



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA EN ACUACULTURA



Conocimiento, Desarrollo y Progreso

“Cultivo de *Nannochloropsis* sp con fertilizantes agrícolas y
evaluación de floculados como alimento para *Brachionus*
plicatilis (Müller, 1786)”

Tesis

Que para obtener el título de Licenciado en Biotecnología en Acuicultura

Presenta

Nava Gómez, Beatriz

Ensenada, B. C.

Junio de 2014

“Cultivo de *Nannochloropsis* sp con fertilizantes
agrícolas y evaluación de floculados como alimento
para *Brachionus plicatilis* (Müller, 1786)”

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN
BIOTECNOLOGÍA EN ACUACULTURA

PRESENTA

BEATRIZ NAVA GÓMEZ

APROBADA POR



DIRECTOR DE TESIS

DR. ENRIQUE VALENZUELA ESPINOZA



SINODAL

DR. ROBERTO MILLÁN NÚÑEZ



SINODAL

DR. MARIO ALBERTO GALAVIZ ESPINOZA

RESUMEN

La microalga marina *Nannochloropsis* sp es utilizada en acuicultura como alimento en el cultivo de *Brachionus plicatilis*, debido a su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados como DHA y EPA, que son transferidos al organismo que la consume. En este estudio se llevaron a cabo dos experimentos con el propósito de conocer bajo que concentración de NaOH se recupera la mayor cantidad de biomasa floculada de *Nannochloropsis* sp y evaluar el uso de fertilizantes agrícolas para la producción de microalgas frescas y floculadas como alimento para *Brachionus plicatilis*. En el experimento uno se evaluaron cinco concentraciones de NaOH: 0.5, 1, 2, 3 y 4 N. La solución de NaOH 0.5 N produjo el menor tiempo de floculación (3.5-4.5 min.) y mayor porcentaje de células floculadas. El porcentaje de recuperación de células de *Nannochloropsis* sp de cultivos en medio f/2 fue de 92.65%, mientras que en cultivos con fertilizantes agrícolas fue 79.75%. Para evaluar el efecto del alimento se realizó un segundo experimento, donde se establecieron cinco tratamientos con tres réplicas cada uno, suministrando alimento a *Brachionus plicatilis* con *Nannochloropsis* sp en las siguientes condiciones: Alimento líquido de *Nannochloropsis* sp (f/2) obtenido por cultivo semi-continuo en medio f/2 y fertilizante agrícola (fer), alimento floculado de *Nannochloropsis* sp en medio f/2 (floc f/2) y fertilizante agrícola (floc fer) y pasta de *Nannochloropsis* sp de Reed Mariculture® (pasta). En medio f/2 la máxima densidad celular se obtuvo al séptimo día con valores de $39.6 \pm 2.0 \times 10^6$ cél mL⁻¹ en el nivel garrafón, mientras que en Erlenmeyer y Fernbach se registraron máximos de $29.6 \pm 1.03 \times 10^6$ y $34.2 \pm 1.32 \times 10^6$ cél mL⁻¹ respectivamente. La máxima densidad celular en cultivos con fertilizante agrícola se obtuvo al séptimo día con valores de $50.3 \pm 1.66 \times 10^6$ cél mL⁻¹ en el nivel garrafón, mientras que en Erlenmeyer y Fernbach se registraron máximos de $36.4 \pm 3.42 \times 10^6$ y $47.5 \pm 2.20 \times 10^6$ cél mL⁻¹ respectivamente. La mayor densidad de rotíferos (226 rot/mL) se obtuvo en el tratamiento floc f/2 y el índice de fertilidad más alto con f/2 líquido (1.15 ± 0.18), mientras que los valores menores se obtuvieron con el fer (117 rot/mL; 0.71 ± 0.13). Se concluye que los fertilizantes agrícolas producen mayor densidad celular de *Nannochloropsis* sp que el medio f/2 y son de menor costo. Al usar floculados de cultivos con fertilizantes agrícolas no tuvieron un efecto negativo en la alimentación de *Brachionus plicatilis*. Sin embargo, se observó mayor producción de rotíferos al usar floculados de medio f/2. El uso de fertilizantes agrícolas constituye una alternativa viable para la producción de *Nannochloropsis* sp y su uso en programas comerciales para la producción de rotíferos marinos.

Palabras clave: Floculación, *Nannochloropsis* sp, *Brachionus plicatilis*.

DEDICATORIA

A quien lee este trabajo...

“No te rindas que la vida es eso, continuar el viaje,
perseguir tus sueños, destrabar el tiempo, correr los
escombros y destapar el cielo”

M. Benedetti

AGRADECIMIENTOS

Quiero darle gracias a Dios, por permitirme llevar esta vida repleta de aprendizajes, rodeada de personas y experiencias hermosas. Gracias por ponerme en el lugar y momento correctos siempre.

A la Universidad Autónoma de Baja California y a la Facultad de Ciencias Marinas, por los profesores que me transmitieron sus conocimientos, y por formarme como profesionista con valores firmes y metas claras.

Al Instituto de Investigaciones Oceanológicas, por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo dentro de sus instalaciones.

Al Dr. Enrique Valenzuela Espinoza, por ser mi director de tesis, por ser “el profe” que me brindó su confianza, me permitió desarrollarme profesionalmente en su laboratorio, creyó en mí y en mi capacidad para lograr lo que quiero. Gracias por despertarme interés en hacer ciencia, con la misma entrega con la que usted realiza su trabajo y por ayudarme a cumplir esta meta.

Al comité de tesis: el Dr. Roberto Millán Núñez y el Dr. Mario Alberto Galaviz Espinoza, por sus consejos, confianza, críticas objetivas y recomendaciones, que contribuyeron y ayudaron a mejorar este trabajo.

A mis padres, Beatriz Gómez G. y Gabriel Nava O., porque son el mejor ejemplo de perseverancia, responsabilidad y amor que se puede tener. Gracias por el apoyo, sus sacrificios, consejos y regaños. Por creer en mí. Los amo.

A mis hermanos Gabo y Rafa, porque después de mis padres ustedes dos son las personas más importantes en mi vida. Jamás me cansaré de decirles que son mi preciado tesoro, y es también gracias a ustedes que soy quien soy.

A mi tío Enrique Gómez González, por motivarme a ser la mejor versión de mí y superarme día a día, éste logro también te lo debo a ti.

A toda mi enorme y bella familia, que ha seguido mis pasos muy de cerca. Sé que estarán orgullosos de mí toda la vida, son una bendición más.

A Brenda Bonett y Sofía León, mis lindas amigas, gracias por su cariño, su tiempo, su trabajo, y tantos momentos especiales que compartieron

conmigo. Las adoro greñudas, mil gracias por ayudarme a realizar este trabajo.

Al profesor Filiberto Núñez y a Vincent Montes Orozco por ayudarme de tantas formas diferentes durante todo el tiempo que estuve en el laboratorio de microalgas.

A Ernesto Sampedro, por ser el amigo incondicional y el compañero del alma. Siendo honesta contigo y conmigo, sin ti, este sueño no se habría cumplido.

A mis amigos: Henry Ríos, Irving M. Azuara, M. del Carmen Corral N., Asael Arroyo, Evelyn Torres y Brisa Chávez. Aunque no ayudaron para nada en este trabajo, son una parte MUY importante de mi vida, los quiero muchísimo, para mí son únicos e irremplazables. Siempre los llevo en la mente y el corazón.

A Enrique Valenzuela Wood. Gracias por cambiar mi vida, por darme tanto cariño como te fue posible en tan poco tiempo, y llenar mi corazón de felicidad. A ti, más que por estar presente, te agradezco todo el amor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Arreglo experimental de las unidades de cultivo para la evaluación del rotífero marino <i>Brachionus plicatilis</i>	8
Figura 2.- Densidad celular promedio de <i>Nannochloropsis</i> sp cultivada en medio f/2 en tres niveles de cultivo: Erlenmeyer-150 mL, Fernbach-2 L y garrafón-18 L.	10
Figura 3.- Tasa de crecimiento específica de <i>Nannochloropsis</i> sp cultivada en medio f/2 en Erlenmeyer, Fernbach y garrafón.	11
Figura 4.- Densidad celular promedio de <i>Nannochloropsis</i> sp cultivada en fertilizante agrícola en tres niveles de cultivo: Erlenmeyer-150 mL, Fernbach-2 L y garrafón-18 L.	12
Figura 5.- Tasa de crecimiento específica de <i>Nannochloropsis</i> sp cultivada en fertilizante agrícola en Erlenmeyer, Fernbach y garrafón.	13
Figura 6.- Pruebas de floculación: a) En 10 mL de cultivo con solución de NaOH 0.5, 1, 2, 3 y 4 N; b) En 1 L de cultivo utilizando solución de NaOH 0.5 N, y c) En 18 L cultivo de <i>Nannochloropsis</i> sp realizados en medio f/2 de Guillard y fertilizante agrícola, en tiempo= 0 min (1), tiempo= 15 min (2), y cosecha transcurridos 25 minutos (3).	14

