

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



**“ASIMILACIÓN DE DIFERENTES FUENTES DE NITRÓGENO Y SU EFECTO EN EL  
CONTENIDO PROTEICO DE TRES MACROALGAS”**

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFIA COSTERA**

PRESENTA

**RIGOBERTO SÁNCHEZ MEDINA**

Ensenada, Baja California, México a junio, 2014

## ASIMILACIÓN DE DIFERENTES FUENTES DE NITRÓGENO Y SU EFECTO EN EL CONTENIDO PROTEICO DE TRES MACROALGAS

Rigoberto Sánchez Medina. IIO. Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California, Apartado postal 453, Ensenada, Baja California, México. \* E-mail: rigobertosm@hotmail.com

### RESUMEN.

Esta investigación centró su objetivo en evaluar si existe una preferencia por las macroalgas verdes, pardas y rojas por una fuente de nitrógeno (N) inorgánico. Para ello se utilizó al sulfato de amonio  $[(\text{NH}_4^+)_2 \text{SO}_4]$  y al nitrato de sodio  $[\text{NaNO}_3^-]$  como fuente; en base a ello, se probaron si las fertilizaciones a corto plazo incrementan el contenido proteico en *Ulva lactuca* (verde), *Eisenia arborea* (parda) y *Chondracanthus squarrulosus* (roja). Para estimar el tiempo que requieren las macroalgas en incrementar su contenido proteico se aplicaron tres tratamientos: a) Sin fertilizar con 100% de irradiancia, b) Fertilizado con 100% de irradiancia, y c) Fertilizado con 0% de irradiancia. Para conocer el N proteico asimilado por las macroalgas, las proteínas formadas se insolubilizaron con ácido tricloroacético, evaluando el N libre o N no proteico. La cinética de asimilación de N, mostró preferencia por el  $(\text{NH}_4^+)_2 \text{SO}_4$  para las tres macroalgas. El mayor consumo de N en sus dos formas correspondió al alga verde *U. lactuca* con  $29.87 \mu\text{mol g}$  de peso seco por hora ( $\text{ps}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) para  $\text{NaNO}_3^-$  y  $211.11 \mu\text{mol g ps}^{-1} \text{h}^{-1}$  para  $(\text{NH}_4^+)_2 \text{SO}_4$ . La fertilización con  $\text{NH}_4^+$  permitió incrementar el nivel de N en las tres especies; en *U. lactuca* en 13.23% a las 24 horas, *E. arborea* un 10.71% a las 48 horas y en *C. squarrulosus* en un 18.65% a las 36 horas. El ANOVA con una  $F_{\text{crit}}$  ( $\alpha = 95\%$ ) indicó que en los tres casos existen diferencias significativas entre tratamientos. El porcentaje de N no proteico evaluado para las tres especies estuvo en el intervalo de 0.04 – 0.13 % y después de aplicar el factor de corrección; *U. lactuca* tuvo el contenido más alto de N (1.84%), un contenido intermedio se presentó en *E. arborea* (1.72%) y el más bajo fue para *C. squarrulosus* (1.46%). Este estudio demuestra la factibilidad de incrementar el valor nutrimental de las macroalgas en periodos de 24 a 48 horas.

**Palabras claves:** Cultivo de Macroalgas, asimilación de nitrógeno, cinética de asimilación, *Ulva*, *Eisenia*, *Chondracanthus*.

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS  
POSGRADO EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

“ASIMILACIÓN DE DIFERENTES FUENTES DE NITRÓGENO Y SU EFECTO EN EL  
CONTENIDO PROTEICO DE TRES MACROALGAS”

T E S I S

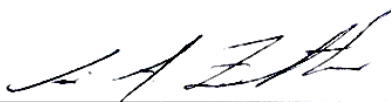
QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

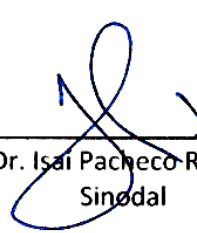
Presenta

**RIGOBERTO SÁNCHEZ MEDINA**

Aprobada por:




Dr. José Antonio Zertuche González  
Director de tesis



---

Dr. Isai Pacheco Ruíz  
Sinodal



---

Dr. Enrique Hernández Garibay  
Sinodal

## **AGRADECIMIENTOS.**

*A mi familia, padres y hermanos por su incondicional apoyo durante este capítulo de mi vida.*

*Al Dr. José A. Zertuche por inspirarme en seguir superándome, al Dr. Enrique Hernández por brindarme asesorías y al Dr. Isaí Pacheco por sus observaciones.*

*A mis compañeros de la CONAFOR, por su amistad y porras. Un aprecio adicional al grupo de SA (M. en C. Fabiola López, Biol. Patricia Mendoza y Biol. Cristina Orozco) por darme la oportunidad de seguir avanzando.*

*A mis colegas del CRIP por su ayuda. Al M. en C. J. Julián Castro, M. en C. Denise Lubinsky y Biol. Itzel Salgado por sus asesorías y apoyo.*

*A los técnicos (Ocean. José Guzmán y M. en C. Mariana Sánchez) por brindarme su tiempo.*

*A mis amigos (presentes y ausentes) que son parte importante del combustible para seguir.*

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por financiar mi estancia en el posgrado.*

## DEDICATORIA

*“A mi familia, amigos y colegas”*

## ÍNDICE DE CONTENIDO.

<b>RESUMEN.</b> .....	II
AGRADECIMIENTOS. ....	IV
DEDICATORIA .....	V
<b>ÍNDICE DE CONTENIDO.</b> .....	VI
<b>LISTA DE TABLAS.</b> .....	VII
<b>LISTA DE FIGURAS.</b> .....	VII
<b>INTRODUCCIÓN.</b> .....	1
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	5
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	5
<b>HIPÓTESIS.</b> .....	5
<b>METODOLOGÍA.</b> .....	5
<i>Cinética de nutrientes</i> .....	5
<i>Asimilación de nitrógeno</i> .....	6
<i>Contenido de nitrógeno proteico</i> .....	8
<i>Contenido de nitrógeno no proteico</i> .....	8
<i>Análisis de datos y estadísticos</i> .....	8
<b>RESULTADOS.</b> .....	9
<i>Cinética de nutrientes</i> .....	9
<i>Asimilación de nitrógeno</i> .....	13
<b>DISCUSIÓN.</b> .....	24
<i>Cinética de nutrientes</i> .....	24
<i>Asimilación de nitrógeno</i> .....	25
<b>CONCLUSIONES.</b> .....	29
<b>BIBLIOGRAFÍA.</b> .....	30

## LISTA DE TABLAS.

Tabla I.....	3
Tabla II.....	11
Tabla III.....	12
Tabla IV.....	17
Tabla V.....	18
Tabla VI.....	18
Tabla VII.....	23
Tabla VIII.....	39
Tabla IX.....	40
Tabla X.....	41

## LISTA DE FIGURAS.

Figura. 1.....	8
Figura.2.....	9
Figura.3.....	10
Figura.4.....	11
Figura. 5.....	14
Figura. 6.....	15
Figura. 7.....	16
Figura. 8.....	20
Figura. 9.....	21
Figura. 10.....	22

## INTRODUCCIÓN.

Las macroalgas marinas son la dieta principal de varios herbívoros de interés comercial como el abulón y el erizo. El crecimiento de estos organismos se relaciona en forma directa con la cantidad de proteína que contienen las macroalgas. El conocimiento del contenido de proteínas en las macroalgas marinas es el principal elemento para determinar su valor nutrimental para ser consideradas en las dietas de organismos en cultivo. Sin embargo, el contenido de proteína en las algas marinas varía de acuerdo a la especie, el medio ambiente donde se desarrolle y la estacionalidad (**Fowden, 1962, Hanisak, 1983, Lobban y Harrison, 1994**). Dada la gran variabilidad que presenta el contenido de proteína en las macroalgas, se han hecho estudios para conocer con detalle la composición química de ciertas especies de interés comercial (**Castro-González *et al*, 1994, Norziah y Ching, 2000, Lourenço *et al*, 2002, Banerjee *et al*, 2009, Ratana-arporn y Chirapart, 2006, Hernández-Carmona *et al*, 2009, Nirmal Kumar *et al*, 2010, Yaich *et al*, 2011, Frikha *et al*, 2011, Pádraigín y FitzGerald, 2013, entre otros**) y determinar su factibilidad como fuente alterna de compuestos naturales biofuncionales (proteínas, péptidos y aminoácidos principalmente). En términos generales se ha reportado que las algas rojas contienen un mayor nivel de proteína el cual puede fluctuar entre el 8%-47% del peso seco, las algas verdes de 8.5%-28%, mientras que las algas pardas de 5%-15% (**Burtin, 2003, Dawczynski *et al*, 2007, Hernández-Carmona *et al*, 2009**).

Por especie, las características genéticas regulan las capacidades del organismo en la absorción de nutrientes del medio, pero existen factores ambientales que pueden influenciar en la fisiología del organismo. La asimilación de nutrientes, así como el crecimiento celular, pueden variar con factores como la luz, la temperatura y fuente de nutriente por mencionar algunos; cualquier condición ambiental que limite la energía celular puede disminuir la asimilación de nutrientes y como consecuencia afecta el crecimiento celular (**DeBoer, 1981, Lobban y Harrison, 1994**).

La cantidad y calidad de luz influye en la fotosíntesis, el crecimiento, desarrollo y la morfogénesis del alga (**Lüning, 1990, Korbee *et al*, 2005**) Las plantas incrementan sus pigmentos fotosintéticos cuando la irradiancia disminuye y cuando la disponibilidad del nitrógeno (N) aumenta (**Kopczak, 1994**). Como ejemplo está el alga verde *Ulva fasciata* Delile que en 10 días de cultivo bajo condiciones limitadas de luz, se detectó que el contenido de clorofila a fue el doble que en condiciones de luz alta. Además se vio que la tasa de consumo de  $\text{NO}_3^-$  presentó un comportamiento inversamente proporcional a los niveles

de luz; bajo condiciones limitadas de luz el consumo fue de  $640.1 \pm 29.7 \mu\text{mol g ps}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , y en condiciones altas de  $439.0 \pm 38.2 \mu\text{mol g ps}^{-1} \text{ d}^{-1}$  (**Lapointe y Tenore, 1981**).

Por otra parte, la temperatura afecta el metabolismo aumentando o disminuyendo la velocidad de la absorción de los nutrientes. Los óptimos de temperatura puede variar entre especies, así como en los estadios de vida (**Edding et al, 2006**). En un trabajo con *Fucus spiralis*, **Topinka (1978)** observó que el consumo de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) presenta una tendencia hiperbólica en cultivos a 5 y 10 °C. Sin embargo, a 15 °C se observó una forma lineal en el consumo de N, a medida que aumentaba la concentración del medio. Esto muestra, como las curvas de asimilación de N en una misma especie pueden verse influenciadas por la temperatura.

**Nishihara et al (2005)**, realizó un estudio específico donde se evidenciaba el efecto sobre la incorporación de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$  a diferentes concentraciones de luz para *Laurencia brongniartii* J. Agardh, finalmente los resultados evidenciaron una diferencia significativa en la incorporación de la fuente. Las tasas de consumo para nitrato presentó una saturación y en irradiancias por arriba de  $40 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  las plantas exhibieron una pérdida de pigmento en su tejido. En contraste, el consumo de amonio mostró una tendencia de aumento en ambas irradiancias ( $15$  y  $40 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), se observó blanqueamiento en alta irradiancia.

En zonas costeras templadas, generalmente, la disponibilidad de nitrógeno inorgánico a finales de primavera y durante el verano, es el principal factor limitante en la producción de macroalgas (**Okhyun, 1998**). En condiciones naturales el  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$  son las principales fuentes de nitrógeno. El consumo varía de acuerdo a la especie y a la cantidad disponible en el medio natural, pudiendo actuar en diferentes escalas de tiempo (**McGlathery et al, 1996**). Las macroalgas pueden utilizar ambas fuentes de nitrógeno, pero no todas pueden aprovecharlas de igual forma (**Hanisak, 1990**). Algunas investigaciones evidencian que al presentarse ambos compuestos químicos ( $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$ ), existe una preferencia por  $\text{NH}_4^+$  en algunas especies debido al bajo costo energético que implica su incorporación (**Smith, 2002, Pedersen et al, 2004, Nishihara et al, 2005**). Es por ello que, la información sobre la afinidad de las macroalgas por nitrato o amonio y su relación con el crecimiento se ha estudiado en un número relativamente amplio de especies (**Tabla I**).

**Tabla I. Estudios reportados de preferencias de fuentes de nitrógeno para algunas especies de macroalgas.  
(Tomado de Hanisak, 1983)**

<b>A. Especies que crecen de forma similar en <math>\text{NO}_3^-</math> o <math>\text{NH}_4^+</math></b>	
<i>Codium fragile</i> Stackhouse	Hanisak, 1979
<i>Chondrus crispus</i> Stackh.	Neish y Fox, 1971
<i>Fucus spiralis</i> L.	Topinka y Robbins, 1976
<i>Gracilaria tikvahiae</i> McLachlan	Lapointe y Ryther, 1978
<i>Porphyra tenera</i> Kjellman	Iwasaki, 1967
<b>B. Especies que crecen mejor en <math>\text{NO}_3^-</math> que <math>\text{NH}_4^+</math></b>	
<i>Gelidium amansii</i> Lmx.	Yamada, 1961 y 1972
<i>Gonotrichum elegans</i>	Fries, 1963
<i>Nemalion multifidum</i> Agardh	Fries, 1963
<i>Palmaria palmata</i> Linnaeus	Morgan y Simpson, 1981
<i>P. tenera</i>	Iwasaki, 1967
<b>C. Especies que crecen mejor en <math>\text{NH}_4^+</math> que <math>\text{NO}_3^-</math></b>	
<i>Chordaria flagelliformis</i> Agardh	Probyn (1981)
<i>G. tikvahiae</i>	DeBoer <i>et al</i> (1978)
<i>Neogardhiella baileyi</i> Wynne	DeBoer <i>et al</i> (1978)
<i>Pterocladia capillacea</i> Bornet	Calabrese y Felicini (1970)

Sin embargo, pocos estudios han determinado la capacidad y el tiempo en que una macroalga, deficiente en nitrógeno, es capaz de asimilar el nitrógeno del medio para incrementar su contenido de proteína. Este tipo de evaluaciones permitiría seleccionar especies aptas como fuente de proteína, ya sea en harinas o directamente como forraje marino.

