



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE
CIENCIAS MARINAS

CONTENIDO DE PROTEINAS, LIPIDOS Y CARBOHIDRATOS EN
Tetraselmis suecica (KYLIN) BUTCH CON DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE NUTRIENTES EN CULTIVO
S E M I C O N T I N U O



T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

O C E A N O L O G O

PRESENTA:

SALVADOR VELAZQUEZ MAGAÑA

RESUMEN

Se evaluó el efecto de tres diferentes concentraciones de nutrimentos en el crecimiento y composición bioquímica de Tetraselmis suecica, en un sistema semicontinuo. Las pruebas estadísticas empleadas se realizaron al 95 % de confiabilidad.

Se encontraron diferencias significativas en la concentración de microalgas en la etapa de cultivo discontinuo entre los experimentos F-F/4; F/2-F/4, la concentración alcanzada al séptimo día de cultivo para cada experimento fue: F (1 999 703 cél/ml); F/2 (1 656 086 cél/ml); F/4 (961 271 cél/ml). La etapa semicontinua presentó diferencias significativas entre los tres experimentos, variando la biomasa de los cultivos.

Los máximos valores porcentuales de proteínas, lípidos y carbohidratos para cada experimento fueron: F (13.84, 25.17 y 21.19 %); F/2 (14.02, 24.63 y 35.78 %); F/4 (13.81, 23.61 y 59.50 %). Las proteínas y lípidos no presentaron diferencias significativas entre experimentos. Siendo los carbohidratos el único constituyente bioquímico que si presentó diferencias, debido a la concentración de nutrimentos.

CONTENIDO DE PROTEINAS, LIPIDOS Y CARBOHIDRATOS EN
Tetraselmis suecica (KYLIN) BUTCH CON DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE NUTRIENTES EN CULTIVO SEMICONTINUO.

TESIS QUE PRESENTA:
SALVADOR VELAZQUEZ MAGAÑA

APROBADA POR



PRESIDENTE DEL JURADO
OC. ENRIQUE VALENZUELA ESPINOZA



SINODAL PROPIETARIO
OC. LEWIS S. McANALLY SALAS



SINODAL PROPIETARIO
QUIM. IRMA E. SORIA MERCADO



SINODAL SUPLENTE
OC. ALFREDO SALAS GARZA



SINODAL SUPLENTE
M.C. GILBERTO GAXIOLA CASTRO

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Investigaciones Oceanológicas por el apoyo brindado y permitirme realizar este trabajo dentro de sus instalaciones.

Al Dr. Enrique Valenzuela Espinoza por haber dirigido este trabajo, facilitarme su laboratorio y tiempo durante los cultivos de microalgas.

A los Oceanólogos José Antonio Segovia y Francisco Delgadillo H. por permitirme emplear su laboratorio para la realización de los análisis químicos.

Al P.O. Adan Castillo por haberme apoyado con material durante los análisis.

A todos y cada uno de los sinodales por sus acertadas críticas y sugerencias para mejorar el presente escrito.

Al P.O. Jorge Gerardo Wilburn B. por su colaboración durante el desarrollo de los experimentos.

DEDICATORIA

A MIS PADRES

SALVADOR Y Ma. GUADALUPE

Por su esfuerzo, apoyo incondicional y el cariño que
siempre me han brindado.

A MIS HERMANAS

CRUZ ANGELICA Y Ma. GUADALUPE DEL ROCIO

Por alentarme a seguir siempre adelante.

A MIS SOBRINOS

CHAVITA Y CHOLITA

CONTENIDO

	PAGINA
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	4
OBJETIVO	6
MATERIALES Y METODOS	7
RESULTADOS	12
DISCUSIONES	26
CONCLUSIONES	31
RECOMENDACIONES	32
LITERATURA CITADA	33
APENDICE I.....	39
APENDICE II.....	40

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1. Curvas de crecimiento de Tetraselmis suecica con diferentes concentraciones de nutrimentos...14
- Figura 2. Cosecha y recuperación del sistema de cultivo semicontinuo de Tetraselmis suecica con diferentes concentración de nutrimentos.....17