LISTA DE TABLAS

Tabla I.- Diseño experimental.....	7
Tabla II.- Resultados promedio (\pm error estándar) del porcentaje de la biomasa floculada de <i>Nannochloropsis</i> sp en medio f/2 con NaOH 0.5 N: Dónde CTIC= Células Totales Iniciales en Cultivo, CCTF= Cantidad de Células Totales Floculadas, % BF=Porcentaje de Biomasa Floculada, CNF= Células No Floculadas, % BNF= Porcentaje de Biomasa No Floculada, y VFF= Volumen Final de Floculado (L).	16
Tabla III.- Resultados promedio (\pm error estándar) del porcentaje de la biomasa floculada de <i>Nannochloropsis</i> sp cultivada en fertilizante agrícola con NaOH 0.5 N: Dónde CTIC= Células Totales Iniciales en Cultivo, CCTF= Cantidad de Células Totales Floculadas, % BF=Porcentaje de Biomasa Floculada, CNF= Células No Floculadas, % BNF= Porcentaje de Biomasa No Floculada, y VFF= Volumen Final de Floculado (L).	16
Tabla IV.- Densidad promedio de rotíferos cuantificada diariamente (rot/mL) y valores promedio (\pm error estándar) del índice de fertilidad en rotífero marino <i>Brachionus plicatilis</i> durante su evaluación con los cinco tipos de alimento.	18
Tabla V.- Valores promedio (\pm error estándar) de la tasa de fertilidad en rotífero marino <i>Brachionus plicatilis</i> durante su evaluación con los cinco tipos de alimento.....	19
Tabla VI.- Efecto de diferentes tipos de alimento en la tasa de fertilidad, tasa de crecimiento e Índice de fertilidad de <i>Brachionus plicatilis</i> . NS= No significativo; S=	

Significativo, ($\alpha=0.05$).20

Tabla VII.- Resultados de la prueba de comparaciones múltiples (Tukey, $\alpha = 0.05$).22

CONTENIDO

Página

RESUMEN	I
DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABLAS	VI
1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- HIPÓTESIS	2
3.- OBJETIVO GENERAL	3
3.1.- Objetivos específicos	3
4.- MATERIALES Y MÉTODOS	3
4.1.- Cultivo de microalgas	3
4.2.- Ensayos de floculación	6
4.3.- Diseño experimental	7
4.4.- Estimación de parámetros de producción de rotíferos	8
4.5.- Análisis estadístico	9
5.- RESULTADOS	10
5.1.- Cultivo microalgal en nivel Erlenmeyer, Fernbach y Garrafón	10
5.2.- Ensayos de floculación	14
5.3.- Evaluación de los tratamientos de alimento en <i>B. plicatilis</i>	17
6.- DISCUSIÓN	23
6.1.- Cultivo de microalgas	23

6.2.- Floculación de <i>Nannochloropsis</i> sp con NaOH	24
6.3.- Producción de <i>Brachionus plicatilis</i> con <i>Nannochloropsis</i> sp suministrada en distinta presentación	26
7.- CONCLUSIONES	29
8.- REFERENCIAS	30

1.- INTRODUCCIÓN

Las microalgas constituyen el primer alimento para larvas y juveniles de organismos acuícolas en cultivo. Sin embargo, una de las principales limitantes para la producción de alimento vivo es el espacio y tiempo requerido para esta actividad, ya que la producción de fitoplancton a escala comercial requiere grandes volúmenes de agua que demandan espacio y al mismo tiempo incrementan el costo de producción en la industria acuícola en un 30 a 50% (Heasman et al. 2000; Knuckey et al. 2006). En la actualidad, existen alternativas para mejorar el costo de producción, mediante el uso de pastas de microalgas, levaduras y distintos tipos de alimentos micro-particulados, como sustitutos del alimento vivo (Albentosa et al. 2002; Espinosa y Allam, 2006). Aunque estas dietas son formuladas de acuerdo al requerimiento de los organismos, los resultados obtenidos no son comparables con respecto a aquellos donde se utilizan dietas en base a microalgas cultivadas (Knuckey et al. 2006). En la actualidad el uso de floculados de microalgas permiten obtener un rendimiento del 85 al 90% comparado con las dietas de alimento fresco, reduciendo el costo de producción y de mantenimiento (Heasman et al. 2000).

La microalga *Nannochloropsis* sp es una especie nutricionalmente importante en la acuicultura, porque contiene ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's), principalmente ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido araquidónico (ARA) y docosahexaenoico (DHA), los cuales son compuestos orgánicos esenciales en las etapas iniciales del desarrollo de peces marinos. Además, esta microalga es comúnmente utilizada como alimento para rotíferos marinos (*Brachionus plicatilis*)

durante su cultivo. Las particularidades de este organismo son su tamaño (130-300 μm), su alta tasa de reproducción, y que su alimentación la constituyen diversas especies de microalgas y levaduras (James et al. 1983). En la industria acuícola el cultivo de rotíferos se alimenta comúnmente con microalgas frescas, ya que este alimento transfiere energía y nutrientes esenciales (Sukenyk, 1993; Sánchez-Torres et al. 2008), sin embargo alimentos alternativos como pasta de microalgas, polvo seco y polvo liofilizado de microalgas son ampliamente utilizados (Navarro y Sarasquete, 1998), obteniendo los mejores resultados al utilizar alimento en pasta. En este contexto el uso de floculados de *Nannochloropsis* sp constituyen una alternativa a las limitantes de espacio, costos de cultivo, y mantenimiento de microalgas como alimento vivo. Por tanto, en este trabajo se pretende utilizar floculados de *Nannochloropsis* sp como un alimento alternativo para el cultivo y producción de rotíferos marinos. Así como evaluar el efecto del alimento fresco y floculado, producido con fertilizantes agrícolas en la producción del rotífero marino *Brachionus plicatilis*.

2.- HIPÓTESIS

La producción del rotífero marino *Brachionus plicatilis* se incrementará al utilizar floculados de *Nannochloropsis* sp cultivada con fertilizantes agrícolas.

3.- OBJETIVO GENERAL

Conocer bajo qué concentración de hidróxido de sodio se recupera la mayor cantidad de biomasa floculada de *Nannochloropsis* sp y evaluar el uso de fertilizantes agrícolas para producir microalgas frescas y floculadas como alimento para *Brachionus plicatilis*.

3.1.- Objetivos específicos

- Comparar la producción del rotífero marino *Brachionus plicatilis* al ser alimentado con microalgas producidas en medio f/2 y fertilizantes agrícolas.
- Comparar la tasa de fertilidad e índice de fertilidad del rotífero marino *Brachionus plicatilis* al ser alimentado con microalgas floculadas, alimento líquido fresco y pasta de *Nannochloropsis* sp.

4.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.- Cultivo de microalgas

La especie *Nannochloropsis* sp fue proporcionada por la colección de cultivos del Laboratorio de Producción de Alimento Vivo del Instituto de investigaciones Oceanológicas (IIO) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC). Esta especie se mantuvo en medio f/2 de Guillard (1975), y medio enriquecido con fertilizante agrícola, ambos a 19 ± 1 °C. El agua de mar utilizada para el medio fue filtrada a través de una serie de tres filtros tipo Cuno de 1 μ m y pasada por lámpara de luz ultravioleta modelo H-50. El medio f/2 fue enriquecido adicionando

macronutrientes, micronutrientes y vitaminas. Los macronutrientes a razón de 75 mg L⁻¹ de NaNO₃ y 5 mg L⁻¹ NaH₂PO₄. Los micronutrientes en las siguientes concentraciones: C₁₀H₁₂FeN₂NaO₈ 5 mg L⁻¹, CuSO₄•5H₂O 0.01 mg L⁻¹, ZnSO₄•7H₂O 0.022 mg L⁻¹, CoCl₂•6H₂O 0.01 mg L⁻¹, MnCl₂•4H₂O 0.18 mg L⁻¹, Na₂MoO₄•2H₂O 0.006 mg L⁻¹. Las vitaminas Cianocobalamina 0.5 µg L⁻¹, Biotina 0.5 µg L⁻¹ y Tiamina-HCl 0.1 mg L⁻¹. Esta cantidad de nutrientes se utilizó para preparar un litro de agua de mar. El medio con fertilizantes agrícolas se constituyó por 882 µM de N-NH₄NO₃, 39.45 µM de P-P₂O₅, 15.51 µM de Fe-EDTA, 8.07 µM de MnSO₄, 6.75 µM de ZnSO₄, 13.92 µM de CuSO₄, 0.5 µg L⁻¹ de Biotina, 0.5 µg L⁻¹ de B₁₂ y 0.1 mg L⁻¹ de Tiamina-HCl (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 1999).