Diversos estudios demuestran que se puede generar un mejor crecimiento en especies de interés comercial al implementar dietas con macroalgas enriquecidas en sistemas de cultivos integrados, donde los efluentes de cultivos de animales marinos son utilizados para fertilizar las macroalgas (**Shpigel *et al*, 1996, Neori *et al*, 1998, Shpigel *et al*, 1999, Boarder y Shpigel, 2001, Taylor y Tsvetnenko, 2004, Viera *et al*, 2005, Cruz-Suárez *et al*, 2008**). Estos estudios parten de la capacidad que tienen las macroalgas de tomar y almacenar nutrientes cuando estos están disponibles en abundancia, para ser utilizados posteriormente. Así, es posible considerar la posibilidad de incrementar el valor nutricional de las macroalgas mediante fertilizaciones controladas. La respuesta de las diferentes especies de macroalgas a fertilizaciones artificiales varía según sus características genéticas, fisiológicas y morfológicas, por lo que habría que evaluar a cada especie de interés. En primera instancia sería necesario determinar la afinidad de la macroalga a las diferentes fuentes de nitrógeno. Por otro lado, cuando las plantas se

fertilizan en condiciones favorables de luz y temperatura, el crecimiento del alga pudiera reflejarse en una menor concentración de proteína en el tejido. Fertilizaciones de corto plazo, en condiciones de obscuridad podrían favorecer el incremento en proteína.

En Baja California existen varias especies nativas, como *Ulva lactuca* Linnaeus, *Eisenia arborea* Areschoug y *Chondracanthus squarulosus* (Setchell y N. L. Gardner) J. R. Hughey, P. C. Silva y Hommersand, las que presentan un gran potencial para su utilización como una fuente de proteína dietética. Se ha observado una alta variabilidad en el contenido proteico a lo largo del año en *U. lactuca* (Castro-González *et al*, 1996) y *E. arborea* (Hernández-Carmona *et al*, 2009). Para *C. squarulosus* no se ha realizado algún estudio que determine la variabilidad proteica estacional *in situ* o en laboratorio. Para conocer en estas tres especies, su capacidad para incrementar el contenido proteico en su tejido, mediante fertilizaciones controladas, deberá ser necesario responder a las siguientes interrogantes: ¿Cuál es la fuente de N que prefieren?, y en el corto plazo (horas), ¿serán capaces de aumentar su contenido proteico?

Este estudio examina la tasa de consumo de dos fuentes de nitrógeno ( $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$ ) para evaluar si existe una preferencia por alguna forma de nitrógeno, y en cultivos en tanques se determinará el tiempo en que las algas serán capaces de incrementar el contenido de proteínas en sus tejidos.

## OBJETIVO GENERAL

- Conocer la factibilidad de incrementar a corto plazo (horas) el contenido de proteína en *Ulva lactuca*, *Eisenia arborea* y *Chondracanthus squarulosus* mediante fertilizaciones controladas.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar si existe una preferencia entre  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$  en *Ulva lactuca*, *Eisenia arborea* y *Chondracanthus squarulosus*.
- Estimar el incremento de proteína en *Ulva lactuca*, *Eisenia arborea* y *Chondracanthus squarulosus* en función del tiempo, al ser fertilizadas con la fuente de N de su preferencia.

## HIPÓTESIS.

Mediante fertilizaciones con una fuente de nitrógeno, el contenido de proteínas en macroalgas puede incrementarse en un plazo de horas.

## METODOLOGÍA.

### Cinética de nutrientes

#### ***Tasa de consumo de nitrógeno en función de la fuente y concentración de sustrato***

Para conocer si existe preferencia por  $\text{NO}_3^-$  o  $\text{NH}_4^+$  en las tres especies, se hicieron ensayos de cinética. Las algas se obtuvieron de Bahía San Quintín y de cultivos del área de tanques del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO). Se trabajó con organismos de cultivo de *E. arborea* (juveniles), y *C. squarulosus*; *U. lactuca* se extrajo del medio silvestre. Se mantuvieron en las instalaciones de la UABC en cultivo estático en agua de mar sin fertilizar, hasta que se observó una decoloración típica de bajos nutrientes (aproximadamente un mes). Se hizo una medición inicial del contenido de nitrógeno en el tejido (método micro Kjeldahl) y una muestra previa a los experimentos para verificar la disminución en el % de N en el tejido.

Posteriormente se pesaron 2 g del alga y se introdujo en matraces marca Pyrex (150 mL) y se inoculó bajo condiciones estériles (mechero encendido), con 100 mL de medio de enriquecido. Los medios de cultivo se prepararon con agua de mar filtrada (filtros millipore 0.45  $\mu\text{m}$ , marca Whatman), pasada por luz ultravioleta (UV) y autoclave (Market Forge Industries Inc. Sterilatic, STME) a 120 °C por 15 minutos.

Para cada fuente de nitrógeno se preparó un gradiente de concentración; para  $\text{NO}_3^-$  de 60, 120, 180, 240 y 300  $\mu\text{M}$ , y con  $\text{NH}_4^+$  de 120, 240, 360, 480 y 600  $\mu\text{M}$ . Se utilizó una concentración más alta con  $\text{NH}_4^+$  por resultados de curvas de calibración previas a los ensayos de cinética (datos no mostrados). Los cultivos se pusieron en el incubador por una hora a 15 °C y 300  $\mu\text{mol fotón m}^2 \text{ s}^{-1}$ , con agitación (cada quince minutos). Para determinar el consumo, se midió la concentración inicial ( $\text{B}_0$ ) y final ( $\text{B}_f$ ) de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$  después de la hora de incubación. Cada muestra se pasó a través de filtros Whatman GF/F de 0.7  $\mu\text{m}$  y posteriormente se vació en recipientes de plástico de 50 mL tipo Falcon, se refrigeraron y almacenaron para medir el consumo de nitrógeno (analizador HATCH modelo DR2800). Cada tratamiento se realizó por triplicado y un control (sin material algal).

El consumo de nitrógeno se determinó por la desaparición de este dentro del medio. Para el cálculo se utilizó la siguiente ecuación:

$$C = (\text{B}_0 - \text{B}_f) / (\text{t} \times \text{ps})$$

donde;

**C:** es la tasa de consumo ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g peso seco}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ),

**B<sub>0</sub>:** es la concentración inicial del sustrato ( $\mu\text{M}$ ),

**B<sub>f</sub>:** la concentración final ( $\mu\text{M}$ ),

**t:** es el tiempo (h) y

**ps:** es el peso seco del alga (g).

Los valores fueron ajustados al volumen donde se realizaron las inoculaciones (100 mL). La habilidad de las macroalgas para incorporar  $\text{NO}_3^-$  o  $\text{NH}_4^+$  se valoró utilizando la velocidad de consumo y el valor de la pendiente.

### Asimilación de nitrógeno

Para determinar el tiempo de asimilación de nitrógeno y el aumento del contenido proteico en plantas fertilizadas se implementó un diseño que incluyera plantas fertilizadas bajo condiciones de luz y oscuridad. El tratamiento de plantas en oscuridad se incluyó para que, en la medida de lo posible, inhibir el crecimiento del alga y favorecer el incremento en proteína. Para ello se implementó la siguiente metodología. Se pre-acondicionaron las algas para disminuir las reservas de N en los organismos, manteniéndolas en un tanque con aislamiento térmico de 1  $\text{m}^3$ , en cultivo estático, en agua de mar filtrada (20  $\mu$ ), pasada por UV con aireación. Durante esta fase, semanalmente se tomaron

muestras de tejido (2 g) para analizar el contenido de nitrógeno total y determinar cuando los organismos habían reducido sus reservas de nitrógeno.

Sobre un tanque de 1 m<sup>3</sup> con agua de mar, se montó una estructura de PVC que dio soporte a nueve recipientes de plástico marca Cambro (de 4 litros cada uno). Se aplicaron 3 tratamientos: a) Sin fertilizar con 100% de irradiancia, b) fertilizado con 100% de irradiancia y c) fertilizado con 0% de irradiancia. Cada tratamiento se realizó por triplicado. En base a los resultados de cinética, la fertilización se hizo con sulfato de amonio ((NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>) y ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). La concentración fue de 600 μM (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> y 30 μM de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, respectivamente.

Para disminuir la irradiancia al 0%, se forro el recipiente Cambro y la tapadera con plástico negro y cinta adhesiva de tela gris. A cada recipiente se le colocó una línea de aireación; en el tratamiento c) se hizo una perforación en la tapa (**Figura 1**).

Se trabajó con organismos silvestres de *E. arborea* y *U. lactuca*, mientras que de *C. squarulosus* con plantas de cultivo. Los cultivos con *U. lactuca* en cada recipiente (9 en total) se inocularon con 30 g de material algal; para *C. squarulosus* y *E. arborea* se utilizaron 60 g en cada recipiente. La colecta de muestras se hizo cada 12 horas por un periodo de 48 horas. En *U. lactuca* las muestras retiradas cada 12 horas fueron de 6 g, y para *C. squarulosus* y *E. arborea* de 12 g. Las muestras se colocaron dentro de una estufa de convección (Yamato Drying oven DX 600) a 60 °C por un periodo mayor a 72 horas. Para evitar la rehidratación de las muestras, hasta su análisis, se dejaron dentro de una cámara de desecación marca Nalgene con sulfato cálcico (CaSO<sub>4</sub>) como material deshidratante. La irradiancia y temperatura en los cultivos se midió con analizadores marca Hobo y el programa HOBOWare Pro para el vaciado de datos.

Se estimó el porcentaje de velocidad de crecimiento relativo por día del cultivo utilizando la siguiente formula:

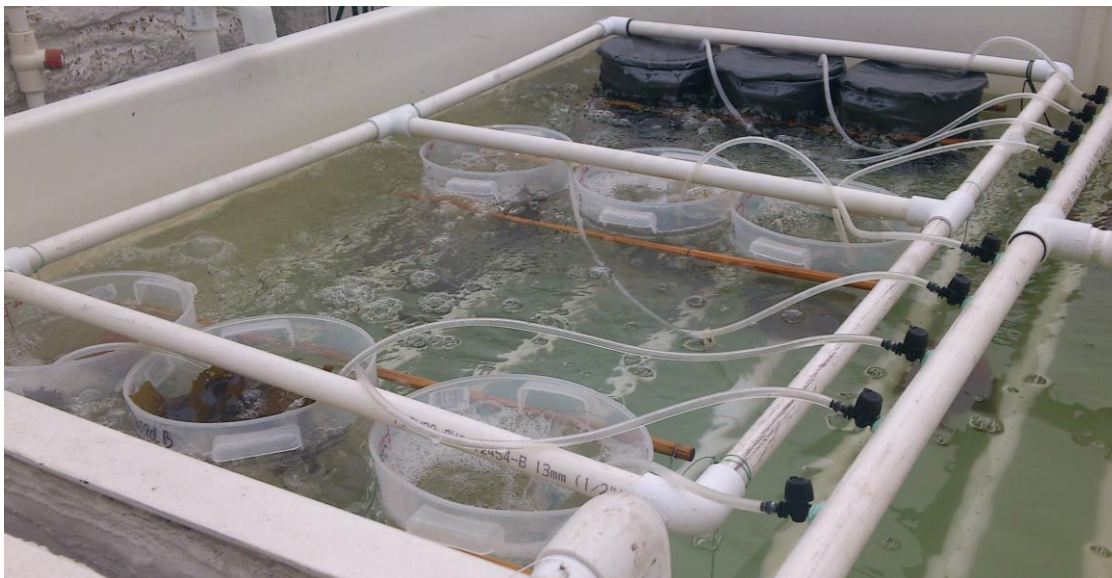
$$R = \ln (W_f/W_0) * 100$$

donde;

**R** es el porcentaje de incremento por día,

**W<sub>f</sub>** es el peso final (g) y

**W<sub>0</sub>** es el peso inicial (g).



**Fig. 1.** Cultivo de macroalgas para determinar la asimilación de  $\text{NH}_4^+$  en función del tiempo en condiciones naturales de luz y oscuridad.

#### Contenido de nitrógeno proteico

El contenido de nitrógeno en el tejido de las macroalgas, se determinó por el método micro Kjeldahl (AOAC, 1990). Para ello se utilizó una muestra de  $0.1 \pm 0.02$  g (peso seco) la que se trituró en un mortero. Posteriormente se colocó en un digestor con los reactivos apropiados y la destilación se realizó por arrastre de vapor, recibiendo el destilado en una solución de ácido bórico. La titulación se hizo con ácido clorhídrico (HCl) valorado. El factor de conversión de nitrógeno a proteína fue de 6.25 (AOAC, 1990).

#### Contenido de nitrógeno no proteico

Se colocaron de 0.1 a 0.2 g de muestra seca y molida en 10 mL de agua destilada, se homogenizó y se adicionaron 10 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 24%, se agitó, se dejó reposar por 10 minutos y posteriormente se centrifugó a 1000 RPM por 10 minutos. Del sobrenadante se tomó una alícuota de 5 mL para la digestión, destilación y titulación por el método micro Kjeldahl, evaluando el nitrógeno libre.

#### Análisis de datos y estadísticos

El consumo de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$  en los experimentos de cinética se realizó con los datos de velocidad de consumo y el valor de la pendiente. Para determinar si en la asimilación de nitrógeno existían diferencias significativas entre los tratamientos fertilizados con  $(\text{NH}_4^+)_2 \text{SO}_4$  se aplicó una prueba de análisis de varianza de una vía (ANOVA) con un nivel de significancia de  $p < 0.05$  (Zar, 1999).