LISTA DE TABLAS

Página

Tabla I.	Valores de pH registrados en los cultivos de <u>Tetraselmis suecica</u> etapas discontinuas y semicontinuo.....	12
Tabla II.	Parámetros poblacionales de <u>Tetraselmis suecica</u> en cultivo semicontinuo para los tres experimentos.....	15
Tabla III.	Análisis estadístico de comparación de pendientes en el sistema de cultivo discontinuo de <u>Tetraselmis suecica</u> al 95 % de confiabilidad.....	16
Tabla IV.	Fluctuaciones del cultivo semicontinuo de <u>Tetraselmis suecica</u> en los tres experimentos con una dilución del 33.3 %	18
Tabla V.	Parámetros poblacionales promedio de <u>Tetraselmis suecica</u> de los tres experimentos durante la etapa del sistema de cultivo semicontinuo.....	19
Tabla VI.	Análisis estadístico de la concentración de <u>Tetraselmis suecica</u> del sistema semicontinuo prueba U de Mann Whitney, al 95 % de confianza...	21
Tabla VII.	Porciento en peso seco de proteínas lípidos y carbohidratos de <u>Tetraselmis suecica</u> en los tres experimentos de las siete cosechas.....	22

Tabla VIII.	Análisis estadístico entre los tres experimentos de los componentes bioquímicos de <u>Tetraselmis suecica</u> prueba t de student al 95 % de confianza.....	23
Tabla IX.	Valores de la razón carbohidratos/proteínas de <u>Tetraselmis suecica</u> para los tres experimentos...	25
Tabla X.	Análisis estadístico de la proporción carbohidratos/proteínas de <u>Tetraselmis suecica</u> prueba U de Mann Whitney al 95 % de confianza...	25

INTRODUCCION

Los sistemas acuaculturales se basan principalmente en la producción de alimento vivo y los organismos que lo consumen, el cual puede ser considerado como una fuente indirecta para la alimentación humana. Las microalgas pueden ser usadas en la alimentación de filtroalimentadores comerciales, es por esto que el fitoplancton es el punto de partida del flujo de energía biológica para la mayoría de los sistemas acuáticos y juega un papel fundamental de la cadena alimenticia en diversas operaciones acuaculturales (Bardach et al., 1972).

La producción diaria de volúmenes suficientes y especies apropiadas de microalgas para su uso en la alimentación de larvas y juveniles de importancia comercial como son moluscos, crustáceos y peces, ha creado la necesidad de su cultivo masivo (De Pauw, 1981).

Las principales areas de nutrición, biotecnología y economía en conjunto pueden ser identificadas en el campo de la producción de microalgas para la acuacultura; estos puntos también son aplicables para la ficocultura en general (De Pauw, 1981).

El valor nutricional de las microalgas puede ser determinado mediante la alimentación de especies comercialmente explotables. Como primer criterio de

aptitud la microalga debe ser de un tamaño apropiado para la ingestión del consumidor, una vez ingerida, éste depende de su composición bioquímica y el requerimiento nutricional del consumidor (Provasoli et al., 1970).

El usar medios de cultivo de menor costo en la producción masiva, puede tener efecto directo en la composición de las microalgas, lo cual puede afectar la concentración de proteínas, lípidos y carbohidratos. Por lo que es conveniente la cuantificación de estos constituyentes en los cultivos de microalgas con diferentes concentraciones de nutrimentos, donde se obtendrá información sobre su composición bioquímica, el valor nutricional de las mismas y si cumple los requerimientos del consumidor.

De acuerdo a lo anterior, un alto valor nutricional del alimento reflejaría un desarrollo adecuado de los estadios larvarios y juveniles de las especies cuya fuente de alimentación lo constituyen las microalgas (Whyte, 1987).

Tetraselmis suecica es empleada en la alimentación de larvas de crustáceos (Griffith et al., 1973); así como fuente suplementaria de minerales para peces de agua dulce (Fabregas y Herrero, 1986) y en la alimentación de moluscos bivalvos de interés comercial (Laing y Utting, 1980).

El emplear los medios tradicionales en el cultivo de microalgas trae como consecuencia un alto costo en la producción. Por lo que es necesario el emplear medios de cultivo de menor costo y diferentes fuentes de nitrógeno, manteniendo el valor alimenticio de las mismas.

ANTECEDENTES

Se han realizado diversos estudios para conocer la variabilidad bioquímica de las microalgas.

