

2002B

193079825

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



"Cultivo de Navícula incerta, Nitzschia commutata y Tetraselmis gracilis, utilizando un medio alterno al f/2".

**TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE
TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**P R E S E N T A
RUTH ADRIANA MONTES MACÍAS**

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. RUTH ADRIANA MONTES MACÍAS
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: "**Cultivo de *Navicula incerta*, *Nitzschia commutata* y *Tetraselmis gracilis*, utilizando un medio alterno al f/2**", 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., 19 de agosto del 2003



**DRA. MÓNICA ELIZABETH RÍOS 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

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

C. DRA MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN DE LA
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA
PRESENTE.

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de titulación que realizó la pasante **Ruth Adriana Montes Macías**, con el título: “**Cultivo de *Navícula incerta*, *Nitzschia commutata* y *Tetraselmis gracilis* utilizando un medio alternativo al f/2**”, consideramos que ha quedado debidamente concluido, 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.

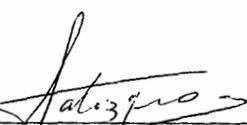
Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que sirva dar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviar un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Las agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco., Enero de 2004.


MC. Enrique Valenzuela Espinoza
Director del Trabajo



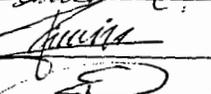
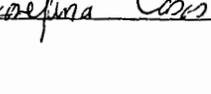

Salvador Velázquez Magaña
Asesor

COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

SINODALES

1. Aurora Rosas Ramírez
2. Idelfonso Enciso Padilla
3. Elva Guadalupe Robles Jarero
4. Josefina Casas Solís

Firma

 19/01/04
 19/01/04
 19/01/04
 Josefina Casas Solís 19/01/04

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad de Guadalajara** en especial al Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, por haberme permitido terminar mis estudios.

A la **Universidad Autónoma de Baja California**, en especial al **Instituto de Investigaciones Oceanológicas**, al proyecto 4020 Producción de microalgas, por la oportunidad de desarrollar este trabajo.

Al **MC. Enrique Valenzuela Espinoza**, por sus enseñanzas, disciplina e inculcación de criterios de trabajo, y sobre todo por su gran apoyo durante mi estancia. Gracias.

Al **Dr Zaúl García Esquivel** y al **MC Marco Aurelio González** por su apoyo, disposición y tiempo dedicado para la realización de este trabajo.

A la **familia Plancton**: Enrique Valenzuela, Filiberto Núñez, "Maria" Moreno, Silvia "Sibebo", y Jaime.

Al **MC Alberto Gálvez** por su apoyo y comprensión. Gracias.

Gracias Dios...

DEDICATORIA**A MIS PADRES:****JOSÉ GUADALUPE MONTES PÉREZ****Y****TERESA MACÍAS MAYORGA.****POR DARME LA VIDA****Y****POR ESE GRAN ESFUERZO PARA QUE
TERMINARA CON MIS ESTUDIOS.****A mi familia: Marco, Víctor, Araceli y Gabriela.****A la familia Barajas Montes:
Sergio, Araceli, Cando y Axel.****A la familia pato:
Pato chillón, la patota y el patito.****A Gaby: Aunque fue largo y sinuoso el camino, salimos
adelante contra todo y contra todos.****GRACIAS**

RESUMEN

Se evaluó el crecimiento, contenido de clorofila *a*, contenido calórico y razón Carbono:Nitrógeno en cultivos estáticos en *Navícula incerta*, *Nitzschia commutata* y *Tetraselmis gracilis*, cultivadas en medio f/2 y un medio alterno conformado por fertilizantes agrícolas. Las condiciones de cultivo fueron las siguientes: temperatura promedio $19^{\circ}\pm 1^{\circ}$ C, salinidad promedio $34 \pm 0.5\%$, irradiancia $132 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$; cada tratamiento se realizó por duplicado. Durante 7 días se tomaron, a diario, muestras de los cultivos para conocer la densidad celular, contenido de clorofila *a* y razón C:N, en el último día de cultivo se colectó la biomasa total de cada una de las especies usada para analizar el contenido calórico. El promedio de densidad celular para cada una de las especies estudiadas fue similar, no encontrándose diferencias significativas ($\alpha=0.05$), en medio f/2 y fertilizantes agrícolas. La tasa de división celular en *N. incerta* (1.08; 1.04) y *T. gracilis* (0.99; 0.94) son similares entre tratamientos. Sin embargo, en *N. commutata* (0.93; 0.88) fueron diferentes. El contenido de clorofila *a* en *N. incerta* fue mayor (0.172; 0.115 pg cél⁻¹), seguida por *N. commutata* (0.077; 0.106 pg cél⁻¹) y en menor concentración en *T. gracilis* (0.037; 0.029 pg cél⁻¹). Se observó una relación directa entre la densidad celular y la razón C:N. El contenido calórico para *N. Incerta* y *N. commutata* en cultivos con medio f/2 fue menor (3779 y 3981 cal/g) que aquellos valores obtenidos al usar fertilizantes agrícolas (4386 y 4111 cal/g). En cambio en cultivos de *T. gracilis* se obtuvieron resultados similares (3779 y 3392 (cal/g) al usar medio f/2 y fertilizantes agrícolas. Los fertilizantes agrícolas no mostraron haber afectado la producción de biomasa en *N. incerta*, *N. commutata* y *T. gracilis*, por tal motivo se recomienda su uso para el cultivo de microalgas dentro de la acuicultura.

ÍNDICE

	Página
I.- INTRODUCCIÓN.	1
II.- ANTECEDENTES.	4
III.- JUSTIFICACIÓN.	6
IV.- HIPÓTESIS.	9
V.- OBJETIVOS.	10
V.1.- Objetivo general.	10
V.2.- Objetivos específicos.	10
VI.- MATERIALES Y MÉTODOS.	11
VI.1.- Cultivos de microalgas.	11
VI.2.- Análisis de clorofila <i>a</i> .	14
VI.3.- Análisis de razón Carbono:Nitrógeno (C:N).	15
VI.4.- Calorimetría.	16
VI.5.- Parámetros poblacionales.	17
VI.6.- Análisis estadístico.	19
VII.- RESULTADOS.	20
VII.1.- Cultivo de microalgas.	20
VII.2.- Clorofila <i>a</i> .	28
VII.3.-Determinación Carbono:Nitrógeno (C:N).	33
VII.4.- Calorimetría.	40
VIII.- DISCUSIÓN.	46
VIII.1- Generalidades.	46
VIII.2.- Crecimiento algal.	48
VIII.3.-Clorofila <i>a</i> .	51
VIII.4. -Carbono:Nitrógeno (C:N) y Calorimetría.	54
IX.- CONCLUSIONES.	58
X.-RECOMENDACIONES.	59
XI.- LITERATURA CITADA.	60
XII.- APÉNDICES.	68

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
I	Crecimiento promedio de <i>Navicula incerta</i> , cultivada en 11 l. en medio f/2 (A) y en fertilizantes agrícolas (B).	23
II	Crecimiento promedio de <i>Nitzschia commutata</i> , cultivada en 11 l. en medio f/2 (A) y en fertilizantes agrícolas (B).	25
III	Crecimiento promedio de <i>Tetraselmis gracilis</i> , cultivada en 11 l. en medio f/2 (A) y en fertilizantes agrícolas (B).	27
IV	Contenido promedio de clorofila <i>a</i> en <i>Navicula incerta</i> , <i>Nitzschia commutata</i> y <i>Tetraselmis gracilis</i> , cultivadas en 11 l. en medio f/2 y fertilizantes agrícolas.	32
V	Razón Carbono:Nitrógeno en <i>Navicula incerta</i> , <i>Nitzschia commutata</i> y <i>Tetraselmis gracilis</i> , durante 7 días de cultivo, en 11 l. con medio f/2 y fertilizantes agrícolas.	37
VI	Contenido de proteína total encontrada en <i>Navicula incerta</i> , <i>Nitzschia commutata</i> y <i>Tetraselmis gracilis</i> , durante 7 días de cultivo, en 11 l. con medio f/2 y fertilizantes agrícolas.	39
VII	Contenido promedio de energía bruta, razón Proteína:Energía, y cenizas para <i>Navicula incerta</i> , <i>Nitzschia commutata</i> y <i>Tetraselmis gracilis</i> , cultivadas en 11 l. en medio f/2 y fertilizantes agrícolas.	42
VIII	Compuestos y concentración de nutrientes para preparar el medio f/2 de Guillard.	68
IX	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.	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Crecimiento promedio de <i>Navicula incerta</i> cultivada en 11 l. en medio f/2 y fertilizantes agrícolas. La barra vertical indica el error estándar. (n=2).	22
2	Crecimiento promedio de <i>Nitzschia commutata</i> cultivada en 11 l. en medio f/2 y fertilizantes agrícolas. La barra vertical indica el error estándar. (n=2).	24
3	Crecimiento promedio de <i>Tetraselmis gracilis</i> cultivada en 11 l. en medio f/2 y fertilizantes agrícolas. La barra vertical indica el error estándar. (n=2).	26
4	Contenido de clorofila <i>a</i> en <i>Navicula incerta</i> cultivada en 11 l. en medio f/2 y fertilizantes agrícolas. La barra vertical indica el error estándar. (n=2).	29
5	Contenido de clorofila <i>a</i> de <i>Nitzschia commutata</i> cultivada en 11 l. en medio f/2 y fertilizantes agrícolas. La barra vertical indica el error estándar. (n=2).	30
6	Contenido de clorofila <i>a</i> de <i>Tetraselmis gracilis</i> cultivada en 11 l. en medio f/2 y fertilizantes agrícolas. La barra vertical indica el error estándar. (n=2).	31
7	Razón C:N (A) y contenido de proteína total (B) para <i>Navicula incerta</i> , en medio f/2 y fertilizantes agrícolas, durante 7 días de cultivo. La barra vertical indica el error estándar (n=2).	34

- 8 Razón C:N (A) y contenido de proteína total (B) para *Nitzschia commutata* en medio f/2 y fertilizantes agrícolas, durante 7 días de cultivo. La barra vertical indica el error estándar (n=2). 35
- 9 Razón C:N (A) y contenido de proteína total (B) para *Tetraselmis gracilis* (C), en medio f/2 y fertilizante agrícola, durante 7 días de cultivo. La barra vertical indica el error estándar (n=2). 36
- 10 Energía bruta obtenida en medio f/2 y fertilizantes agrícolas para *Navicula incerta*. La barra vertical indica el error estándar (n =2) 43
- 11 Energía bruta obtenida en medio f/2 y fertilizantes agrícolas para *Nitzschia commutata*. La barra vertical indica el error estándar (n =2) 44
- 12 Energía bruta obtenida en medio f/2 y fertilizantes agrícolas para *Tetraselmis gracilis*. La barra vertical indica el error estándar (n =2) 45

I.- INTRODUCCIÓN

El fitoplancton es el primer eslabón de la trama alimentaria en los sistemas acuáticos y transfiere energía al siguiente nivel trófico (Brown *et al.*, 1989). Los fines de su cultivo son varios: algunos investigadores estudian su morfología, sistemática, genética y composición química por la amplia diversidad del material algal producido; otros estudian los factores abióticos que modifican los procesos fisiológicos, lo cual permite comprender el desarrollo del fitoplancton en el ambiente natural (De la Cruz, 1975; Simental-Trinidad, 1999).

