



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS BIOTECNOLOGÍA EN ACUACULTURA

**“Determinación de peso seco orgánico de microalgas
como requisito básico para alimentar diferentes estadios
de crecimiento de organismos marinos”.**

Tesis para obtener el título de

Licenciado en Biotecnología en Acuicultura

Presenta

Ramses Erick Gaspar Cruz

Ensenada, B. C.

Abril de 2019

**“Determinación de peso seco orgánico de microalgas
como requisito básico para alimentar diferentes estadios
de crecimiento de organismos marinos”.**

Tesis para obtener el título de
Licenciado en Biotecnología en Acuicultura

Presenta
Ramses Erick Gaspar Cruz

Aprobada por:



Dr. Enrique Valenzuela Espinoza



Dr. Juan Gabriel Correa Reyes



M. C. Rosario Jara Montañez

Resumen

Se evaluó el crecimiento y contenido orgánico de las microalgas marinas *Navicula incerta*, *Nannochloropsis* sp y *Rhodomonas* sp. El cultivo de estas especies se llevo a cabo a temperatura controlada de $19 \pm 1^\circ\text{C}$ e irradianza de $300 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Diariamente, por siete días, se tomaron muestras para cuantificar la densidad celular y el contenido orgánico. La densidad celular promedio de *Navicula incerta*, obtenida tanto en medio control (f/2 de Guillard (1975)) como experimental (Mathiesen y Thorner (1966)), solo fue significativa ($T_{\text{calculada}} > T_{\text{crítica}}$) al séptimo día de cultivo, con tasas de crecimiento promedio de 0.58 ± 0.06 y 0.49 ± 0.08 respectivamente. En cambio, la densidad celular promedio obtenida en los cultivos de *Nannochloropsis* sp y *Rhodomonas* sp no mostraron diferencias significativas ($T_{\text{calculada}} < T_{\text{crítica}}$) en ambos tratamientos. El cultivo de *Nannochloropsis* sp registró tasas de crecimiento promedio de 0.47 ± 0.04 en medio f/2 de Guillard (1975) y 0.51 ± 0.04 en medio Mathiesen y Thorner (1966), mientras que el cultivo de *Rhodomonas* sp se obtuvieron valores de 0.52 ± 0.08 en f/2 de Guillard (1975) y 0.51 ± 0.09 en Mathiesen y Thorner (1966). En *Navicula incerta* y *Nannochloropsis* sp se determinó que el contenido orgánico celular fue similar y no se encontraron diferencias significativas en ambos medios de cultivo, en tanto que en *Rhodomonas* sp el contenido orgánico fue mayor y significativamente diferente en el medio experimental, observándose diferencias desde el primer y al cuarto día de cultivo. Estos resultados sugieren que *Navicula incerta* debe ser suministrada como alimento al séptimo día de cultivo, *Nannochloropsis* sp al sexto día de cultivo y *Rhodomonas* sp en los primeros tres días de cultivo, esta última se recomienda sea cultivada con el medio Mathiesen y Thorner (1966) debido a que la concentración de nutrientes afectó significativamente el contenido orgánico celular en esta microalga.

Palabras clave: Cultivo, Microalgas marinas, Peso orgánico, Alimento.

DEDICATORIA

A mis padres, Teresa y Pedro, por su apoyo incondicional.

A mi hermano, Alan, por toda su ayuda cuando la necesite.

A la memoria de mi abuela, Juanita, por todo su cariño.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma de Baja California y al Instituto de Investigaciones Oceanológicas por las facilidades y el apoyo para la realización de este trabajo.

Al Dr. Enrique Valenzuela Espinoza muchas gracias por el apoyo y el tiempo dedicado en la dirección de este trabajo.

A mis sinodales. La M. C. Rosario Jara Montañez y el Dr. Juan Gabriel Correa Reyes, gracias por su apoyo y contribución en la elaboración de mi tesis.

A la M. C. Alejandra Ferreira Arrieta gracias por toda la ayuda durante la realización de la parte experimental de este trabajo.

A mis amigos Yessenia, Fernando, Ary y Linda gracias por su valiosa amistad.

A todas aquellas personas que de alguna u otra manera contribuyeron a la realización de este trabajo, a todos ellos mi reconocimiento.

¡Gracias!

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Densidad celular promedio de *Navicula incerta*, cultivada en 10 L con medio f/2 de Guillard (1975) y medio Mathiesen y Thorner (1966). Las barras verticales indican el error estándar. **11**

Figura 2. Tasa de crecimiento promedio de *Navicula incerta*, cultivada en 10 L con medio f/2 de Guillard (1975) y medio Mathiesen y Thorner (1966). Las barras verticales indican el error estándar. **12**

Figura 3. Producción diaria promedio de *Navicula incerta*, cultivada en 10 L con medio f/2 de Guillard (1975) y medio Mathiesen y Thorner. Las barras verticales indican el error estándar. **13**

Figura 4. Densidad promedio de *Nannochloropsis* sp, cultivada en 18 L con medio f/2 de Guillard (1975) y medio Mathiesen y Thorner (1966). Las barras verticales indican el error estándar. **14**

Figura 5. Tasa de crecimiento promedio de *Nannochloropsis* sp, cultivada en 18 L con medio f/2 de Guillard (1975) y medio Mathiesen y Thorner (1966). Las barras verticales indican el error estándar **15**

Figura 6. Producción celular diaria promedio de *Nannochloropsis* sp, cultivada en 18 L con medio f/2 de Guillard (1975) y medio Mathiesen y Thorner (1966). Las barras verticales indican el error estándar. **16**

Figura 7. Densidad celular promedio de *Rhodomonas* sp, cultivada en 18 L con medio f/2 de Guillard (1975) y medio Mathiesen y Thorner (1966). Las barras verticales indican el error estándar. **17**

Figura 8. Tasa de crecimiento promedio de *Rhodomonas* sp, cultivada en 18 L con medio f/2 de Guillard (1975) y medio Mathiesen y Thorner (1966). Las barras verticales indican el error estándar. **18**

Figura 9. Producción celular diaria promedio de *Rhodomonas* sp, cultivada en 18 L con medio f/2 de Guillard (1975) y medio Mathiesen y Thorner (1966). Las barras verticales indican el error estándar. **19**

Figura 10. Contenido orgánico promedio de *Navicula incerta*, cultivada en 10 L con medio f/2 de Guillard (1975) y medio Mathiesen y Thorner (1966). Las barras verticales indican el error estándar. **21**

Figura 11. Peso orgánico promedio de *Nannochloropsis* sp, cultivada en 18 L con medio f/2 de Guillard (1975) y medio Mathiesen y Thorner (1966). Las barras verticales indican el error estándar. **22**

Figura 12. Contenido orgánico promedio en *Rhodomonas* sp, cultivada en 18 L con medio f/2 de Guillard (1975) y medio Mathiesen y Thorner (1966). Las barras verticales indican el error estándar. **23**

LISTA DE TABLAS

Página

Tabla I. Prueba t de student para muestras independientes con un nivel de confianza del 95%, aplicada a los datos de densidad celular en *Rhodomonas* sp (P<0.05 significativa). **20**

Tabla II. Prueba t de student para muestras independientes con un nivel de confianza del 95%, aplicada a los datos de peso orgánico en *Rhodomonas* sp (P<0.05 significativa). **24**

CONTENIDO

	Página
1. Introducción	1
1.1. Justificación	2
1.2. Biotecnología	2
1.3. Acuicultura	3
2. Hipótesis	5
3. Objetivos	5
3.1. General	5
3.2. Específicos	6
4. Materiales y Métodos	6
4.1. Análisis estadísticos	9
5. Resultados	9
5.1. Variables fisicoquímicas	9
5.2. Cultivo microalgal	10
5.3. Contenido orgánico	20
6. Discusión	24
6.1. Cultivo microalgal	24
6.2. Contenido orgánico	25
7. Conclusiones	27
8. Literatura citada	28

1. Introducción:

Las especies acuáticas que se cultivan, tanto en México como en el mundo, requieren en algún momento de su historia de vida, una alimentación exógena con base a microalgas (Canavate, 2011).

Las microalgas son organismos autótrofos fotosintéticos, que contienen clorofila *a* y pigmentos accesorios fotosintéticos y fotoprotectores. Realizan fotosíntesis mediante la cual liberan oxígeno. Estas al igual que otros organismos como las cianobacterias son el primer alimento vivo disponible en medios acuáticos (Gómez, 2007).

De acuerdo con Graham y Wilcox (2000), los micro-organismos se clasifican en dos grupos: Procariotas y Eucariotas. En el primer grupo se encuentran las Cianofíceas y Proclorófitas. En el segundo las Clorofíceas, Crisofíceas, Haptofíceas, Bacilariofíceas, Pirofíceas, Criptofíceas y Euglenofíceas.

El contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos en las distintas clases de microalgas es variable y depende de la especie, el sistema y las condiciones de cultivo, pero generalmente son una fuente importante de ácidos grasos (González, 2015).

El uso del fitoplancton en la acuicultura ha sido reconocido por su alto valor nutricional debido a que contienen compuestos fitoquímicos como carotenoides y otros tipos de antioxidantes, los cuales son benéficos para los organismos que lo consumen. Pero en los últimos años la biomasa microalgal es utilizada para la producción de biocombustibles y fertilizantes (Espinoza, 2017).

En la actualidad para la producción de fitoplancton en laboratorios se utilizan tanto medios artificiales como medios naturales o enriquecidos para el cultivo de estos organismos (Ponce *et al.* 2012). Para la elaboración de medios artificiales se utilizan sales marinas y agua destilada (las cuales emulan el agua de mar), además de nutrientes, este tipo de medios se utilizan principalmente para estudios de fisiología, pero su desventaja es que no todas las especies de microalgas crecen en él y su costo de elaboración es oneroso (Torretera y Tacon, 1989). En cambio los

medios naturales son los más utilizados en acuicultura para la producción masiva de microalgas, este medio se prepara con soluciones de nutrientes (nitratos, fosfatos, secuestrante, silicatos y vitaminas) los cuales se agregan al agua de mar natural de acuerdo a los requerimientos de cada especie (Ponce *et al.* 2012).

En acuicultura la determinación de la biomasa es de gran importancia, ya que se trata de una variable clave para establecer las tasas de producción, consumo de nutrientes y el cálculo de los balances de masa de cualquier bioproceso. Uno de los métodos más utilizados para su determinación es el gravimétrico (Arnáiz *et al.* 2000). En este, el peso seco total de la biomasa microalgal presente en un cultivo, se determina usando muestras de volumen y concentración celular conocidos, concentrados en filtros de peso seco constante conocidos. La cantidad de biomasa total (orgánica e inorgánica) presente en este cultivo se calcula como la diferencia entre el peso inicial del filtro y el peso final del filtro con la muestra, dividida entre el volumen de la muestra filtrada. Asimismo, el valor dietético de las microalgas depende de la composición y del contenido energético de estas, lo cual a su vez está relacionado con la cantidad de materia orgánica presente en su biomasa (Arredondo-Vega y Voltolina, 2007).