Durante siete días de experimentación se determinó la densidad celular de los cultivos realizados en volúmenes de 0.150, 2, y 18 L, utilizando una cámara Neubauer de 0.1 mm de profundidad bajo un microscopio Carl Zeiss con contraste de fases, en todos los casos por triplicado. Los dos primeros niveles de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121 °C, 15 libras por pulgada² de presión durante 15 minutos. Después, los medios esterilizados se dejaron enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se agregaron vitaminas estériles en condiciones controladas. Los cultivos en Erlenmeyer recibieron un inóculo de 2 mL de *Nannochloropsis* sp. Los cultivos permanecieron en crecimiento en irradiación fotosintéticamente activa de 95 µmol quanta m⁻² s⁻¹ suministrada por lámparas fluorescentes Osram de 75 W.

Posteriormente, la evaluación de los cultivos continuó en contenedores Fernbach, que fueron preparados con 1.85 L de medio de cultivo, y esterilizados siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. A cada Fernbach se le

adicionaron 2 mL de vitaminas estériles y 150 mL del inóculo con densidad conocida obtenido del nivel Erlenmeyer en condiciones asépticas. Los cultivos en Fernbach se expusieron a $150 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ suministrada por lámparas fluorescentes Osram de 75 W. Además, muestras diarias ($n=3$) de 1 mL fueron cuantificadas como se menciona arriba. La biomasa que se obtuvo en Fernbach, se usó como inóculo para el cultivo en garrafón (18 L). Previo a la inoculación de *Nannochloropsis* sp en garrafón, el agua de mar fue pasada por radiación con lámpara ultravioleta de 25 W, tratada con hipoclorito de sodio y tiosulfato de sodio, para lo cual se prepararon soluciones de hipoclorito de sodio (416 mL de NaOCl al 6% aforado a 1 L con agua destilada) y tiosulfato de sodio (248.1 g aforado a 1 L con agua destilada), de la solución de hipoclorito de sodio se añadieron 0.25 mL L^{-1} al garrafón aforado con agua de mar y reposó por 24 horas; posteriormente, el cloro se neutralizó agregando 0.1 mL de tiosulfato de sodio por litro de agua de mar. Finalmente, se introdujo aireación por dos horas para completar la reacción. Los nutrientes se adicionaron a razón de 1 ml L^{-1} a cada una de las unidades experimentales en garrafón y recibieron un inóculo de 2 L. Las condiciones del cultivo en este volumen en cuanto a temperatura fue de $19 \pm 1^\circ\text{C}$, el flujo de aire de 5 L min^{-1} , y adición puntual de CO_2 por la mañana y por la tarde a razón de 5 L min^{-1} con irradianza de $300 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ suministrada por cuatro lámparas fluorescentes de 75 W. Los cultivos fueron evaluados durante 7 días, y cuantificados como se indica arriba. El pH se registró antes y después de adicionar CO_2 . De los datos de densidad celular se obtuvo la tasa de crecimiento específica (μ) de *Nannochloropsis* sp con base a la siguiente expresión:

$$\mu = \text{Ln} (C_2) - \text{Ln} (C_1) / t_2 - t_1$$

Donde C_1 y C_2 son la concentración celular inicial y final, y t_1 y t_2 son el tiempo inicial y final, respectivamente.

4.2.- Ensayos de floculación:

Se prepararon cinco soluciones de NaOH con normalidad 0.5, 1, 2, 3 y 4. Para conocer cual normalidad provocaría la mayor floculación de microalgas, se realizaron pruebas en tubos de ensayo en 10 mL de cultivo con densidad celular conocida, añadiendo la solución de NaOH por goteo. Se observó la reacción y se registró el tiempo de sedimentación. Después se eligieron las soluciones con mejor resultado para realizar bioensayos en 1 L de cultivo de *Nannochloropsis* sp. De estos ensayos la concentración que resultó en menor tiempo de floculación y mayor biomasa floculada fue utilizada para el bioensayo final, el cual se llevó a cabo en tres unidades de evaluación con volumen de 18 L (n=3).

Para la floculación y recuperación de la biomasa de *Nannochloropsis* sp se agitó vigorosamente el cultivo y se adicionó la solución de NaOH, para después invertir la unidad de cultivo y permitir la sedimentación de las células. Para coleccionar el floculado se instaló una llave de paso (Fig. 6). Una vez que finalizó la floculación, se cosechó el volumen floculado, y se le midió el pH con un potenciómetro Orion Star 211. Posteriormente se le adicionó CO_2 para neutralizar el NaOH y ajustar el pH. El floculado se cuantificó en una cámara Neubauer (cél ml^{-1}) para conocer la concentración final de células de *Nannochloropsis* sp.

4.3.- Diseño experimental

El sistema acuícola diseñado para la evaluación experimental constó de 5 tratamientos con 3 réplicas cada uno, suministrando alimento a *Brachionus plicatilis* con *Nannochloropsis* sp en las siguientes condiciones: Alimento líquido de *Nannochloropsis* sp obtenido por cultivo semi-continuo en medio f/2 y fertilizante agrícola, alimento floculado de *Nannochloropsis* sp en medio f/2 y fertilizante agrícola y por último pasta de *Nannochloropsis* sp de Reed Mariculture®. Las unidades de evaluación fueron distribuidas aleatoriamente estableciendo el orden por medio de un programa de cómputo (Figura 1). La temperatura del medio en el que se mantuvieron los rotíferos fue monitoreada diariamente (25 ± 1 °C; 32 ups) y se mantuvieron con aireación constante. Se alimentó a razón de 150×10^3 células por rotífero por día en cada unidad de evaluación (Tamaru et al. 1991).

Tabla I.- Diseño experimental






Ensayos experimentales				
Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4	Tratamiento 5
Cultivo líquido de <i>Nannochloropsis</i> sp. en medio f/2	Cultivo líquido de <i>Nannochloropsis</i> sp. en fertilizante	Floculado de <i>Nannochloropsis</i> sp. en medio f/2	Floculado de <i>Nannochloropsis</i> sp. en fertilizante	Pasta de <i>Nannochloropsis</i> sp. Reed Mariculture®
				
Con 3 unidades de evaluación.	Con 3 unidades de evaluación.	Con 3 unidades de evaluación.	Con 3 unidades de evaluación.	Con 3 unidades de evaluación.



Figura 1.- Arreglo experimental de las unidades de cultivo para la evaluación del rotífero marino *Brachionus plicatilis*.

4.4.- Estimación de parámetros de producción de rotíferos:

Se determinó el índice de fertilidad (razón entre el número de huevos observados y el total de rotíferos observados en la muestra) y la tasa de fertilidad (Razón de hembras ovadas y el número total de organismos en la muestra). Se utilizaron como un indicador de la calidad nutricional del alimento procedente de cada uno de los tratamientos.

Índice de fertilidad (fecundidad):

$$IF = DH/DR$$

Donde DH es igual a la densidad de huevos y DR es igual a la densidad de rotíferos en la muestra.

Tasa de fertilidad (reproducción):

$$PH = NR_h \times 100 / TR$$

Donde PH es la producción de huevos, NR_h es el número de rotíferos con huevos y TR es el número total de rotíferos en la muestra.

Tasa de crecimiento poblacional:

$$TC = (\ln N_t - \ln N_0) / t$$

Donde $\ln N_t$ es la densidad de rotíferos ($\text{indiv}/\text{mL}^{-1}$) al tiempo t , $\ln N_0$ densidad inicial de rotíferos ($\text{indiv}/\text{mL}^{-1}$) y t el periodo de cultivo (días).

4.5.- Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza de una vía para conocer el efecto de los distintos tratamientos de alimentación. Cuando hubo diferencias significativas entre en los distintos tratamientos se realizó una prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($\alpha = 0.05$). Los análisis estadísticos se realizaron mediante el paquete Statistica versión 7.

5.-RESULTADOS

5.1.- Cultivo microalgal en nivel Erlenmeyer, Fernbach y Garrafón.

El crecimiento promedio de *Nannochloropsis* sp cultivada en medio f/2 de Guillard, en los distintos niveles de cultivo se muestra en la figura 2. El número de células iniciales en el nivel Erlenmeyer, Fernbach y garrafón fueron: $1.24 \pm 0.09 \times 10^6$, $2.87 \pm 0.23 \times 10^6$ y $3.09 \pm 0.45 \times 10^6$ células mL⁻¹ respectivamente. A partir de estas concentraciones inició el crecimiento exponencial, con una duración de cuatro días en todos los niveles de cultivo, con tasas de crecimiento promedio de 0.62, 0.48, y 0.72 respectivamente.