Las algas planctónicas son consideradas los productores primarios más importantes del mar; mientras que las diatomeas bentónicas cubren un área limitada por la extensión de la plataforma continental. En ambientes litorales como lagunas costeras y estuarios, la producción primaria depende en gran medida de la microflora bentónica. En zonas inter y submareales superficiales las microalgas bentónicas pueden igualar, y en ocasiones superar, la producción primaria debida al fitoplancton (Gracida-Valdepeña, 1999).

La producción acuícola ha tenido gran importancia en el

ámbito mundial, enfocándose a la producción de especies de importancia económica, para la cual usan microalgas marinas como fuente de alimento para animales marinos que se encuentran en cultivo, en particular de larvas y juveniles de moluscos, gasterópodos, crustáceos, equinodermos y peces (Brown, 1991; Herrero *et al.*, 1991; Kawamura *et al.*, 1997). La producción de microalgas como alimento vivo, en comparación con fórmulas alternativas, garantiza mejores niveles de crecimiento y sobrevivencia (Laing *et al.*, 1990; Laing y Millican, 1992; Cordero-Esquivel y Voltolina, 1994), ya que aportan nutrimentos importantes de diferente naturaleza y composición (Brown, 1989; López-Elías, 1990). Por ello, es necesario producir volúmenes importantes de biomasa microalgal de diferentes especies, las cuales tienen una densidad celular distinta y un valor nutricional adecuado que reúnen los requerimientos del organismo consumidor. (Whyte 1987; Dunstan *et al.*, 1994).

El hábitat, las condiciones de iluminación y cambios estacionales durante el verano o invierno, son factores que modifican los procesos biológicos celulares de las diatomeas en el ambiente marino. Durante el verano el crecimiento de las diatomeas bentónicas es mayor, caso contrario ocurre en el invierno (Kawamura y Hirano, 1992).

Los sustratos colonizados por microalgas bentónicas en el ambiente natural son considerados de gran importancia, ya que éstos pueden ser señalamientos químicos para el establecimiento de larvas de organismos acuáticos como el abulón (Searcy-Bernal *et al.*, 1992; Hideki *et al.*, 1997; Castro-Gálvez, 1999).



II. ANTECEDENTES

Las diatomeas bentónicas *Nitzschia commutata* y *Navicula incerta* (Lewin y Lewin, 1960) pertenecen a la División Chrysophyta, clase Bacillarioficeae, y *Tetraselmis gracilis* (Butcher, 1959), pertenece a la División Chlorophyta, clase Prasinophyta. Estudios realizados sobre diatomeas bentónicas tratan aspectos relacionados con la ubicación taxonómica, la estructura (diversidad, dominancia, etc.) y la distribución de las asociaciones que la conforman (Siqueiros-Beltrones, 1991).

Investigaciones recientes sobre el cultivo de fitoplancton con fines acuiculturales, van desde la búsqueda de métodos para el cultivo con medios de bajo costo, utilizando fertilizantes agrícolas inorgánicos (Ocampo-Aranda, 1990; Herrero *et al.*, 1991; Pérez-Castañeda, 1992; López-Elías y Voltolina, 1993; Simental-Trinidad, 1999; Gracida-Valdepeña, 1999; Fonseca-Madrugal, 2001) y orgánicos (Castillo-Adame, 1990), hasta bioensayos con organismos para evaluar la calidad celular de las distintas especies como alimento. Si se considera el costo económico de los reactivos para el cultivo de grandes volúmenes de microalgas

utilizando métodos estándar de laboratorio como el medio f/2 de Guillard (1975), éste contribuye con un 30% del costo total (Coouteau y Sorgeloos, 1992). Es por esto que las técnicas para la producción de microalgas resultan onerosas cuando se cultivan en grandes volúmenes, los que son necesarios para alimentar larvas de bivalvos y postlarvas de gasterópodos (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 1999; Simental-Trinidad, 1999).

Las granjas acuícolas han utilizado diferentes técnicas para el cultivo de microalgas bentónicas: una de ellas consiste en utilizar láminas acanaladas de plástico o fibra de vidrio (técnica japonesa) y otra se basa en la adhesión en fondo y paredes de estanques cilíndricos (técnica americana).

En la actualidad, en diversas investigaciones, se ha utilizado la técnica americana para promover el cultivo de las diatomeas bentónicas en recipientes de 18 litros (Simental-Trinidad, 1999; Correa-Reyes, 2001; Carbajal-Miranda, 2002). Como parte del desarrollo para hacer eficiente el cultivo de diatomeas bentónicas, en este trabajo se propone el uso de recipientes con fondo y paredes rectangulares, por las ventajas que presentan: se manejan y almacenan con mas facilidad, requieren menor volumen de líquido y proporcionan mayor área de cultivo.

III.- JUSTIFICACIÓN

La mayoría de los trabajos realizados han centrado su atención en conocer la composición química en cuanto a proteínas, lípidos y carbohidratos, los cuales varían en función de las condiciones de cultivo (Flynn *et al.*, 1992; Gracida-Valdepeña, 1999; Simental-Trinidad, 1999; Geider *et al.*, 2002;). Sin embargo, la biomasa total de microalgas, destinada para la nutrición animal, puede ser expresada también en términos de carbono, nitrógeno y contenido calórico, así como otros constituyentes (Gómez-Montes *et al.*, 2002) como las clorofilas, los cuales son de importancia para conocer los cambios que se presentan a nivel celular en el cultivo.

El cultivo de microalgas permitirá producir diatomeas bentónicas, las cuales servirán como alimento de gasterópodos marinos. Si se considera que el contenido calórico y la calidad varían en función del ciclo de crecimiento de las microalgas, el conocer esta relación para la nutrición animal, permitirá establecer criterios en cultivos de microalgas empleadas en la acuicultura.

En los cultivos de microalgas planctónicas se desea que

las células se distribuyan homogéneamente en la columna de agua, donde el volumen del cultivo es lo más importante; mientras que en los cultivos de especies bentónicas se desea que éstas se fijen al fondo y paredes, pues lo importante es la superficie colonizada (Voltolina, 1985).

La mayoría de los investigadores realizan el cultivo de microalgas bentónicas en recipientes cilíndricos con un volumen útil de 12 litros y un área de 2286 cm². Estos recipientes en comparación con contenedores de fondo y paredes rectangulares proporcionan menor superficie y mayor volumen para el crecimiento de diatomeas bentónicas.

Es importante considerar las condiciones para el cultivo de microalgas ya que factores como la irradiancia, temperatura, limitación de nutrientes, la competencia con otras algas, presión del forrajeo (Sigmon y Cahoon, 1997; Sommer, 1997) y la composición química de éstas, varía dependiendo no sólo de la composición del medio de cultivo, sino también de la etapa de su ciclo de vida y del sistema de cultivo, razón por la cual también su valor nutritivo es variable (Gracida-Valdepeña, 1999). El medio de cultivo provee a las microalgas los nutrientes necesarios para su desarrollo; y diferentes especies tendrán distintos requerimientos nutricionales y composición química. Por tal motivo en este

estudio se considera necesario conocer si distintas fuentes de nutrientes producen cambios significativos en el crecimiento de *Navicula incerta*, *Nitzschia commutata* y *Tetraselmis gracilis*.

Por lo antes expuesto, en este trabajo se usaron contenedores con fondo y paredes rectangulares transparentes, con una superficie de 3436 cm² y un volumen de 11 litros, lo cual probablemente sea uno de los factores importantes en la cantidad de biomasa producida por estas especies, debido a su naturaleza bentónica y por requerir mayor área disponible, que columna de agua para su crecimiento, como tradicionalmente se ha llevado a cabo.

IV. HIPÓTESIS.

IV.1.- Distintos nutrientes inorgánicos para el cultivo de microalgas producirán diferente calidad y cantidad de biomasa microalgal en *Navícula incerta*, *Nitzschia commutata* y *Tetraselmis gracilis*.

IV.2.- El contenido calórico, Carbono:Nitrógeno y clorofila *a* de *Navícula incerta*, *Nitzschia commutata* y *Tetraselmis gracilis*, será el mismo al cultivarlas en medio f/2 y en medio constituido con fertilizantes agrícolas.

V. OBJETIVOS.

V.1.–Objetivo general.

V.1.1.- Comparar el crecimiento en cultivos estáticos de *Navicula incerta*, *Nitzschia commutata* y *Tetraselmis gracilis* cultivadas en medio f/2 y fertilizantes agrícolas para su posible uso en acuicultura.

V.2.–Objetivos particulares.

V.2.1.–Conocer el contenido calórico y razón Carbono:Nitrógeno en *Navicula incerta*, *Nitzschia commutata* y *Tetraselmis gracilis*, cultivadas en medio f/2 y un medio alterno conformado por fertilizantes agrícolas.

V.2.2.– Conocer el cambio en el contenido de clorofila *a* en *Navicula incerta*, *Nitzschia commutata* y *Tetraselmis gracilis*, cultivadas en medio f/2 y fertilizantes agrícolas.

VI.- MATERIALES Y MÉTODOS.

VI.1.-Cultivo de microalgas.

Dos especies de diatomeas, *Navícula incerta* y *Nitzschia commutata* y la flagelada *Tetraselmis gracilis*, fueron adquiridas del cepario del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (I. I. O.) de la Universidad Autónoma de Baja California. Estas especies fueron mantenidas en laboratorio a $19^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, en el medio f/2 descrito por Guillard 1975 (cuadro VIII) y un medio constituido con fertilizantes agrícolas utilizado en este estudio, el cual está descrito en Valenzuela-Espinoza, (1997) (cuadro IX).

El agua de mar para el cultivo se filtró a $1\ \mu\text{m}$ mediante filtros tipo cuno e irradiada con lámparas ultravioleta de 25 W. Se midió un volumen de 1 litro en probeta graduada, al cual se le adicionó 1 ml. de cada uno de los constituyentes inorgánicos y orgánicos de los medios arriba citados.

El primer nivel de cultivo se realizó en matraces Erlenmeyer por duplicado, por especie, y cada matraz contenía 200 ml. de medio preparado de acuerdo al f/2 de Guillard (1975) y medio alterno constituido por fertilizantes agrícolas. Estos fueron esterilizados en autoclave a 1.05 Kg

cm² de presión durante 15 minutos e inoculados con 10 ml de cepa de *Navicula incerta*, *Nitzschia commutata* y *Tetraselmis gracilis*. Se mantuvieron por 7 días a temperatura de 19° ± 1°C en luz continua, con 4 lámparas fluorescentes de 75 W que suministraron 132 μmol quanta m⁻² s⁻¹, medida con un irradiómetro Biospherical Instruments Inc. QSL 100 4π.

El segundo nivel de cultivo se llevó a cabo en recipientes de polipropileno, los cuales contenían 11 litros de agua de mar cada uno; fueron preparados por duplicado para cada una de las especies, tanto para medio f/2, como para fertilizantes agrícolas, sumando un total de 12 unidades experimentales. El agua de mar se filtró e irradió con lámparas de luz ultravioleta de 25 W. Posteriormente se trató con 0.25 ml l.⁻¹ de hipoclorito de sodio (416 ml de NaOCl al 6% aforado a 1 litro con agua destilada) que se adicionó a los contenedores de 11 l., se les dejó en reposo por 24 horas. Al término de este tiempo, el cloro se neutralizó al adicionar 0.1 ml. de tiosulfato de sodio por litro de agua de mar. Se suministró aireación por 2 horas para completar la reacción (Pruder y Bolton, 1978).

