos especies de microalgas en dos fases de crecimiento cultivadas en medios simplificados. *Oceanología* 2:133-148.
- Claustre. Herve. and J.Gostan. 1987. Adaptation of biochemical composition and cell size to irradiance in two microalgae possible ecological implications. *Marine Ecology*. 40:167-174.
- Collins. C. D. and Boylen, C. W. 1982. Physiological responses of *Anabaena v.* (Cyanophyceae) to instantaneous exposure to various combinations of high light intensity and temperature. *Journal Phycol.* 18: 206.
- Correa-Reyes, J.G., M. Sánchez, D. Alfaro and N. Flores. 2001. Isolation and growth of eight strains of benthic diatoms, cultured under two light conditions. *J. Shellfish Res.* 20: 603-610.
- Coutteau. P. and Sorgeloos. 1992. The use of algal substitutes and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs:an international survey. *J. Shellfish Res.* 11: 467-476.
- Dubinsky. Z. Falkowsky, P.G. and Wyman, K. 1986. Light harvesting and utilization by phytoplankton. *Plant Cell Physiol.*, 27 (7): 1335-13349.
- Fabregas. J. Vázquez, V. Cabezas. B. and Otero, A. 1993. Tris not only controls the pH in microalgal cultures, but also feeds bacteria. *Journal Phycol.* 5: 543-545.
- Falkowsky, P.G., Owens. T.G. 1980. Light-shade adaptation two strategies in marine phytoplankton. *Plant Cell Physiol.*, 66: 592-595.
- Foog. L. and Take, Z. 1987. algal cultures and phytoplankton ecology. The University of Wisconsin Press. 259 pp.
- Guillard. R. R. L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates animals. 29-60. In *Culture of Marine invertebrates animals*. Smith, W. L. and Chanley (eds). Plenum Publishing Corp., New York, 338 pp.
- Kaplan. D. Cohen, Z. and Abeliovich, A. 1986. Optimal growth conditions for *Isochrysis galbana*. *Biomass* 9: 37-48.
- Kirk. J.T.O. 1994 *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems*. Second edition Cambridge University Press.
- Lafarga-De la Cruz, F. 1997. Relación entre el consumo de nutrientes y los cambios en la composición bioquímica de *Rhodomonas sp* cultivada con medio f/2 y fertilizantes agrícolas. Tesis de licenciatura, FCM, UABC. Ensenada, Baja California. 56pp.
- Lafarga- De la Cruz, F. 2000. Interacción entre luz, consumo de nutrientes, composición celular y producción de *Rhodomonas sp*. En cultivos estáticos. Tesis de Maestría. FCM, UABC. Ensenada, Baja California 133pp.
- Laing. I. y F. Ayala. 1990 Commercial mass culture techniques for producing microalgae.. *J. Mar. Biol.* 70: 1-12