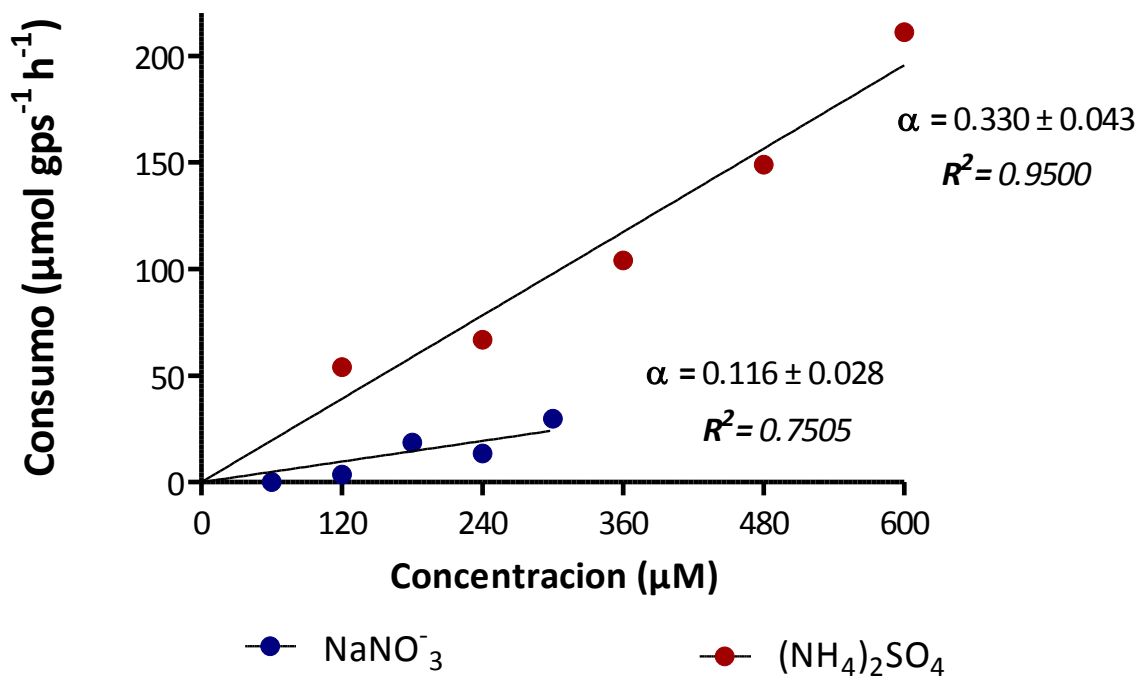
## RESULTADOS.

### Cinética de nutrientes

#### **Tasa de consumo de nitrógeno en función a la concentración de sustrato.**

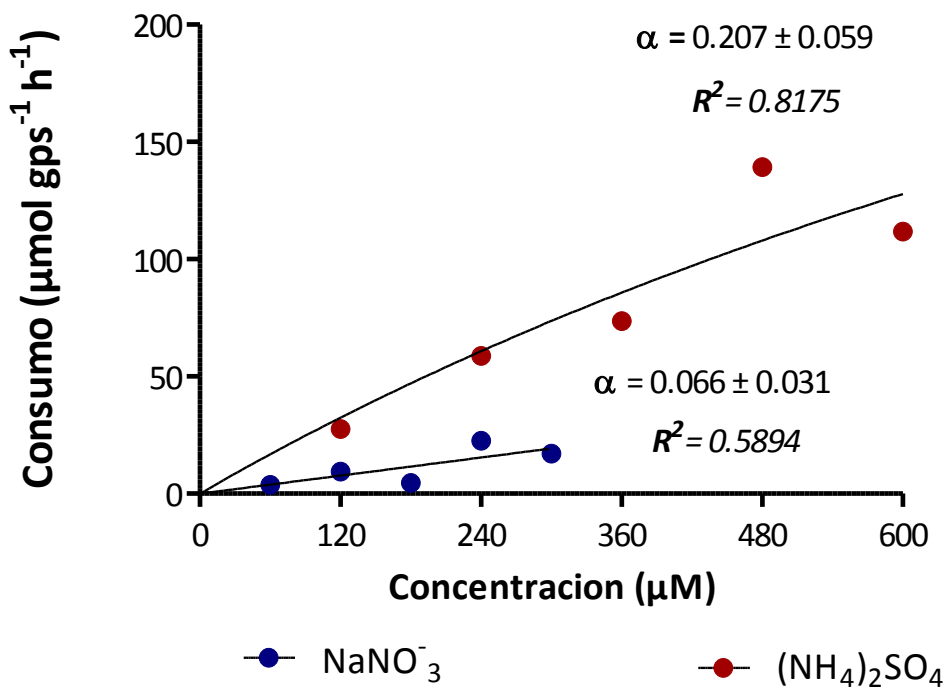
En las tres macroalgas, las plantas mostraron un mayor consumo cuando se fertilizaron con  $(\text{NH}_4^+)_2\text{SO}_4$ .

En *Ulva lactuca* la tasa de consumo de  $\text{NO}_3^-$  presentó un valor mínimo de  $0.00 \mu\text{mol g ps}^{-1} \text{h}^{-1}$  en el medio de  $60 \mu\text{M}$  y un máximo de  $29.87 \mu\text{mol g ps}^{-1} \text{h}^{-1}$  en  $300 \mu\text{M}$ . Para  $\text{NH}_4^+$  el consumo mínimo fue  $53.95 \mu\text{mol g ps}^{-1} \text{h}^{-1}$  en el medio de  $120 \mu\text{M}$  y un máximo de  $211.11 \mu\text{mol g ps}^{-1} \text{h}^{-1}$  a  $600 \mu\text{M}$  (**Tabla II**). Los valores de la pendiente con  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$  fueron  $0.116 \pm 0.028$  y  $0.330 \pm 0.043$ , respectivamente (**Figura 2**).



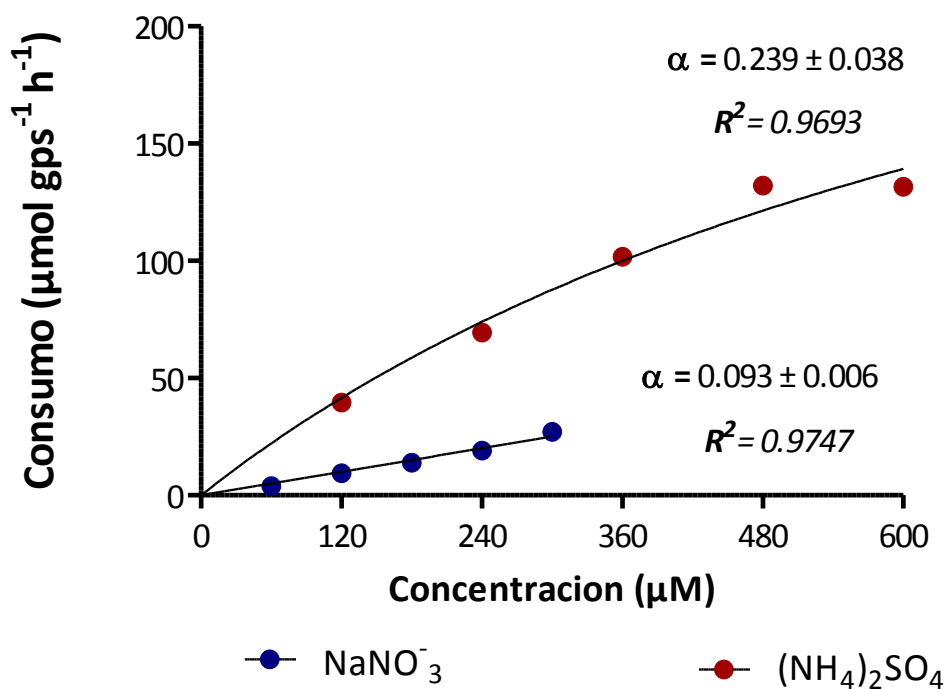
**Fig.2.** Consumo de  $\text{NaNO}_3$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $\mu\text{mol g ps}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) en una hora en *U. lactuca* limitada de nitrógeno,  $\alpha$  = valor de la pendiente.

En *Eisenia arborea* la tasa de consumo de  $\text{NO}_3^-$  presentó un valor mínimo de  $3.80 \mu\text{mol g ps}^{-1} \text{h}^{-1}$  en el medio de  $60 \mu\text{M}$  y un máximo de  $22.63 \mu\text{mol g ps}^{-1} \text{h}^{-1}$  en  $240 \mu\text{M}$ . Con  $\text{NH}_4^+$  el consumo mínimo fue  $27.52 \mu\text{mol g ps}^{-1} \text{h}^{-1}$  en el medio de  $120 \mu\text{M}$  y un máximo de  $139.18 \mu\text{mol g ps}^{-1} \text{h}^{-1}$  a  $600 \mu\text{M}$  (**Tabla II**). Los valores de la pendiente con  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$  fueron  $0.066 \pm 0.031$  y  $0.207 \pm 0.059$ , respectivamente (**Figura 3**).



**Fig.3.** Consumo de  $\text{NaNO}_3$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $\mu\text{mol g ps}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) en una hora en *E. arborea* limitada de nitrógeno,  $\alpha$  = valor de la pendiente.

*Chondracanthus squarulosus* presentó una tasa de consumo de  $\text{NO}_3^-$  que incrementó en forma gradual, con un valor mínimo de  $3.88 \mu\text{mol g ps}^{-1} \text{h}^{-1}$  para el medio de  $60 \mu\text{M}$  y un máximo de  $27.08 \mu\text{mol g ps}^{-1} \text{h}^{-1}$  en  $300 \mu\text{M}$ . Con la fuente de  $\text{NH}_4^+$ , el consumo mínimo fue de  $39.56 \mu\text{mol g ps}^{-1} \text{h}^{-1}$  en el medio de  $120 \mu\text{M}$  y un máximo de  $132.05 \mu\text{mol g ps}^{-1} \text{h}^{-1}$  a  $480 \mu\text{M}$  (**Tabla II**). Los valores de la pendiente con  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$  fueron  $0.093 \pm 0.006$  y  $0.239 \pm 0.038$ , respectivamente (**Figura 4**).



**Fig.4.** Consumo de  $\text{NaNO}_3^-$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $\mu\text{mol g ps}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) en una hora en *C. squarulosus* limitada de nitrógeno,  $\alpha$  = valor de la pendiente.

**Tabla II.** Consumo promedio ( $n=3$ ) de  $\text{NaNO}_3^-$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $\mu\text{mol g ps}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) en las tres especies después de 1 hora de incubación en 100 mL de medio enriquecido a 15 °C y 300  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}$ . SD = desviación estándar.

		Consumo	SD	Consumo	SD	Consumo	SD	Consumo	SD	Consumo	SD	Pendiente ( $\alpha$ )
<i>Ulva lactuca</i>	$\text{NaNO}_3^-$	[60]		[120]		[180]		[240]		[300]		0.116 ± 0.028
		0.00 ± 0.00		3.53 ± 0.41		18.55 ± 0.90		13.56 ± 0.98		29.87 ± 1.37		
<i>Ulva lactuca</i>	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	[120]		[240]		[360]		[480]		[600]		0.330 ± 0.043
		53.95 ± 0.39		66.78 ± 0.30		103.96 ± 4.68		148.99 ± 1.18		211.11 ± 1.43		
<i>Eisenia arborea</i>	$\text{NaNO}_3^-$	[60]		[120]		[180]		[240]		[300]		0.066 ± 0.031
		3.80 ± 0.66		9.46 ± 0.46		4.55 ± 0.56		22.63 ± 0.07		17.03 ± 0.34		
<i>Eisenia arborea</i>	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	[120]		[240]		[360]		[480]		[600]		0.207 ± 0.059
		27.52 ± 0.90		58.75 ± 0.20		73.55 ± 0.56		139.18 ± 0.89		111.70 ± 0.86		
<i>Chondracanthus squarulosus</i>	$\text{NaNO}_3^-$	[60]		[120]		[180]		[240]		[300]		0.093 ± 0.006
		3.88 ± 0.16		9.37 ± 0.70		13.93 ± 0.86		19.03 ± 0.48		27.08 ± 1.23		
<i>Chondracanthus squarulosus</i>	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	[120]		[240]		[360]		[480]		[600]		0.239 ± 0.038
		39.56 ± 0.12		69.40 ± 0.63		101.72 ± 0.80		132.05 ± 0.72		131.66 ± 1.77		

**Pre-acondicionamiento del alga para la reducción de nitrógeno en tejido.**

En todos los casos se detectó una reducción de reservas de nitrógeno, el cual fue mayor en *U. lactuca* y *C. squarrulosus* (Tabla III). En *U. lactuca* bajó de un contenido inicial de N del 2.57% (proteína=16.08%) a un 0.85% (proteína=5.32%). En *C. squarrulosus* bajó del 2.66% (proteína=16.61%) a un 0.72% (proteína=4.51%) y en *E. arborea* bajó del 3.16% (proteína=19.76%) a un 2.39% (proteína=14.93%).

**Tabla III.** Contenido de nitrógeno total en las tres especies (promedio,  $n=3$ ), con organismos en condiciones iniciales y después del pre-tratamiento (limitados de nitrógeno). SD = desviación estándar. Factor proteico de 6.25.