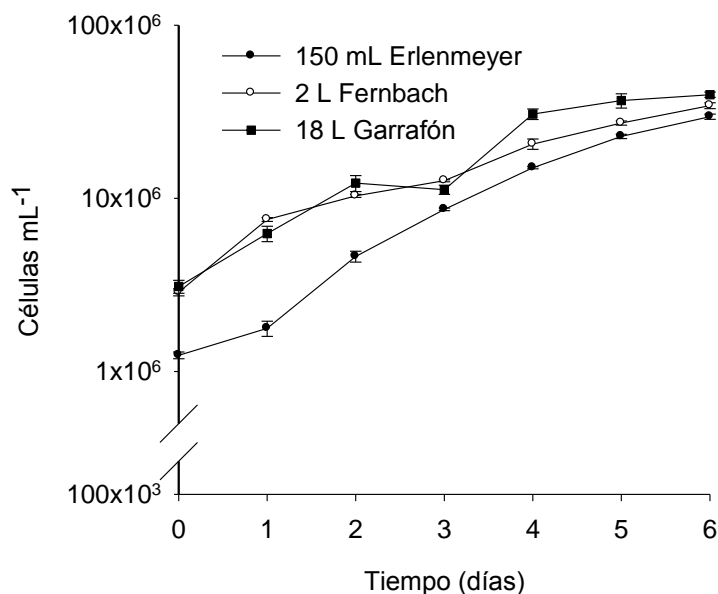


Figura 2.- Densidad celular promedio de *Nannochloropsis* sp cultivada en medio f/2 en niveles de cultivo: Erlenmeyer-150 mL, Fernbach-2 L y garrafón-18 L. La barra vertical indica el error estándar (n=3).

La tasa de crecimiento específica (μ) para cada uno de los niveles de cultivo fue variable y disminuyó conforme transcurrió el tiempo de cultivo (Figura 3). Al quinto día comenzó la fase de lento crecimiento con una disminución en la tasa de crecimiento (Figura 3). La máxima densidad celular se obtuvo al séptimo día con valores de $39.6 \pm 2.0 \times 10^6$ cél mL⁻¹ en el nivel garrafón, mientras que en Erlenmeyer y Fernbach se registraron máximos de $29.6 \pm 1.03 \times 10^6$ y $34.2 \pm 1.32 \times 10^6$ cél mL⁻¹ respectivamente.

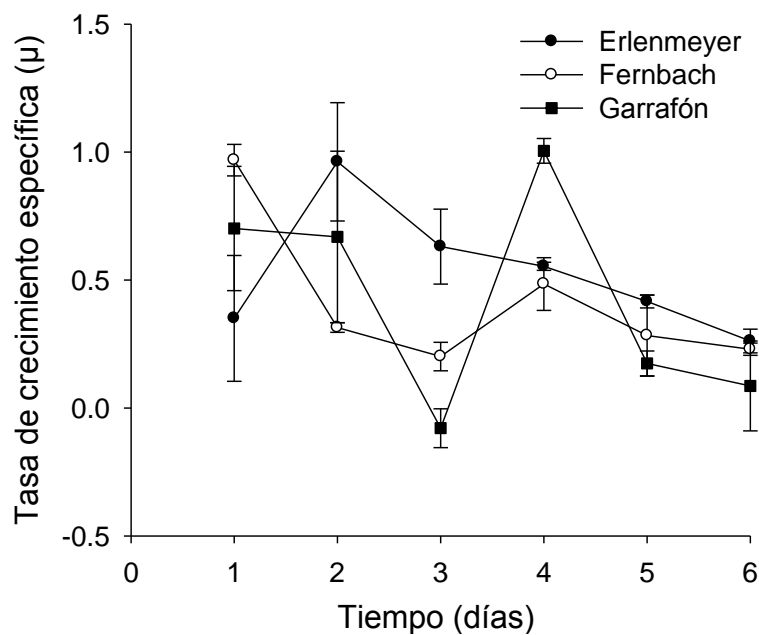


Figura 3.- Tasa de crecimiento específica de *Nannochloropsis* sp cultivada en medio f/2 en Erlenmeyer, Fernbach y garrafón. La barra vertical indica el error estándar (n=3).

El Crecimiento promedio de *Nannochloropsis* sp cultivada en fertilizantes agrícolas en los tres niveles de cultivo se muestra en la Figura 4. El número de células iniciales en el nivel Erlenmeyer, Fernbach y garrafón fueron: $1.08 \pm 0.20 \times 10^6$, $4.35 \pm 0.30 \times 10^6$ y $7.97 \pm 2.01 \times 10^6$ cél mL⁻¹ respectivamente. A partir de estas concentraciones inició el crecimiento exponencial, con una duración de cinco días en todos los niveles de cultivo. Al sexto día de cultivo se observó una disminución del crecimiento celular en los dos primeros niveles de cultivos.

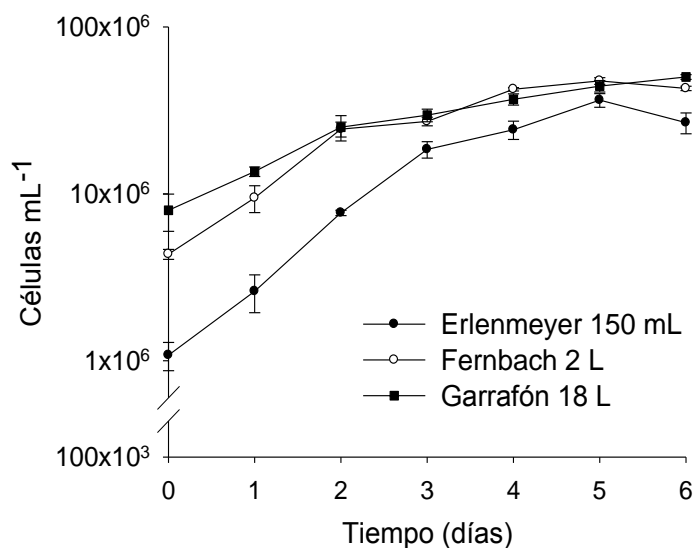


Figura 4.- Densidad celular promedio de *Nannochloropsis* sp cultivada en fertilizante agrícola en tres niveles de cultivo: Erlenmeyer-150 mL, Fernbach-2 L y garrafón-18 L. La barra vertical indica el error estándar (n=3).

En la figura 5 se observa que la tasa de crecimiento específica (μ) para cada uno de los niveles de cultivo disminuyó conforme transcurrió el tiempo de cultivo. Al quinto día comenzó la fase de lento crecimiento con una disminución en la tasa de crecimiento (Fig. 4). La máxima densidad celular en cultivos con fertilizante agrícola se obtuvo al séptimo día con valores de $50.3 \pm 1.66 \times 10^6 \text{ cél mL}^{-1}$ en el nivel garrafón, mientras que en Erlenmeyer y Fernbach se registraron máximos de $36.4 \pm 3.42 \times 10^6$ y $47.5 \pm 2.20 \times 10^6 \text{ cél mL}^{-1}$ respectivamente.

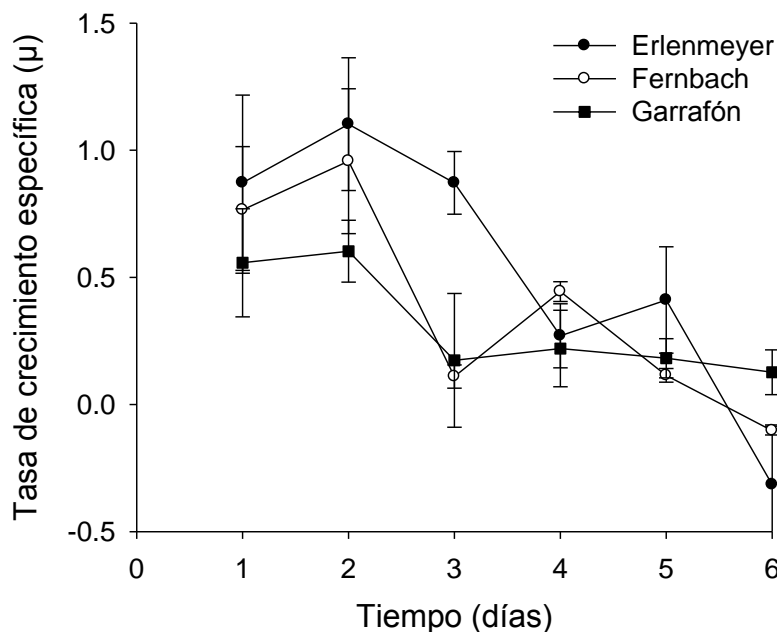


Figura 5.- Tasa de crecimiento específica de *Nannochloropsis* sp cultivada en fertilizante agrícola en Erlenmeyer, Fernbach y garrafón. La barra vertical indica el error estándar (n=3).

5.2.- Ensayos de floculación de *Nannochloropsis* sp.