- Lee, Y. K. Tan, H. M. and Hew, C. S. 1985. The effect of growth temperature on the bioenergetics of photosynthetic algal cultures. *Biotech. Bioeng.* 27:555-561.
- López-Eliás, J. y D. Voltolina. 1993. Cultivos semicontinuos de cuatro especies de microalgas con un medio no convencional. *Ciencias Marinas*, Vol. 19, No. 2: 169-180.
- López-Muñoz, I., Abalde, J. y Herrero, C. 1992. Crecimiento y contenido en pigmentos de cuatro especies de microalgas marinas cultivadas con diferentes temperaturas e intensidades de luz. *Nova Acta Científica Compostelana*. 3: 59-65.
- Millán-Núñez, R y S. Álvarez-Borrego. 1978. Ecuaciones espectrofotométricas tricomas para la determinación de clorofilas *a*, *b* y *c*, y sus feofitinas. *Ciencias Marinas*, 5(1): 47-55.
- Milligan, A. and Harrison, P. 2000. Effects of non steady state iron limitation on nitrogen assimilatory enzymes in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Journal Phycol.* 36:78-86.
- Parson, T.R., Y. Maita and C.M. Lalli. 1985. Manual of chemical and biological methods for seawater analysis. First edition. Ed. Pergamon press. 173pp.
- Regan, D.L. and Ivancic, N. 1984. Mixed populations of marine microalgae in continuous culture: Factors affecting species dominance and biomass productivity. *Biotech. Bioeng.* 26: 1265-1271.
- Reitan, K.I., J.R. Rainuzzo, G. Oie. and Y. Olsen. 1997. A review of nutritional effects of algae marine in fish larvae. *Aquaculture*, 170: 147-159.
- Richmond, A. 1986. Outdoor mass culture of microalgae. In *Handbook of microalgal mass culture*. Richmond, A. (ed.) pp. 285-338. CRC Press Inc. Boca Raton Florida.
- Rojó-Salazar, G.. 2002. Supervivencia y crecimiento de *Haliotis rufescens* (Swainson, 1822) alimentadas con diatomeas bentónicas. Tesis de Maestría. FCM. IIO. UABC. Ensenada. Baja California. 94pp.
- Sánchez-Saavedra, M. del Pilar. 1994. Efectos de la calidad de luz sobre el crecimiento y la composición bioquímica de microalgas. Tesis de Doctorado. CICESE, Ensenada. Baja California. 74pp.
- Sánchez-Saavedra, M. del Pilar and D. Voltolina. 1994. The chemical composition of *Chaetoceros* sp. (Bacillariophyceae) under different light conditions. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 107B (1): 39-44.
- Simental-Trinidad, J.A., M. Sánchez-Saavedra, and J. Correa-Reyes. 2001. Biochemical composition of benthic marine diatoms using as culture medium a common agricultural fertilizer. *J. Shellfish Res.* 20: 611-617.
- Staehr, P.A., P. Henriksen. and S. Markager. 2002. Photoacclimation of four marine phytoplankton species to irradiance and nutrient availability. *Marine Ecol. Prog. Ser.* Vol. 238: 47-59.
- Strzepek, R.F. and N. Price. 2002. Influence of irradiance and temperature on the iron content of the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae). *Marine Ecol. Prog. Ser.* Vol. 206: 107-117.
- Thompson P.A., P.J. Harrison and J. Whyte. 1990. Influence of irradiance on the fatty acid composition of phytoplankton. *J. Phycol.* 26: 278-88
- Thompson, P.A., M. Guo and P.J. Harrison. 1993. The influence of irradiance on the value for larvae of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Mar. Biol.*, 117:259-268.

- Valenzuela-Espinoza, E. 1997. Uso de un medio alterno al f/2 para el cultivo de *Isochrysis aff galbana* (CLONE T-ISO). Tesis de Maestría, FCM, IIO, UABC. Ensenada, Baja California. 51 pp.
- Valenzuela-Espinoza, E. Gendrop, V. Perez, R. y Wilburn, J. 1999. Supervivencia de larvas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con *Chaetoceros muelleri* producido con fertilizantes agrícolas. *Ciencias Marinas*, 25(3): 423-437.

## XII. APENDICES

### XII.1 Medios de cultivo

Cuadro VI. Compuestos y concentración de nutrientes para preparar el medio f/2 de Guillard (1975).

Compuesto	Solución Stock	Concentración
NaNO <sub>3</sub>	75gr***	883μM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	5gr***	36.3μM
*Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O*	30gr***	107μM
Solución de vitaminas.		-
B <sub>12</sub>	0.5μg	
Biotina	0.5μg	
Tiamina. HCl	0.1mg	
Solución de metales traza		
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.01mg***	0.04μM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.006mg***	0.03μM
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.022 mg***	0.08μM
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.01 mg***	0.05μM
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.018 mg***	0.9μM
Solución primaria		
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	3.15mg***	11.7μM
Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	4.36mg***	11.7μM

\*Solo cuando la especie de alga lo necesita\*

\*\*Para preparar 1 litro de medio

\*\*\*disolver en 1 litro de agua destilada

Cuadro VII. Nombres comerciales de los fertilizantes agrícolas usados para preparar el medio de cultivo y la concentración de nutrientes que se le agregan al agua de mar.

Nombre comercial	Compuesto químico	Porcentaje (%)	Cantidad agregada (mg L <sup>-1</sup> )	Concentración (μM)
Fertimex	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	35.5	36.8	882
Subdury	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	44.0	5.6	39.45
KGRO	Fe-EDTA	0.43	5.4	5.51
KGRO	Fe-NO	5.62	70.7	1265.8
KGRO	MnSO <sub>4</sub>	0.087	1.09	8.07
KGRO	ZnSO <sub>4</sub>	0.087	1.9	6.75
KGRO	CuSO <sub>4</sub>	0.159	2.0	13.92
KGRO	Sulfuro	3.64	45.84	1429.6

## XII.2. Variables físico-químicas

Cuadro VIII. Variables físicos químicas en los cultivos de *Thalassiosira pseudonana* cultivada en 2.3 L con medio f/2 de Guillard.