1.1. Justificación

1.2. Biotecnología

La biotecnología se puede definir como un conjunto de herramientas que utiliza a los organismos vivos con el objetivo de obtener o modificar productos, hacer mejoras en plantas o animales, o desarrollar microorganismos para fines determinados (CAR/PL, 2003).

Respecto a las microalgas, la biotecnología se basa en la producción de cultivos masivos de estos organismos, pero también en la recuperación de productos de alto valor a partir de la biomasa generada, identificando cepas de interés para conocer que metabolitos produce y bajo qué condiciones de fotoperiodo, luz, pH y tipo de medio de cultivo son producidos (Bertoldi *et al.* 2008). Asimismo, los procesos más atractivos en investigación sobre algas son la extracción de ácidos grasos y su transformación para combustibles (Vieira y De

Morais, 2011).

Por otra parte, los pigmentos son productos presentes en la biomasa de las microalgas, entre ellos, las clorofilas son moléculas que se generan en estos microorganismos (Streit *et al.* 2015). Becker (1994) menciona que la clorofila representa del 0.50 al 1.50 % del peso seco de la biomasa microalgal. Por su parte Pastuzo (2016) menciona que *Dunaliella cf. viridis*, tiene una concentración máxima de clorofila de 10.02 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ y 4.95 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de carotenoides, cuando es cultivada con el medio Jhonson modificado, mientras que al cultivarla con un medio a base de fertilizante agrícola F1 los niveles de clorofila y carotenoides son menores: 7.34 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ y 3.84 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente.

Pigmentos como los carotenoides se encuentran en las membranas tilacoidales de los cloroplastos en las microalgas, tanto en el interior como fuera de los cuerpos lipídicos (Bidigare *et al.* 1993). De los 600 carotenoides conocidos solo unos pocos tienen uso comercial, entre ellos se encuentran: beta-caroteno, licopeno, astaxantina, cantaxantina, criptoxantina, zeaxantina y luteína. Estos tienen distintas aplicaciones comerciales, entre las que destacan los: colorantes de alimentos; aditivos para incrementar la pigmentación en pollos, huevos, salmónidos y crustáceos; y para aumentar la fertilidad en el ganado (Harvey, 1988).

El éxito de la biotecnología de microalgas depende en gran medida de la elección adecuada de la microalga, la cual debe tener propiedades relevantes para realizar cultivos y así obtener productos específicos de alto valor agregado (Pulz y Gross, 2004).

1.3. Acuicultura

En la acuicultura las microalgas han servido de alimento de una gran cantidad de organismos de diferentes grupos taxonómicos. En la producción de moluscos bivalvos, el suministro de microalgas es total, ya que estos organismos se alimentan exclusivamente del fitoplancton durante todo su historia de vida, en cambio el uso de microalgas para la producción de peces marinos está limitada al inicio de la ontogenia de estos (Canavate, 2011).

En el caso de cultivo de crustáceos, específicamente en sus primeras etapas, las microalgas son una importante fuente de alimento vivo, pero igualmente son utilizadas para la producción de rotíferos, copépodos y *Artemia*, mismas que son el alimento de estadios larvarios y juveniles más avanzados de los crustáceos (Ponce *et al.* 2012).

Las microalgas para este estudio fueron seleccionadas por su importancia en la alimentación de organismos marinos. *Rhodomonas* sp es una clase de criptófita utilizada en la acuicultura por su valor nutricional, el cual es capaz de incrementar la tasa de supervivencia de moluscos como *Pecten maximus* (Tremblay *et al.* 2007) y la tasa de crecimiento de juveniles de *Crassostrea gigas* (McCausland *et al.* 1999). *Navicula incerta* al igual que otras diatomeas, ha sido ampliamente utilizada para el suministro de alimento de postlarvas y juveniles de abulón (Correa-Reyes *et al.* 2009) y en etapas postlarvales de erizo y camarón. *Nannochloropsis* sp posee altas concentraciones de ácido eicosapentaenoico (EPA), el cual es un ácido graso esencial que es asimilado por rotíferos marinos durante su alimentación con *Nannochloropsis* sp (Lubzenz, 1987) y transferido a larvas de peces marinos para su desarrollo y crecimiento (Watanabe *et al.* 1983; Skiftesvik *et al.* 2003).

La forma tradicional del uso de microalgas para la alimentación de organismos marinos, es mediante la cantidad de células por unidad de volumen, en el caso de ostiones, su alimentación inicia con el estadio veliger (D), que comprende del primer al sexto día post-eclosión. Como larva D, se le suministran 30×10^3 células por mililitro por día de microalgas. En la segunda y tercera semana de vida, su alimentación cambia a 50×10^3 y 80×10^3 cél·mL⁻¹ de microalgas dos veces por día. A los 21 días de edad, su ración cambia a 100×10^3 cél·mL⁻¹ de microalgas por día (Breese y Malouf, 1975). Con base en estos antecedentes, es necesario cuantificar el peso seco celular y la cantidad de materia orgánica presente en la biomasa microalgal que es usada en la alimentación de los organismos (Helm *et al.* 2006). Una vez que se conoce el peso orgánico celular de la microalga a utilizar como alimento, estas se suministran en raciones peso-especificas del organismo a alimentar. Asimismo, trabajos publicados por Helm *et al.* (2006) proponen que la

ración diaria para la alimentación de bivalvos en acondicionamiento para su reproducción, varía entre el 2% y 4% del peso seco medio de la carne del organismo. Mientras que Kreeger y Langdon (1993) evaluaron las tasas de alimentación de juveniles de mejillones (*Mytilus trossulus*) durante tres semanas con microalgas a diferentes concentraciones de proteínas, suministrando el 27.5% del peso del cuerpo del organismo.

En el caso del cultivo de postlarvas de abulón, aún falta información acerca de la ración alimenticia que satisfaga los requerimientos de alimento de postlarvas en centros acuícolas a nivel comercial (Jara-Montañez, 2012). La determinación de estas raciones peso específicas, adecuadas para cada especie, en sus diferentes estadios de vida, tiene como finalidad proporcionar información acerca del peso seco orgánico de microalgas como requisito básico para alimentar diferentes estadios de crecimiento de organismos marinos. Esto con la idea de incrementar y mejorar el aprovechamiento del alimento consumido por los organismos y evitar la acumulación de residuos orgánicos que se generan, ya que el 50% de los costos de producción son generados por el alimento (García-Ulloa, 2004). De acuerdo a Gómez-Gil *et al.* (2001), la correcta dosificación del alimento mantiene una buena calidad de agua, de lo contrario, el alimento no consumido y las heces, pasan a formar parte del suministro de nutrientes, que al exceder los niveles óptimos propicia el incremento de las comunidades bacterianas en los estanques de cultivo.

2. Hipótesis:

Cambios en la concentración de nutrientes para el cultivo de diferentes especies de microalgas podrían modificar su peso específico en diferentes fases de crecimiento.

3. Objetivos:

3.1. General

Determinar el peso orgánico celular de diferentes especies de microalgas utilizadas en la alimentación de invertebrados marinos de importancia comercial.

3.2. Específicos

Conocer los cambios en la densidad celular de distintas especies de microalgas marinas cultivadas en medio Mathiesen y Thorner (1966) y medio f/2 de Guillard (1975).

Cuantificar el peso orgánico celular de *Rhodomonas* sp, *Nannochloropsis* sp y *Navicula incerta* en diferentes fases de crecimiento con respecto al tiempo de cultivo.

4. Materiales y Métodos:

Las microalgas marinas *Rhodomonas* sp, *Nannochloropsis* sp y *Navicula incerta* se obtuvieron de la colección de cultivos del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California. Estas especies se mantuvieron a temperatura de $19 \pm 1^\circ\text{C}$ en medio f/2 de Guillard (1975), el cual se usó como control en esta investigación.

Se realizó un experimento aleatorizado, el cual consistió de dos tratamientos: medio de cultivo Mathiesen y Thorner (1966) y medio de cultivo f/2 de Guillard (1975) como control; con tres unidades de evaluación por tratamiento y para cada una de las microalgas ensayadas. En cada caso se determinó la densidad celular y el peso orgánico.

La secuencia del cultivo se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Estos se prepararon con 150 mL del medio Mathiesen y Thorner (1966) por triplicado y sus respectivos controles con medio f/2 de Guillard (1975). Los medios se esterilizaron en autoclave a 121°C y 15 libras de presión durante 15 minutos, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y enseguida cada matraz recibió asépticamente 5 mL de la cepa inicial unialgal de *Rhodomonas* sp, *Nannochloropsis* sp y *Navicula incerta*. El tiempo de cultivo en Erlenmeyer fue de 4 días con iluminación continua suministrada por lámparas fluorescentes General Electric, luz de día de 75 W, a una irradianza fotosintéticamente activa de $150 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Biospherical Instruments Inc., modelo QSL-100, sensor de 4π). El siguiente nivel de cultivo se realizó en matraces Fernbach, preparados con 2.3 L del medio

por triplicado y sus respectivos controles, estos se esterilizaron como se mencionó anteriormente. Cada Fernbach recibió 150 mL de inóculo (que se obtuvo de los cultivos en Erlenmeyer) en condiciones asépticas y el tiempo de cultivo fue de 4 días, a una irradianza de $300 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. En el caso de *Navicula incerta* el cultivo se realizó en contenedores de polipropileno de 10 L (en medio Mathiesen y Thorner (1966) y medio f/2 de Guillard (1975), para este nivel de cultivo se utilizó agua de mar filtrada a través de 4 filtros tipo Cuno de $1 \mu\text{m}$ e irradiada con un sistema de luz ultravioleta H-50. Previo al filtrado del agua de mar, se preparó una solución de hipoclorito de sodio con 416 mL aforados a 1 L con agua destilada, de esta solución se utilizaron 0.75 mL por cada litro de agua de mar y se dejó en reposo por 24 horas, al finalizar este tiempo se agregaron 0.3 mL de solución de tiosulfato de sodio por cada litro de agua de mar (248.1 g de tiosulfato de sodio disueltos en 1 L con agua destilada) para neutralizar el cloro. Posteriormente el agua fue aireada por 2 horas para eliminar el cloro residual (Pruder y Bolton, 1978). Finalmente se agregaron los nutrientes del medio Mathiesen y Thorner (1966) a cada una de las unidades experimentales, así como el medio f/2 de Guillard (1975) a cada uno de los controles. Para las unidades experimentales de *Navicula incerta*, recibieron un inóculo de 150 mL de cultivo, el cual fue previamente homogenizado por un periodo de 3 minutos con un sonicador marca Bransonic 12 a una frecuencia de 50-60 Hz.