En estos ensayos se utilizaron cinco concentraciones de NaOH: 0.5, 1, 2, 3 y 4 N. Las últimas 4 concentraciones fueron descartadas debido a que los resultados obtenidos en volumen de 10 ml mostraron mayor tiempo de floculación (tiempo > 5 min), y mayor cantidad de células no floculadas. En cambio al utilizar la solución de NaOH 0.5 N se produjo el menor tiempo de floculación (3.5-4.5 min.) y el mayor porcentaje de células floculadas (Figura 6).

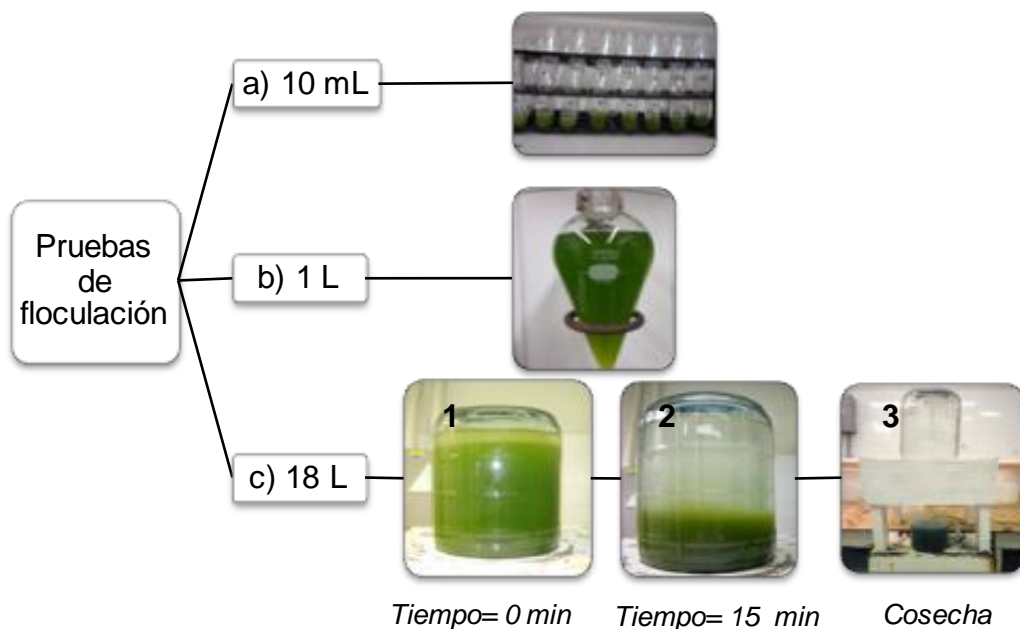


Figura 6.- Pruebas de floculación: a) En 10 mL de cultivo con solución de NaOH 0.5, 1, 2, 3 y 4 N; b) En 1 L de cultivo utilizando solución de NaOH 0.5 N, y c) En 18 L cultivo de *Nannochloropsis* sp, cultivos realizados en medio f/2 y

fertilizante agrícola, en tiempo= 0 min (1), transcurridos 15 minutos (2), y cosecha de biomasa (3).

En la tabla II y III se muestra el porcentaje de la biomasa floculada y no floculada respectivamente (%BF; %BNF). El volumen final floculado (VFF) representó el 13.70% del volumen total inicial del cultivo realizado en medio f/2, con un porcentaje promedio del 92.65% de biomasa floculada (Tabla II), y un tiempo de floculación entre 15 y 20 minutos, mientras que, el cultivo generado con fertilizante agrícola, el VFF representó un 15.55% del volumen total inicial con un porcentaje promedio de 79.75% de biomasa floculada (Tabla III). Además, se observa que el porcentaje de biomasa floculada (%BF) fue un 12.9% mayor en cultivo en medio f/2 con respecto a fertilizantes agrícolas.

La coloración del cultivo se mantuvo en un verde brillante en ambos tipos de alimento, consistencia espesa y olor similar al de un aceite vegetal en ambos tipos de alimento. El pH al cual se logró la floculación varió de 9.74-9.94 y se neutralizó a valores de 6.69 - 7.20 mediante la adición de CO_2 a razón de 5 mL L^{-1} durante 5 minutos.

Tabla II.- Resultados promedio (\pm error estándar) del porcentaje de biomasa floculada de *Nannochloropsis* sp en medio f/2 con NaOH 0.5 N: Dónde CTIC= Células Totales Iniciales en Cultivo, CCTF= Cantidad de Células Totales Floculadas, % BF=Porcentaje de Biomasa Floculada, CNF= Células No Floculadas, % BNF= Porcentaje de Biomasa No Floculada, y VFF= Volumen Final de Floculado (L).

Réplica	CTIC	CCTF	%BF	CNF	% BNF	VFF(L)
1	7.04×10^{11}	6.36×10^{11}	90.36	6.79×10^{10}	9.64	2,300.00
2	7.61×10^{11}	6.97×10^{11}	91.62	6.37×10^{10}	8.38	2,600.00
3	6.77×10^{11}	6.50×10^{11}	95.98	2.73×10^{10}	4.02	2,500.00
Promedio	7.14 ± 0.24	6.61 ± 0.18	$92.65 \pm$	5.30 ± 1.29	$7.35 \pm$	2,466 L
\pm Err. Est.	$\times 10^{11}$	$\times 10^{11}$	1.70	$\times 10^{10}$	1.70	

Tabla III.- Resultados promedio (\pm error estándar) del porcentaje de la biomasa floculada de *Nannochloropsis* sp cultivada en fertilizante agrícola con NaOH 0.5 N: Dónde CTIC= Células Totales Iniciales en Cultivo, CCTF= Cantidad de Células Totales Floculadas, % BF=Porcentaje de Biomasa Floculada, CNF= Células No Floculadas, % BNF= Porcentaje de Biomasa No Floculada, y VFF= Volumen Final de Floculado (L).

Réplica	CTIC	CCTF	%BF	CNF	% BNF	VFF(L)
1	9.24×10^{11}	6.60×10^{11}	71.43	2.64×10^{11}	28.57	2,600.00
2	9.58×10^{11}	8.46×10^{11}	88.31	1.12×10^{11}	11.69	3,100.00
3	9.14×10^{11}	7.26×10^{11}	79.49	1.87×10^{11}	20.51	2,700.00
Promedio	9.32 ± 0.23	7.0 ± 0.94	$79.75 \pm$	1.88 ± 0.76	$20.25 \pm$	2,800 L
\pm Err. Est.	$\times 10^{11}$	$\times 10^{11}$	8.44	$\times 10^{11}$	8.44	

5.3.- Evaluación de los 5 diferentes tratamientos de alimento en *Brachionus plicatilis*.

El índice de fertilidad de *B. plicatilis* permite conocer la producción de huevos en la población que se evalúa. Los valores promedio obtenidos en este estudio del índice de fertilidad de *B. plicatilis* se muestran en la tabla IV, los tratamientos en los que se utilizó alimento líquido (tratamiento *f/2* y *fer*) registraron los valores promedio mayores (1.15 ± 0.18 y 0.71 ± 0.13) en la producción de huevos en el día 4 del cultivo (tabla IV). Mientras que los tratamientos en los que se alimentó con los floculados de *Nannochloropsis* sp, obtenidos a partir de cultivos en medio *f/2* y fertilizantes agrícolas (*floc f/2* y *floc fer*), la mayor producción de huevos de *B. plicatilis* se presentó en el día 5, con índices similares (0.62 ± 0.06 y 0.60 ± 0.22 respectivamente), y valores mínimos de 0.12 ± 0.04 ; 0.08 ± 0.04 fueron observados en el día 3 y 4 para los tratamientos *floc f/2* y *floc fer* (Tabla IV).

El tratamiento en el que se alimentó *B. plicatilis* con pasta de *Nannochloropsis* sp se observó una similitud en el índice de fertilidad durante los primeros cuatro días de evaluación, con valores mínimos de 0.19 y máximos de 0.26 (Tabla IV), para el quinto y sexto día el índice de fertilidad se incrementó a valores de 0.42 ± 0.05 y 0.48 ± 0.04 (Tabla IV), que equivale al doble de la producción de huevos que se obtuvo en el día cuatro (0.21 ± 0.04 ; Tabla IV). Sin embargo, en el séptimo día índice de fertilidad disminuyó a 0.17 ± 0.07 (Tabla IV).

Tabla IV.- Densidad promedio de rotíferos cuantificada diariamente (rot/mL) y valores promedio (\pm error estándar) del índice de fertilidad en rotífero marino *Brachionus plicatilis* durante su evaluación con los cinco tipos de alimento.