A cada unidad de evaluación se le introdujeron 7 cajas para muestreo con un área de 9321 mm² y un volumen de 75.51 ml cada una. Posteriormente se agregaron 400 ml de

inóculo de *Navicula incerta*, *Nitzschia commutata* y *Tetraselmis gracilis*, obtenidas de las mismas condiciones de cultivo (Matraz Erlenmeyer). Previo al inóculo, las microalgas se homogeneizaron durante 3 minutos en un sonicador Bransonic 12 a una frecuencia de 50-60 Hz. Los cultivos se mantuvieron estáticos, con luz continua, proporcionada con cuatro lámparas fluorescentes (Sylvania de 75 W) que en promedio suministrarán una irradiancia, de $108 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, para medio f/2 y $101 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para fertilizantes agrícolas. Diariamente se recuperaba una caja de muestreo de cada unidad de evaluación y se resuspendieron las microalgas en un volumen de 150 ml. De este volumen se cuantificó un mililitro de cada especie durante 7 días en un contador de partículas marca Beckman Coulter Multisizer 3.

VI.2- Análisis de clorofila *a*.

Para el análisis de clorofila se filtraron 10 ml. de muestra de cada una de las especies en cultivo, a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F de 25 mm. de diámetro y 0.7 μm de poro. Los filtros con muestra fueron envueltos en papel aluminio y almacenados en nitrógeno líquido. Para el análisis se extrajeron los filtros del papel aluminio y se colocó cada uno en tubos para centrifuga de 15 ml de capacidad. Se adicionaron a cada tubo 8 ml. de acetona al 90% y se mantuvieron en oscuridad a 4° C durante 24 horas. Posteriormente cada tubo se aforó a 10 ml. con acetona al 90% y fueron centrifugados a 1190 rpm durante 10 minutos. El extracto clorofílico de cada muestra fue leído en un Espectrofotómetro Spectronic Genesys 2, a longitudes de onda de 750, 665, 645 y 630. La concentración del pigmento se determinó mediante las ecuaciones de Millán-Núñez y Álvarez-Borrego (1978).

VI.3-. Análisis de razón Carbono:Nitrógeno (C:N).

En los primeros 4 días se filtraron volúmenes de 140 ml. de *Navicula incerta*, *Nitzschia commutata* y *Tetraselmis gracilis* a través de filtros de nitrocelulosa Millipore de 0.8 μm de poro Whyte AAWP y 47 mm. de diámetro. Del quinto al séptimo día, sólo se filtraron 100 ml. de cada especie. La muestra retenida en el filtro se colectó mediante una navaja y se almacenó en tubos de polipropileno natural eppendorf marca Fisherbrand, para microcentrífuga de 1.5 ml. Las muestras fueron liofilizadas y mantenidas a -70°C en un criocongelador, hasta ser analizadas.

El porcentaje de carbono y nitrógeno orgánico de cada muestra se determinó en un autoanalizador orgánico elemental (LECO CHNS-932). Multiplicando el valor del contenido de nitrógeno orgánico por un factor de 5.8 (Gnaiger, *et al.*, 1984) se obtuvo la cantidad de proteína total. Con estos valores se realizaron los cálculos para conocer la razón Proteína:Energía (P:E) y razón Carbono:Nitrógeno (C:N).

VI.4.- Calorimetría.

En el séptimo día se colectó, por cada unidad experimental, la biomasa total producida en 1 l. de *Navicula incerta*, *Nitzschia commutata* y *Tetraselmis gracilis* respectivamente. Se concentraron en tubos de polipropileno natural eppendorf de 1.5 ml., la muestra concentrada se mantuvo en nitrógeno líquido, para después ser liofilizada. Con las muestras liofilizadas se hicieron pastillas de 2 mg. por especie con ayuda de un peletizador marca Pellet Prees Pau Parr Instrument Company Moline y secadas en un horno 1370 FM VWR International Manufactured by Shel Lab, a temperatura de 60° C. Las muestras secas se colocaron en navcillas de aluminio previamente incineradas a 450° C durante 24 horas, en una mufla Thermolyne FB 1415M. El contenido calórico se obtuvo al introducir las en una bomba calorimétrica digital automatizada (Parr 1281), después de la combustión con oxígeno. La energía bruta (cal/g), se determinó directamente en las muestras.

VI.5.- Parámetros poblacionales.

De los resultados obtenidos en el contador de partículas se calculó:

Tasa de crecimiento específico (μ) de cada condición de cultivo mediante las ecuaciones descritas por Guillard (1975).

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

Donde: μ = Tasa de crecimiento específico 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.

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

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

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

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

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

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

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

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

VI.6.- 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 llevó a cabo el análisis paramétrico de ANOVA de una vía, con el objeto de determinar diferencias entre tratamientos. El análisis se realizó con el paquete estadístico SPSS con $\alpha=0.05$.

Para determinar diferencias significativas entre los valores promedio de crecimiento, en el experimento se utilizó una prueba t de Student ($\alpha=0.05$).

VII.- RESULTADOS.

VII.1- Cultivo de microalgas.

El crecimiento promedio que se obtuvo en una superficie de 3,436 cm² y un volumen de 11 litros para cada una de las especies estudiadas, se muestran en las figuras 1, 2, 3 y cuadros I, II, III. Los cultivos para medio f/2 y fertilizantes agrícolas, en cada una de las especies, iniciaron con densidades celulares similares: *Navicula incerta*, empezó con 756 y 731 cél mm² tanto en medio f/2 como en fertilizantes agrícolas; en tanto que *Nitzschia commutata* presentó 763 y 833 cél mm² al inicio del cultivo. Valores de 1370 y 1316 cél mm² fueron registrados para *Tetraselmis gracilis* tanto para medio f/2 y fertilizantes agrícolas, respectivamente.

Los cultivos en ambos tratamientos (medio f/2 y fertilizantes agrícolas), en las tres especies estudiadas, presentaron fase lag o de retardo, la cual se manifestó durante las primeras 24 horas de cultivo. Posteriormente se inició una fase exponencial, la cual tuvo una duración de cuatro días donde se obtuvo la mayor concentración celular y producción diaria (PD), (cuadros I, II y III). La tasa de crecimiento promedio (μ) y las divisiones por día (D) en cada tratamiento,

en las distintas condiciones experimentales, fueron similares (cuadros I, II y III), mientras que, el tiempo de duplicación (TD) es inversamente proporcional a la tasa de crecimiento específica (μ).

La concentración celular fue semejante durante los siete días de cultivo para *Navícula incerta* y *T. Gracilis*, en cambio con *Nitzschia commutata* se registró la menor concentración celular. No obstante, la máxima concentración celular se obtuvo al séptimo día de cultivo para las tres especies, en los dos medios de cultivo.

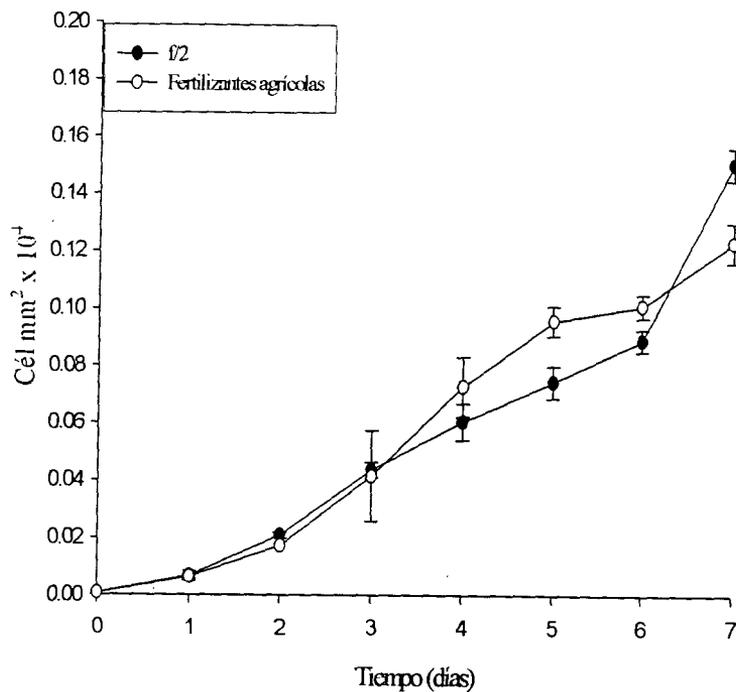


Figura 1. Crecimiento promedio de *Navicula incerta* cultivada en 11 l. con medio f/2 y fertilizantes agrícolas. La barra vertical indica el error estándar. (n=2).

Cuadro I.- Crecimiento promedio de *Navicula incerta*, cultivada en 11 l. con medio f/2 (A) y en fertilizantes agrícolas (B).

(A)

Tiempo (día)	Concentración (cél mm ²)	μ (días)	TD (días)	D (Div día ⁻¹)	PD (cél mm ²)	VP (%)
0	756	---	---	---	---	---
1	6 844	2.21	0.31	3.18	6 088	805.29
2	20 985	1.12	0.62	1.61	14 141	206.61
3	43 662	0.73	0.95	1.05	22 677	108.06
4	60 424	0.32	2.17	0.46	16 762	38.39
5	74 281	0.21	3.33	0.30	13 857	22.93
6	88 792	0.18	4	0.25	14 511	19.53
7	150 035	0.52	1.33	0.75	61 243	68.97
Promedio		0.75	1.81	1.08		

(B)

Tiempo (días)	Concentración (cél mm ²)	μ (días)	TD (días)	D (Div día ⁻¹)	PD (cél mm ²)	VP (%)
0	731	-----	-----	-----	-----	-----
1	6 500	2.18	0.31	3.14	5 769	789.19
2	31 417	1.58	0.44	2.27	24 917	383.33
3	62 622	0.69	1.01	0.99	31 201	99.32
4	72 728	0.15	4.76	0.21	10 106	16.13
5	95 546	0.27	2.63	0.38	22 818	31.37
6	100 721	0.06	12.5	0.06	5 175	5.41
7	122 707	0.19	3.70	0.27	21 986	21.82
Promedio		0.73	3.62	1.04		

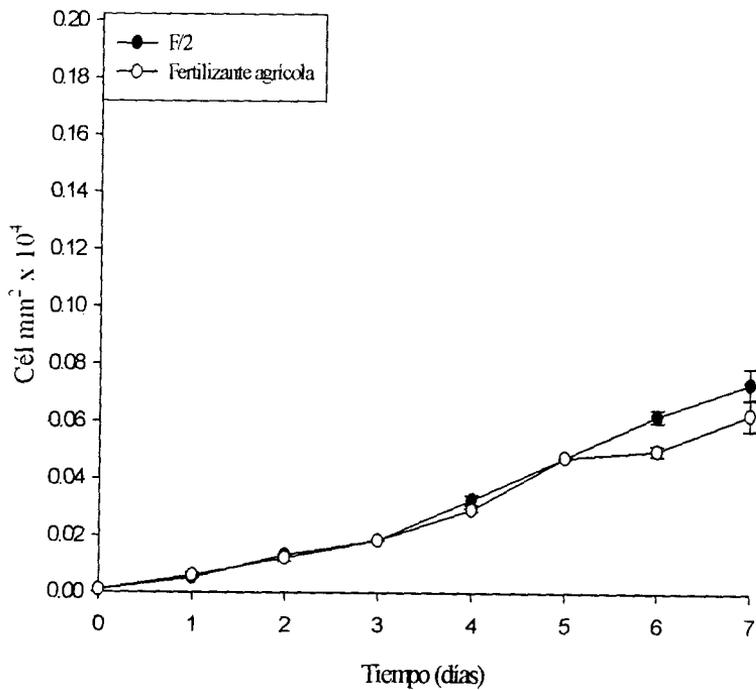


Figura 2. Crecimiento promedio de *Nitzschia commutata* cultivada en 1 l. con medio f/2 y fertilizantes agrícolas. La barra vertical indica el error estándar. (n=2).