	Condición	Nitrogeno (%)	Promedio N (%)	SD	Proteína (%)	Promedio P (%)	SD
<b><i>Ulva lactuca</i></b>	<i>Inicial</i>	2.56	<b>2.57</b>	± 0.02	16.00	<b>16.08</b>	± 0.15
		2.60			16.26		
		2.56			15.98		
	<i>Pre-tratamiento</i>	0.83	<b>0.85</b>	± 0.02	5.18	<b>5.32</b>	± 0.18
		0.88			5.53		
		0.84			5.25		
<b><i>Eisenia arborea</i></b>	<i>Inicial</i>	3.20	<b>3.16</b>	± 0.03	19.98	<b>19.76</b>	± 0.20
		3.15			19.70		
		3.13			19.59		
	<i>Pre-tratamiento</i>	2.40	<b>2.39</b>	± 0.03	14.97	<b>14.93</b>	± 0.24
		2.35			14.66		
		2.42			15.15		
<b><i>Chondracanthus squarrulosus</i></b>	<i>Inicial</i>	2.50	<b>2.66</b>	± 0.13	15.65	<b>16.61</b>	± 0.87
		2.70			16.85		
		2.78			17.35		
	<i>Pre-tratamiento</i>	0.94	<b>0.72</b>	± 0.18	5.87	<b>4.51</b>	± 1.18
		0.59			3.68		
		0.64			3.99		

### Asimilación de nitrógeno

#### **La asimilación de nitrógeno en función del tiempo en plantas fertilizadas bajo condiciones naturales de luz y bajo obscuridad.**

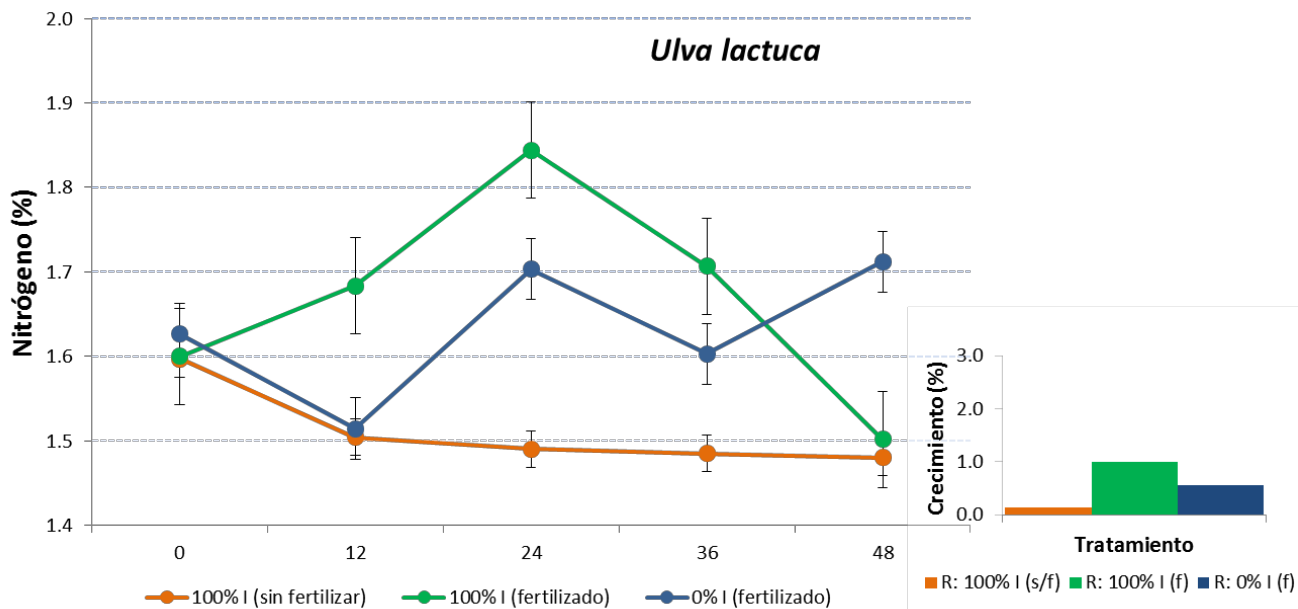
Con el resultado de cinética se determinó que la fuente de N que prefieren las tres algas en este estudio, es el  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , por lo cual todas las fertilizaciones para evaluar el efecto en las reservas de nitrógeno se realizaron con esa especie química.

En *U. lactuca* el tratamiento que presentó una mayor concentración de nitrógeno en el tejido fue el tratamiento que se fertilizó y con 100% de irradiancia; este a las 24 horas (h) de iniciar el cultivo presentó el mayor porcentaje de N con un 1.84%. Posteriormente inició un decremento en el contenido hasta alcanzar el mínimo a las 48 h con 1.50%. Se observó un crecimiento relativo del 0.99% por día<sup>-1</sup> (**Figura 5**).

En el tratamiento fertilizado y con 0% de irradiancia; los cultivos presentaron un valor muy fluctuante en el tiempo, alcanzando el valor más alto a las 48 h con 1.71%. El crecimiento relativo fue 0.55% (**Figura 5**).

El tratamiento sin fertilizar y con 100% de irradiancia; presentó su máximo valor al inicio, posteriormente este valor se redujo en el tiempo hasta alcanzar a las 48 h un contenido de nitrógeno al 1.48% en el tejido. El crecimiento relativo fue 0.14% (**Figura 5**).

El análisis estadístico ANOVA evidenció diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ( $p = <0.05$ ), ver **Tabla VIII (Anexos)**.



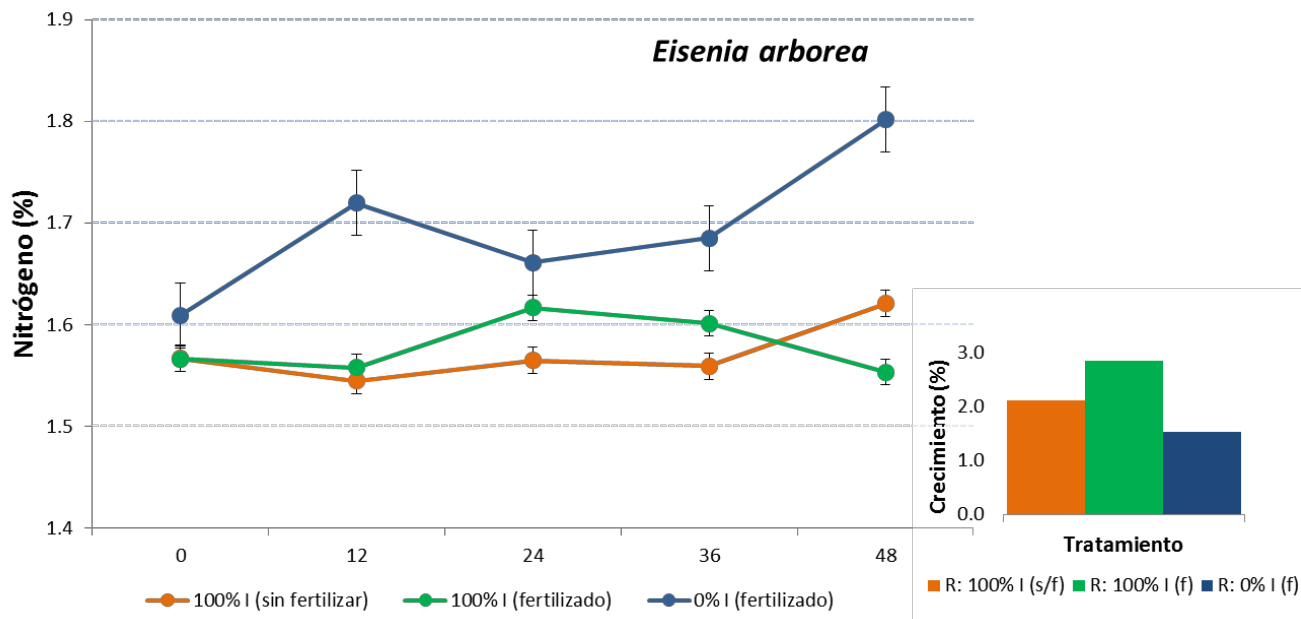
**Fig. 5.** Asimilación de nitrógeno y crecimiento (%) en *U. lactuca* utilizando  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  como fuente de N cada 12 horas por un periodo de 48. (n=3; R=Biomasa día<sup>-1</sup>).

En *E. arborea* el tratamiento que presentó la mayor concentración de nitrógeno fue el fertilizado y con 0% de irradiancia; la mayor concentración de N en el tejido se alcanzó a las 48 h, con 1.80%. Se obtuvo un crecimiento relativo del 1.53% por día<sup>-1</sup> (**Figura 6**).

El tratamiento fertilizado y con 100% de irradiancia; presentó su máximo valor a las 24 h con 1.62%, posteriormente el porcentaje decreció hasta alcanzar 1.55% a las 48 h. El crecimiento relativo fue 2.85% (**Figura 6**).

El tratamiento sin fertilizar y con el 100% de irradiancia; presentó su máximo valor a las 48 h con 1.62%. El crecimiento relativo fue 2.1% (**Figura 6**).

El análisis estadístico ANOVA evidenció diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ), ver **Tabla IX (Anexos)**.



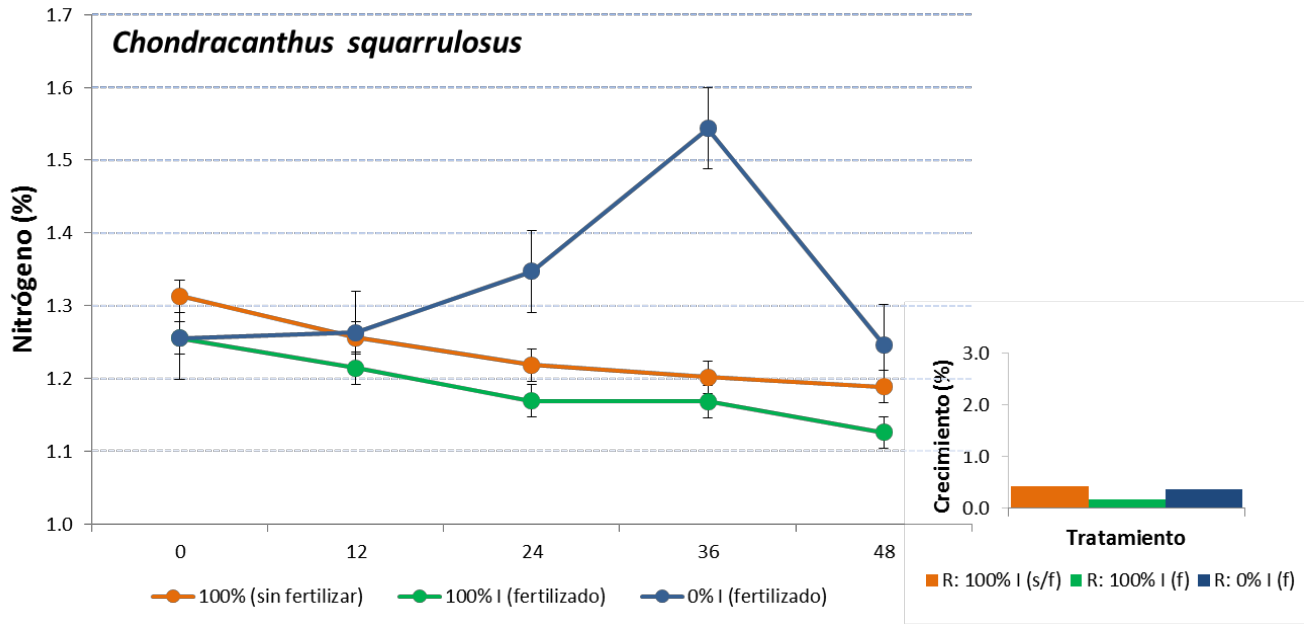
**Fig. 6.** Asimilación de nitrógeno en *E. arborea* utilizando  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fuente de N cada 12 horas por un periodo de 48 horas. ( $n=3$ ;  $R=\text{Biomasa día}^{-1}$ ).

*C. squarulosus* presentó una mayor concentración de nitrógeno en el tratamiento fertilizado y con 0% de irradiancia a las 36 h con un 1.54%. Se observó un crecimiento relativo del 0.36% por día (**Figura. 7**).

El tratamiento fertilizado con 100% de irradiancia, presentó un valor inicial de 1.25% al iniciar el cultivo y después de 48 horas se observó un decremento del contenido de nitrógeno a 1.12%. El crecimiento relativo fue 0.17% (**Figura. 7**).

El tratamiento sin fertilizar y con 100% de irradiancia, la mayor concentración de nitrógeno en el tejido se localizó a inicio del experimento, posteriormente el nitrógeno disminuyó hasta alcanzar el mínimo a las 48 h con 1.18%. El crecimiento relativo fue 0.42% (**Figura. 7**).

El análisis estadístico ANOVA evidenció diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ( $p = <0.05$ ), ver **Tabla X (Anexos)**.



**Fig. 7.** Asimilación de nitrógeno y crecimiento (%) en *C. squarulosus* utilizando  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fuente de N cada 12 horas por un periodo de 48 horas. (n=3; R=Biomasa día<sup>-1</sup>).

Parámetros físicos

**Temperatura.**

En *U. lactuca* sin fertilizar y 100% de irradiancia; una mínima de 18.71 C° y máxima de 26.42 C°; el fertilizado y con 100% de irradiancia; mínima de 18.77 C° y máxima de 25.74 C°; el fertilizado y con 0% de irradiancia; mínima de 18.37 C° y máxima de 23.64 C° (**Tabla IV**).

**Tabla IV.** Valores máximos y mínimos de los promedio ( $n=3$ ) de los tratamientos cada 30 minutos de temperatura(C°) e irradiancia ( $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) durante el cultivo de *U. lactuca* por un periodo de 48 horas.

<b><i>Ulva lactuca</i></b>	<b>100% I (sin fertilizar)</b>	<b>Temperatura (C°)</b>	Mínima=	<b>18.71</b>	<b>Irradiancia (<math>\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}</math>)</b>	Mínima=	<b>0</b>
			Máxima=	<b>26.42</b>		Máxima=	<b>1460.45</b>
	<b>100% I (fertilizado)</b>		Mínima=	<b>18.77</b>		Mínima=	<b>0</b>
			Máxima=	<b>25.74</b>		Máxima=	<b>2571.87</b>
	<b>0% I (fertilizado)</b>		Mínima=	<b>18.37</b>		Mínima=	<b>0</b>
			Máxima=	<b>23.64</b>		Máxima=	<b>0</b>

Con *E. arborea* sin fertilizar y 100% de irradiancia; presentó mínima de 19.76 C° y máxima de 26.30 C°; el tratamiento fertilizado y con 100% de irradiancia; una mínima de 20.01 C° y máxima de 25.55 C°; el fertilizado y con 0% de irradiancia; una mínima de 20.23 C° y máxima de 23.65 C° (**Tabla V**).