Tratamiento	Día						
	1	2	3	4	5	6	7
rot/mL	100	56	32	60	51	182	147
f/2	0.15 \pm 0.06	0.21 \pm 0.00	0.41 \pm 0.01	1.15 \pm 0.18	0.32 \pm 0.09	0.47 \pm 0.09	0.25 \pm 0.10
rot/mL	100	77	41	48	68	119	117
fer	0.24 \pm 0.02	0.20 \pm 0.08	0.40 \pm 0.07	0.71 \pm 0.13	0.33 \pm 0.05	0.52 \pm 0.04	0.50 \pm 0.02
rot/mL	100	82	94	80	103	226	217
floc f/2	0.25 \pm 0.02	0.42 \pm 0.19	0.12 \pm 0.04	0.53 \pm 0.12	0.62 \pm 0.06	0.30 \pm 0.04	0.14 \pm 0.05
rot/mL	100	64	65	62	52	64	86
floc fer	0.26 \pm 0.04	0.39 \pm 0.12	0.10 \pm 0.03	0.08 \pm 0.04	0.60 \pm 0.22	0.40 \pm 0.07	0.26 \pm 0.06
rot/mL	100	52	76	61	59	78	164
pasta	0.19 \pm 0.04	0.25 \pm 0.02	0.26 \pm 0.05	0.21 \pm 0.04	0.42 \pm 0.05	0.48 \pm 0.04	0.17 \pm 0.07

La tasa de fertilidad de *B. plicatilis*, a diferencia del índice de fertilidad, determina la cantidad de huevos producidos por hembra por cada día de cultivo. En los resultados obtenidos, en el cultivo de *B. plicatilis* que recibió alimento fresco de *Nannochloropsis* sp producida en medio f/2 (Tratamiento f/2; Tabla V), generó mayor fertilidad (72.66 \pm 21.59) en el cuarto día de cultivo que el resto de los

tratamientos (Tabla V). La misma tendencia se observó para los tratamientos *fer* y *floc f/2* con valores de 44.90 ± 11.63 y 48.53 ± 8.89 en el cuarto día respectivamente. Asimismo, el índice de fertilidad en los tratamientos *floc fer* y *pasta* en los días 5 y 6 también resultaron similares (46.40 ± 19.57 y 46.79 ± 4.71 respectivamente; Tabla V).

Tabla V.-Valores promedio (\pm error estándar) de la tasa de fertilidad en rotífero marino *Brachionus plicatilis* durante su evaluación con los cinco tipos de alimento.

Tratamiento	Día						
	1	2	3	4	5	6	7
<i>f/2</i>	18.15 \pm 3.03	16.74 \pm 1.02	32.45 \pm 1.22	72.66 \pm 21.59	31.36 \pm 5.64	34.14 \pm 3.21	21.83 \pm 6.56
<i>fer</i>	23.36 \pm 1.86	19.19 \pm 5.38	33.38 \pm 4.80	44.90 \pm 11.63	33.30 \pm 1.94	39.81 \pm 2.38	43.09 \pm 1.15
<i>floc f/2</i>	25.32 \pm 2.30	29.19 \pm 12.38	11.12 \pm 4.04	48.53 \pm 8.89	48.25 \pm 6.20	29.41 \pm 4.64	13.71 \pm 5.18
<i>floc fer</i>	23.90 \pm 5.16	32.98 \pm 5.12	3.63 \pm 2.32	3.88 \pm 3.88	46.40 \pm 19.57	29.04 \pm 5.00	25.09 \pm 6.11
<i>pasta</i>	18.55 \pm 3.15	24.74 \pm 1.92	22.04 \pm 2.76	19.70 \pm 4.68	45.62 \pm 2.95	46.79 \pm 4.71	17.32 \pm 6.56

El análisis de varianza de una vía que se muestran en la tabla VI, resume los resultados del efecto de los cinco tratamientos de alimento sobre la variable dependiente (tasa de fertilidad, tasa de crecimiento poblacional e índice de fertilidad) en el cultivo del rotífero marino *Brachionus plicatilis*.

Tabla VI.- Efecto de diferentes tipos de alimento en la tasa de fertilidad, tasa de crecimiento e Índice de fertilidad de *Brachionus plicatilis*. NS= No significativo; S= Significativo, ($\alpha=0.05$).

Día	d.f. error= 10									
	Índice de fertilidad			Tasa de crecimiento		Tasa de fertilidad			P<0.05	
	Valor F	Valor P	p<0.05	Valor F	Valor P	Valor F	Valor P	Valor F	Valor P	P<0.05
1	1.537	0.264	NS	3.201	0.061	NS	1.514	0.27	NS	
2	0.966	0.467	NS	12.554	0.00065	S	1.069	0.421	NS	
3	11.402	0.00096	S	7.194	0.00537	S	15.883	0.00025	S	
4	14.043	0.00041	S	2.703	0.092	NS	4.982	0.01803	S	
5	1.643	0.238	NS	3.995	0.03443	S	0.685	0.617	NS	
6	1.978	0.173	NS	1.2402	0.354	NS	3.344	0.055	NS	
7	4.967	0.01820	S	2.172	0.145	NS	4.309	0.02778	S	

El análisis de varianza mostró que durante los primeros dos días de cultivo se encontraron diferencias significativas solo en la tasa de crecimiento poblacional de *Brachionus plicatilis* ($P<0.001$; Tabla VI). De los resultados de la prueba de comparaciones múltiples, se encontró que hubo diferencias significativas en el índice de fertilidad para los tratamientos *f/2 vs floc f/2*, *f/2 vs floc fer*, *floc fer vs fer* en los días 3 y 4 del cultivo, mientras que, al comparar *floc f/2 vs fer* y *f/2 vs pasta* solo hubo diferencias significativas en el tercer y cuarto día respectivamente ($P<0.05$; Tabla VII). Para el séptimo día solo los tratamientos *floc f/2 vs fer* y *pasta vs fer* fueron significativos ($P<0.05$; Tabla VII).

Al analizar la tasa de crecimiento poblacional de *B. plicatilis* entre los tratamientos *f/2* vs. *floc f/2* y *f/2* vs *pasta*, se observaron diferencias significativas solo en los días 2 y 3 del cultivo (Tabla VII). Así mismo, durante el día 2 hubo diferencias significativas entre los tratamientos *floc f/2* vs *fer*, *pasta* vs *fer* y *floc fer* vs *fer* ($p < 0.05$; Tabla VII). Posteriormente, solo en el día 5 los tratamientos *f/2* vs. *floc fer* fueron significativos ($P < 0.05$; Tabla VII).

Con respecto a la tasa de fertilidad se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en el tercer día de evaluación para: *f/2* vs. *floc f/2*, *f/2* vs *floc fer*, *floc f/2* vs. *fer*, y *floc fer* vs *fer*. Del mismo modo, al comparar *f/2* vs *floc fer* ($P < 0.05$; Tabla VII). Esta misma variable mostró diferencias en el día 4 solo para los tratamientos *f/2* vs *floc fer*. Posteriormente en el día siete se obtuvieron diferencias significativas en los tratamientos *pasta* vs. *fer* y *floc f/2* vs *fer* ($p < 0.05$; Tabla VII).

Tabla VII.- Resultados de la prueba de comparaciones múltiples (Tukey, $\alpha = 0.05$).

Comparación entre Tratamientos	Días							
	1	2	3	4	5	6	7	
	d.f. error= 10 <i>P</i> < 0.05							
Índice de fertilidad	f/2 vs. floc f/2	NS	NS	S	S	NS	NS	NS
	f/2 vs. pasta	NS	NS	NS	S	NS	NS	NS
	f/2 vs. fer	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	f/2 vs. floc fer	NS	NS	S	S	NS	NS	NS
	floc f/2 vs. pasta	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	floc f/2 vs. fer	NS	NS	S	NS	NS	NS	S
	floc f/2 vs. floc fer	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	pasta vs. fer	NS	NS	NS	NS	NS	NS	S
	pasta vs. floc fer	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	floc fer vs. fer	NS	NS	S	S	NS	NS	NS
Tasa de Crecimiento poblacional	f/2 vs. floc f/2	NS	S	S	NS	NS	NS	NS
	f/2 vs. pasta	NS	S	S	NS	NS	NS	NS
	f/2 vs. fer	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	f/2 vs. floc fer	NS	NS	NS	NS	S	NS	NS
	floc f/2 vs. pasta	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	floc f/2 vs. fer	NS	S	NS	NS	NS	NS	NS
	floc f/2 vs. floc fer	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	pasta vs. fer	NS	S	NS	NS	NS	NS	NS
	pasta vs. floc fer	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	floc fer vs. fer	NS	S	NS	NS	NS	NS	NS
Tasa de Fertilidad	f/2 vs. floc f/2	NS	NS	S	NS	NS	NS	NS
	f/2 vs. pasta	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	f/2 vs. fer	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	f/2 vs. floc fer	NS	NS	S	S	NS	NS	NS
	floc f/2 vs. pasta	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	floc f/2 vs. fer	NS	NS	S	NS	NS	NS	S
	floc f/2 vs. floc fer	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	pasta vs. fer	NS	NS	NS	NS	NS	NS	S
	pasta vs. floc fer	NS	NS	S	NS	NS	NS	NS
	floc fer vs. fer	NS	NS	S	NS	NS	NS	NS

6.- DISCUSIÓN

6.1.- Cultivo de microalgas

La densidad celular promedio de *Nannochloropsis* sp en medio f/2, se incrementó un 13% conforme se realizó el escalamiento de un nivel de cultivo a otro de mayor volumen, sin diferencias significativas ($P < 0.05$) en la densidad celular final entre niveles de cultivo (Figura 2). Sin embargo, al utilizar fertilizantes agrícolas para el cultivo de *Nannochloropsis* sp se observó en la densidad celular final un incremento del 37.67% del nivel Erlenmeyer al nivel Fernbach, y del Fernbach a garrafón un 14.55% (Figura 4). Esto demuestra que el uso de fertilizantes agrícolas produjo mayor densidad celular que aquella obtenida en el medio f/2. En otros estudios se ha documentado el uso de fertilizantes agrícolas (Valenzuela et al. 1999) y productos de naturaleza zeolítica (Nieves et al. 2000) para el cultivo de microalgas con resultados positivos, lo cual concuerda con lo encontrado en este estudio.