Cuadro II.- Crecimiento promedio de *Nitzschia commutata* cultivada en 11 l. Con medio f/2 (A) y en fertilizantes agrícolas (B).

(A)

Tiempo (días)	Concentración (cél mm ²)	μ (días)	TD (días)	D (Div día ⁻¹)	PD (cél mm ²)	VP (%)
0	731	----	----	----	----	----
1	5 109	1.90	0.36	2.74	4 346	569.59
2	13 197	0.95	0.72	1.37	8 088	158.30
3	18 353	0.33	2.12	0.47	5 156	39.06
4	32 592	0.58	1.20	0.83	14 239	45.30
5	47 359	0.37	1.88	0.53	14 767	77.80
6	61 959	0.27	2.63	0.38	14 600	30.82
7	73 230	0.17	4.16	0.24	11 271	18.19
Promedio		0.65	1.86	0.93		

(B)

Tiempo (días)	Concentración (cél mm ²)	μ (días)	TD (días)	D (Div día ⁻¹)	PD (cél mm ²)	VP (%)
0	833	---	---	---	---	---
1	5 904	1.96	0.35	2.82	5 071	608.76
2	12 135	0.72	0.97	1.03	6 231	105.53
3	18 756	0.43	1.61	0.62	6 621	54.56
4	29 095	0.44	1.58	0.63	10 339	55.12
5	39 214	0.30	2.32	0.43	10 119	34.77
6	49 817	0.24	2.94	0.34	10 603	27.06
7	62 490	0.23	3.03	0.33	12 673	25.43
Promedio		0.61	1.82	0.88		

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

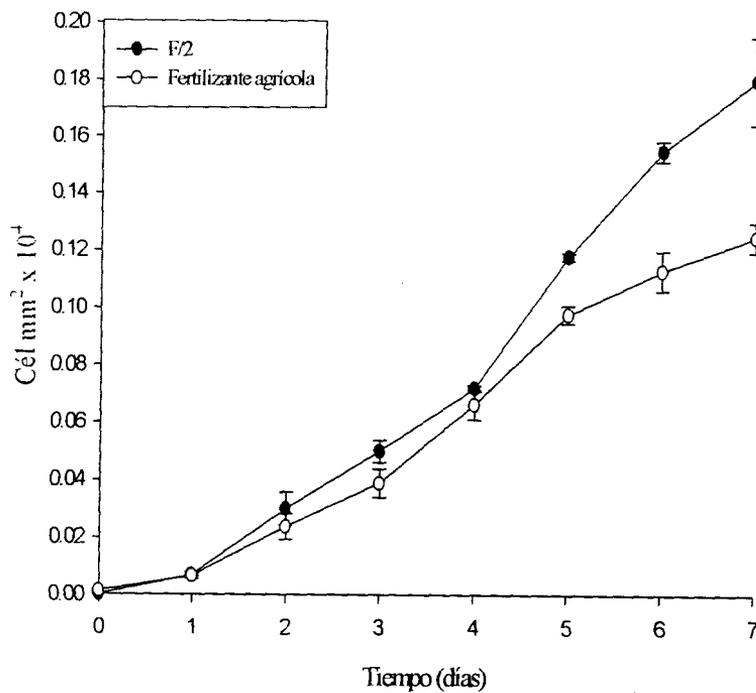


Figura 3. Crecimiento promedio de *Tetraselmis gracilis* cultivada en 11 l. con medio f/2 y fertilizantes agrícolas. La barra vertical indica el error estándar. (n=2).

Cuadro III.- Crecimiento promedio de *Tetraselmis gracilis*, cultivada en 11 l. Con medio f/2 (A) y en fertilizantes agrícolas (B).

(A)

Tiempo (días)	Concentración (cél mm ²)	μ (días)	TD (días)	D (Div día ⁻¹)	PD (cél mm ²)	VP (%)
0	1 370	---	---	---	---	---
1	6 905	1.62	0.42	2.33	5 535	404.01
2	29 945	1.46	0.47	2.10	23 040	333.67
3	50 070	0.52	1.33	0.75	20.125	67.20
4	71 986	0.36	1.96	0.51	21 916	43.77
5	117 779	0.49	1.42	0.70	45 793	63.61
6	154 531	0.27	2.63	0.38	36 752	31.20
7	179 438	0.15	4.76	0.21	24 907	16.11
	Promedio	0.69	1.85	0.99		

(B)

Tiempo (días)	Concentración (cél mm ²)	μ (días)	TD (días)	D (Div día ⁻¹)	PD (cél mm ²)	VP (%)
0	1 316	---	---	---	---	---
1	6 5448	1.60	0.43	2.30	5 232	397.56
2	23 757	1.29	0.53	1.86	17 209	262.81
3	38 970	0.50	1.38	0.72	15 213	64.03
4	66 324	0.53	1.31	0.76	27 354	70.19
5	97 646	0.38	1.85	0.54	31 321	47.22
6	112 892	0.15	4.76	0.21	15 246	15.61
7	124 516	0.10	7.14	0.14	11 624	10.29
	Promedio	0.65	2.48	0.94		

VII.2.- Clorofila *a*.

El contenido de clorofila *a* por unidad de célula para cada una de las especies se observa en las figuras 4, 5, 6, y cuadro IV. Al comparar el contenido de clorofila *a* entre especies, se observó que en *Navícula incerta* se encuentra en mayor concentración, seguida por *Nitzschia commutata* y en menor concentración en *Tetraselmis gracilis*.

En general se observó que el contenido de clorofila *a* se incrementó con el tiempo de cultivo. Para *Navícula incerta* los valores máximos (0.172 y 0.115 pg de clorofila *a* cél⁻¹) se encontraron al sexto día de cultivo, en ambos medios (figura 4, cuadro IV). Esta misma tendencia se observó solo en medio con fertilizantes agrícolas en *Nitzschia commutata*, en el cual su mayor contenido se presentó al sexto día (0.106 pg clorofila *a* cél⁻¹). Para el medio f/2 fue al tercer día con 0.080 pg clorofila *a* cél⁻¹, manteniéndose con poca variación durante el resto del tiempo (figura 5).

Con respecto a *Tetraselmis gracilis* el mayor contenido de este pigmento se obtuvo en los primeros tres días para el medio f/2; en cambio, en el medio con fertilizantes agrícolas se encontraron variaciones en el contenido de clorofila *a* con respecto al tiempo de cultivo (figura 6, Cuadro IV).

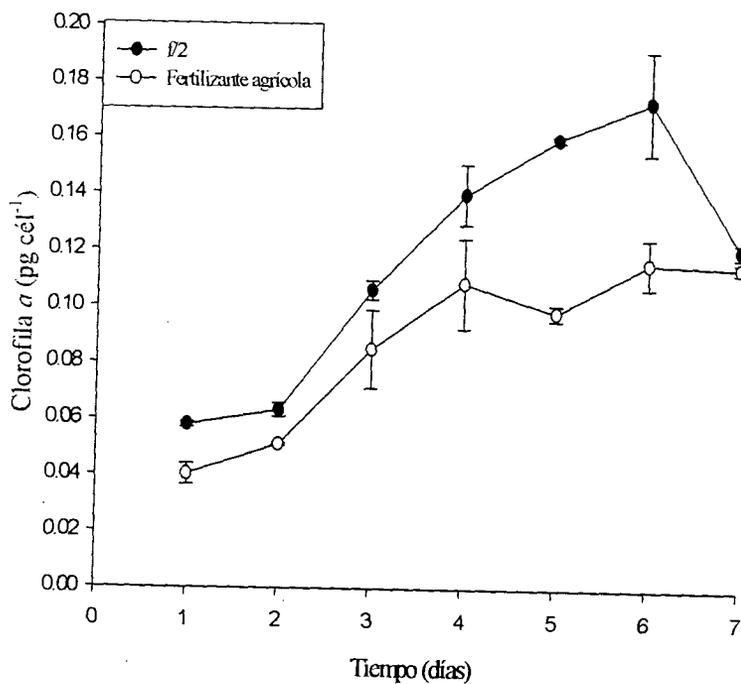


Figura 4.- Contenido de clorofila *a* de *Navicula incerta* cultivada en 11 l. en medio f/2 y fertilizantes agrícolas. La barra vertical indica el error estándar. (n=2).

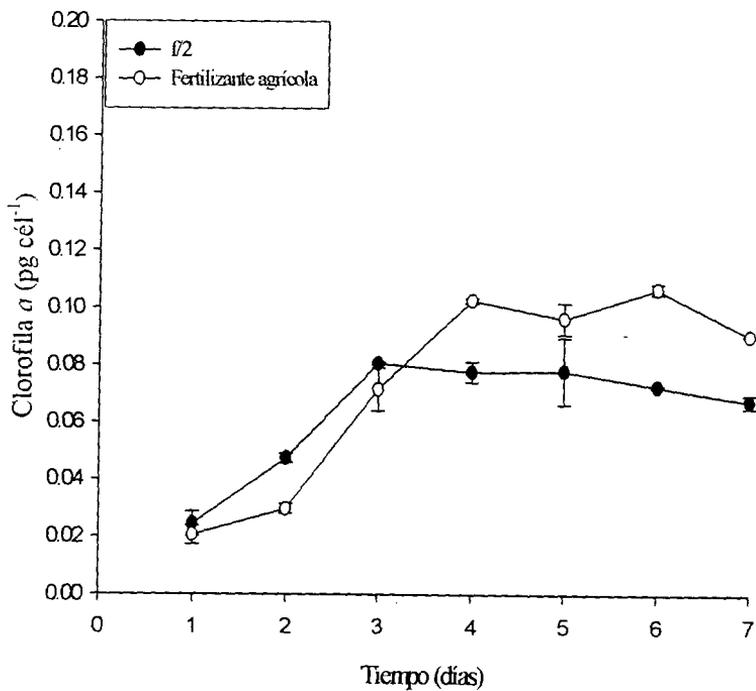


Figura 5.- Contenido de clorofila *a* de *Nitzschia commutata* cultivada en 1 l. en medio f/2 y fertilizantes agrícolas. La barra vertical indica el error estándar. (n=2).