Estas investigaciones han sido encaminadas a determinar la concentración porcentual de proteínas, lípidos, carbohidratos y pigmentos en la fase exponencial del cultivo con diferentes especies de microalgas. Parsons *et al* (1961) y Parsons (1961) reportan para Tetraselmis maculata que las proteínas están en mayor cantidad que los carbohidratos y que la clorofila a se encuentra en mayor concentración que la clorofila b y ausencia de clorofila c. Por otra parte Pitt (1971) encontró que Tetraselmis suecica es productora de carotenos, los cuales al ser ingeridos por larvas y juveniles de bivalvos son transformados enzimáticamente a vitamina A.

Platt y Brian (1973) estudiaron los constituyentes bioquímicos del fitoplancton marino y determinaron el contenido calórico de éste y la concentración porcentual de proteínas, lípidos y carbohidratos. Encontraron que la cantidad de proteínas, lípidos y carbohidratos varía durante el florecimiento, siendo mayor la cantidad de proteínas que de carbohidratos al principio de éste.

Otras investigaciones se han llevado a cabo en cultivos semicontinuos con T. suecica a diferentes

intensidades de luz (Caceres, 1982), quien encontró que esta solo tiene efecto en el contenido de carbohidratos y no sobre la concentración de proteínas y lípidos.

Moal et al (1978) y Whyte (1987) determinaron que con altas concentraciones de nutrimentos, I. suecica presenta inhibición en el crecimiento. Mostraron además que la relación carbono-nitrógeno y la concentración de carbohidratos en la microalga, varían de acuerdo a la fase de crecimiento en la que se encuentra el cultivo, la cual es modificada por la cantidad de nutrimentos y la adición de bióxido de carbono, los cuales prolongan la fase de crecimiento exponencial. Gallager y Mann (1981) muestran que la razón carbono/nitrogeno y los azúcares tienen efecto en el desarrollo de organismos filtroalimentadores.

Otros estudios han revelado que a diferentes salinidades y/o concentración de nutrimentos la composición bioquímica de I. suecica presenta variaciones. Fabregas et al (1984; 1985) establecen que la mayor eficiencia de transformación de nitratos a proteínas se dá con 2 mM de nitratos y una salinidad de 35 o/oo, y que la concentración de nitratos no tiene una relación directa con la cantidad de carbohidratos presentes. Por otra parte Whikfors (1986) determinó que en I. maculata la concentración de nitratos tiene efecto

sobre la cantidad de proteínas y carbohidratos de esta especie, mientras que los lípidos no son influenciados.

En el laboratorio de acuicultura del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la U. A. B. C. se han desarrollado cultivos de microalgas tanto discontinuos como semicontinuos encaminados éstos a optimizar la producción sin darle importancia a la composición bioquímica de las mismas, la cual a su vez repercute directamente en el desarrollo de los estadios larvarios y juveniles tanto de bivalvos como de crustáceos, así como en el acondicionamiento de reproductores cuya fuente de alimentación la constituyen las microalgas. Debido a esto, T. suecica fue seleccionada para conocer el efecto de diferentes concentraciones de nutrimentos en la composición bioquímica de ésta.

OBJETIVO

Determinar si existen diferencias en el contenido de proteínas lípidos y carbohidratos de Tetraselmis suecica cultivada con tres diferentes concentraciones de nutrimentos en cultivo semicontinuo.

MATERIALES Y METODOS

Los experimentos con *T. suecica* se realizaron en el Laboratorio de Moluscos del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California. Se tuvo experimento y replica para cada uno de los ensayos.

La cepa fue adquirida del "stock" del laboratorio, la cual se mantuvo con el medio F/2 de Guillard (1974).

Para los experimentos se utilizaron los medios F, F/2, F/4, de Guillard (1974). Cuyos constituyentes se describen a continuación.