Por otra parte, se observó una variabilidad en la tasa de crecimiento específica de *Nannochloropsis* sp, tanto en medio f/2 como en fertilizantes agrícolas (Figuras 3 y 5), con una disminución respecto al tiempo de cultivo. Observaciones similares han sido hechas por Rocha et al. (2003), quien evaluó aspectos importantes en el crecimiento de *Nannochloropsis gaditana*, mostrando que al igual que otras especies en la naturaleza, la tasa de crecimiento de la microalga se modifica por el medio de cultivo, el cual no se mantiene constante, debido a factores como la temperatura e irradianza que influyen directa o indirectamente en la división celular de la microalga. Del mismo modo, estudios realizados por Goldman et al. (1979) y Clark (2001), indican que la tasa de

crecimiento de fitoplancton en aguas marinas se modifica de acuerdo a factores como tamaño de las células y asimilación de nutrientes en su medio. También, cabe destacar que para la producción de *Nannochloropsis* sp, el costo del medio de cultivo en base a fertilizantes agrícolas resulta ocho veces más económico que el medio f/2 (Valenzuela et al. 1999). En consecuencia el uso de *Nannochloropsis* sp para la producción de rotíferos marinos será de menor costo.

6.2.- Floculación de *Nannochloropsis* sp con NaOH

Al utilizar los concentrados de *Nannochloropsis* sp, uno de los objetivos fue encontrar un alimento alternativo a la microalga cultivada de forma tradicional, que resultara igual de nutritiva como para poder reemplazarla y al mismo tiempo facilitara el trabajo de cultivo de rotíferos, para finalmente compararlos entre sí y contrastarlo junto a otro producto comercial similar (Pasta *Nannochloropsis* sp de Reed Mariculture®). Cuando se introdujo el agente floculante (NaOH 0.5 N) en la suspensión microalgal se produjo un incremento en el pH, que generó el agrupamiento de las células suspendidas creando acumulaciones de mayor tamaño, y como resultado de este proceso, las células agrupadas se acumularon en el fondo, separándolas del medio acuoso que las mantenía suspendidas (Elmaleh et al. 1996). Los resultados de este estudio mostraron que el producto químico que se utilizó puede ser considerado como un agente floculante específico de *Nannochloropsis* sp, ya que produjo una recuperación de células mayores al 90% (tabla II y III). Resultados similares en otras especies de microalgas han sido reportados por Knuckey et al. (2006), usando NaOH combinado con cloruro férrico (FeCl_3) y polielectrolitos. También, Guevara et al.

(2011) documenta que al usar Quitosano en combinación con soluciones de ácido acético y NaOH como co-floculantes, se recupera aproximadamente el 90% de la biomasa microalgal. Sin embargo, el uso de soluciones co-floculantes aumenta el costo y también puede deteriorar la pared celular de las microalgas así como la calidad nutricional de la misma (Zheng et al. 2012). A diferencia de los estudios antes mencionados, en este trabajo no se utilizó ningún agente co-floculante lo cual representa una ventaja en el costo de producción del floculado.

Actualmente el uso de alimentos floculados en la industria acuícola tiene gran importancia, ya que representa menor costo de mantenimiento comparado con alimento fresco (30-40%), y menor costo de producción que los concentrados obtenidos por centrífuga (Knuckey et al. 2006; Poelman et al. 1997). Se han realizado pruebas de floculación para un considerable número de especies de importancia acuícola analizando el valor de pH al cual se presenta la mayor floculación de células microalgales; por ejemplo Guevara et al. (2011) mencionan que *Rhodomonas salina* flocula con pH de 10, *Chaetoceros calcitrans* con pH 10-10.6 (Knuckey et al. 2006), sin embargo, Elmaleh et al. (1996) afirma que la floculación de células tiene lugar en condiciones de pH que van de 9.5 a 12. Estos valores coinciden con los obtenidos en este estudio, ya que la floculación de *Nannochloropsis* sp se presentó al conseguir pH de 9.74-9.94, obteniendo la mayor precipitación de células.

También es importante destacar que, en este estudio se utilizó bióxido de carbono (CO₂) para contrarrestar el efecto de la solución floculante (NaOH 0.5 N), a diferencia de otros trabajos que para neutralizar el efecto del floculante mencionan el uso de soluciones como ácido clorhídrico concentrado (HCl), ácido

sulfúrico (H_2SO_4), o ácido acético con Quitosano (Knuckey et al. 2006; Shelef et al. 1988; Guevara et al. 2011). Debido a que el CO_2 es un ácido de Lewis (Atkins et al. 2012), y al adicionar este gas al floculado, el átomo de carbono del CO_2 acepta un par de electrones del átomo de oxígeno de una molécula de agua, y un protón migra desde el átomo de oxígeno del H_2O a un átomo de oxígeno del CO_2 , en consecuencia se forma una molécula de H_2CO_3 , disminuyendo el pH de la solución floculada, contrarrestando de esta forma el efecto del NaOH, la cual es una solución base, logrando así que el floculado se neutralice sin necesidad de añadir alguna solución ácida que pudiera afectar la integridad de *Nannochloropsis* sp, y por tanto su uso como alimento en acuacultura.

6.3.- Producción de *Brachionus plicatilis* con *Nannochloropsis* sp suministrada en distinta presentación

Debido a que los parámetros como el índice de fertilidad, la tasa de crecimiento poblacional, y la tasa de fertilidad engloban valores de fecundidad, supervivencia y tiempo de desarrollo (Malekzadeh-Viayeh et al. 2010), estas variables fueron evaluadas como indicadores de la calidad nutricional en la reproducción de *B. plicatilis*, tomando en cuenta que, la alimentación es el principal componente dentro del cultivo de rotíferos que afecta de forma directa su tasa de reproducción y la producción de huevos (Srivastava et al. 2006). Debido a esto, las raciones alimenticias fueron calculadas diariamente conforme a la densidad existente (rot/mL) al momento de llevar a cabo el conteo en cada uno de los diferentes tratamientos y sus réplicas. Sin embargo, aunque los huevecillos fueron contabilizados, no se consideraron para el cálculo de la ración alimenticia

(150,000 cél/rot), por tanto, es posible que se generara un déficit de alimento para la nueva población. Comúnmente, el cultivo de rotíferos inicia con una cantidad determinada de alimento que el organismo consumirá en el transcurso de los días de cultivo. Este modo de alimentación no considera la producción de huevecillos, y conforme el tiempo avanza, la alimentación de los organismos en cultivo suele complementarse con levadura, por lo que es importante considerar tanto la población presente, como la progenie resultante de la reproducción de *B. plicatilis* (Liu y Kelley, 1991).