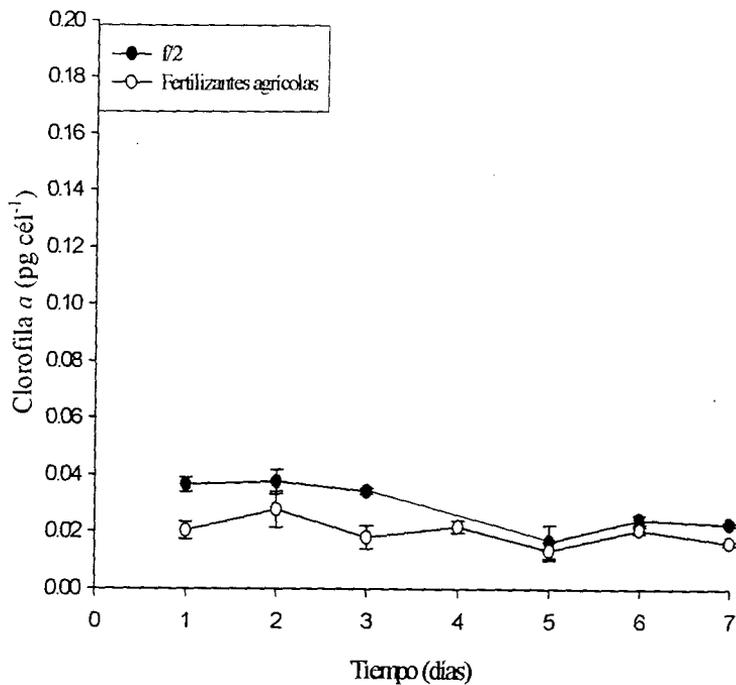


Figura 6.- Contenido de clorofila *a* de *Tetraselmis gracilis* cultivada en 1 l. en medio f/2 y fertilizantes agrícolas. La barra vertical indica el error estándar. (n=2).

Cuadro IV.- Contenido promedio de clorofila *a* en *Navicula incerta*, *Nitzschia commutata* y *Tetraselmis gracilis*, cultivadas en 1 l. con medio f/2 y fertilizantes agrícolas.

Día	<i>Navicula incerta</i> pg cél ⁻¹		<i>Nitzschia commutata</i> pg cél ⁻¹		<i>Tetraselmis gracilis</i> pg cél ⁻¹	
	f/2	Fertilizantes agrícolas	f/2	Fertilizantes agrícolas	f/2	Fertilizantes agrícolas
1	0.057	0.040	0.024	0.020	0.036	0.020
2	0.063	0.051	0.047	0.029	0.037	0.029
3	0.109	0.084	0.080	0.071	0.034	0.017
4	0.139	0.108	0.077	0.102	0.025	0.021
5	0.159	0.097	0.077	0.095	0.020	0.013
6	0.172	0.115	0.072	0.106	0.024	0.020
7	0.120	0.114	0.067	0.090	0.022	0.016

VII.3.- Determinación Carbono:Nitrógeno (C:N).

Conforme la concentración celular se incrementó, la razón C:N aumentó en cada condición de cultivo y en cada una de las especies estudiadas.

La razón C:N para *N. incerta*, *N. commutata* y *T. gracilis*, se presentan en las figuras 7, 8 y 9 (A) y cuadro V. Durante el período de cultivo esta razón varió de 5.80 a 7.88 y 5.51 a 7.85 en medio f/2 y fertilizantes agrícolas respectivamente; el máximo valor se presentó al séptimo día de cultivo en ambos medios para *N. incerta*. Para *N. commutata* los valores comprendieron entre 5.79 a 6.55 y 5.59 a 6.77 en medio f/2 y fertilizantes agrícolas, respectivamente. Valores máximos fueron encontrados al segundo día (6.70) en medio f/2 y en fertilizantes agrícolas (6.77) al séptimo día. *T. gracilis* registró valores entre 5.50 - 8.17 y 5.64 - 8.06 en medio f/2 y fertilizantes agrícolas, respectivamente (cuadro V).

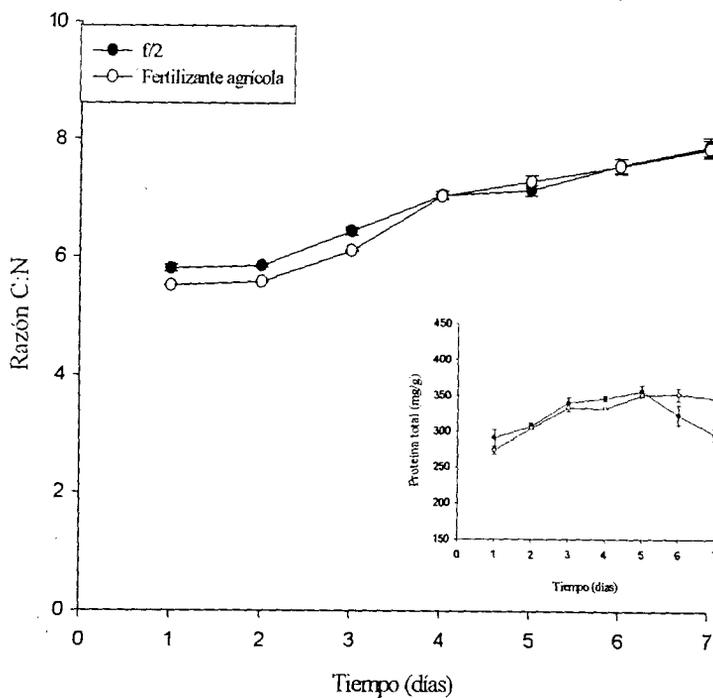


Figura 7-. Razón C:N (A) y contenido de proteína total (B), para *Navicula incerta*, en medio f/2 y fertilizantes agrícolas, durante 7 días de cultivo. La barra vertical indica el error estándar (n=2).

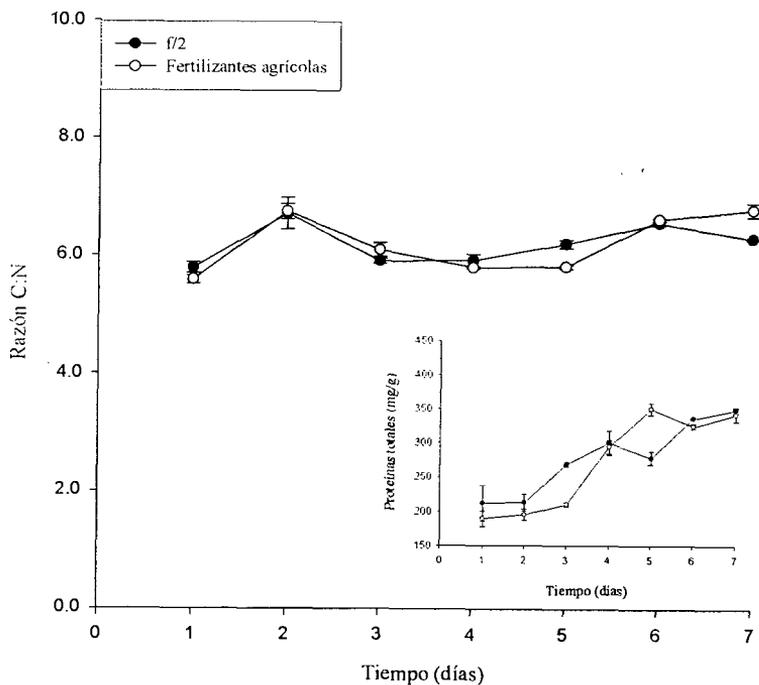


Figura 8.- Razón C:N (A) y contenido de proteína total (B), para *Nitzschia commutata* en medio f/2 y fertilizantes agrícolas, durante 7 días de cultivo. La barra vertical indica el error estándar (n=2).

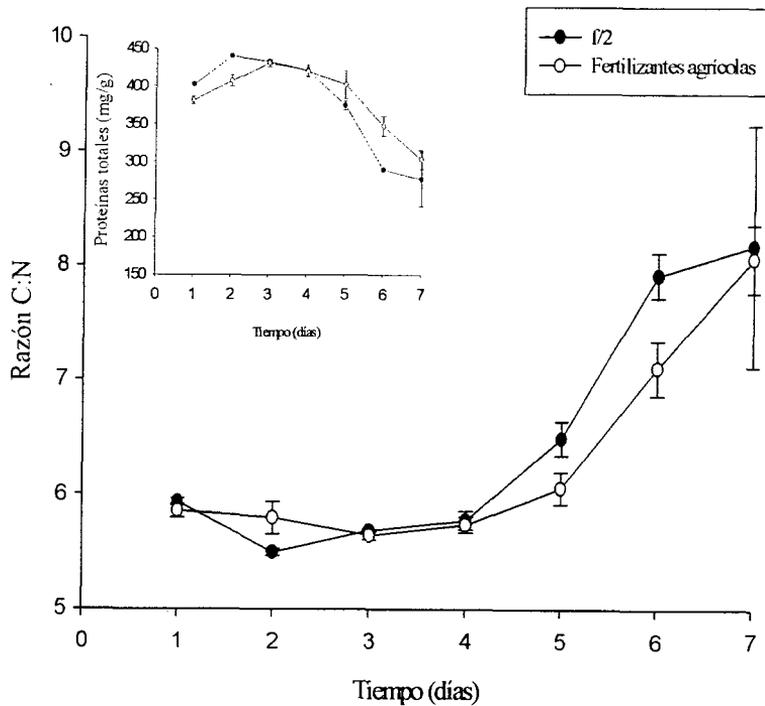


Figura 9.- Razón C:N (A) y contenido de proteína total (B), para *Tetraselmis gracilis* (C), en medio f/2 y fertilizantes agrícolas, durante 7 días de cultivo. La barra vertical indica el error estándar (n=2).

Cuadro V. Razón C:N, en *Navicula incerta*, *Nitzschia commutata* y *Tetraselmis gracilis*, durante 7 días de cultivo, en 1 l. en medio f/2 y fertilizantes agrícolas.

Día	<i>Navicula incerta</i>		<i>Nitzschia commutata</i>		<i>Tetraselmis gracilis</i>	
	f/2	C:N Fertilizantes agrícolas	f/2	C:N Fertilizantes agrícolas	f/2	C:N Fertilizantes agrícolas
1	5.80	5.51	5.79	5.59	5.93	5.85
2	5.85	5.57	6.70	6.74	5.50	5.80
3	6.43	6.10	5.90	6.10	5.68	5.64
4	7.05	7.04	5.91	5.80	5.77	5.73
5	7.13	7.29	6.20	5.81	6.49	6.06
6	7.56	7.54	6.55	6.61	7.92	7.10
7	7.88	7.85	6.28	6.77	8.17	8.06
Prom.	6.81	6.70	6.19	6.20	6.49	6.32

El contenido promedio de proteína total en *Navícula incerta*, *Nitzschia commutata* y *Tetraselmis gracilis*, se presentan en las figuras 7, 8 y 9 (B) cuadro VI. Se encontró que los valores promedios de proteína total varían de 291 a 356 y de 274 a 352 mg/g. para *N. incerta*. Los valores para *N. commutata* se encontraron en el intervalo de 212 a 348 y 189 a 350 mg/g. Y para *T. gracilis* van de 277 a 440 y 303 a 431 mg/g en medio f/2 y fertilizantes agrícolas, respectivamente.

El valor promedio menor de proteína total en *N. incerta* y *N. commutata* se presentó el primer día del análisis; en contraste, para *T. gracilis*, éste se presentó el último día de análisis. El máximo valor para cada una de las especies se ubicó en diferentes días: para *N. incerta* se presentó al quinto y séptimo día, en *N. commutata* al quinto y séptimo día y para *T. gracilis* al segundo y tercer día de cultivo para medio f/2 y fertilizantes agrícolas, respectivamente (cuadro VI).

Cuadro VI.- Contenido de proteína total encontrada en *Navicula incerta*, *Nitzschia commutata* y *Tetraselmis gracilis*, durante 7 días de cultivo, en 1 l. con medio f/2 y fertilizantes agrícolas.