**Tabla V.** Valores máximos y mínimos de los promedio ( $n=3$ ) de los tratamientos cada 30 minutos de temperatura( $C^{\circ}$ ) e irradiancia ( $\mu E m^{-2} s^{-1}$ ) durante el cultivo de *E. arborea* por un periodo de 48 horas.

<b><i>Eisenia arborea</i></b>	<b>100% I (sin fertilizar)</b>	<b>Temperatura (<math>C^{\circ}</math>)</b>	Mínima=	<b>19.76</b>	<b>Irradiancia (<math>\mu E m^{-2} s^{-1}</math>)</b>	Mínima=	<b>0</b>
			Máxima=	<b>26.3</b>		Máxima=	<b>688.89</b>
	<b>100% I (fertilizado)</b>		Mínima=	<b>20.01</b>		Mínima=	<b>0</b>
			Máxima=	<b>25.55</b>		Máxima=	<b>1253.79</b>
	<b>0% I (fertilizado)</b>		Mínima=	<b>20.23</b>		Mínima=	<b>0</b>
			Máxima=	<b>23.65</b>		Máxima=	<b>0</b>

En *C. squarulosus* sin fertilizar y 100% de irradiancia, presentó una mínima temperatura de  $18.61 C^{\circ}$  y una máxima de  $26.42 C^{\circ}$ ; el tratamiento fertilizado y con 100% de irradiancia una mínima de  $18.55 C^{\circ}$  y una máxima de  $26.52 C^{\circ}$ ; el cultivo con 0% de irradiancia y fertilizado, mínima de  $19.47 C^{\circ}$  y máxima de  $24.09 C^{\circ}$  (Tabla VI).

**Tabla VI.** Valores máximos y mínimos de los promedio ( $n=3$ ) de los tratamientos cada 30 minutos de temperatura( $C^{\circ}$ ) e irradiancia ( $\mu E m^{-2} s^{-1}$ ) durante el cultivo de *C. squarulosus* por un periodo de 48 horas.

<b><i>Chondrakanthus squarulosus</i></b>	<b>100% I (sin fertilizar)</b>	<b>Temperatura (<math>C^{\circ}</math>)</b>	Mínima=	<b>18.61</b>	<b>Irradiancia (<math>\mu E m^{-2} s^{-1}</math>)</b>	Mínima=	<b>0</b>
			Máxima=	<b>26.42</b>		Máxima=	<b>1001.19</b>
	<b>100% I (fertilizado)</b>		Mínima=	<b>18.55</b>		Mínima=	<b>0</b>
			Máxima=	<b>26.52</b>		Máxima=	<b>1019.56</b>
	<b>0% I (fertilizado)</b>		Mínima=	<b>19.47</b>		Mínima=	<b>0</b>
			Máxima=	<b>24.09</b>		Máxima=	<b>0</b>

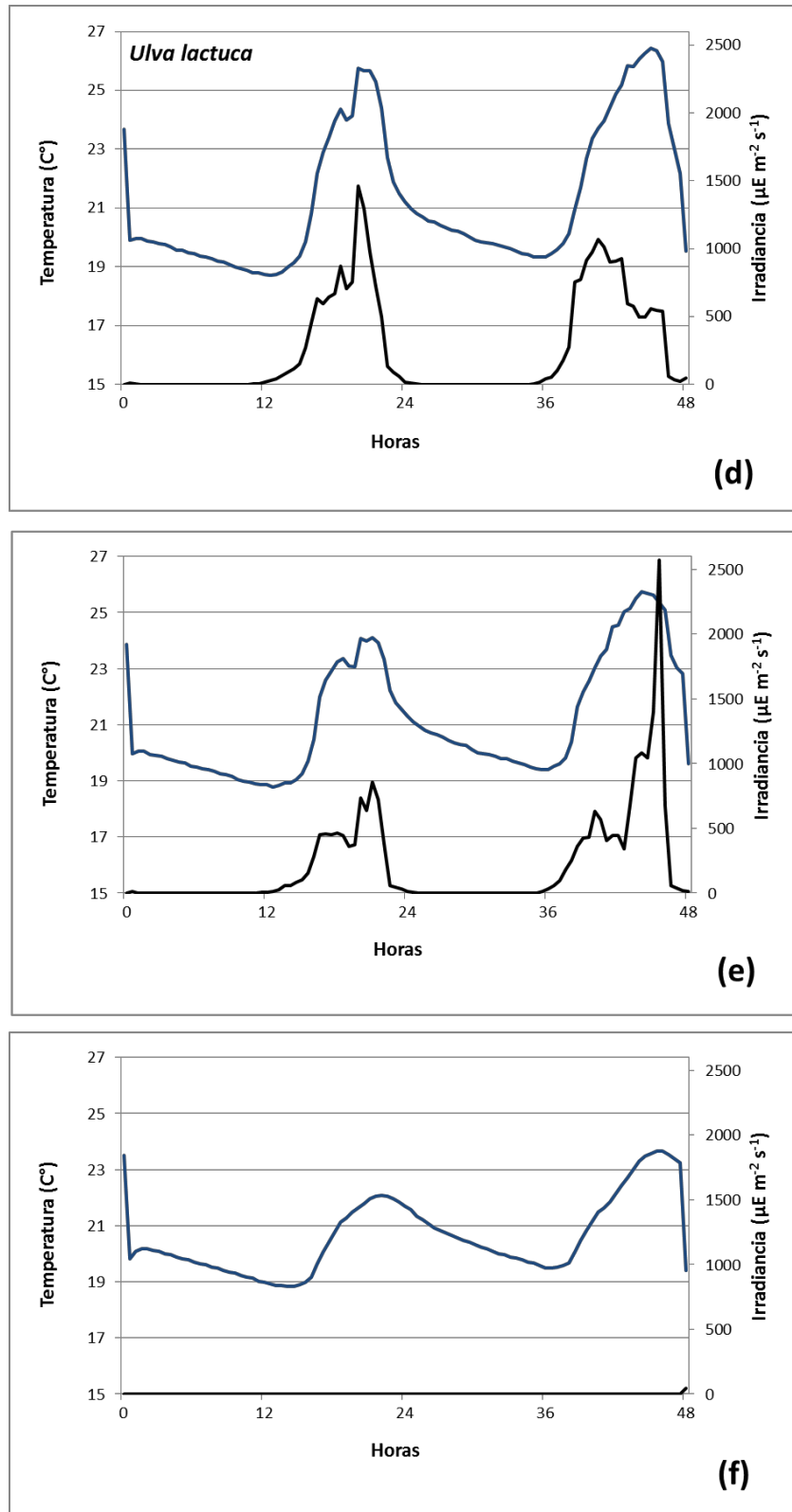
### Irradiancia.

*U. lactuca* en la condición sin fertilizar y 100% de irradiancia; alcanzó  $1,460.45 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; el tratamiento fertilizado y con 100% de irradiancia; llegó a  $2,571.87 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y el tratamiento fertilizado y con 0% de irradiancia;  $0.00 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (**Tabla IV**).

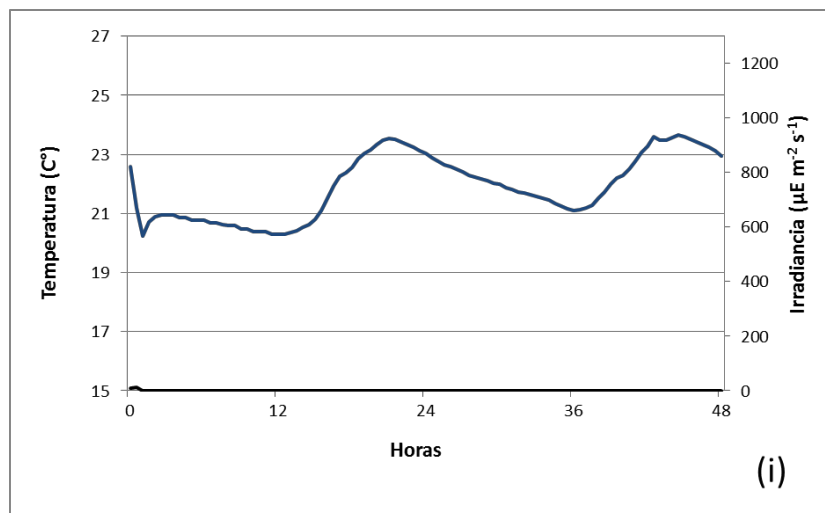
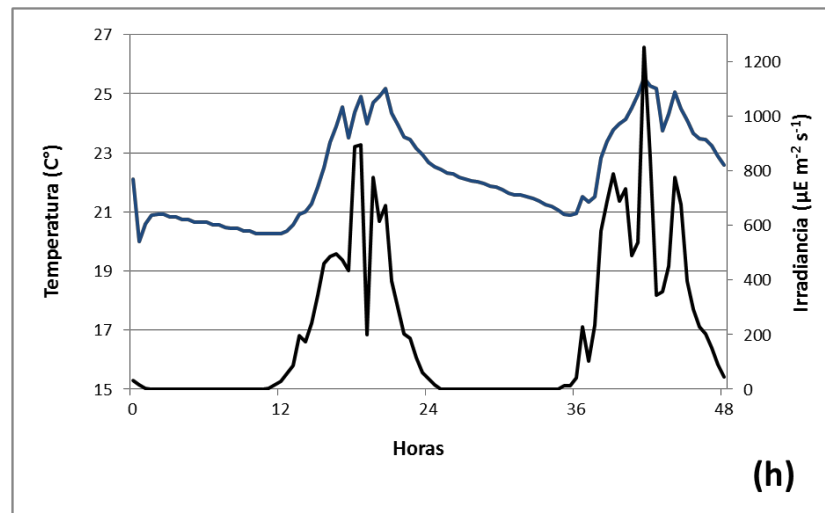
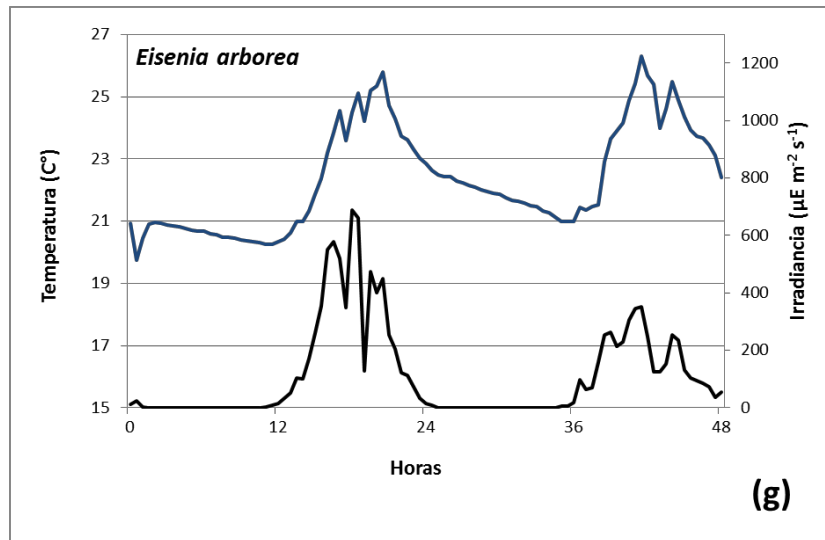
Con *E. arborea*; la condición sin fertilizar y 100% de irradiancia alcanzó  $688.89 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; el tratamiento fertilizado y con 100% de irradiancia llegó a  $1,253.79 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; y el tratamiento fertilizado y con 0% de irradiancia  $0.00 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (**Tabla V**).

*C. squarulosus* en la condición sin fertilizar y 100% de irradiancia alcanzó  $1001.19 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; el tratamiento fertilizado y con 100% de irradiancia llegó a  $1019.56 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y el fertilizado y con 0% de irradiancia;  $0.00 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (**Tabla VI**).