La mayor densidad promedio de rotíferos por mL de cultivo se obtuvo al sexto día (226 rot/mL) con alimento floculado de *Nannochloropsis* sp cultivada en medio f/2. Los resultados de este estudio son menores que los obtenidos por Guevara et al. (2011) quien reporta para al quinto día de cultivo una densidad de *B. plicatilis* de 362 rot/mL, usando pastas de *Rhodomonas salina*. Sin embargo, el acumulamiento de desechos orgánicos en el cultivo provocó el deterioro de los cultivos posteriormente a que *B. plicatilis* presentara estas densidades. En nuestro estudio, no ocurrió lo antes mencionado al alimentar a *B. plicatilis* con las pastas de *Nannochloropsis* sp. En el caso de tratamientos alimentados con microalga líquida en medio f/2 se registraron 182 rot/mL, en el sexto día de cultivo. Este resultado es 2.8 veces mayor a los obtenidos por Malekzadeh-Viayeh et al. (2010) que alimentó *B. plicatilis* con *Nannochloropsis* sp fresca, y obtuvo densidades de 64 rot/mL. Por otra parte es importante mencionar que el alimento líquido y floculados de *Nannochloropsis* sp producida con fertilizantes agrícolas produjeron menor densidad de rotíferos que el alimento producido con medio f/2, y pasta. Asimismo, el mayor índice de fertilidad en *B. plicatilis* se obtuvo en el cuarto día en

el tratamiento *f/2* líquido, seguido del tratamiento *fer* líquido (Tabla IV), traduciéndose estos resultados en un incremento en la densidad poblacional de *B. plicatilis* para el quinto y sexto día de su cultivo (Tabla IV). Hagiwara et al. (2001) menciona que el número de huevos producidos por cada hembra de rotífero es un indicador de las condiciones del cultivo, lo cual puede explicar que al usar microalga líquida en medio *f/2* y fertilizante produjo mejores condiciones para el cultivo de los rotíferos. Por otra parte, se observó que el tratamiento *floc fer*, durante el tercer y cuarto día, presentaron los menores índices de fertilidad, y las menores densidades (Tabla IV). Quizá esto se deba a la baja calidad nutricional de la microalga la cual fue posiblemente modificada durante el proceso de floculación, ya que, los cambios de pH dañan la pared celular y pueden provocar estrés químico en la microalga (Brown et al. 2002).

7.- CONCLUSIONES

- ❖ No hubo diferencias significativas en la tasa de crecimiento de *Nannochloropsis* sp al cultivarla en medio f/2 y fertilizantes agrícolas.
- ❖ Se observó mayor densidad de *Nannochloropsis* sp y menor costo de producción al utilizar fertilizantes agrícolas para el cultivo.
- ❖ La solución de NaOH 0.5 N puede ser usada como floculante para la microalga *Nannochloropsis* sp, con porcentajes de recuperación mayor al 90%.
- ❖ El tratamiento f/2 floculado produjo mayor densidad de *B. plicatilis* por mL de cultivo, seguido del tratamiento *floc f/2*.
- ❖ La mayor tasa de fertilidad y el mayor índice de fertilidad en el cultivo de *Brachionus plicatilis* se obtuvo en el tratamiento f/2 líquido.

8.- REFERENCIAS

- Albentosa, M., A. Pérez-Camacho, M.J. Fernández-Reiriz y U. Labarta. 2002. Wheatgerm flour in diets for Manila clam, *Ruditapes philippinarum* (L.), spat. *Aquaculture* 212:335–345.
- Atkins, y Jones. 2012. Principios de química, *los caminos del descubrimiento*. Tercera edición. Editorial panamericana. Pp 245-247, 990.
- Brown, M. y R. Robert. 2002. Preparation and assessment of microalgal concentrates as feeds for larval and juvenile Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* 207: 289-309.
- Clark D. R. 2001. Growth rate relationship to physiological indices of nutrient status in marine diatoms. Ecology Research Unit. School of Biological Sciences. University of Wales Swansea, Singleton Park. Pp 249-256.
- Elmaleh, S., Yahi, H. y Coma, J. 1996. Suspended solids abatement by pH Increase-upgrading of an oxidation pond effluent. Pergamon, vol 30, No. 10. ELSEVIER. Great Britain.
- Espinosa, E.P. y B. Allam. 2006. Comparative growth and survival of juvenile hard clams, *Mercenaria mercenaria*, fed commercially available diets. *Zoo Biol* 25:503–525.
- Goldman J. C., McCarthy J. J. y Peavey D. G. 1979. Growth rate influence on the chemical composition of phytoplankton in oceanic waters. Macmillian Journals Ltd. Nature publishing group. Vol 279. Massachusetts. Pp 210-215.

- Guevara, M., Bastardo, L., Cortez' R., Arredondo-Vega, B., Romero L. y Gómez, P. 2011. Pastas de *Rhodomonas salina* (Cryptophyta) como alimento para *Brachionus plicatilis* (Rotífera) Rev. biol. trop vol.59 no.4 San José.
- Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. Smith, W.L. and M.H. Chandley (ed.) Culture of marine invertebrates animals. Plenum publishing Corp. New York, pp 29-60.
- Heasman, M., Diemar, J., O'connor, W., Sushames, T. y Foulkes. 2000. Development of extended shelf life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve mollusks- a summary. Aquaculture Research. 2000, 31, 637-659.
- Knukey, R., Brown, M., Robert, R. y Frampton, D. 2006. Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. Aquacultural Engineering, Volume 35, I. 3. 300-325.
- Lee SJ, Kim S-B, Kim J-E, Kwon G-S, Yoon B-D, y Oh H-M. 1998. Effects of harvesting method and growth stage on the flocculation of the green alga *Botryococcus braunii*. Lett Appl Microbiol; 27:14–8.
- Liu, K. K. y Kelley, C. D. 1991. The Oceanic Institute Hatchery Manual Series, Milk Fish (*Chanos chanos*). The oceanic Institute, Center Applied Aquaculture, pp 88.
- Malekzadeh-Viayeh, R., Mohammadi, H., y Banj-Shafiei, A. 2010. Population growth of six Iranian Brachionus Rotifer Strains in Response to Salinity and Food Type. Hydrobiological, N°.95, vol. 6 pp. 461-470.

- Molina Grima, E., y Belarbi, E.H. 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances* 20. 491-515.
- Nieves, M., Voltolina, D., López-Ruiz, J., Cisneros, M. y Piña, P. 2000. Cultivo de microalgas marinas con medios enriquecidos con productos de naturaleza zeolítica. *Hidrobiológica*, Vol. 10, num. 1. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, México. Pp 1-6.
- Orozco-Álvarez, C, García, S. L. y Fernández, L. L. 2010. Ultrafiltración de microalgas. XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Departamento de Bioingeniería, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. IPN. México, D.F.
- Papazi, A., Makridis, P., y Divanach, P., 2009. Harvesting *Chlorella minutissima* using cell coagulants. *Journal of Applied Phycology* 22 (3), 349–355.
- Poelman, E., De Pauw, N., y Jeurissen, B., 1997. Potential of electrolytic flocculation for recovery of micro-algae. *Resources, Conservation and Recycling* 19, 1 10.
- Rocha, J., García, J. y Henriques, M. 2003. Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. *Chemical Engineering EISEVIER*. Department, University of Coimbra, 3030-290 Portugal.
- Sánchez-Torres, H., Juscamaita-Morales, J., Vargas-Cárdenas, J. y Oliveros-Ramos. 2008. Production of the microalgae *Nannochloropsis oculata* (droop) hibberd on media enriched with biological fish ensilage. *Ecología Aplicada*. Departamento Académico de Biología, Universidad Nacional Agraria, La Molina. Lima, Perú.

- Sandnes J. M., Källqvist T., Wenner D. y Gislerod H. R. 2005. Combined influence of light and temperature on growth rates of *Nannochloropsis oceanica*: linking cellular responses to large-scale biomass production. Norwegian University of Life Sciences (UMB). Journal of Applied Phycology. 17: pp 515-525.
- Shelef, G. y Sukenik, A. 1988. Flocculation of Microalgae with Cationic Polymers (Effect of Medium Salinity). EL SEVIER, Science Publisher Ltd, England. Great Britain. Biomass Vol. 17 (Pp: 65-76).
- Smith, B. y Davis, R. 2011. Sedimentation of algae flocculated using naturally available, magnesium-based flocculants. Department of Chemical and Biological Engineering, University of Colorado, Boulder, CO 80309-0424, United States. Volume 1, Issue 1. Pp: 32-39.
- Srivastava, A., K. Hamre, J. Stoss, R. Chakrabarti y S. K. Tonheim, 2006: Protein content and amino acid composition of the live feed rotifer (*Brachionus plicatilis*): With emphasis on the water soluble fraction. Aquaculture 254: 534–543.
- Tamaru, C. S., C.S. Lee, y H. Ako. 1991. Improving the larval rearing of striped mullet (*Mugil cephalus*) by manipulating quantity and quality of the rotifer, *Brachionus plicatilis*. In W. Fulks and L. Main (Eds.). Rotifer and microalgae system. Proceedings of a U.S.- Asia Workshop, January 28-31. Honolulu, Hawaii. pp. 89-104.
- Valenzuela-Espinoza, E., Millán-Núñez, R., y 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. Aquaculture

engineering (20), ELSEVIER. Instituto de Investigaciones Oceanológicas. Ensenada, Baja California, México. Pp 135-147.

Zheng, H., Gao, Z., Yin, J., Tang, X., Xiaojun, T. y Huang, H. 2012. Harvesting of microalgae by flocculation with poly (γ -glutamic acid). Bioresource Technology (112) EL SEVIER. Satate Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering. Republic of China. Pp 212-220.