Para *Rhodomonas* sp, y *Nannochloropsis* sp, el último nivel de cultivo se realizó en garrafones, preparados por triplicado con 18 L del medio y sus respectivos controles, para este nivel de cultivo se utilizó agua de mar filtrada (4 filtros tipo cuno de $1 \mu\text{m}$), la cual se irradió con un sistema de luz ultravioleta H-50. El tratamiento del agua de mar se realizó de igual forma que los contenedores de polipropileno de *N. incerta*. Cada garrafón recibió 2 L de inóculo obtenido de los cultivos en Fernbach y después en condiciones asépticas se agregaron los nutrientes del medio Mathiesen y Thorner (1966) a cada una de las repeticiones, como también a los respectivos controles del medio f/2 de Guillard (1975), y el tiempo de cultivo fue de 7 días, a una irradianza de $300 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Para obtener el peso seco total y el peso seco orgánico se utilizó el método de Sorokin (1973). Para esto se cuantificó diario por 7 días la densidad celular con una cámara Neubauer de 0.1 mm de profundidad, observando mediante un microscopio compuesto (Zeiss), cada muestra en el medio Mathiesen y Thorner (1966) (incluyendo sus réplicas) y sus controles. Los filtros GF/F usados para la determinación de peso seco se lavaron previamente con agua destilada para eliminar impurezas y fueron secados a 60 °C por 24 h en una estufa marca Curtin Matheson Scientific Equatherm. Posteriormente los filtros fueron calcinados en una mufla Modelo Furnace 1300 a 450°C por un periodo de 4 horas. Una vez que se enfriaron los filtros se registró su peso en una balanza analítica digital marca Sartorius. Después se tomó un volumen conocido de microalgas el cual estuvo sujeto a la concentración celular estimada para cada especie, se determinó su concentración celular y se filtró a través de filtros Whatman de fibra de vidrio GF/F de 4.7 cm de diámetro, posteriormente se lavó la muestra con formiato de amonio (2.25%) para eliminar sales. Las muestras filtradas fueron secadas a 60 °C por 24 horas y en seguida fueron introducidas en un desecador, al cual se le aplicó vacío a 25 libras de presión con una bomba manual y permanecieron en esta condición por 30 minutos, luego los filtros se pesaron y por diferencia de peso del filtro y el filtro con muestra se obtuvo el peso seco total. Por último para determinar cenizas fueron incineradas las muestras a 450°C durante 12 horas y se pesaron en una balanza analítica. Para determinar el peso seco orgánico se restó el peso de las cenizas.

4.1. Análisis estadístico

Los resultados de cada tratamiento experimental se analizaron mediante una prueba t de student para determinar diferencias significativas entre los pesos de las microalgas provenientes de los dos medios de cultivo. El análisis se realizó con el paquete estadístico Sigma Plot versión 7, con nivel de significancia $\alpha=0.05$.

5. Resultados:

5.1. Variables fisicoquímicas

La temperatura promedio inicial registrada en el cultivo de *Nannochloropsis* sp y *Rhodomonas* sp fue de 24 ± 0.40 °C, en cambio para *Navicula incerta* se registró una menor temperatura al inicio del cultivo en comparación con las especies antes mencionadas; las cuales a su vez registraron un valor mínimo de 18.56 ± 0.56 °C. Por otra parte, *Navicula incerta* registró un máximo de temperatura de 21.40 ± 0.50 °C en el tercer día de su cultivo e inmediatamente disminuyó a valores de 18.10 ± 0.10 °C. El pH promedio en el cultivo de *Nannochloropsis* sp se incrementó en los primeros cuatro días de cultivo a valores promedio de 9.6 ± 0.05 para el medio f/2 de Guillard (1975) y de 9.5 ± 0.03 para el medio Mathiesen y Thorner (1966). A partir de este día el pH disminuyó a valores de 9.2 ± 0.03 y 9.3 ± 0.03 , al sexto día de cultivo, respectivamente.

En el cultivo de *Rhodomonas* sp los valores de pH mostraron diferentes tendencias durante el periodo del cultivo, observándose para el cuarto día de cultivo valores máximos de 9.26 ± 0.08 y 9.4 ± 0.06 en el medio f/2 de Guillard (1975) y Mathiesen y Thorner (1966) respectivamente y partir de ese día el pH disminuyó en ambos tratamientos, obteniéndose al sexto día valores de 8.9 ± 0.03 en el medio f/2 de Guillard (1975) y 9.2 ± 0.03 para el medio Mathiesen y Thorner (1966).

5.2. Cultivo microalgal

Durante el crecimiento de *Navicula incerta* no se observó fase de acondicionamiento. La fase exponencial comprendió del primer al quinto día, a partir de ese tiempo se inició la fase estacionaria del crecimiento celular de *N. incerta* en medio f/2 de Guillard (1975), mientras que en el medio Mathiesen y Thorner (1966) esta fase se presentó hasta el sexto día para después disminuir y entrar en fase de muerte del cultivo (Figura 1). La mayor densidad celular obtenida para *N. incerta* en el medio f/2 de Guillard (1975) fue en el último día de cultivo, con valores promedio de $28,600 \pm 0.0004$ cél mm² (Figura 1), registrando una tasa de crecimiento promedio de 0.19 ± 0.11 (Figura 2) y dos máximos en su producción celular uno en el tercer día ($7,663 \pm 0.0013$ cél mm²) y el segundo en el quinto día ($11,357 \pm 0.0001$ cél mm²) del cultivo respectivamente (Figura 3). La máxima producción celular fue de $11,357 \pm 0.0001$ cél mm² (Figura 3) y tasa de crecimiento de 0.64 (Figura 2). El análisis estadístico mostró diferencias significativas en los resultados de densidad celular de *Navicula incerta* al séptimo día de cultivo ($T_{calculada} > T_{crítica}$).

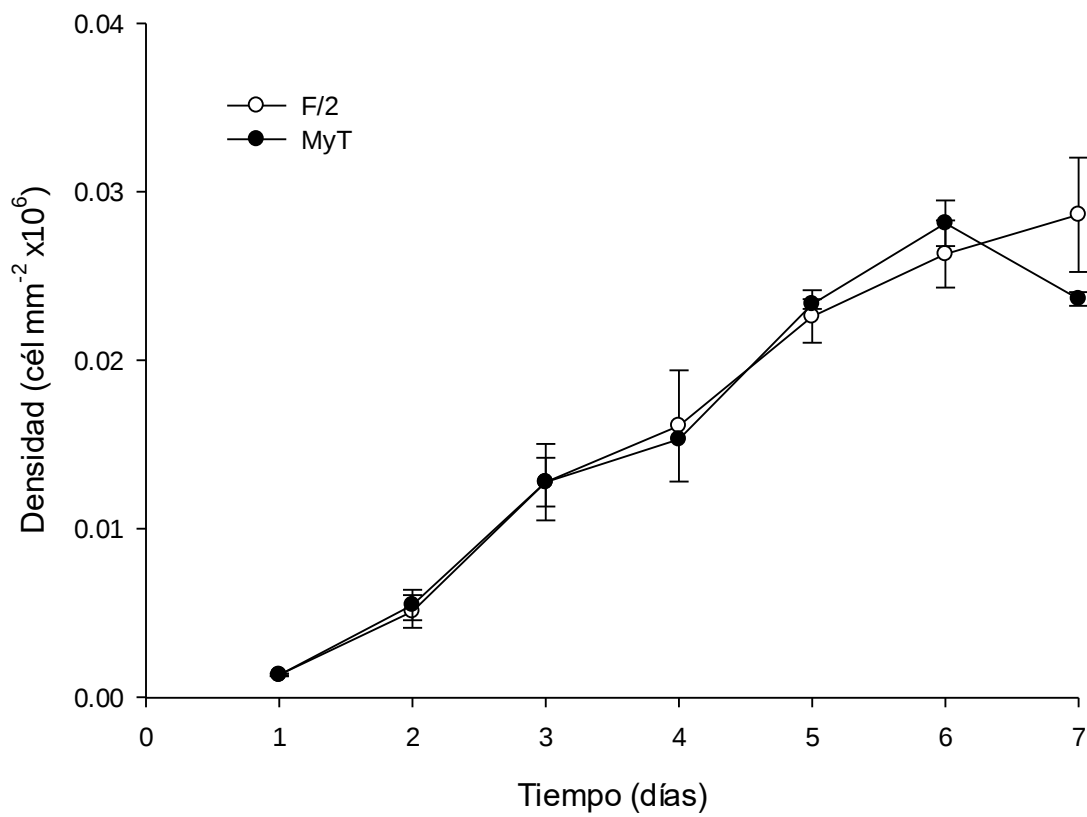


Figura 1. Densidad celular promedio de *Navicula incerta*, cultivada en 10 L con medio f/2 de Guillard (1975) y medio Mathiesen y Thorner (1966). Las barras verticales indican el error estándar.

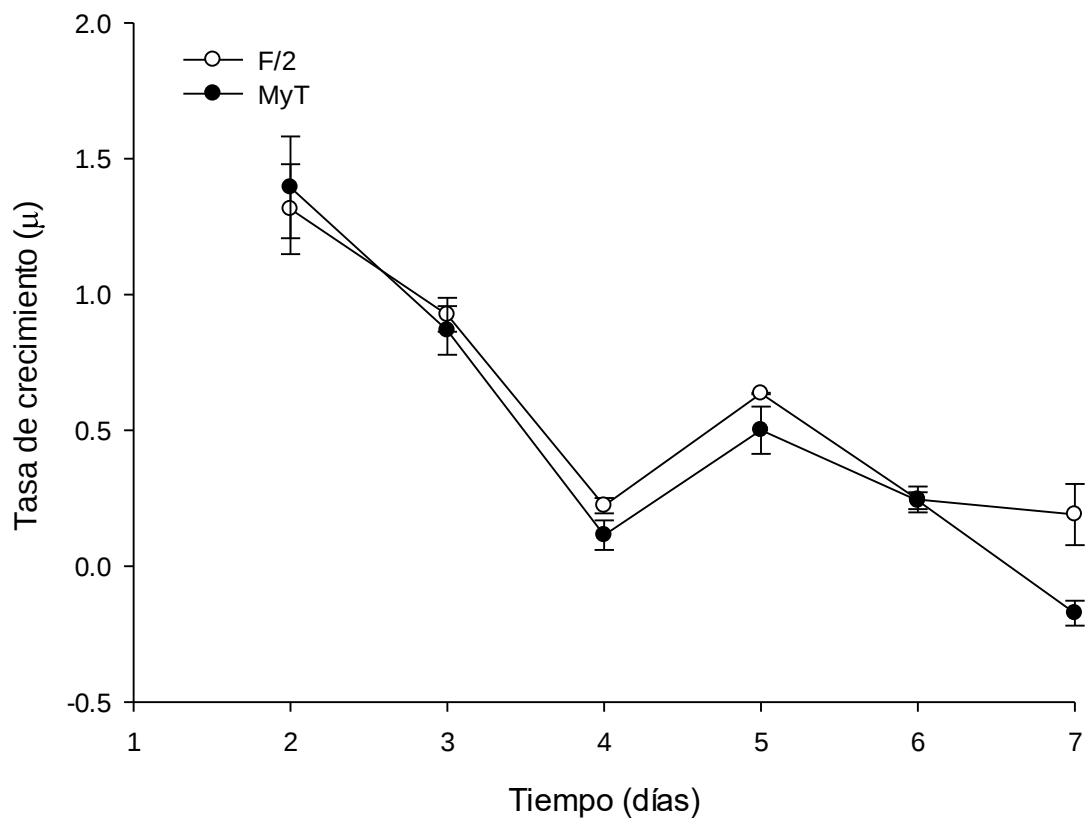


Figura 2. Tasa de crecimiento promedio de *Navicula incerta*, cultivada en 10 L con medio f/2 de Guillard (1975) y medio Mathiesen y Thorner (1966). Las barras verticales indican el error estándar.