Día	<i>Navicula incerta</i>		<i>Nitzschia commutata</i>		<i>Tetraselmis gracilis</i>	
	mg/g		mg/g		mg/g	
	f/2	Fertilizantes agrícolas	f/2	Fertilizantes agrícolas	f/2	Fertilizantes agrícolas
1	291	274	212	189	402	381
2	307	304	213	195	440	407
3	339	332	269	210	433	431
4	346	331	300	294	421	420
5	356	350	278	350	374	402
6	322	352	336	324	289	347
7	295	346	348	342	277	303

VII.4.- Calorimetría.

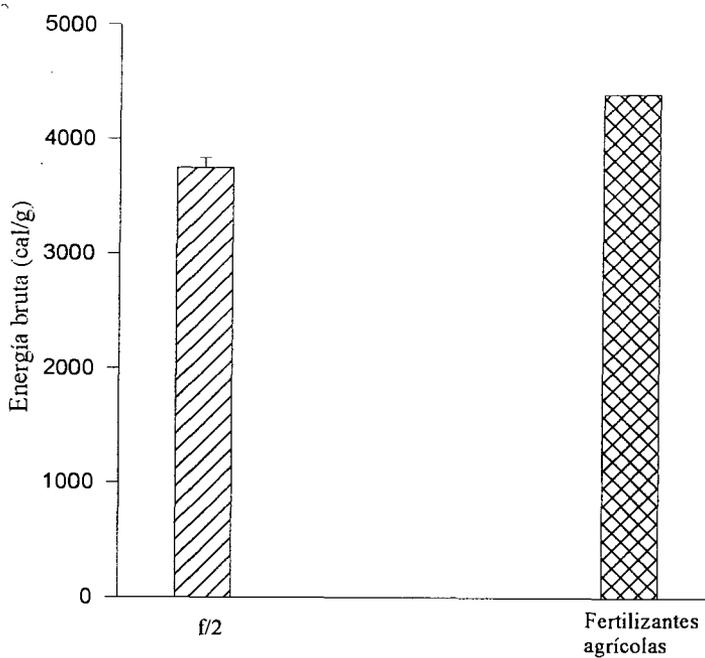
Los resultados de energía bruta encontrados para *Navicula incerta*, *Nitzschia commutata* y *Tetraselmis gracilis*, se presentan en las figuras 10, 11 y 12, cuadro VII. Durante el experimento el contenido calórico para *Navicula incerta*, *Nitzschia commutata* en cultivos con medio f/2, fue menor (3779 y 3981 cal/g) que aquellos valores obtenidos al usar fertilizantes agrícolas (4386 y 4111 cal/g). En cambio en cultivos de *Tetraselmis gracilis* se obtuvieron resultados similares (3779 y 3392 cal/g) al usar medio f/2 y fertilizantes agrícolas (cuadro VII).

La Razón Proteína:Energía (P:E) en el séptimo día de cultivo para *Navicula incerta*, *Nitzschia commutata* y *Tetraselmis gracilis* se indican en el cuadro VII. Se manifiestan resultados similares para la razón Proteína:Energía en ambos medios para *N. incerta* (78.06 y 78.89 mg prot/Kcal) y en *N. commutata* (87.42 y 83.15 mg prot/Kcal). En cambio, los resultados de *Tetraselmis gracilis*, fueron de 72.74 y 89.32 mg prot/Kcal para medio f/2 y fertilizantes agrícolas, respectivamente.

Con respecto a las cenizas, los valores encontrados para *Navicula incerta* se ubican entre 48.28 y 46.25% para medio f/2 y fertilizantes agrícolas. Como resultado del cultivo de *Nitzschia commutata* esta especie generó un 54.69 y 59.41 % de cenizas producto de su crecimiento en medio f/2 y fertilizantes agrícolas, y para *Tetraselmis gracilis*, se registraron 56.75 y 55.49 % de cenizas para medio f/2 y fertilizante agrícolas, respectivamente (cuadro VII).

Cuadro VII.- Contenido promedio de energía bruta, razón Proteína:Energía, y cenizas para *Navicula incerta*, *Nitzschia commutata* y *Tetraselmis gracilis*, cultivadas en 11 litros con medio f/2 y fertilizantes agrícolas.

Especie	Medio	Energía bruta (cal/g)	Razón (mgprt/Kcla)	P:E	Cenizas
				Error estándar	%
<i>Navicula incerta</i>	f/2.	3779	78.06	31.65	48.28
	Fertilizantes agrícolas	4386	78.89	1.45	46.25
<i>Nitzschia commutata</i>	f/2	3981	87.42	43.50	54.69
	Fertilizantes agrícolas	4111	83.15	23.93	59.41
<i>Tetraselmis gracilis</i>	f/2	3794	72.76	30.98	56.75
	Fertilizantes agrícolas	3392	89.33	53.48	55.49



Séptimo día de cultivo

Figura 10.- Energía bruta obtenida en medio f/2 y fertilizantes agrícolas, para *Navicula incerta*,. La barra vertical indica el error estándar (n=2).

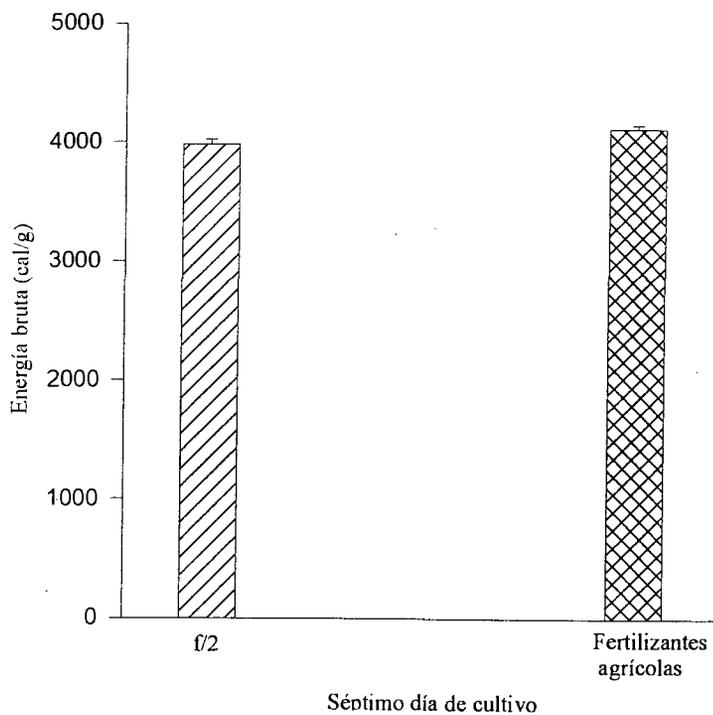


Figura 11.- Energía bruta obtenida en medio f/2 y fertilizantes agrícolas para *Nitzschia commutata*. La barra vertical indica el error estándar (n =2).

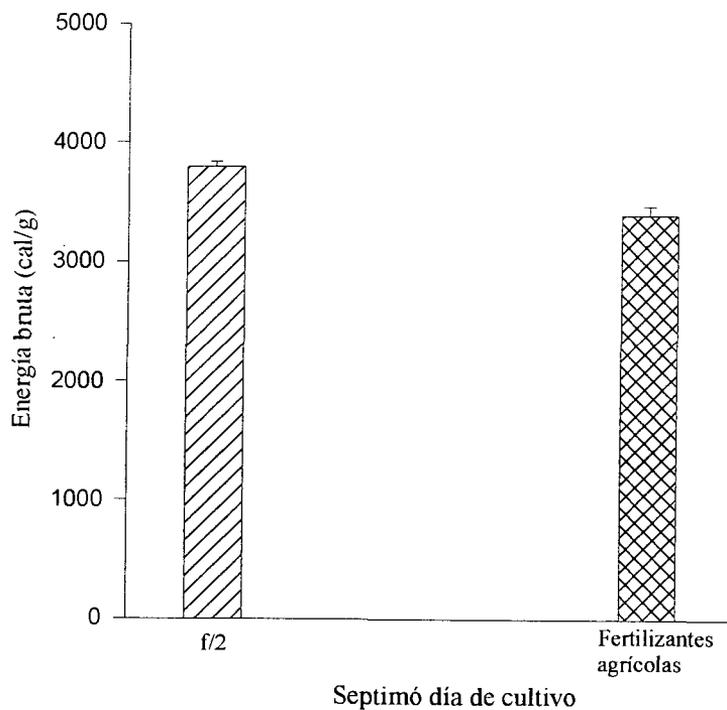


Figura 12.- Energía bruta obtenida en medio f/2 y fertilizantes agrícolas, para *Tetraselmis gracilis*. La barra vertical indica el error estándar (n=2).

VIII.- DISCUSIÓN

VIII.1- Generalidades.

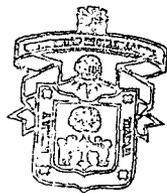
Entre los principales factores que influyen en la calidad y la cantidad celular de las microalgas, figuran la irradiancia, la temperatura y la limitación de nutrientes, (Sigmon y Cahoon, 1997; Sommer, 1997). Siendo el origen y la concentración de nutrientes en el medio de cultivo factores que influyen directamente en el crecimiento, composición celular, contenido de clorofila, así como en el rendimiento final (Whyte, 1987; Valenzuela-Espinoza, 1997; Gracida-Valdepeña, 1999).

La temperatura establecida en el presente trabajo ($19\pm 1^\circ$ C), se ubica en el promedio que ha sido reportada como óptima para los géneros de *Navicula* y *Nitzschia* (Flores-Vergara, 1998; Simental-Trinidad, 1999; Rojo-Salazar, 2002).

En relación a la irradiancia, se ha documentado que las diatomeas bentónicas crecen en un amplio espectro de luz (Kawamura y Hirano, 1992; Simental-Trinidad, 1999; Correa-Reyes *et al.*, 2001). Sin embargo, en la continua

producción de biomasa pudieron haber modificado la irradiancia al interior de los cultivos.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

VIII.2.- Crecimiento algal.

En el crecimiento de las tres especies de microalgas cultivadas no se registraron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) (cuadro IV) en las densidades celulares obtenidas con el medio f/2 y fertilizantes agrícolas. Lo cual indica que los fertilizantes agrícolas no influyen de forma negativa en la tasa de crecimiento de las diferentes especies. El crecimiento de las microalgas durante el tiempo de cultivo muestran dos fases: la fase de retardado o lag y exponencial (figuras 1, 2 y 3). En la fase de crecimiento exponencial se observó que las células se duplican progresivamente debido a que las condiciones de cultivo y nutrientes disueltos en el medio son óptimos, en esta fase fue donde se registró la mayor tasa de crecimiento específica (μ), divisiones día (D). Concentraciones similares fueron encontradas durante los 7 días de cultivo en cada una de las especies (cuadros I, II y III).

Otra consideración importante en el presente estudio es el tipo de recipiente para el cultivo de microalgas, que en particular, se llevó a cabo en recipientes con fondo y paredes rectangulares transparentes. Éstos proporcionan una mayor área disponible para el crecimiento celular y menor columna

de agua, lo cual permitió obtener concentraciones celulares superiores a las reportadas en unidades de cultivo cilíndricas, las que proporcionan mayor volumen y menor superficie para el crecimiento de diatomeas bentónicas (Flores-Vergara, 1998; Simental-Trinidad, 1999; 2001; Correa-Reyes, *et al.*, 2001; Carbajal-Miranda, 2002). En los estudios arriba citados se obtuvieron tasas de crecimiento específica (μ), divisiones día (D) similares. Sin embargo, en lo referente a la densidad celular son menores a los encontrados en el presente trabajo, esto puede ser debido a que los recipientes utilizados permitían la entrada de luz suficiente para el crecimiento.