Día	A						B					
	T°C	pH*	S‰									
1	21	8.1	34	21	8.1	34	24	8.1	34	24	8.1	34
2	23.5	8.4/7.6	34	23	8.4/7.7	34	24.5	8.4/7.6	34	24.5	8.4/7.7	34
3	23.5	8.3/7.7	34	23	8.4/7.7	34	24.5	8.3/7.7	34	24.5	8.3/7.8	34
4	23	8.3/7.9	34	22.5	8.3/7.9	34	24.5	8.3/7.9	34	24.5	8.3/7.9	34
5	23.5	8.4/7.7	34	22.5	8.4/7.7	34	24.5	8.4/7.7	34	24.5	8.4/7.7	34
6	23.5	8.4/7.7	34	22.5	8.4/7.7	34	24.5	8.3/7.7	34	24.5	8.3/7.7	34
7	22	8.2/7.7	34	22	8.2/7.7	34	24.5	8.1/7.6	34	24.5	8.1/7.6	34
<b>Prom.</b>	<b>22.8</b>	<b>8.3/7.7</b>	<b>34</b>	<b>22.3</b>	<b>8.3/7.7</b>	<b>34</b>	<b>24.4</b>	<b>8.2/7.7</b>	<b>34</b>	<b>24.4</b>	<b>8.2/7.7</b>	<b>34</b>

\*Después de inyección de CO<sub>2</sub>

A Luz fluorescente.

B Luz incandescente.

Cuadro IX. Parámetros físicos químicos en los cultivos de *T. pseudonana* cultivados en 2.3 L con fertilizantes agrícolas.

Día	A						B					
	T°C	pH*	S‰	T°C	pH*	S‰	T°C	pH*	S‰	T°C	pH*	S‰
1	21	8.0	34	21	8.0	34	24	7.8	34	24	7.9	34
2	23	8.1/7.6	34	23.5	8.0/7.6	34	24	8.0/7.7	34	24	8.1/7.6	34
3	23	8.0/7.6	34	23.5	8.0/7.6	34	24	8.0/7.6	34	24	8.0/7.6	34
4	23	8.0/7.7	34	23.5	8.0/7.7	34	24.5	8.1/7.8	34	24.5	8.1/7.8	34
5	23	8.2/7.7	34	23.5	8.2/7.7	34	24.5	8.2/7.7	34	24.5	8.2/7.7	34
6	23	8.0/7.6	34	23.5	8.2/7.6	34	24.5	8.3/7.8	34	24.5	8.3/7.6	34
7	22	8.0/7.6	34	22	8.2/7.6	34	24.5	8.0/7.6	34	24.5	8.0/7.6	34
<b>Prom.</b>	<b>22.5</b>	<b>8.0/7.6</b>	<b>34</b>	<b>23</b>	<b>8.0/7.6</b>	<b>34</b>	<b>24.8</b>	<b>8.0/7.6</b>	<b>34</b>	<b>24.2</b>	<b>8.0/7.6</b>	<b>34</b>

\*Después de inyección de CO<sub>2</sub>

A Luz fluorescente.

B Luz incandescente.

### XII.3 tratamiento estadístico de los datos

Cuadro X. Análisis de varianza ANOVA de dos vías  $\alpha = 0.05$ .

	f/2 f	f/2 f	f/2 i	f/2i
<b>promedios</b>	2532230	2514500	2482881	2731860
<b>varianza</b>	3.29E+12	3.53E+12	3.45E+12	4.35E+12
<b>f deFisher</b>	1.072206		1.258809	
<b>f crit 0.05</b>	3.798	Ho se acepta	3.798	Ho se acepta
<b>var pon</b>	3.41E+12		3.9E+12	
<b>t</b>				
<b>calculada</b>	0.019195		0.252193	
<b>t crit 0.05</b>	2.145	Ho se acepta	2.145	Ho se acepta
<b>F máxima</b>	1.917683			
	3.798	Ho se acepta		
	fer f	fer f	fer i	feri
<b>promedios</b>	2510455	2072283	2040363	2482396
<b>varianza</b>	3.49E+12	2.66E+12	2.27E+12	3.88E+12
<b>f deFisher</b>	1.311692		1.710164	
<b>f crit 0.05</b>	3.798	Ho se acepta	3.798	Ho se acepta
<b>var pon</b>	3.08E+12		3.07E+12	
<b>t</b>				
<b>calculada</b>	0.499497		0.504517	
<b>t crit 0.05</b>	2.145	Ho se acepta	2.145	Ho se acepta
<b>F máxima</b>	1.917683			
	3.798	Ho se acepta		