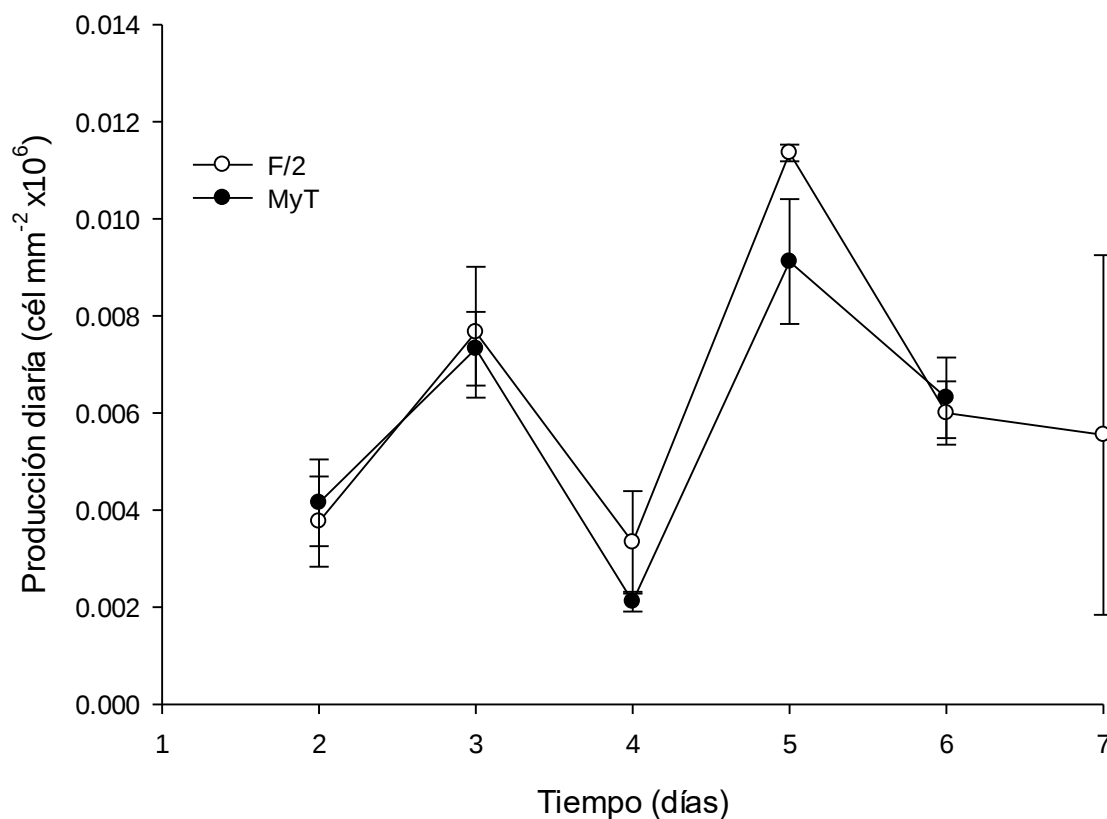


Figura 3. Producción diaria promedio de *Navicula incerta*, cultivada en 10 L con medio f/2 de Guillard (1975) y medio Mathiesen y Thorner (1966). Las barras verticales indican el error estándar.

En lo que respecta al cultivo de *Nannochloropsis* sp, este presentó una fase de acondicionamiento durante las primeras veinticuatro horas de cultivo en ambos medios de cultivo. A partir de este tiempo y hasta el cuarto día se identificó la fase exponencial en ambos medios de cultivo, encontrándose únicamente diferencias significativas entre los tratamientos en el segundo y quinto día de cultivo ($T_{\text{calculada}} = 2.86 > T_{\text{crítica.05/2,4}} = 2.77$) y ($T_{\text{calculada}} = 11.12 > T_{\text{crítica.05/2,4}} = 2.77$), observándose en el segundo día de cultivo la mayor tasa de crecimiento con valores de 0.95 ± 0.08 y 1.08 ± 0.01 para medio f/2 de Guillard (1975) y medio Mathiesen y Thorner (1966) respectivamente (Figura 5). La concentración celular fue similar en ambos medios del cuarto hasta el séptimo día del crecimiento, con pequeños cambios en la tasa

de crecimiento de *Nannochloropsis* sp al final del cultivo. La mayor densidad celular ($35,163,300 \pm 1.57 \text{ cél mL}^{-1}$) se observó en el medio f/2 de Guillard (1975) (Figura 4), con dos máximos de producción celular muy similares, uno al cuarto ($7,033,300 \pm 0.80 \text{ cél mL}^{-1}$) y otro al sexto día ($7,130,000 \pm 0.81 \text{ cél mL}^{-1}$) de cultivo respectivamente (Figura 6). Mientras que en el medio de cultivo Mathiesen y Thorner (1966) la mayor densidad fue de $38,616,700 \pm 0.86 \text{ cél mL}^{-1}$ al séptimo día de cultivo (Figura 4). Pero en cuanto a la máxima producción celular esta registró un valor de $8,800,000 \pm 1.85 \text{ cél mL}^{-1}$ (Figura 6) y una tasa de crecimiento de 0.26 ± 0.05 al séptimo día de cultivo (Figura 5).

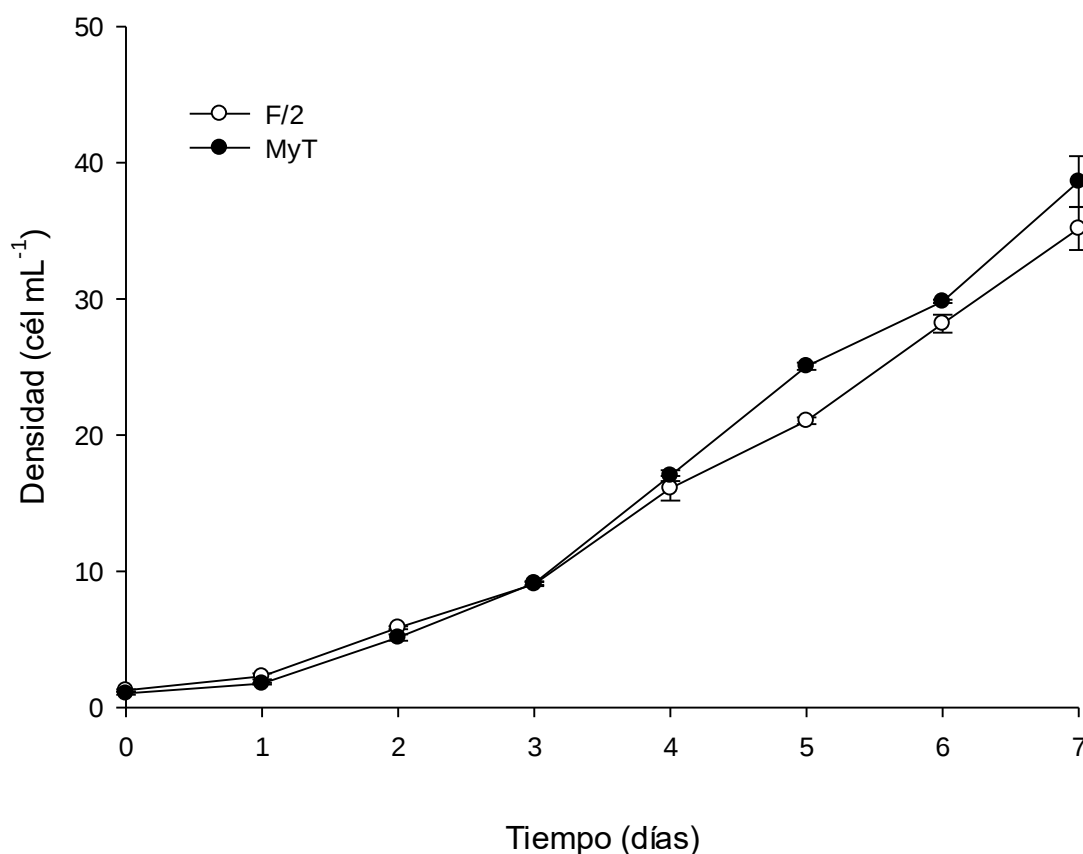


Figura 4. Densidad promedio de *Nannochloropsis* sp, cultivada en 18 L con medio f/2 de Guillard (1975) y medio Mathiesen y Thorner (1966). Las barras verticales indican el error estándar.

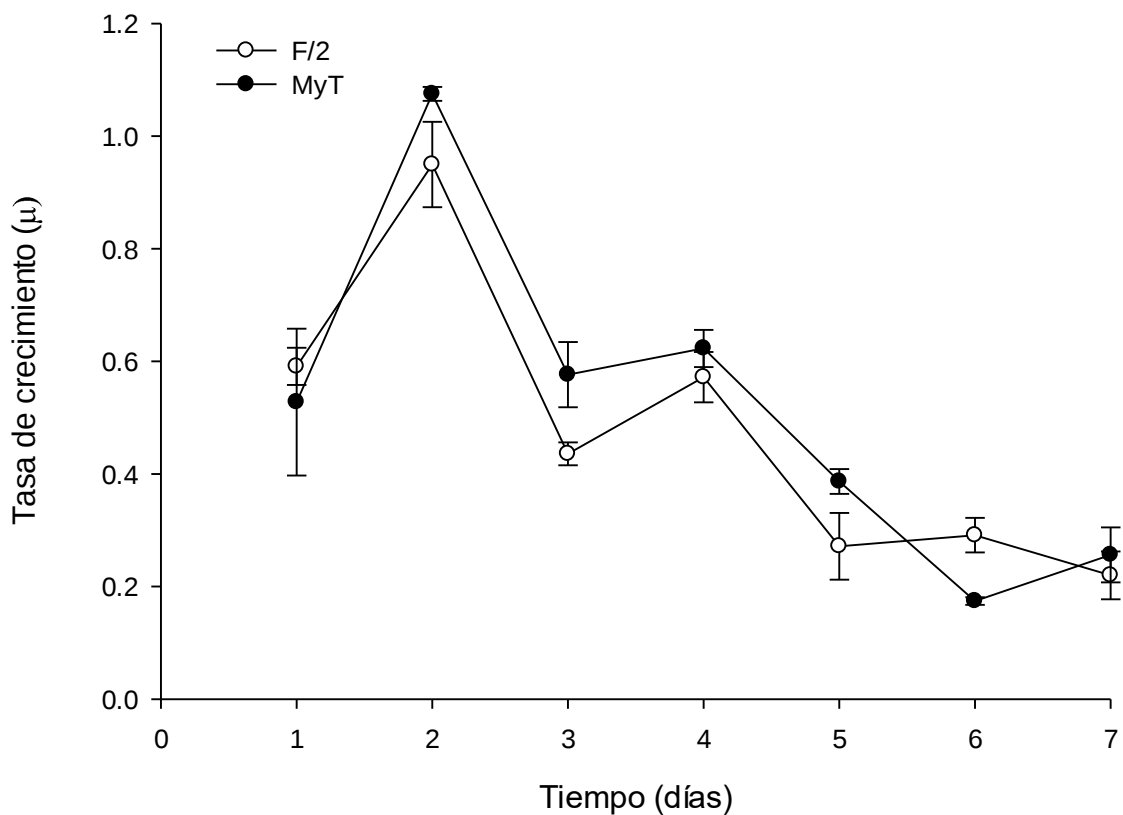


Figura 5. Tasa de crecimiento promedio de *Nannochloropsis* sp, cultivada en 18 L con medio f/2 de Guillard (1975) y medio Mathiesen y Thorner (1966). Las barras verticales indican el error estándar.