Por otra parte, *Tetraselmis gracilis* (cuadro III) presentó una tendencia similar a las diatomeas bentónicas, en donde la densidad celular tanto, en los cultivos en medio f/2 como en fertilizantes agrícolas, no presentó diferencias significativas ($\alpha=0.05$); estos resultados son superiores a las reportadas por Fábregas *et al.*, (1985) Whyte (1987), Herrero *et al.*, (1991), López-Muñoz *et al.*, (1992) y menores a los reportados por Fernández-Reiriz *et al.*, (1989). Con base a estos resultados se cumple con la hipótesis y objetivo inicialmente planteados. Además se comprueba, que el medio constituido por fertilizantes agrícolas, no afecta la tasa de crecimiento para

ninguna de las especies usadas en este estudio. También estos resultados demuestran que mediante el uso de fertilizantes agrícolas se pueden obtener densidades suficientes de microalgas en cortos períodos de tiempo; resultando benéfico para empresas dedicadas a la acuicultura, en las que se necesitan grandes cantidades de biomasa.

VIII.3.-Clorofila *a*.

El contenido total de clorofila *a* (figuras 4, 5 y 6, cuadro IV), presentó una relación lineal con respecto a la densidad celular en todos los tratamientos experimentales. Se considera entonces, que la respuesta en el contenido de clorofila *a* estuvo correlacionada íntimamente con el crecimiento poblacional (figuras 1, 2 y 3; cuadros I, II y III). *Navicula incerta* no mostró diferencias en el contenido de clorofila *a*, las microalgas registraron una mayor cantidad en el medio f/2 (cuadro IV). Estos resultados son menores a los reportados por Simental Trinidad (1999) quien encontró cantidades de 2.72 y 4.42 pg cél⁻¹ utilizando 150 μEm⁻² s⁻¹ tanto para medio f/2 y fertilizantes agrícolas; mientras que Rojo-Salazar (2002) reporta un contenido de 26.2 pg cél⁻¹ quien utiliza 35 μmol quanta m⁻² s⁻¹. Aún con las diferencias en la cantidad de luz utilizada en este trabajo (132 μmol quanta m⁻² s⁻¹), se obtuvieron mayores densidades celulares pero menor contenido de clorofila.

Dichas diferencias en el contenido de clorofila *a* pueden deberse a la cantidad y calidad del inóculo y a la irradiancia. La reducción en el contenido de los pigmentos 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).

Nitzschia commutata mostró diferencias significativas (cuadro IV), ($\alpha=0.05$), en el contenido de este pigmento, en donde las microalgas cultivadas con fertilizantes agrícolas mostraron una mayor cantidad de clorofila *a* en relación a las cultivadas con medio f/2; estos resultados son superiores a los reportados por Simental-Trinidad (1999), quien reporta concentraciones de 3.86 y 3.81 pg de clorofila *a* por millón de células de *Nitzschia lavis* en medio f/2 y fertilizantes agrícolas y para *Nitzschia thermalis* v. *minor* reporta cantidades de 4.35 y 7.24 pg cél de clorofila *a* por millón de células para medio f/2 y fertilizantes agrícolas.

Esta diferencia, con respecto al presente estudio, puede deberse a la concentración y forma química de nutrientes en el medio, los cuales pueden afectar la producción de este pigmento (Whyte, 1987).

Para *Tetraselmis gracilis* se observó una tendencia contraria en su crecimiento, es decir, conforme aumentó la densidad celular disminuyó el contenido de dicho pigmento. Algunos autores mencionan que este comportamiento puede

deberse a la disponibilidad de luz y a la concentración de nutrientes en el medio (Whyte, 1987; Abalde *et al.*, 1995; Simental-Trinidad, 1999). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el contenido de clorofila *a* (figura 6), en medio f/2 y fertilizantes agrícolas. Las microalgas cultivadas en medio f/2 presentaron un contenido de clorofila *a* ligeramente mayor a las cultivadas en fertilizantes agrícolas (cuadro IV). Estos resultados son menores a los reportados por Fábregas *et al.*, (1985), cuyos valores son 3.1 y 3.8 pg/cél respectivamente. De la misma forma, Whyte (1987), encuentra 0.589 µg/ml. 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.

VIII.4. -Carbono:Nitrógeno (C:N) y Calorimetría.

En los cultivos de microalgas es interesante evaluar las razones de consumo entre los nutrientes, Redfield (1963) indica que existe una razón de $C_{106}:N_{16}:P_1$, debido a las grandes variaciones que existen entre las especies, estas proporciones solo sirven de índices aproximados del estado del fitoplancton natural (Darley 1987). El carbono, por célula, muestra varias respuestas a la limitación de N, P y Si; las tendencias generales son la disminución del contenido de proteínas y clorofila por célula y un aumento en el contenido de carbohidratos y lípidos (Lafarga-De la Cruz 2000; Rojo-Salazar, 2002).

Los resultados de razón C:N se muestran en las figuras 7, 8 y 9, (cuadro V). Los valores encontrados en este trabajo son cercanos a los reportados por Geider *et al.*, (2002). La razón C:N varía de 2 a 6. En el presente trabajo se encontró una razón C:N de 5.80 a 7.88 y 5.51 a 7.85 en medio f/2 y fertilizantes agrícolas respectivamente. Este mismo autor afirma que la variabilidad de la composición C:N:P en el fitoplancton puede cambiar debido a la concentración de nitrógeno y fósforo contenido en los reservorios celulares de acumulación de nutrientes o energía de reserva.

La mayor concentración de nitrógeno orgánico está en las proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos y en clorofilas. El contenido promedio de proteínas totales para *N. incerta*, *N. commutata* y *T. gracilis* se presenta figuras 7, 8 y 9 (B), (cuadro VI). En este trabajo se observó un mayor contenido de proteínas en *T. gracilis* (440 y 431 mg/g) el segundo y tercer día, en cambio en *N. incerta* (356 y 352 mg/g) se presentaron al quinto y sexto día, en *N. Commutata* (348 y 350 mg/g) se observó al quinto y séptimo día en fertilizantes agrícolas y medio f/2. Rojo-Salazar (2002) expone que esta diferencia puede explicarse en razón al consumo de nitrato por las especies durante el experimento. En la fase estacionaria disminuyó el consumo, hubo un cambio en la fisiología microalgal, donde las células cambian la ruta de la síntesis de las proteínas por la de carbohidratos y lípidos. El contenido proteico de las microalgas depende de la fuente de carbono y nitrógeno, ya que éstas están constituidas de un 50 a 55 % de carbono y un 5 a 7 % de nitrógeno y son la estructura de las proteínas; esta es una de las principales razones por las que se considera a estos organismos como fuente no convencional de proteína. (Espinoza de los Monteros *et al.*, 1984; Watanabe, 1988).

El rol esencial de las proteínas es el mantenimiento, crecimiento y proporción de energía para reponer en los tejidos (Espinoza de los Monteros *et al.*, 1984; Watanabe, 1988; Abalde *et al.*, 1995; Simental-Trinidad, 1999), las microalgas contienen una fracción de N no proteico, por lo que la mayoría de las dietas formuladas para organismos marinos se basa en la estimación de N total. El desarrollo de un organismo depende del equilibrio en la incorporación de energía con los alimentos, las proteínas y otros componentes esenciales. Los animales necesitan energía, y esta necesidad depende del ciclo biológico en que se encuentren los organismos. Todos los componentes orgánicos de una dieta liberan calor tras una combustión. El contenido de energía bruta de un alimento depende de su composición química, sirviendo para combustión de carbohidratos, proteínas y grasas. Sin embargo, la composición de un alimento influye únicamente sobre el calor de combustión o energía bruta (Espinoza de los Monteros *et al.*, 1984; Watanabe, 1988).

Los resultados obtenidos de cenizas se presentan en el cuadro VII. Es común encontrar altos porcentajes de cenizas en las diatomeas debido a su pared celular compuesta por sílice. Estudios al respecto revelan que las diatomeas

bentónicas del género *Nitzschia* contiene de 28 a 43.8% de cenizas con respecto al peso seco (Flores-Vergara, 1998) y de 23 a 70% (Rojo-Salazar, 2002). Los resultados de cenizas encontrados en este estudio van de 48.28 a 46.25% para *N. incerta*, 54.69 a 59.41 para *N. commutata*, y para *T. gracilis* van de 55.49 a 56.75% en un período de siete días. Tanto el contenido calórico como la razón C:N permiten conocer el estado fisiológico celular del cultivo y mediante su evaluación se pueden establecer criterios de calidad nutricional para la alimentación de estadios larvales y postlarvales de organismos acuáticos.

IX.- CONCLUSIONES

1.- La biomasa microalgal obtenida para *Navícula incerta*, *Nitzschia commutata* y *Tetraselmis gracilis* fue similar en el medio constituido por fertilizantes agrícolas y la producida en medio f/2.

2.- Se obtiene mayor producción cultivando estas especies en recipientes con fondo y paredes rectangulares transparentes.

3.- El contenido de clorofila *a* en el cultivo basado en fertilizantes agrícolas es similar al obtenido en medio f/2, ya que se presentó una relación lineal con respecto a la densidad celular en todos los tratamientos experimentales.

4.- Conforme la concentración celular se incrementó, la razón C:N aumentó en cada condición de cultivo y en cada una de las especies estudiadas.

5.-El contenido calórico para *Navícula incerta*, *Nitzschia commutata* en cultivos con medio f/2, fue menor que aquellos valores obtenidos al usar fertilizantes agrícolas. En cambio en cultivos de *Tetraselmis gracilis* se obtuvieron resultados similares al usar medio f/2 y fertilizantes agrícolas

6.- El costo de producción se reduce al utilizar un medio de cultivo con fertilizantes agrícolas.

X.- RECOMENDACIONES

1.- Se recomienda realizar análisis de nutrientes para conocer si esto influye en la calidad nutricional de *Navicula incerta*, *Nitzschia commutata* y *Tetraselmis gracilis*.

2.- Se recomienda realizar estudios en los cuales se analice la composición proximal de *Navicula incerta*, *Nitzschia commutata* y *Tetraselmis gracilis*, para determinar si el contenido calórico, razón C:N y su valor nutricional varía significativamente en medio f/2 y fertilizantes agrícolas.

XI.- LITERATURA CITADA

- Abalde, J., Cid, A., Fidalgo, P. 1995. Microalgas, cultivos y aplicaciones. Universidad de la Coruña. Casa del Libro. 19-125.
- Brown, M. R., S. W. Jeffrey y C. D. Garland. 1989. Nutricional aspects of microalgae used in mariculture, a literature review. CSIRO Marine Laboratories Report 205.
- Brown, M. R. 1991. The aminoacid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 145: 79-99.
- Carbajal-Miranda, M., J. 2002. Evaluación del crecimiento de poslarvas de abulón rojo *Haliotis rufescens* (Swainson 1822). Utilizando como alimento dietas mono-específicas y mixta de diatomeas bentónicas. Tesis de Maestría. C.I.C.E.S.E. Ensenada, Baja California. 87 pp.
- Castillo-Adame, M. 1990. Cultivo de *Ostrea edulis* L. (Ostión europeo) alimentadas con microalgas producidas en biodigestores de estiércol de vaca y gallina. Tesis Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Marinas. Instituto de Investigaciones Oceanológicas. Ensenada, Baja California. 41 pp.
- Castro-Gálvez, R. 1999. Efecto del ácido Gamma-aminobutírico sobre el asentamiento, sobrevivencia y crecimiento poslarval del abulón azul (*Haliotis fulgens*) cultivado con el método japonés. Tesis Maestría. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Marinas. Instituto de Investigaciones Oceanológicas. Ensenada, Baja California. 45 pp.