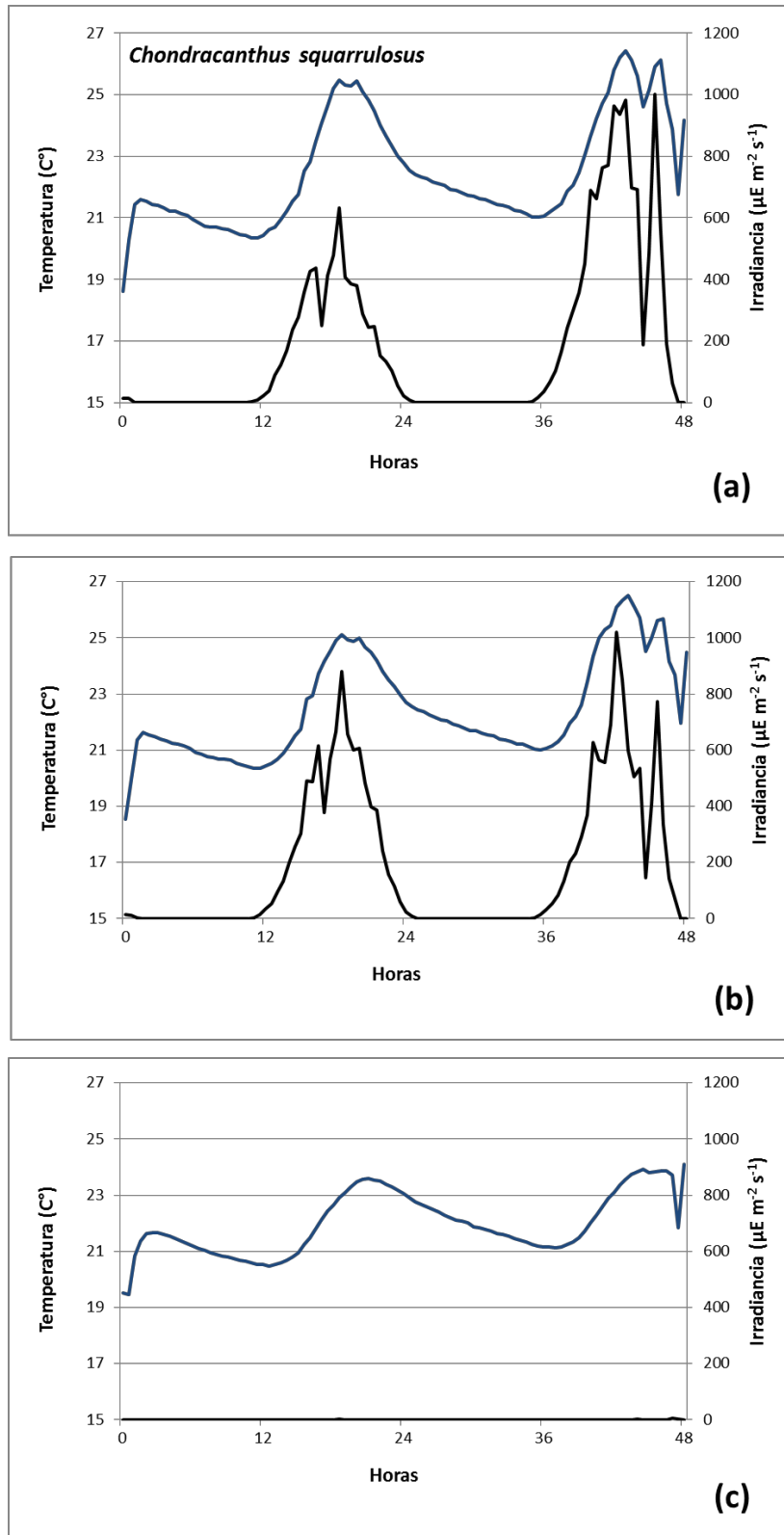
El monitoreo por 48 horas en los cultivos mostró que temperatura e irradiancia, tuvieron 2 periodos de picos y valles; correspondiente al ritmo circadiano. Para todas las especies con luz, los picos tuvieron una forma abrupta y marcada. Mientras que en el tratamiento en oscuridad, la línea de temperatura presentó una forma suavizada y reducida, nunca alcanzaron el tamaño de los picos de los otros tratamientos (**Figuras 8, 9 y 10**). En oscuridad los picos al iniciar y finalizar el cultivo se deben a la instalación y desinstalación de los termógrafos en los recipientes.



**Fig. 8.** Monitoreo cada 30 minutos de temperatura(C°) e irradiancia (μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) durante el cultivo de *U. lactuca* por un periodo de 48 horas, la figura (d) 100% I (sin fertilizar), (e) 100% I (fertilizado) y (f) 0% I (fertilizado).



**Fig. 9.** Monitoreo cada 30 minutos de temperatura(C°) e irradiancia ( $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) durante el cultivo de *E. arborea* por un periodo de 48 horas, la figura **(g)** 100% I (sin fertilizar), **(h)** 100% I (fertilizado) y **(i)** 0% I (fertilizado).



**Fig. 10.** Monitoreo cada 30 minutos de temperatura(C°) e irradiancia (μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) durante el cultivo de *Chondracanthus squarulosus* por un periodo de 48 horas, la figura **(a)** 100% I (sin fertilizar), **(b)** 100% I (fertilizado) y **(c)** 0% I (fertilizado).

Nitrógeno no proteico

Se consideró el tratamiento con el porcentaje de nitrógeno más alto de las 48 horas de cultivo de cada una de las especies para determinar el nitrógeno no-protéico. En *C. squarrulosus* fue a las 36 horas de iniciar el cultivo, el porcentaje de N se encontró entre 0.08 – 0.13%, para *U. lactuca* a las 24 horas con contenidos de N entre 0.04 y 0.05%, y *E. arborea* a las 48 horas de 0.05-0.08%. (Tabla VII).

**Tabla VII.** Determinación de nitrógeno no proteico para aplicar factor de corrección a los valores nitrógeno total para las tres especies de macroalgas (n=3).

Especie	Tiempo (hora)	Condición	N no Proteico (%)	N Total (%)	N Proteico (%)	
					Nitrógeno	Proteína
<i>Ulva lactuca</i>	24	100% I (sin fertilizar)	0.04	1.49	1.45	9.05
		<b>100% I (fertilizado)</b>	<b>0.04</b>	<b>1.84</b>	<b>1.80</b>	<b>11.27</b>
		0% I (fertilizado)	0.05	1.70	1.65	10.33
<i>Eisenia arborea</i>	48	100% I (sin fertilizar)	0.06	1.62	1.56	9.75
		100% I (fertilizado)	0.05	1.55	1.51	9.41
		<b>0% I (fertilizado)</b>	<b>0.08</b>	<b>1.80</b>	<b>1.72</b>	<b>10.77</b>
<i>Chondracanthus squarrulosus</i>	36	100% I (sin fertilizar)	0.09	1.20	1.11	6.94
		100% I (fertilizado)	0.13	1.17	1.04	6.52
		<b>0% I (fertilizado)</b>	<b>0.08</b>	<b>1.54</b>	<b>1.46</b>	<b>9.15</b>

## DISCUSIÓN.

### Cinética de nutrientes

#### **Tasa de consumo de nitrógeno en función a la concentración de sustrato**

Se observó una tendencia similar en la tasa de consumo de nitrógeno en las tres especies, con una mayor afinidad por el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) sobre el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y donde la principal diferencia fue la cantidad de nitrógeno que pueden consumir. La tasa de consumo fue más alta en *Ulva lactuca* (**Figura. 2**) que en las otras dos especies (**Figuras. 3 y 4**) lo cual es congruente con el concepto de función-forma donde *U. lactuca* presenta una mayor área con respecto a su volumen (**Lobban y Harrison, 1994**), mientras que la relación área: volumen de *E. arborea* (juvenil) y *C. squarulosus* es relativamente similar. En trabajos realizados en *Ulva pertuosa* Kjellman se observó que su velocidad de consumo fue superior que las demás especies, debido a una mayor área/volumen, con un consumo alto y una relativa baja capacidad de almacenamiento, donde su tasa de crecimiento está altamente relacionado con la disponibilidad de nitrógeno en el medio (**Jing-Wen y Shuang-Lin, 2001**). Estas variaciones sistemáticas en sus consumos de cinética están relacionadas a diferencias en su morfología algal, donde los organismos con frondas y talos delgados (monostromáticos) consumen los nutrientes más rápido por unidad de biomasa que las especies con frondas y talos anchos (**Pedersen y Borum, 1997**).

El amonio en *E. arborea* y *C. squarulosus* presentó una disminución en la velocidad de consumo de N a medida que aumento la concentración, mientras que *U. lactuca* su consumo se mantuvo lineal a medida que aumentó la concentración (**Figura. 2**). Este comportamiento se ha observado en otras especies de algas como: *N. baileyi*, *Gracilaria foliifera* Børgesen, *G. tikvahiae*, *Gracilaria pacifica* Abbott, *Chaetomorpha linum* Kützinger, *Ulva fenestrata* Postels y Ruprecht y *Ulva rigida* Agardh, lo cual es muy común al utilizar en el cultivo formas reducidas de nitrógeno inorgánico (**Mariachiara y Wheeler, 1999, Smit, 2002, Runcie et al, 2003**). *E. arborea* y *C. squarulosus* pierden la linealidad en su tasa de consumo, debido a un inicio en la saturación en el tejido (**Figuras. 3 y 4**). **Jing-Wen y Shuang-Lin (2001)**, en trabajos similares con otras especies de macroalgas, determinaron una pérdida en la linealidad típica del consumo de  $\text{NH}_4^+$  debido a la acumulación de nitrógeno intracelular y a la inhibición de la retroalimentación en los procesos de transporte.

En los sistemas costeros la fuente más abundante de nitrógeno inorgánico es el nitrato (**Lobban y Harrison, 1994**). Sin embargo, cuando existe una disponibilidad de amonio el comportamiento común que se observa es una preferencia por esta especie química, aunque existen excepciones. Esta mayor

afinidad se explica debido a que para reducir el nitrato se requieren ocho electrones extras mientras que el amonio se asimila de forma directa (Lobban y Harrison, 1994; Rees *et al*, 2007).

### Asimilación de nitrógeno

En este estudio se consideró una especie anual (*U. lactuca*), una pseudo-perene (*C. squarulosus*) y una perene (*E. arborea*) y cada una de ellas presenta estrategias fisiológicas de sobrevivencia diferentes, incluyendo sus capacidades de almacenamiento de N (Fujita, 1985). Por lo tanto, es de esperarse respuestas diferentes a la asimilación de N. La asimilación del N bajo los diferentes tratamientos de luz y oscuridad mostró algunas generalidades para todos los tratamientos sin fertilizar, pero variantes en los tratamientos fertilizados de acuerdo a la morfología y fisiología de cada especie. En todos los casos, las plantas sin fertilizar mantuvieron un valor bajo o un decaimiento en el contenido de N, mientras que en los casos fertilizados, tanto en luz como oscuridad, se observó un enriquecimiento que varió en tiempo y concentración de acuerdo a la especie. En *E. arborea* y *C. squarulosus* fue similar.

Ambas especies mostraron un mayor enriquecimiento de N bajo el tratamiento de fertilizado con 0% de irradiancia (Figuras. 6 y 7); mientras que *U. lactuca* mostró su pico más alto en el tratamiento fertilizado con 100% de irradiancia (Figura 5).

En ciertas especies de algas limitadas en N, se ha visto que la asimilación de  $\text{NH}_4^+$  puede aumentar de cuatro a cinco su valor normal (Syrett, 1962). El enriquecimiento de N varió entre 10-18% en el grupo de especies estudiadas. Mientras que el tratamiento de oscuridad pareció estimular el incremento de N en el tejido, es de esperarse que se presentara un umbral donde se agotan las reservas de ATP que pudieran mantener el metabolismo de asimilación de N. Es probable que este umbral pudiese incrementarse si la planta se expusiera a periodos intermitentes de luz que permitieran generar ATP. Por otro lado, el incremento de proteína como el logrado en los tratamientos utilizados en este estudio (14.2% en promedio) pueden resultar relevantes cuando se trata de alimentar organismos en cultivo.

En caso de *Ulva*, el tratamiento con luz mostró el mayor enriquecimiento a las 24 horas, para después decaer por debajo del tratamiento de oscuridad. *Ulva* es considerada una especie oportunista que responde más rápidamente a cambios ambientales (Barr, 2007).

Algunas especies del eulitoral presentan una saturación por luz a los  $500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , las laminariales y otras especies de la parte media del sublitoral se saturan a los  $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , mientras que las algas rojas de aguas profundas solo requieren  $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  para su saturación, pudiéndose considerar a las algas

del intermareal como “plantas de sol” y aquellas del submareal como “plantas de sombra” (Lobban y Wynne, 1981, Lüning, 1990). Aparentemente, las características oportunistas de *U. lactuca* le permitieron responder al incremento de N rápidamente a pesar de estar expuesta a altas irradiancias. Sin embargo, esta condición no se mantuvo por más de 24 horas.

En este estudio *U. lactuca* mostró un comportamiento diferente a las otras dos especies; la concentración más alta de nitrógeno se observó en la condición fertilizado con 100% de irradiancia, que dada la distribución ecológica de esta especie en la zona del intermareal, con características morfológicas y fisiológicas típicas de un alga oportunista (foliosa con una alta razón área/volumen y las constantes de saturación de N más altas en este trabajo) cuando se encuentra en niveles altos de nutrientes, el crecimiento y la fotosíntesis están relativamente acoplados y presentan una saturación de luz a irradiancias similares. Esta respuesta es una adaptación del organismo para reducir la acumulación de reservas, lo que permite el crecimiento a la mejor tasa dado los nutrientes disponibles en el medio (Dring, 1982). *U. lactuca* inició con un contenido de nitrógeno del 1.60% y a las 24 horas alcanzó un 1.84%, con un aumento del 13.23% (Figura. 5). Esta situación podría explicar lo que sucedió entre las 36 a 48 horas del experimento (Figura. 5), la planta tuvo un consumo alto que permitió un crecimiento hasta las 24 horas, pero las últimas horas del cultivo se alcanzó una irradiancia de  $2571.87 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Tabla IV) que pudo generar una fotoinhibición y reducir el número de pigmentos proteicos. Similar a lo que se vio en las otras dos especies en los tratamientos de 100% de irradiancia fertilizado y sin fertilizar.

El tratamiento sin fertilizar 100% de irradiancia tuvo un decremento que se mantuvo constante durante el cultivo, incluso el crecimiento de biomasa fue el menor de los tres tratamientos con un 0.14% (Figura 5). La irradiancia y la disponibilidad de nitrógeno regulan la fotosíntesis, tasas de crecimiento y consumo de nutrientes en *U. lactuca* (Duke et al, 1986) y debido a que la planta no tuvo la presencia de N en el cultivo e irradiancias cercanas a  $1460.45 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Tabla IV), pudo afectar de manera negativa la fisiología del organismo. El tratamiento fertilizado con 0% de irradiancia, aunque no presentó el valor más alto de N mostró un incremento no lineal, siguiendo una tendencia a la temperatura del cultivo. Se ha reportado que la temperatura óptima para el desarrollo de *U. lactuca* es a los 18 °C (Pacheco-Ruiz et al, 2003), y esta influye de forma directa en la actividad de la producción de enzimas (RUBISCO) que regula las tasas de crecimiento (Davison y Davison, 1987). En esa condición se observó incrementos en la concentración de N (Figura. 5) a las 24 horas y cercano a las 48 horas, donde se obtuvo los picos más altos de temperatura (Figura. 8).