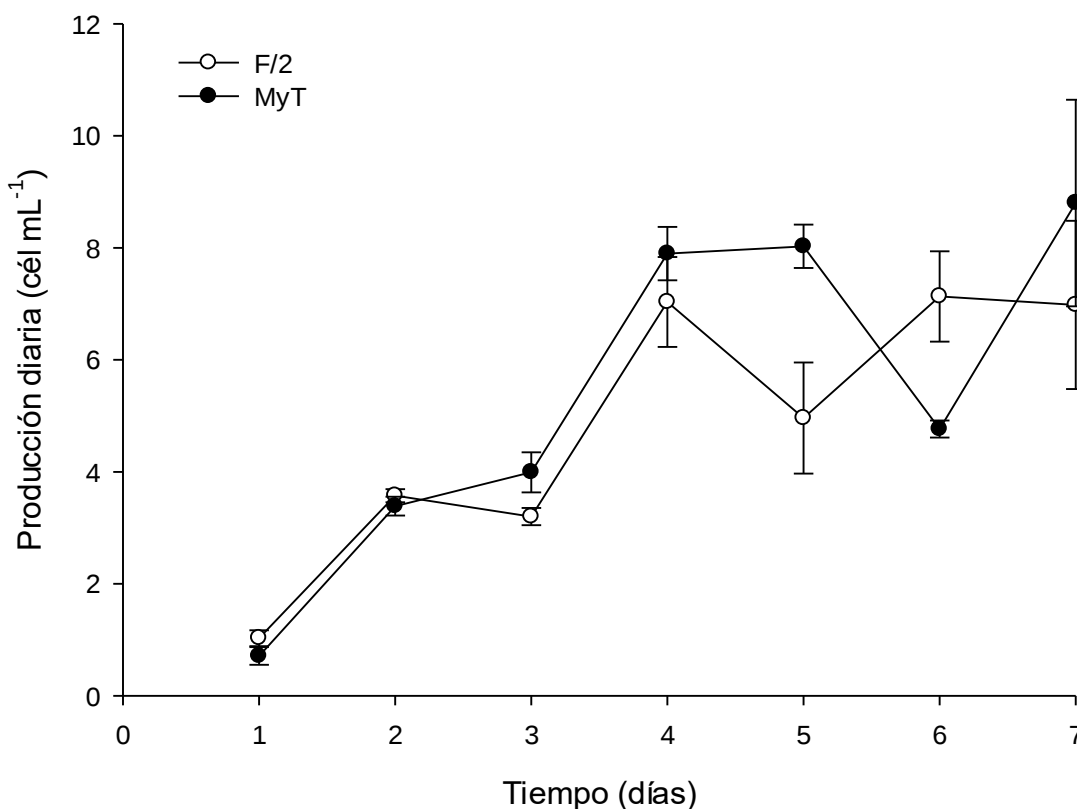


Figura 6. Producción celular diaria promedio de *Nannochloropsis* sp, cultivada en 18 L con medio f/2 de Guillard (1975) y medio Mathiesen y Thorner (1966). Las barras verticales indican el error estándar.

Rhodomonas sp presentó fase de acondicionamiento de dos días en ambos medios de cultivo. A partir de este tiempo y hasta el séptimo día se identificó la fase exponencial en ambos tratamientos, observándose la mayor tasa de crecimiento: 0.82 ± 0.04 y 0.79 ± 0.12 en el tercer día de cultivo para medio f/2 de Guillard (1975) y medio Mathiesen y Thorner (1966) respectivamente (Figura 8). La concentración celular fue superior en el medio f/2 de Guillard (1975) del segundo hasta el séptimo día del crecimiento, con valores promedio de $3,460,000 \pm 0.28$ cél mL⁻¹ (Figura 7). La máxima producción celular de *Rhodomonas* sp fue al séptimo día de cultivo con $1,873,300 \pm 0.36$ cél mL⁻¹ (Figura 9) y una tasa de crecimiento de 0.78 ± 0.13 (Figura 8). En el medio Mathiesen y Thorner (1966) la mayor densidad alcanzada fue al

séptimo día de cultivo con valores promedio de $3,186,700 \pm 0.38 \text{ cél mL}^{-1}$ (Figura 7), una máxima producción celular de $1,706,700 \pm 0.20 \text{ cél mL}^{-1}$ (Figura 9) y una tasa de crecimiento de 0.77 ± 0.04 al séptimo día (Figura 8). Los resultados de densidad celular de *Rhodomonas* sp mostraron diferencias significativas entre los tratamientos del segundo al cuarto día de cultivo, debido a que los valores calculados de la prueba t de student fueron mayores al valor crítico (Tabla I).

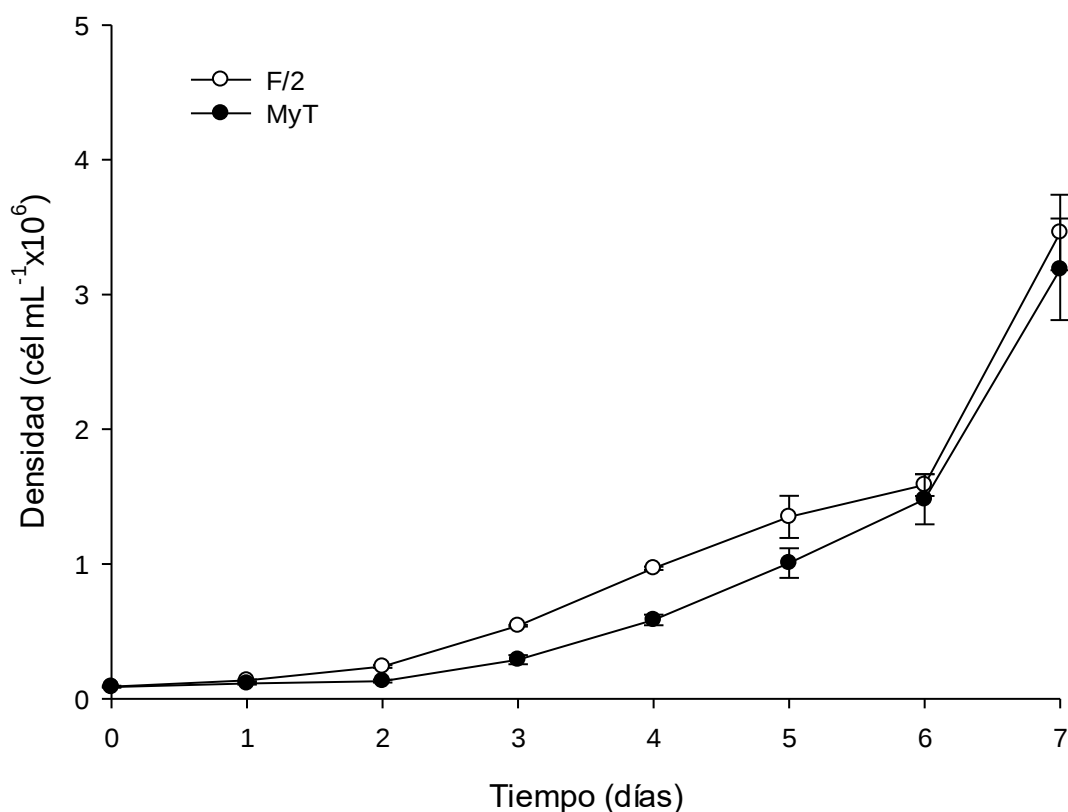


Figura 7. Densidad celular promedio de *Rhodomonas* sp, cultivada en 18 L con medio f/2 de Guillard (1975) y medio Mathiesen y Thorner (1966). Las barras verticales indican el error estándar.

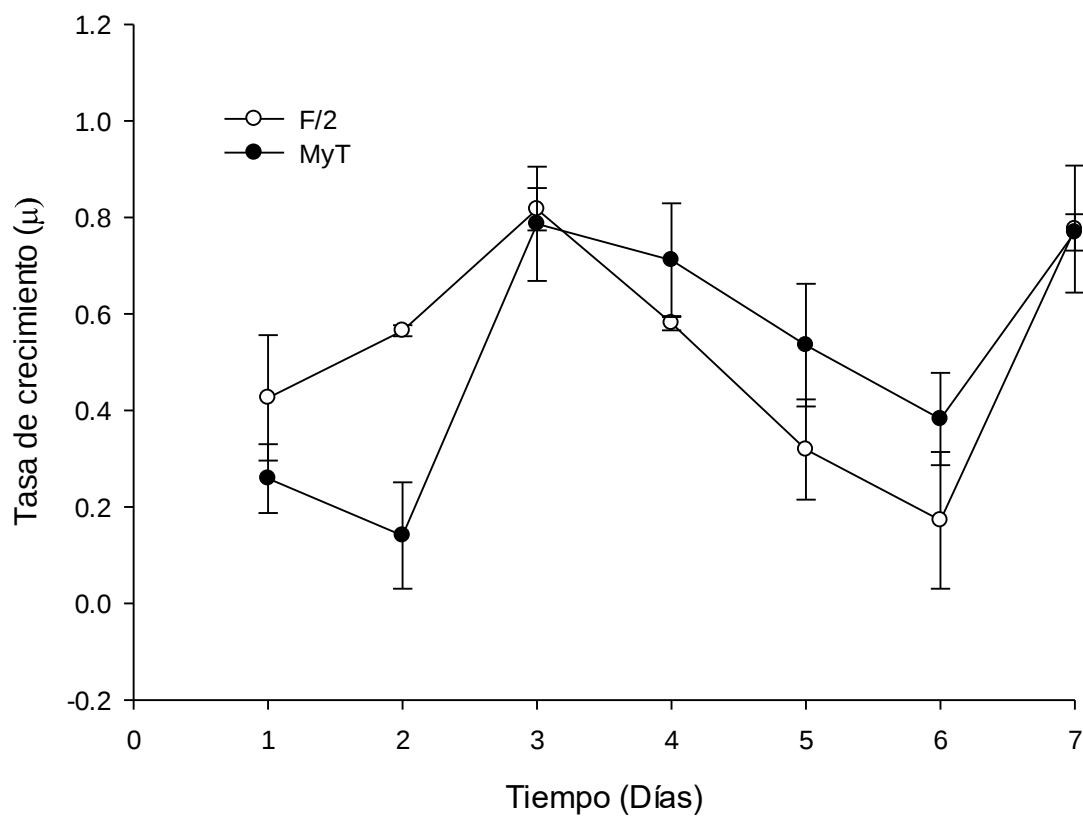


Figura 8. Tasa de crecimiento promedio de *Rhodomonas* sp, cultivada en 18 L con medio f/2 de Guillard (1975) y medio Mathiesen y Thorner (1966). Las barras verticales indican el error estándar.