- Cordero-Esquivel, B. y D. Voltolina, L. 1994. Growth of *Mytilus galloprovincialis* fed with fould microalgae and to feeding regimes. J. Of the World Aquaculture Society. 25 (3):471-475.
- Correa-Reyes, J., G., Sánchez-Saavedra, M., P., Sequeiros-Beltrones, D., and Flores-Acevedo, N. 2001. Isolation and growth of eight strains of benthic diatoms, cultured under tow light conditions. Journal Shellfish Research, Vol. 20, 2:603-610.
- Coutteau, P., Sorgeloos. 1992. The use of algal substitutes and requeriment for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve mollusc: an international survey. J. Shellfish Res. 11, 631pp.
- Daume, S., Long, B. M., Crouch P. 2003. Changes in amino acid content of an algal feed species (*Navicula* sp.) and their effect on growth and survival of juvenile abalone (*Haliotis rubra*). Journal Applied Phycology. 15: 201-207.
- Darley, M. 1987. Biología de las Algas: Enfoque Fisiológico. Limusa. México. 12-23 pp.
- De la Cruz y Alfonso. 1975 Cultivo masivo de algas planctónicas marinas mediante fertilización. Ciencias. Universidad de la Habana, serie 8 (17) 1-24.
- Dunstan, G. A., J. K Volkman, S. M. Barrett, J. M. Leroi and S. W. Jeffrey. 1994. Essential polynsaturated fatty acids from 14 species of diatom (bacillariophyceae). Phytochemistry. 35: 155-161.
- Espinoza de los Monteros y U. Labarta. 1984. Nutrición en Acuicultura II. Plan de formación de Técnicos Superiores. Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica. 317.

- Fabregas, J., Herrero, C., Cabezas, B., Abalde, J. 1985. Mass culture and biochemical variability of the marine microalga *Tetraselmis suecica* Kylin (Butch) with high nutrient concentrations. *Aquaculture* 49: 231-244.
- Fernández-Reiriz, M. J., Pérez-Camacho, A., Ferreiro, M J., Blanco, J., Planas, M., Campos, M. J., y Labarta, U. 1989. *Aquaculture*. 83: 17-37.
- Flores-Vergara, C. 1998. Crecimiento y composición bioquímica de microalgas bentónicas cultivadas bajo diferentes condiciones de temperatura e intensidad de luz. Tesis de Maestría C.I.C.E.S.E. Baja California. 1-24 pp.
- Flynn, K. J., Garrido, J. L., Zapata, M., Opik, H., Hipkin, C. R. 1992. Changes in fatty acids, amino acids and carbon/nitrogen biomass during nitrogen starvation of ammonium and nitrate grown *Isochrysis galbana*. *Journal of Applied Phycology* 4: 95-104.
- Fonseca-Madrigal, J. 2001. Efecto de seis dietas microalgales en el desarrollo larvario, metamorfosis y obtención de Juveniles del erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus* (STIPSON). Tesis Maestría. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Marinas. Instituto de Investigaciones Oceanológicas. Ensenada, Baja California. 84 pp.
- Geider R. J., La Roche, J. 2002. Redfield revised: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. *Eur. J. Phycol* 37:1-17.
- Gnaider, E. and Bitterlich, G. 1984. Proximate biochemical composition and caloric content calculated from elemental CHN analysis: a stoichiometric concept. *Oceanologia* 62: 289-298.

- Gómez-Montes, L., García-Esquivel, Z., D'Ambramo, L., Shimada, A. Vásquez-Peláez, C., Viana, M. T. 2002. Effect of dietary protein:energy ratio on intake, growth and metabolism of juvenile green abalone *Haliotis fulgens*. *Aquaculture* 1-12.
- Gracida-Valdepeña, M. 1999. "Producción de tres especies de Diatomeas utilizando una mezcla de fertilizante agrícolas". Tesis de Maestría C.I.C.E.S.E. Baja California. 108 pp.
- Guillard R. R. L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine Invertebrate. P.29-60. En: *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Smith, W. L. and M. H. Chanley (Eds). Plenum Publishing Corp., New York, 338 pp.
- Hideki, T., Kawamura, T., Yamashita, Y. 1997. Survival and growth rates of post-larval abalone *Haliotis discus hannai* fed conspecific trail mucus and/or benthic diatom *Cocconeis scutellum* var *parva*. *Aquaculture*. 152:129-138.
- Herrero, C., Cid, A., Fabregas, J., Abalde, J. 1991. Yields in biomass and chemical constituents of four commercially important marine microalgae with different culture media. *Aquacult. Eng.* 10: 99-110.
- Kawamura, T. and Hirano, R. 1992. Seasonal changes in benthic diatom communities colonizing glass slides in Aburatsubo Bay, Japan. *Diatom Research*. Vol. 7 2:227-239.
- Kirk, J.T.O. 1994 *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems*. Second edition Cambridge University Press.
- 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., A. R. Child y A. Janke. 1990. Nutricional value of dried algal diets for larvae of manila clam (*Tapes philippinarum*). J. Mar. Biol. Ass. U. K. 70: 1-12
- Laing, I., y P. F. Millican. 1992. Indoor nursery cultivation of juvenile bivalve mollusc using diets of dried algae. Aquaculture. 102:231-243
- López-Eliás, J. A. 1990. Cultivos semicontinuos de cuatro especies de microalgas con medios simplificados: evaluación de técnicas analíticas y de producción. Tesis de Maestría. C.I.C.E.S.E. Baja California. 163 pp
- López-Eliás, J., Voltolina, D. 1993. Cultivos semicontinuos de 4 especies de microalgas con un medio no convencional. Ciencias Marinas. 15 (1), 73-79.
- 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 Cientifica Compostelana. 3: 59-65.
- Millán-Núñez, R., Álvarez-Borrego, S. 1978. Ecuaciones espectrofotométricas tricomáticas para la determinación de clorofilas a, b, y c y sus feofitinas. Ciencias Marinas. 5(1):47-55.
- Ocampo-Aranda, F., 1990. Efecto de la microalga *Monochrysis lutheri* Cultivada con fertilizantes agrícolas en el crecimiento y sobrevivencia de larvas y postlarvas del mejillón *Mytilus edulis* (L). Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Marinas. Instituto de Investigaciones Oceanológicas. Ensenada, Baja California. 95 pp.

- Peréz-Castañeda, L. A. 1999. Determinación de tasa de pastoreo y crecimiento de postlarvas de adúlón azul, *Haliotis fulgens*, en distintas densidades de la diatomea bentónica *Navicula incerta*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Marinas. Instituto de Investigaciones Oceanológicas. Ensenada, Baja California. 32 pp.
- Pruder, G. D. y Bolton, E. T. 1978. System configuration and performance: Bivalve Molluscan Marine. Proceeding of the Ninth Annual Meeting World Mariculture Society. 747-759.
- Rojó-Salazar, G. 2002. Supervivencia y crecimiento de *Haliotis rufescens* (Swainson, 1822) alimentadas con diatomeas bentónicas. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Marinas. Instituto de Investigaciones Oceanológicas. Ensenada, Baja California. 94 pp.
- Searcy-Bernal, R., Vélez-Espino, L. A., and Anguiano-Beltrán, C. 2001. Effect of biofilm density on grazing and growth rates of *Haliotis fulgens* post-larvae juvenile. Journal of Shellfish Research. Vol. 20 2:587-597.
- Sigmon, D. E. y L. B. Cahoon. 1997. Comparative effects of benthic microalgae and phytoplankton on dissolved silica fluxes. Aquatic Microb. Ecology. 13:275-284.
- Simental-Trinidad, J. 1999. Producción masiva de diatomeas empleando fertilizantes agrícolas y su efecto en la cantidad de biomasa y en la composición proximal. Tesis de Maestría. División Oceanología. Departamento Acuicultura. C.I.C.E.S.E. Ensenada, Baja California, 108 pp.

- Simental-Trinidad, J.A., Sánchez-Saavedra, M., P. y. Correa-Reyes, J. G. 2001. Biochemical composition of benthic marine diatoms using as culture medium a common agricultural fertilizer. *J. Shellfish Res.* 20: 611-617
- Siqueiros-Beltrones, D., S. E. Ibarra-Ovando y M. Pouiman-Tapia. 1991. Composición y estructura de las asociaciones de las diatomeas bentónicas del Estero de Punta Banda en otoño de 1983 y 1996. *Ciencias Marinas*, 17 (1): 119-138.
- Siqueiros-Beltrones, D. 1992. Estudios de las diatomeas bentónicas en litorales de la península de Baja California. *Memorias del IX Simp. Int. Biol. Mar. La Paz, Baja California Sur.* 65-70.
- Sommer, U. 1997. Selectivity of *idothea chelipes* (Crustacea: Isopoda) grazing on benthic microalgae. *Limnol. Oceanogr.* 42(7):1622-1628.
- 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 Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Marinas. Instituto de Investigaciones Oceanológicas. Ensenada, Baja California. 51 pp.
- Valenzuela-Espinoza, E., Gendrop-Funes, V., Pérez-Castañeda, R., Wilburn-González, J. 1999. Supervivencia de larvas de *Litopenaus vannamei* (BOONE) alimentadas con *Chaetoceros mullieri* producido con fertilizantes Agrícolas. *Ciencias Marinas* 25 (3): 423-43.
- Valenzuela-Espinoza, E., Millan-Núñez, R., Núñez-Cebrero, F. 1999. "Biomass production and nutrient uptake by *Isochrysis aff. galbana* (Clone T-ISO) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. *Aquacultural Engineering* 20:135-147.

- Voltolina, D. L. 1985. Biomass evaluation in cultures of benthic diatoms: an experimental review of methodology. Coastal Marine Science Laboratory. Internal Manuscript Series Report. 85:4-40 pp
- Watanabe, T. 1988. Fish Nutrition and Mariculture. Department of Aquatic Biosciences. Tokyo University of Fisheries. 233 pp.
- Whyte, J. N. C. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture. *Aquaculture*. 60: 231-241

XII.- APÉNDICES

Cuadro VIII.- Compuestos y concentración de nutrientes para preparar el medio f/2 de Guillard, 1975.

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

*Solo cuando la especie de alga lo necesita

**Para preparar 1 litro de medio

***disolver en 100 ml de agua destilada

Cuadro IX. 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 (%)	Solución Stock Cantidad agregada (g L ⁻¹)	Cantidad agregada (mg L ⁻¹)	Concentración (μM)
Fertimex	NH ₄ NO ₃	35.5	36.8	36.8	882
Subdury	P ₂ O ₅	44.0	5.6	5.6	39.45
KGRO	Fe-EDTA	0.43	5.4	5.4	5.51
KGRO	Fe-NO	5.62	70.7	70.7	1265.8
KGRO	MnSO ₄	0.087	1.09	1.09	8.07
KGRO	ZnSO ₄	0.087	1.9	1.9	6.75
KGRO	CuSO ₄	0.159	2.0	2.0	13.92
KGRO	Sulfuro	3.64	45.84	45.84	1429.6