*E. arborea* se distribuye desde la zona intermareal hasta los 34 m de profundidad (Spalding *et al*, 2003). Demuestra una gran tolerancia a temperaturas altas (25°C- 27°C, Dieck, 1993), la cual le brinda una mayor persistencia durante y/o en la recuperación de los periodos de eventos extremos, como los años ENSO donde la temperatura aumenta, (Hernández-Carmona *et al*, 2001; Hernández-Carmona *et al*, 2011; Matson y Edwards, 2007; Parada-Sánchez *et al* 2012). Considerando esto, la temperatura máxima del experimento con *E. arborea* (23.65°C) no fue causa que impidiera al organismo consumir y asimilar N (Tabla V). En el tratamiento fertilizado con 0% de irradiancia, *E. arborea* al presentar adaptaciones fisiológicas a condiciones limitadas de luz, le permite incorporar nutrientes del medio en forma paulatina para almacenar nitrógeno. Esto puede estar relacionado con el aumento de biomasa, que al ser comparado contra los otros dos tratamientos fue el menor con 1.53% (Figura. 6). Los tratamientos de 100% de irradiancia fertilizado y sin fertilizar, tuvieron concentraciones más bajas de nitrógeno en el tejido, pero un crecimiento de 2.85% donde se fertilizó y 2.1% en el tratamiento no fertilizado (Figura. 6). Estos crecimiento se obtuvieron a pesar de encontrarse en una irradiancia fuera de su límite de tolerancia; para el tratamiento sin fertilizar 100% de irradiancia ( $688.89 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y fertilizado con 100% de irradiancia ( $1253.79 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (Tabla V). Cercano a las 48 horas ambos tratamientos mostraron diferentes tendencias, esta variación se puede explicar por la irradiancia alta que se presentó en el tratamiento fertilizado que pudo causar un fotoestrés y con esto una disminución en el contenido de N. Mientras que en el tratamiento que no se fertilizó, aunque las condiciones fueron menos severas (Figura. 9), se desconoce que factor generó el incremento de N al finalizar el cultivo.

*C. squarulosus* es una especie que se distribuye desde la zona del submareal hasta una profundidad aproximada de 5 m. Se ha observado que esta especie presenta ventajas fotosintéticas sobre otras especies al estar en temperaturas bajas y periodos cortos de luz, lo cual es consistente con su mayor tasa de crecimiento durante los meses de invierno en campo (Cabello-Pasini *et al*, 2003). En el tratamiento fertilizado con 0% de irradiancia, se observó un claro enriquecimiento a las 36 horas seguido de una disminución a las 48 horas, de acuerdo a lo planteado en la hipótesis. Como se mencionó anteriormente, este comportamiento se puede atribuir al decaimiento de ATP entre las 36 y 48 horas (Figura. 7). El enriquecimiento de N en el tejido no se vio afectado por el incremento de biomasa del organismo; el crecimiento relativo en los tres tratamientos fue bajo (0.17%-0.42%), pudiendo el N irse directamente como reserva en su tejido. Lo que respecta a los otros dos tratamiento de 100% de irradiancia fertilizado y sin fertilizar se observó que la irradiancia alcanzó periodos que pueden considerarse no óptimos para esta especie, con valores por arriba de  $1000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Tabla VI). El

periodo de exposición a las altas irradiancias durante el cultivo (**Figura. 10**), pudo haber generado un estrés que causo el decremento de nitrógeno en la **figura 7**, debido a que en altas irradiancias el contenido de pigmentos puede disminuir para evitar una inhibición irreversible en el sistema fotosintético (fotodaño) y la fotoinhibición (**Lüning, 1990**).

La captación de N por las algas puede inhibirse cuando se tienen altas reservas celulares. Se sabe que las fuentes de N se pueden conservar como nitrógeno vacuolar (**Hanisak, 1983**) lo cual nos daría un dato no real del contenido de nitrógeno proteico. Al no ser asimilado por el organismos se considera nitrógeno no proteico, como: aminoácidos libres, clorofila, nitrato, nitrito, iones de amonio y ácidos nucleicos (**Se-Kwon, 2012**). En este estudio se observó que el N no proteico fue despreciable (intervalos de 0.04 al 0.13%), por lo cual, los resultados de enriquecimiento de N pueden suponerse proteicos (**Tabla VII**).

Con los resultados obtenidos de la asimilación de las tres especies, se observó que la interacción de combinación de factores físicos (luz y temperatura) y químicos (fuente de nitrógeno), aunado a la función-forma y estrategias de sobrevivencia de cada una, resultan en respuestas fisiológicas diferentes. Este estudio demuestra que es posible estimular el enriquecimiento del alga baja en nutrientes mediante fertilizaciones de corto plazo (horas) y que, en términos generales, fertilizaciones en obscuridad tienden a incrementar el enriquecimiento. Sin embargo, la respuesta es específica para cada especie y el enriquecimiento tiene un umbral que para la variedad de especies consideradas en este estudio fue de un enriquecimiento del 10 al 18% del valor inicial.

## CONCLUSIONES.

- En los experimentos de cinética, en función de la fuente de N,  $(\text{NH}_4^+)_2 \text{SO}_4$  y  $\text{NaNO}_3^-$  se observó una mayor afinidad por la fuente de amonio en las tres especies.
- El tamaño de la pendiente fue mayor al doble en el consumo de  $(\text{NH}_4^+)_2 \text{SO}_4$  contra  $\text{NaNO}_3^-$ , en las tres especies.
- Las variaciones de consumo se asocian a diferencias en la morfología, los organismos con frondas y talos delgados (monostromáticos) consumen los nutrientes más rápido por unidad de biomasa.
- La fertilización con  $\text{NH}_4^+$  permitió incrementar el nivel de N en las tres especies; *C. squarulosus* en un 18.65% a las 36 horas, *U. lactuca* en 13.23% a las 24 horas y *E. arborea* un 10.71% a las 48 horas.
- El N no proteico fue relativamente bajo; *U. lactuca* tiene el contenido más alto de N (1.84%), seguida por *E. arborea* (1.72%) y al final *C. squarulosus* (1.46%).
- El trabajo demuestra la factibilidad de incrementar el valor nutricional (proteína) en periodos de 24 a 48 horas en *C. squarulosus*, *E. arborea* y *U. lactuca* por medio de fertilizaciones controladas.

## BIBLIOGRAFÍA.

- **AOAC.** (1990). Official Method of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, USA. 15<sup>th</sup> Edition.
  
- **Banerjee, K., R. Ghosh, S. Homechaudhuri y A. Mitra.** (2009). Seasonal variation in the biochemical composition of red seaweed (*Catenella repens*) from Gangetic delta, northeast coast of India. *Journal of Earth System Science.* (V): 118, (N): (5), pp 497–505.
  
- **Barr, N. G.** (2007). Aspects of nitrogen metabolism in the green alga *Ulva* ; Developing an indicator of seawater nitrogen loading. Tesis de doctorado. University of Auckland, Marine Science Department, New Zealand, pp 219.
  
- **Boarder S. J. y M. Shpigel.** (2001). Comparative performances of juvenile *Haliotis roei* fed on enriched *Ulva rigida* and various artificial diets. *Journal of Shellfish Research.* (V): 20, (N): 2, pp 653–657.
  
- **Burtin P.** (2003). Nutritional value of seaweeds. *Electronic Journal of Environmental Agricultural and Food Chemistry.* (V): 2, pp 248–503.
  
- **Cabello-Pasini A., J. A. Zertuche-González e I. Pacheco-Ruíz.** (2003). Photosynthesis, Growth and Nitrogen Uptake of Competing Marine Macrophytes in the Gulf of California. *Botánica Marina.* (V): 46, (N): 6, pp 503–512.
  
- **Calabrese, G. y G. P. Felicini.** (1970). Research on the red algae pigments. I. Pigments of *Pterocladia capillacea* cultured with some nitrogenous materials. *G. Bot. Ital.* (V): 104, pp 81-89.
  
- **Castro-González, M. I., S. Carrillo-Domínguez y F. Pérez-Gil.** (1994). Composición química de *Macrocystis pyrifera* (sargazo gigante) recolectada en verano e invierno y su posible empleo en alimento animal. *Revista Ciencias Marinas.* (V): 20, (N): 1, pp 33-40.
  
- **Castro-González, M. I, F. Pérez-Gil Romo, S. Pérez-Estrella y S. Carrillo-Domínguez.** (1996). Composición química del alga verde *Ulva lactuca*. *Revista Ciencias Marinas.* (V): 22, (N): 2, pp 205-213.

- **Cruz-Suárez L. E., M. Tapia-Salazar, M. G. Nieto-López y D. Ricque-Marie.** (2008). A review of the effects of macroalgae in shrimp feeds and in Co-Culture. *Avances en nutrición acuícola IX. Simposio Internacional de Nutrición Acuícola.* Nov. 24-27. México, Nuevo León. pp 304-333.
  
- **Davison, I. R. y J. O. Davison.** (1987). The effect of growth temperature on enzyme activities in the brown alga *Laminaria saccharina*. *Br. Journal of Phycology.* (V): 22, pp 1–11.
  
- **Dawczynski C., R. Schubert y G. Jahreis.** (2007). Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. *Food Chemistry.* (V): 103, (N): 3, pp 891–899.
  
- **Dring, M. J.** (1982). *The Biology of Marine Plants.* Press Syndicate of the University of Cambridge. USA. First Edition. pp 199.
  
- **DeBoer J. A., H. J. Guigli, T. L. Israel y C. F. D'Elia.** (1978). Nutritional studies of two red algae. I. Growth rate as a function of nitrogen source and concentration. *Journal of Phycology.* (V): 14, pp 261–266.
  
- **DeBoer J. A.** (1981). *Nutrients EN: Lobban, C. S. y M. J. Wynne. The biology of seaweeds.* University of California Press, USA. First Edition. pp 356-392.
  
- **Duke, C. S., S., B. E. Lapointe y J. Ramus.** (1986). Effects of light on growth, RuBPCase activity and chemical composition of *Ulva* species (Chlorophyta). *Journal of Phycology.* (V): 22, pp 362–370.
  
- **Edding, M., F. Tala y J. Vásquez.** (2006). *Fisiología Vegetal: Fotosíntesis, Productividad y Algas Marinas.* Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile. Capítulo XI, pp 39.
  
- **Fowden, L.** (1962). Amino acids and proteins. EN: Lewin R. *Physiology and biochemistry of algae.* Academic Press Inc. USA. Fifth printing. pp 189-206.
  
- **Fries, L.** (1963). On the cultivation of axenic red algae. *Physiol. Plant.* (V): 16, pp 695-708.

- **Frikha, F., M. Kammoun, N. Hammami, L. Belbahri, Y. Gargouri, y N. Miled.** (2011). Chemical composition and some biological activities of marine algae collected in Tunisia. *Ciencias Marinas*. (V): 37, (N): 3, pp 113–124.
  
- **Fujita, R. M.** (1985). The role of nitrogen status in regulating transient ammonium uptake and nitrogen storage by macroalgae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. (V): 92, pp 283–301.
  
- **Fujita R. M., P. A. Wheeler y R. L. Edwards.** (1988). Metabolic regulation of ammonium uptake by *Ulva rigida* (chlorophyta): a compartmental analysis of the rate-limiting step for uptake. *Journal of Phycology*. (V): 24, pp 560-566.
  
- **Hanisak M. D.** (1979). Growth patterns of *Codium fragile ssp. tomentosoides* in response to temperature, irradiance, salinity, and nitrogen source. *Marine Biology*. (V): 50, pp 319-332.
  
- **Hanisak M. D.** (1983). The nitrogen relationships of marine macroalgae. EN: Carpenter, E. J. y D. G. Capone. *Nitrogen in the Marine Environment*. Academic Press. USA. First Edition. pp 699-730.
  
- **Hanisak M. D.** (1990). The use of *Gracilaria tikvahiae* (Gracilariales, Rhodophyta) as a model system to understand the nitrogen nutrition of cultured seaweeds. *Hydrobiologia*. (V): 204/205, (N): 1, pp 79-87.
  
- **Hein M., M. F. Pedersen y K. Sand-Jensen.** (1995). Size-dependent nitrogen uptake in micro- and macroalgae. *Marine Ecology Progress Series*. (V): 118, pp 247-253.
  
- **Hernández-Carmona, G., D. Robledo y E. Serviere-Zaragoza.** (2001). Effect of nutrient availability on *Macrocystis pyrifera* recruitment and survival near its southern limit off Baja California. *Botánica Marina*. (V): 44, pp 221-229.
  
- **Hernández-Carmona, G., S. Carrillo-Domínguez, D. L. Arvizu-Higuera, E. Rodríguez-Montesinos, J. I. Murillo-Álvarez, M. Muñoz-Ochoa y R. M. Castillo-Domínguez.** (2009). Monthly variation in the chemical composition of *Eisenia arborea* J. E. Areschoug. *Journal of Applied Phycology*. (V): 21, (N): 5 pp 607–616.

- **Hernández-Carmona, G., R. Riosmena-Rodríguez, E. Serviere-Zaragoza y G. Ponce-Díaz.** (2011). Effect of nutrient availability on understory algae during El Niño Southern Oscillation (ENSO) conditions in Central Pacific Baja California. *Journal of Applied Phycology*. (V): 23, pp 635–642.
  
- **Iwasaki, H.** (1967). Nutritional studies of the edible seaweed *Porphyra tenera*. II Nutrition of Conchocelis. *Journal of Phycology*. (V): 3, pp 30-34.
  
- **Jing-Wen, L. y D. Shuang-Lin.** (2001). Comparative studies on utilizing nitrogen capacity between two macroalgae *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* (Rhodophyta) and *Ulva pertuosa* (Chlorophyta). II. Feedback controls of intracellular nitrogen pools on nitrogen uptake. *Journal of Environmental Science*. (V): 13, (N): 3, pp 323-327.
  