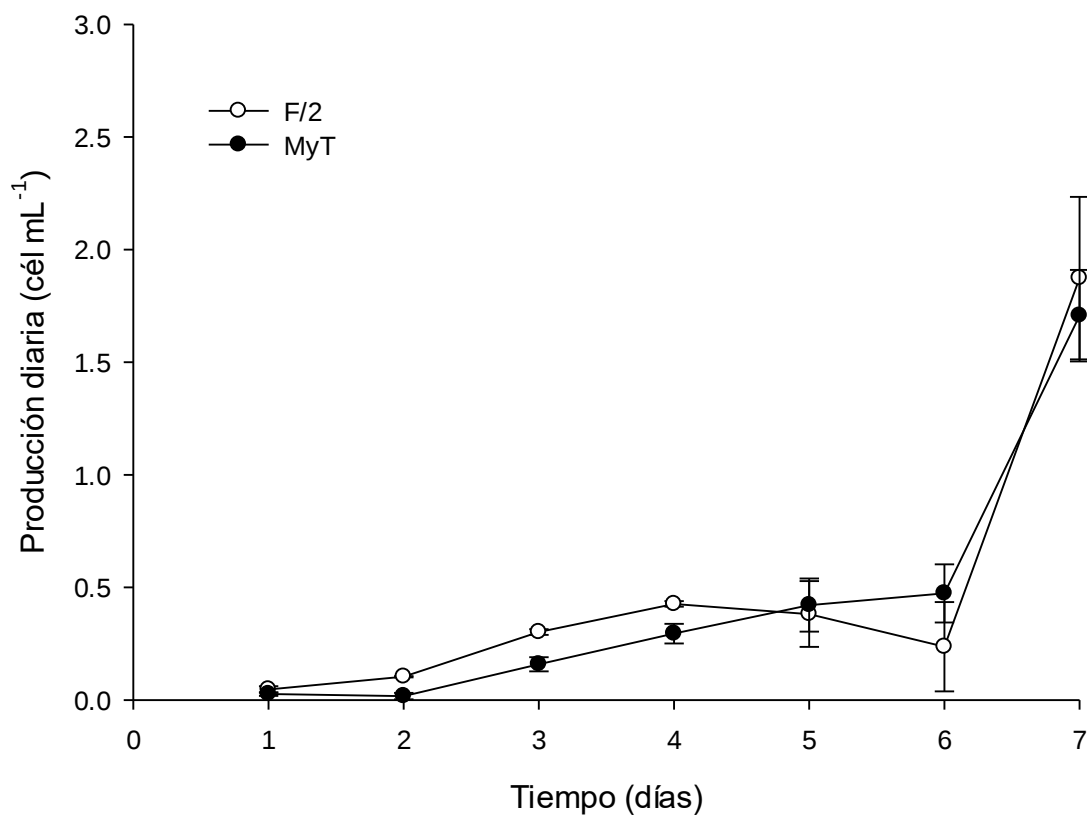


Figura 9. Producción celular diaria promedio de *Rhodomonas* sp, cultivada en 18 L con medio f/2 de Guillard (1975) y medio Mathiesen y Thorner. Las barras verticales indican el error estándar.

Tabla I. Prueba t de student para muestras independientes con un nivel de confianza del 95%, aplicada a los datos de densidad celular en *Rhodomonas* sp ($P < 0.05$ significativa).

gl=4	Concentración celular		
Día	t calculada	t crítica	Significancia
0	0.28	2.77	NS
1	2.09	2.77	NS
2	7.60	2.77	S
3	7.41	2.77	S
4	9.18	2.77	S
5	1.79	2.77	NS
6	0.53	2.77	NS
7	0.58	2.77	NS

S=Diferencias significativas, NS=No significativas.

5.3. Contenido orgánico

El peso orgánico promedio, de *Navicula incerta*, en el primer día de cultivo en medio f/2 de Guillard (1975) fue de 141 ± 9.66 pg cél⁻¹, mientras que en el medio Mathiesen y Thorner (1966) fue de 162 ± 18.07 pg cél⁻¹. Del segundo día hasta el séptimo día, el contenido orgánico de *N. incerta* en medio f/2 de Guillard (1975) fue mayor que en medio Mathiesen y Thorner (1966), registrándose el último día de cultivo el mayor peso orgánico en ambos medios de cultivo, con valores de 286 ± 23.91 pg cél⁻¹ para el medio f/2 de Guillard (1975) y de 283 ± 35.20 pg cél⁻¹ para el medio Mathiesen y Thorner (1966) (Figura 10). No se encontraron diferencias significativas en el contenido orgánico de *N. incerta* entre los tratamientos, debido a que los valores calculados de la prueba t de student fueron menores al valor crítico ($T_{calculada} < T_{crítica}$).

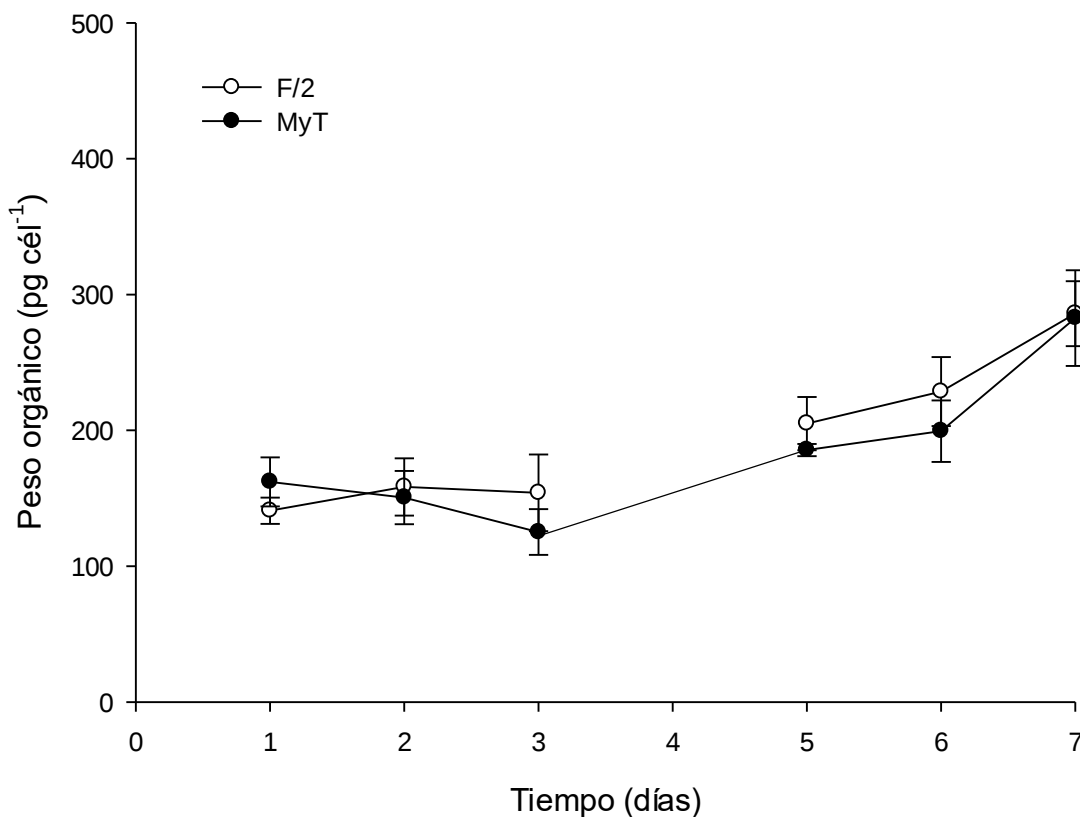


Figura 10. Contenido orgánico promedio de *Navicula incerta*, cultivada en 10 L con medio f/2 de Guillard (1975) y medio Mathiesen y Thorner. Las barras verticales indican el error estándar.

Al inicio del cultivo, el contenido orgánico de *Nannochloropsis* sp registró su máximo valor en ambos medios, con valores promedio de 13 ± 0.79 pg cél⁻¹ para el medio f/2 de Guillard (1975) y de 18 ± 2.58 pg cél⁻¹ para el medio Mathiesen y Thorner (1966). Del primer día hasta el final del periodo de cultivo, el peso orgánico de *Nannochloropsis* sp disminuyó de igual manera en ambos medios, obteniéndose al sexto día valores promedio de 5 ± 0.27 pg cél⁻¹ para el medio f/2 de Guillard (1975) y de 6 ± 0.02 pg cél⁻¹ para el medio Mathiesen y Thorner (1966) (Figura 11). La prueba t de student no mostró diferencias significativas en el contenido orgánico entre los tratamientos.

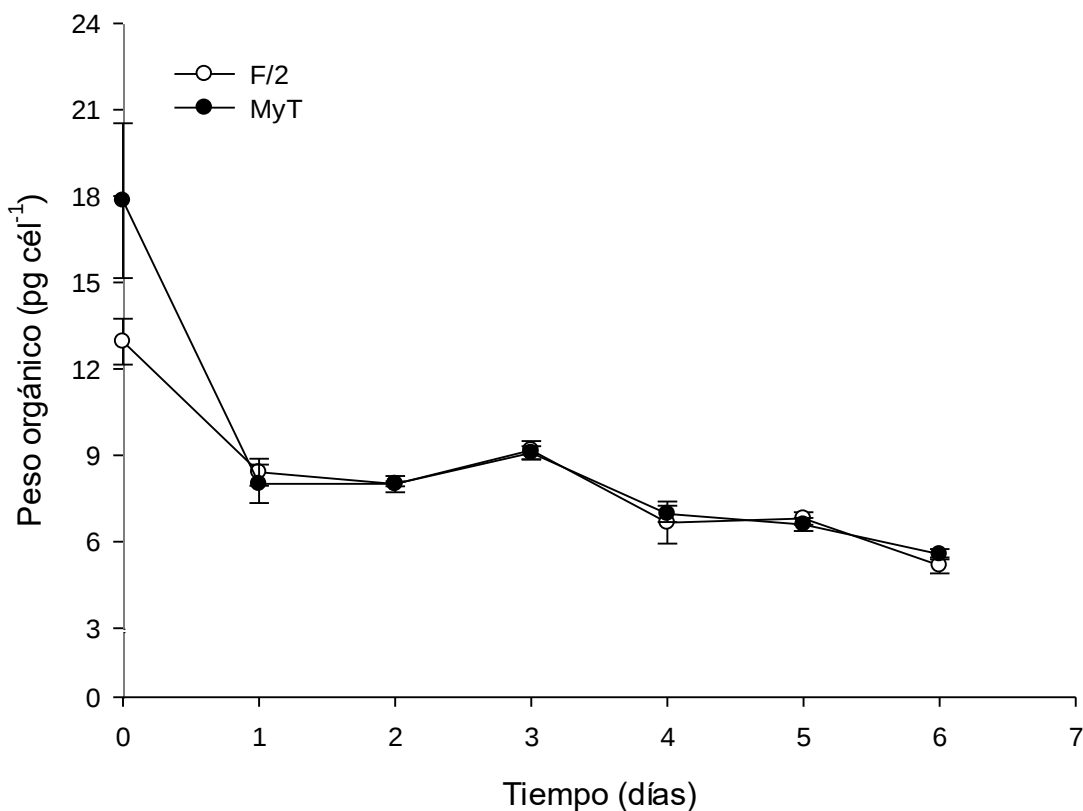


Figura 11. Peso orgánico promedio de *Nannochloropsis* sp, cultivada en 18 L con medio f/2 de Guillard (1975) y medio Mathiesen y Thorner. Las barras verticales indican el error estándar.

En general el peso orgánico registrado en el cultivo de *Rhodomonas* sp siempre fue mayor en células cultivadas en medio Mathiesen y Thorner (1966) (Figura 12). En el segundo día de cultivo se observaron valores máximos promedio de 161 ± 7.96 pg cél⁻¹ para el medio f/2 de Guillard (1975) y de 267 ± 4.83 pg cél⁻¹ para el medio Mathiesen y Thorner, a partir del segundo día hasta el final del cultivo el peso orgánico celular de *Rhodomonas* sp disminuyó a valores promedio similares de 106 ± 1.62 pg cél⁻¹ para el medio f/2 de Guillard (1975) y de 105 ± 3.46 pg cél⁻¹ para el medio Mathiesen y Thorner (1966) (Figura 12). En los resultados del contenido orgánico de *Rhodomonas* sp solo se detectaron diferencias significativas

entre los tratamientos del primer al cuarto día, debido a que los valores calculados de la prueba t de student fueron mayores al valor crítico (Tabla II).

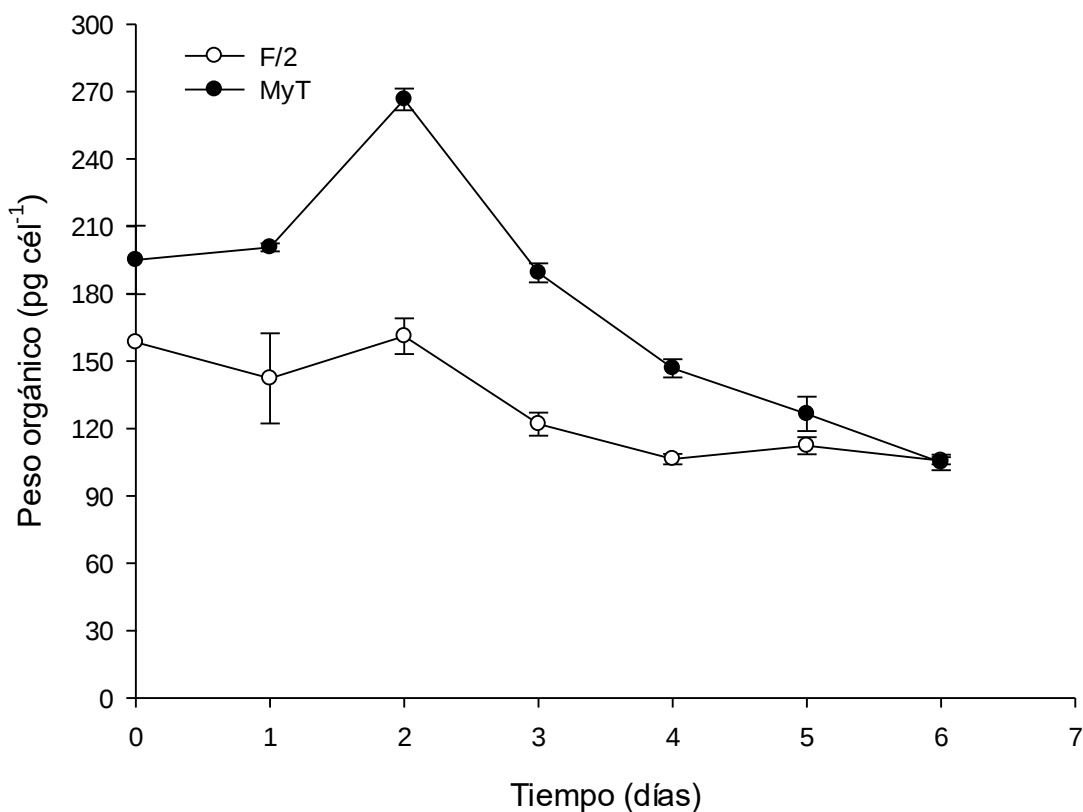


Figura 12. Contenido orgánico promedio en *Rhodomonas* sp, cultivada en 18 L con medio f/2 de Guillard (1975) y medio Mathiesen y Thorner. Las barras verticales indican el error estándar.

Tabla II. Prueba t de student para muestras independientes con un nivel de confianza del 95%, aplicada a los datos de peso orgánico en *Rhodomonas* sp (P<0.05 significativa).

Peso orgánico			
Día	t calculada	t crítica	Significancia
0	1.38	12.7	NS
1	3.85	3.18	S
2	11.31	4.30	S
3	9.17	3.18	S
4	9.50	3.18	S
5	1.66	4.30	NS
6	0.22	4.30	NS

S=Diferencias significativas, NS=No significativas.

6. Discusión:

6.1. Cultivo microalgal

Las microalgas *Nannochloropsis* sp y *Rhodomonas* sp cultivadas en los medios Mathiesen y Thorner (1966) y f/2 de Guillard (1975), presentaron diferencias significativas en su crecimiento celular en diferentes días de cultivo. Esto significa que cada especie tiene un requerimiento específico de nutrientes para su crecimiento, ya que el medio de cultivo Mathiesen y Thorner (1966) modificó la tasa de crecimiento de las dos especies cultivadas (Figuras 4 y 7).

Así mismo los cultivos de *Nannochloropsis* sp y *Rhodomonas* sp, presentaron tres fases de crecimiento, en cambio para los cultivos de *Navicula incerta*, solo se observó la fase exponencial y la estacionaria (Figuras 1, 4 y 7). Además, las densidades celulares obtenidas por *Navicula incerta* (Figura 1) fueron superiores a las reportadas por Rojo-Salazar (2002), quien encontró al séptimo día de cultivo una densidad máxima de 10,248 células mm⁻², con tasa de crecimiento promedio de 0.64 e irradianza de 35 μ mol quanta m⁻² s⁻¹. De igual manera la densidad celular de *Nannochloropsis* sp registrada en este estudio (Figura 4) es mayor que la reportada por Rojo-Cebreros *et al.* (2016) quien al sexto día de cultivo obtuvo una densidad

máxima de 18×10^6 células mL^{-1} , a una irradianza de 4,000 Lux ($78 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Por otra parte *Rhodomonas* sp (Figura 7) presentó densidades superiores a las reportadas por Cazares (2014), quien alcanzó una densidad celular máxima de $1,800 \times 10^3$ células mL^{-1} al séptimo día de cultivo

De acuerdo a los resultados antes mencionados, las tres especies de microalgas evaluadas en este estudio, superan las densidades reportadas en la literatura, probablemente debido a que se utilizó una mayor irradianza, lo cual concuerda con lo obtenido por Kaplan *et al.* (1986), quien menciona que al incrementar la irradianza de 50 a $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ los cultivos microalgales duplican su tasa de crecimiento.

6.2. Contenido orgánico

El peso orgánico celular de *Navicula incerta* en el medio de cultivo f/2 de Guillard (1975) fue mayor que en el medio de cultivo Mathiesen y Thorner (1966) (Figura 10) a partir del segundo día de cultivo, aunque estadísticamente no se encontraron diferencias significativas. Los resultados encontrados concuerdan a los reportados por Correa-Reyes (2001), quien obtuvo valores entre 95 y 250 pg cél⁻¹, cultivadas en medio “f”. Por otra parte, Rojo-Salazar (2002) reportó un peso de 214 pg cél⁻¹, para el tercer día de cultivo en medio f/2 de Guillard (1975), coincidiendo con los pesos obtenidos a partir del sexto día de este estudio.

Por otra parte, *Nannochloropsis* sp registro un mayor peso orgánico celular al inicio del cultivo, tanto en el medio f/2 de Guillard (1975) como en el medio Mathiesen y Thorner, a partir de este tiempo se observó una disminución en el peso orgánico celular de *Nannochloropsis* sp, posteriormente se observó poca variación en el peso orgánico celular (Figura 11), con respecto al tiempo de cultivo, sin diferencias significativas entre los pesos orgánicos celulares en ambos medios. Los resultados observados en este estudio coinciden con los reportados por Saracco (2003), quien obtuvo valores peso orgánico para *Nannochloropsis* sp de entre 3 y 22 pg cél⁻¹, cultivadas en medio “f”. Por otra parte, Montes (2014) reportó pesos celulares entre 6 y 12 pg cél⁻¹ en *Nannochloropsis* sp., cultivada en medio “f”.

Mientras que, Rojo-Cebreros *et al* (2012) obtuvo un valor de $5.65 \pm 0.37 \text{ pg cel}^{-1}$ y Anzueto (2014) reporta un valor de $10 \text{ pg} \cdot \text{cél}^{-1}$ en medio f/2 de Guillard (1975). Estos resultados son similares a los obtenidos en este estudio para el sexto día de cultivo. Sin embargo, cabe señalar que los resultados de los trabajos antes mencionados se obtuvieron con un medio de cultivo “f”, el cual en particular tiene mayor concentración de nitrógeno y fósforo que el medio f/2 de Guillard (1975) utilizado en este estudio. Esto confirma que la concentración de nutrientes no modificó de manera importante el peso orgánico celular de *Nannochloropsis* sp evaluada en este estudio.

En el cultivo de *Rhodomonas* sp, se observó un incremento en el contenido orgánico celular de la especie en el segundo día del cultivo (Figura 12), para luego continuar con una tendencia a disminuir hacia el final del cultivo, esta microalga presentó mayor peso orgánico en el medio de cultivo Mathiesen y Thorner (1966) que en el medio f/2 de Guillard (1975) (Figura 12), encontrándose diferencias significativas del primer al cuarto día de cultivo. Estos resultados coinciden con los reportados por Cazares (2014), quien obtuvo valores promedio de $175 \pm 1.8 \text{ pg cel}^{-1}$ en *Rhodomonas salina* cultivada en medio “f” de Guillard. Asimismo, Anzueto (2014) reporta un peso orgánico celular similar de $106.0 \pm 3.1 \text{ pg cel}^{-1}$ en *Rhodomonas salina* cultivada en medio de cultivo f/2 de Guillard (1975).