- **Kopczak, C. D.** (1994). Variability of nitrate uptake capacity in *Macrocystis pyrifera* (Laminariales, Phaeophyta) with nitrate and light availability'. *Journal of Phycology*. (V): 30, pp 573–580.
  
- **Korbee N., F. L. Figueroa y J. Aguilera.** (2005). Effect of light quality on the accumulation of photosynthetic pigments, proteins and mycosporine-like amino acids in the red alga *Porphyra leucosticta* (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. (V): 80, (N): 2, pp 71–78.
  
- **Lapointe, B. E. y J. H. Ryther.** (1978). Some aspects of growth and yield of *Gracilaria tikvahiae* in culture. *Aquaculture*. (V): 15, pp 185-193.
  
- **Lapointe, B. E., y R. Tenore.** (1981). Experimental outdoor studies with *Ulva fasciata* Delile. I. Interaction of light and nitrogen on nutrient uptake, growth, and biochemical composition. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. (V): 53, pp 135–152.
  
- **Lobban, C. S. y P. J. Harrison.** (1994). *Seaweed ecology and physiology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. First Edition. pp 366.

- **Lourenço, Sergio O., E. Barbarino, J. C. de-Paula, L. O. da S. Pereira y U. M. Lanfer Marquez.** (2002). Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for 19 tropical seaweeds. *Phycological Research*. (V): 50, pp 233–241.
  
- **Lüning K.** (1990). *Seaweeds: Their environment, Biogeography, and Ecophysiology*. Wiley Interscience Publication, USA. First Edition. pp 527.
  
- **Mariachiara Naldi y P.A.Wheeler.** (1999). Changes in nitrogen pools in *Ulva fenestrata* (Chlorophyta) and *Gracilaria pacifica* (Rhodophyta) under nitrate and ammonium enrichment. *Journal of Phycology*. (V): 35, (N): 1, pp 70–77.
  
- **Matson P. G. y M. S. Edwards.** (2007). Effects of ocean temperature on the southern range limits of two understory kelps, *Pterygophora californica* and *Eisenia arborea*, at multiple life-stages. *Marine Biology*. (V): 45, (N): 5, pp 297-309.
  
- **McGlathery K. J., M. F. Pederson, y J. Borum.** (1996). Changes in intracellular nitrogen pools and feedback controls on nitrogen uptake in *Chaetomorpha linum* (Chlorophyta). *Journal of Phycology*. (V): 32, (N): 3, pp 393–401.
  
- **Morgan, K. C. y F. J. Simpson.** (1981). Cultivation of *Palmaria* (Rhodymenia) *palmate*: Effect of high concentrations of nitrate and ammonium on growth and nitrogen uptake. *Aquatic Botany*. (V): 11, pp 167-171.
  
- **Neish A. C. y C. H. Fox.** (1971). Greenhouse experiments on the vegetative propagation of *Chondrus crispus* (Irish Moss), Technical Report Issue 12. Atlantic Regional Laboratory, National Research Council of Canada. pp 70.
  
- **Neori A., N. L. C. Ragg y M. Shpigel.** (1998). The integrated culture of seaweed, abalone, fish and clams in modular intensive land-based systems: II. Performance and nitrogen partitioning within an abalone (*Haliotis tuberculata*) and macroalgae culture system. *Aquacultural Engineering*. (V): 17, (N): 4, pp 215–239.

- **Nirmal Kumar, J. I., R. N. Kumar, M. K. Amb, A. Bora, y Sudeshnachakraborty.** (2010). Variation of biochemical composition of eighteen marine macroalgae collected from Okha Coast, Gulf of Kutch, India. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry.* (V): 9, (N): 2, pp 404–410.
  
- **Nishihara G. N., R. Terada y T. Noro.** (2005). Effect of temperature and irradiance on the uptake of ammonium and nitrate by *Laurencia brongniartii* (Rhodophyta, Ceramiales). *Journal of Applied Phycology.* (V): 17, (N): 5, pp 371–377.
  
- **Norziah, M. H. y C. Y. Ching.** (2000). Nutritional composition of edible seaweed *Gracilaria changgi*. *Food Chemistry.* (V): 68 (N): 1, pp 69–76.
  
- **Okhyun A., R. J. Petrell, y P. J. Harrison.** (1998). Ammonium and nitrate uptake by *Laminaria saccharina* and *Nereocystis luetkeana* originating from a salmon sea cage farm. *Journal of Applied Phycology.* (V): 10, pp 333–340.
  
- **Pacheco-Ruíz, I., F. Becerril-Bobadilla, J. A. Zertuche-González, A. Chee Barragán, A. Gálvez-Telles y R. Blanco-Betancourt.** (2003). Effects of El Niño on beds of *Ulva lactuca* along the northwest coast of the Gulf of California, Mexico. *Geofísica Internacional.* (V): 42, (N): 3, pp 447-453.
  
- **Pádraigín, A. H., y R. J. FitzGerald.** (2013). Extraction of protein from the macroalga *Palmaria palmata*. *LWT - Food Science and Technology.* (V): 51, (N):1, pp 375-382.
  
- **Parada-Sánchez, G. M., R. Riosmena-Rodríguez, E. A. Martínez y G. Hernández-Carmona.** (2012). Morphological variability of intertidal *Eisenia arborea* (Laminariales, Ochrophyta) at Punta Eugenia, Baja California Sur. *Algae.* (V): 27, (N): 2, pp 109-114.
  
- **Pedersen, M. F. y J. Borum.** (1997). Nutrient control of estuarine macroalgae: Growth strategy and the balance between nitrogen requirements and uptake. *Marine Ecology Progress Series.* (V): 161, pp 155–163.

- **Pedersen, A., G. Kraemer y C. Yarish.** (2004). The effects of temperature and nutrient concentrations on nitrate and phosphate uptake in different species of *Porphyra* from Long Island Sound (USA). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. (V): 312, (N): 2, pp 235–252.
  
- **Probyn, T. A.** (1981). Aspects of the light and nitrogenous nutrient requirement for growth of *Chordaria flagelliformis* (O. F. Mull) C. Ag. *Proceedings of the International Seaweed Symposium 10<sup>th</sup>*, 1980, pp 339-344.
  
- **Ratana-arporn, P. y A. Chirapart.** (2006). Nutritional Evaluation of Tropical Green Seaweeds *Caulerpa lentillifera* and *Ulva reticulata*. *Kasetsart Journal (Natural Science)*. (V): 40, pp 75–83.
  
- **Rees, T. A. V., B. C. Dobson, M. Bijl y B. Moralissen.** (2007). Kinetics of nitrate uptake by New Zealand marine macroalgae and evidence for two nitrate transporters in *Ulva intestinalis* L. *Hydrobiologia*. (V): 586, pp 135–141.
  
- **Runcie, W. J., R. J. Ritchie y A. W. D. Larkum.** (2003). Uptake kinetics and assimilation of inorganic nitrogen by *Catenella nipae* and *Ulva lactuca*. *Aquatic Botany*. (V): 76, pp 155–174.
  
- **Se-Kwon Kim.** (2012). *Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology*. John Wiley & Sons, First Edition. UK. pp 663.
  
- **Spalding, H., M. S. Foster y J. N. Heine.** (2003). Composition, distribution, and abundance of depth-water (>30 m) macroalgae in central California. *Journal of Phycology*. (V): 39, pp 273-284.
  
- **Smith, A. J.** (2002). Nitrogen uptake by *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta): Adaptations to a temporally variable nitrogen environment. *Botánica Marina*. (V): 45, (N): 2, pp 196-209.
  
- **Syrett, P. J.** (1962). Nitrogen Assimilation. EN: Lewin R. *Physiology and biochemistry of algae*. Academic Press Inc. USA. Fifth printing. pp 171-188.
  
- **Taylor M. H. y E. Tsvetnenko.** (2004). A growth assessment of juvenile abalone *Haliotis laevis* fed enriched macroalgae *Ulva rigida*. *Aquaculture International*. (V): 12, pp 467–480.

- **tom Dieck, I.** (1993). Temperature tolerance and survival in darkness of kelp gametophytes (Laminariales, Phaeophyta): ecological and biogeographical implications. *Marine Ecology Progress Series*. (V): 100, pp 253-264.
  
- **Topinka, J. A. y J. V. Robbins.** (1976). Effects of nitrate and ammonium enrichment on growth and nitrogen physiology in *Fucus spiralis*. *Limnology and Oceanography*. (V): 21, (N): 5, pp 659-664.
  
- **Topinka, J. A.** (1978). Nitrogen uptake by *Fucus spiralis* (Phaeophyceae). *Journal of Phycology*. (V): 14, pp 241–247.
  
- **Shpigel M., A. Marshall, I. Lupatsch, J. P. Mercer y A. Neori.** (1996). Acclimation and propagation of the abalone *Haliotis tuberculata* in a land-based culture system in Israel. *Journal of World Aquaculture Society*. (V): 27, (N): 4, pp 435–442.
  
- **Shpigel M., N. L. Ragg, I. Lupatsch y A. Neor.** (1999). Protein content determines the nutritional value of the seaweed *Ulva lactuca* L. for the abalone *Haliotis tuberculata* L. and *H. discus hannai* Ino. *Journal of Shellfish Research*. (V): 18, (N): 1, pp 227–233.
  
- **Viera M.P., J. L. Gómez-Pinchetti, G. Courtois-De-Vicose, A. Bilbao, S. Suárez; R. J. Haroun y M. S. Izquierdo.** (2005). Suitability of three red macroalgae as a feed for the abalone *Haliotis tuberculata* *coccinea* Reeve. *Aquaculture*. (V): 248, pp 75-82.
  
- **Yaich, H., H. Garna, S. Besbes, M. Paquot, C. Blecker y H. Attia.** (2011). Chemical composition and functional properties of *Ulva lactuca* seaweed collected in Tunisia. *Food Chemistry*. (V): 128, (N): 4, pp 895–901.
  
- **Yamada, N.** (1961). Studies on the manure for seaweed. I. On the change of nitrogenous component of *Gelidium amansii* Lmx. cultured with different nitrogen sources. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. (V): 27, pp 953-957.
  
- **Yamada, N.** (1972). Manuring for *Gelidium*. 7<sup>th</sup> Proc. International Seaweed Symposium, 1971, pp 385-390.

•Zar, J. H. (1999). Biostatistical Analysis. Prentice Hall, USA. Fourth edition. pp 663.

•ANEXOS.

Tabla VIII. Valores de nitrógeno total en muestras de en *Ulva lactuca* utilizando  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fuente de N cada 12 horas por un periodo de 48 horas. Todos los valores son promedios; n=3.

	Condición	Toma de muestra (Hora)	Nitrógeno (%)	SD	Proteína (%)	SD
<i>Ulva lactuca</i>	100% I (sin fertilizar)	0	1.60	±0.04	9.98	± 0.30
		12	1.50		9.40	
		24	1.49		9.59	
		36	1.49		9.28	
		48	1.48		9.25	
	100% I (fertilizado)	0	1.60	± 0.12	10.00	± 0.79
		12	1.68		10.52	
		24	1.84		11.52	
		36	1.71		10.67	
		48	1.50		9.39	
	0% I (fertilizado)	0	1.63	± 0.08	10.16	± 0.50
		12	1.51		9.47	
		24	1.70		10.65	
		36	1.60		10.02	
		48	1.71		10.70	
<b>Fcal</b>					<b>3.97</b>	
<b>F<sub>α,2,12</sub></b>					<b>3.88</b>	

**Tabla IX.** Valores de nitrógeno total en muestras de en *Eisenia arborea* utilizando  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fuente de N cada 12 horas por un periodo de 48 horas. Todos los valores son promedios;  $n=3$ .

	<i>Condición</i>	<i>Toma de muestra (Hora)</i>	<i>Nitrógeno (%)</i>	<i>SD</i>	<i>Proteína (%)</i>	<i>SD</i>
<b><i>Eisenia arborea</i></b>	<b>100% I (sin fertilizar)</b>	0	1.57	± 0.02	9.79	± 0.18
		12	1.54		9.65	
		24	1.56		9.78	
		36	1.56		9.74	
		48	1.62		10.13	
	<b>100% I (fertilizado)</b>	0	1.57	± 0.02	9.79	± 0.17
		12	1.56		9.74	
		24	1.62		10.10	
		36	1.60		10.01	
		48	1.55		9.71	
	<b>0% I (fertilizado)</b>	0	1.61	± 0.07	10.06	± 0.44
		12	1.72		10.75	
		24	1.66		10.38	
		36	1.69		10.53	
		48	1.80		11.26	
<b>Fcal</b>					<b>10.68</b>	
<b>F<sub>α,2,12</sub></b>					<b>3.88</b>	

**Tabla X.** Valores de nitrógeno total en muestras de en *Chondracanthus squarulosus* utilizando  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  como fuente de N cada 12 horas por un periodo de 48 horas. Todos los valores son promedios; n=3.

	<i>Condición</i>	<i>Toma de muestra (Hora)</i>	<i>Nitrógeno (%)</i>		<i>Proteína (%)</i>	
				<i>SD</i>		<i>SD</i>
<b><i>Chondracanthus squarulosus</i></b>	<b>100% I (sin fertilizar)</b>	0	1.31	± 0.05	8.21	± 0.31
		12	1.26		7.85	
		24	1.22		7.62	
		36	1.20		7.51	
		48	1.19		7.43	
	<b>100% I (fertilizado)</b>	0	1.26	± 0.04	7.85	± 0.30
		12	1.21		7.59	
		24	1.17		7.31	
		36	1.17		7.30	
		48	1.13		7.04	
	<b>0% I (fertilizado)</b>	0	1.26	± 0.12	7.85	± 0.78
		12	1.26		7.90	
		24	1.35		8.42	
		36	1.54		9.65	
		48	1.25		7.79	
<b>Fcal</b>					<b>3.90</b>	
<b>F<sub>α,2,12</sub></b>					<b>3.88</b>	