Los resultados del presente estudio demuestran que el efecto por concentración de nutrientes fue solo válido para el cultivo de *Rhodomonas* sp, ya que durante cuatro días de cultivo los cambios en el contenido orgánico celular de *Rhodomonas* sp siempre fue mayor en el medio Mathiesen y Thorner (1966). Por tanto se corrobora la hipótesis que la concentración de nutrientes modificó el contenido orgánico de esta especie, mientras que en *Navicula incerta* y *Nannochloropsis* sp los cambios en la concentración de nutrientes no tuvieron efectos significativos en su contenido orgánico celular.

7. Conclusiones:

- La densidad celular de *Nannochloropsis* sp y *Rhodomonas* sp no fue significativa al final del periodo de cultivo, mientras que *Navicula incerta* solo difiere en el último día de cultivo.
- El efecto por concentración de nutrientes en los medios evaluados no modificó significativamente el contenido orgánico celular de *Navicula incerta* y *Nannochloropsis* sp, mientras que en *Rhodomonas* sp el contenido orgánico celular fue mayor con el medio que tenía mayor concentración de nutrientes (Mathiesen y Thorner (1966)) a excepción del último día de cultivo.
- Debido a que la biomasa y contenido orgánico de *Navicula incerta* aumentan con respecto al tiempo, esta microalga debe ser suministrada como alimento al séptimo día de cultivo, que es en donde obtuvo la mayor densidad celular y el mayor peso orgánico.
- La microalga *Nannochloropsis* sp debe ser proporcionada como alimento el sexto día de cultivo, ya que en este el día presenta la mayor densidad celular en ambos medios y debido a que no hay variaciones significativas en el contenido orgánico celular durante el tiempo de cultivo.

8. Literatura citada:

- Anzueto, S. M. A. 2014. Efecto de la dieta y la temperatura en los parámetros poblacionales y en el valor nutricional del copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus* cultivado en laboratorio. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México.
- Arnáiz, C., Isac, L., y Lebrato, J. 2000. Determinación de la biomasa en procesos biológicos. Tecnológico del agua. 205. 45-52 pp.
- Arredondo-Vega, B. O. y Voltolina, D. 2007. Determinación de peso seco y contenido orgánico e inorgánico. CIBNOR. 23-26 pp.
- Bertoldi, F. C., Sant'Anna, E., Barcelos, O. J. L. 2008. Revista: Biotecnología de microalgas. B. CEPPA. 26(1): 9–20 pp.
- Becker, E.W. 1994. Microalgae. Biotechnology and Microbiology. Cambridge Univ. Press. Cambridge, 293 pp. En: Streit N; Ramírez Mérida L., G; Queiroz-Zepka, L; Jacob-Lopes, E., Queiroz, M. 2015. Producción de pigmentos naturales (clorofila-a) en biorrefinerías agroindustriales. Ciencia y Tecnología. 8(2): 27-34 pp.
- Bidigare, R. R., Ondrusek, M. E., Kennicutt II, M. C., Iturriaga, R., Harvey, H. R., Hohan, R.W., Macko, S.A. 1993. Evidence for a photoprotective function for secondary carotenoids of snowalgae. J. Phycol. (29): 427-434 pp.
- Breese, W. P. y Malouf, R. E. 1975. Hatchery Manual for the Pacific Oyster. Oregon State University. Sea Grant College Program. Ag. Exp. St. Spec. Rpt. 443. 22 pp.
- Canavate, J. 2011. Las algas como recurso. Valorización. Aplicaciones industriales y tendencias., Capítulo: Funciones de las microalgas en acuicultura. Editor: Centro Tecnológico del Mar - Fundación CETMAR.193-205 pp.
- CAR/PL. 2003. Aplicaciones de la Biotecnología en la industria. Centro de Actividad Regional para la Producción Limpia.11 pp.
- Cazares, S. A. 2014. Efecto de dietas mixtas de microalgas marinas en el cultivo y composición de ácidos grasos esenciales del copépodo *Pseudodiaptomus*

- euryhalinus*. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, México.
- Correa-Reyes. 2001. Selección de especies de diatomeas bentónicas para el cultivo de abulón. Tesis de doctorado. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, México. 137 pp.
- Correa-Reyes, J. G., Sánchez-Saavedra, M. del P., María Teresa Viana, M. T., Flores-Acevedo, N. y Vásquez-Peláez, C. 2009. Effect of eight benthic diatoms as feed on the growth of red abalone (*Haliotis rufescens*) postlarvae. *Revista Appl. Phycol.* 21:387–393 pp.
- Espinoza, F. 2017. Microalgas en la alimentación ¿Suplementos novedosos o reinventados?. *Revista Ciencia.* 68 (2): 1-5 pp.
- García-Ulloa, M. 2004. Efecto de la ración alimenticia en el crecimiento de juveniles de tilapia *Oreochromis aureus* (Steindachner) bajo condiciones experimentales de cultivo. *Revista Avances en Investigación Agropecuaria.* 8 (1): 1-7 pp.
- Gómez-Gil, B., Roque, A., y Guerra F. A. L. 2001. Enfermedades Infecciosas más Comunes en la Camaronicultura en México y el Impacto del Uso de Antimicrobianos. CIAD, A.C. Unidad Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental. 315-346 pp.
- Gómez, L. 2007. Microalgas: aspectos ecológicos y biotecnológicos. *Revista cubana de Química.* 19 (2): 3-20 pp.
- González, C., A. 2015. ¿Qué son las microalgas?. Fundación Cajamar – grupo cooperativo Cajamar.11: 1-11 pp.
- Graham, L.E. y Wilcox, L.W. 2000. Introduction to the Algae. *Algae*. Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, NJ. 1-20 pp. En: González C., A. 2015. ¿Qué son las microalgas?. Fundación Cajamar – grupo cooperativo Cajamar.11: 1-11 pp.
- Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. En: *Culture of marine invertebrates animals*. Smith, W. L. y M. H. Chanley (Editores). Plenum Publishing Corp. New York, 29-60 pp.
- Harvey, W. 1988. Cracking open marine algae biological treasure chest. *Biotechnol.* 6: 488-492 pp.

- Helm, M.M., Bourne, N., y Lovatelli, A. 2006. (comp./ed.) Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. FAO Documento Técnico de Pesca. No. 471. Roma, FAO. 184 pp.
- Jara-Montañez, R. 2012. Producción intensiva de postlarvas de abulón (*Haliotis rufescens*) en cultivo estático utilizando raciones de alimento peso-específicas y distintas densidades postlarvales. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada Baja California.
- Kaplan, D; Cohen, Z. y Abeliovich A. 1986. Optimal growth condition for *Isochrysis galbana*. Biomasa, 9: 37-48 pp.
- Kreeger D. A. y C. J. Langdon. 1993. Effect of Dietary Protein Content on Growth of Juvenile Mussels, *Mytilus trossulus* (Gould 1850). Biol. Bull. 185: 123-139 pp.
- Lubzenz, E. 1987. Raising rotifers for use in aquaculture. Hydrobiologia, 147(1): 245-255 pp.
- Mathiesen, G.C. y Thorner, R.C. 1966. Possible methods of improving the shellfish industry of Martha's Vineyard, Duke's County, Massachusetts. Mar. Res. Found. Mass., IV + 138.
- Montes, G. O. G. 2014. Efecto de la intensidad de la luz y de la tasa de inyección de aire en el crecimiento y la productividad de la microalga *Nannochloropsis* sp., cultivada en un biorreactor plano. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, México
- Pastuzo, C., M., A. 2016. Efectos de los fertilizantes agrícolas en el crecimiento celular y producción de pigmentos y carbohidratos en cultivos de *Dunaliella cf. viridis*. Tesis de licenciatura, Universidad de Guayaquil. Guayaquil, Ecuador.
- Ponce, P. J., Ayón, P. D., Arredondo, F. J., y Castillo, V. S. 2012. Estrategias para el cultivo de microalgas utilizadas en la alimentación de larvas de camarón. Cuernavaca, Mor. AGT EDITOR. 23-54 pp.
- Pruder, G.D., Bolton, E.T., 1978. System configuration and performance: Bivalve Molluscan Mariculture. Proceeding for the 9th Annual Meeting World Mariculture Society, pp. 747–759.
- Pulz, O., y W. Gross. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. Applied Microbiology and Biotechnology. (65): 635–648.

- Rojo-Cebreros, Á. H., Román-Reyes, J. C., Rodríguez-Montes de Oca, G. A., Nieves-Soto, M., Piña-Valdez, P. y Medina-Jasso, M. A. 2012. Balance energético del rotífero *Brachionus rotundiformis* Tschugunoff 1921, alimentado con cuatro especies de microalgas. Revista Universidad y ciencia, trópico húmedo. 28(3):231-244 pp.
- Rojo-Cebreros, Á. H., Morales-Plascencia, M. E., Ibarra-Castro, L., Martínez-Brown, Juan. M., y Medina-Jasso, M. A. 2016. Floculación de *Nannochloropsis* sp., inducida por hidróxido de sodio: eficiencia de floculación, efecto sobre la viabilidad microalgal y su uso como alimento para rotíferos. Lat. Am. J. Aquat. Res., 44(4): 662-670 pp.
- Rojo-Salazar. G. 2002. Supervivencia y crecimiento de poslarvas y juveniles de *Halotis rufescens* (Swainson, 1822) alimentadas con diatomeas bentónicas. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, México.
- Saracco, A. M. de R. 2003. Cultivo y composición proximal de la microalga *Nannochloropsis oculata* bajo diferentes condiciones de temperatura e intensidad de luz. Tesis de licenciatura. Universidad de Guadalajara. Las Agujas, Jalisco, México.
- Skiftesvik, A. B., Browman H. I. y St-Pierre, J. F. 2003. Life in green water: the effect of microalgae on the behavior of Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. Institute of Marine Research. 97-103 pp.
- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. 321-343 p. En: Stein, J. R. (Ed.). Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements. Cambridge University Press. Cambridge, MA.USA. 448 pp.
- Streit, N., Ramirez, L. G., Queiroz, L., Jacob-Lopes, E., y Queiroz, M. 2015. Producción de pigmentos naturales (clorofila-a) en biorrefinerías agroindustriales. Ciencia y Tecnología. 8(2): 27-34 pp.
- Torrentera, B. L. y Tacon, G. J. A. 1989. La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura una diagnosis. Programa Aquila GCP/RLA/075/ITA, Documento de Campo No. 12 FAO, Roma. En: Ponce, P. J., Ayón, P. D., Arredondo, F., J. Castillo, V. S. 2012. Estrategias para el cultivo de microalgas

utilizadas en la alimentación de larvas de camarón. Cuernavaca, Mor. AGT EDITOR. 53 pp.

Tremblay, R., Cartier, S., Miner, P., Pernet, F., Quere, C., Moal, J., Muzellec, M., Mazuret, M., y Samain, J. 2007. Effect of *Rhodomonas salina* addition to standard hatchery diet during the early ontogeny of the scallop *Pecten maximus*. Aquaculture 262. 410-418 pp.

Vieira C. J. A. y de Moraes, M. G. 2011. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. BioresourceTechnology., (102): 2–9 pp.

Watanabe, T., Kitajima, C. and Fujita, S., 1983. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. Aquaculture, 34: 115-143.