NUTRIENTES MAYORES	SOLUCION STOCK (gr/l)		
	MEDIO		
	F	F/2	F/4
NaNO ₃	150.0	75.0	37.5
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	10.0	5.0	2.5
SECUESTRANTE Y METALES TRAZA			
FeCl ₃ · 6H ₂ O	3.15	3.15	3.15
Na ₂ EDTA	4.36	4.36	4.36
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.96	9.8	4.9
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	4.4	22.0	11.0
CoCl ₂ · 6H ₂ O	2.0	10.0	5.0
MnCl ₂ · 4H ₂ O	36.0	180.0	90.0
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	1.26	6.3	3.15

VITAMINAS

Biotina	0.001	0.1	0.05
Cianocobalamina (B ₁₂)	0.001	0.1	0.05
Tiamina (B ₁)	0.2	2.0	1.0

AMORTIGUADOR

Tris	200.0
------	-------

La cepa se mantuvo en matraces Erlenmeyer de 250 ml con un volumen de medio de cultivo de 50 ml, éste se esterilizó en autoclave a 1.05 Kg/cm² (15 lb/pulg²) de presión por un tiempo de 15 minutos. Posteriormente se inocularon cada uno de los matraces con 5 ml de la cepa bajo una atmósfera aséptica generada por dos mecheros Bunsen. Este nivel se mantuvo durante 7 días, tiempo en el cual el cultivo presenta condiciones óptimas de crecimiento (Guillard, 1974).

Al séptimo día se transfirieron 150 ml del cultivo logrado anteriormente, a seis bolsas de polietileno con un volumen de medio de cultivo de 12 l cada una. Los constituyentes mayores de medio de cultivo para cada uno de los experimentos son los siguientes: Medio F, 150 mg/l de nitratos, 10 mg/l de fosfatos; medio F/2, 75 mg/l de nitratos, 5 mg/l de fosfatos; medio F/4, 37.5 mg/l de nitratos, 2.5 mg/l de fosfatos. Así como los metales traza y vitaminas correspondientes, a una

salinidad de 33 o/oo y temperatura de 20 °C. Este nivel recibió una intensidad lumínica incidente de 84 watts/m², proporcionada por lámparas fluorescentes de 10 pies de longitud. La intensidad de luz se midió con un irradiómetro QSL-100, Biospherical Instruments Inc.

El crecimiento y recuperación del cultivo fue estimado con un espectrofotómetro Hatch DRL/2 a una longitud de onda de 680 nm (Sorokin, 1973). Para lo cual se realizó previamente una curva de calibración mediante conteos en una cámara Neubauer de 0.1 mm de profundidad (Apéndice I). Los parámetros poblacionales: Constante de crecimiento (K), Tiempo de duplicación (TD), Divisiones por día (D), Producción diaria (PD) y Variación porcentual (VP) se estimaron de acuerdo a de la Cruz y Alfonso (1975).

En el transcurso de los experimentos se llevaron registros diarios de pH, temperatura y salinidad, el pH se midió con un potenciómetro Fisher modelo 156. La temperatura fue medida con un termómetro ERTCO, con escala de -1 a 51 °C y una precisión de 0.1 °C. Los registros de salinidad se efectuaron con un refractómetro (A. D. Gilbert) con una precisión de 1 o/oo.

A los siete días de iniciado el cultivo en las bolsas de 12 litros se comenzó el sistema semicontinuo, con la cosecha de un volumen del 33.33 % cada dos días tiempo en el cual el cultivo recuperó su concentración inicial, similar a lo realizado por Parés y Leyva (1982). Se realizaron un total de siete cosechas en catorce días. El volumen cosechado fue recuperado con aproximadamente cuatro litros de medio de cultivo para cada uno de los experimentos (F - F/2 - F/4).

La velocidad, temperatura y duración de centrifugación fue determinado mediante experimentación, lo cual evitó que las microalgas se lisen y se disuelvan los constituyentes bioquímicos. Una vez realizado lo anterior se procedió a concentrar el cosechado en frascos de 250 ml, a 3 000 RPM y 4 ° C durante 5 minutos en una centrífuga Diamond IEC Division modelo B-20. Posteriormente el precipitado se secó a 60 ° C por 48 horas en una estufa Precision modelo 16, las muestras se almacenaron en frascos a temperatura ambiente para su posterior análisis.

En la determinación de proteínas, lípidos y carbohidratos se emplearon de 25 a 50 mg de microalga seca (Platt y Brian, 1973), se colocaron las muestras en tubos de ensayo de 20 ml con tapón de rosca.

Las concentraciones de proteínas, lípidos y carbohidratos fueron determinadas con un espectrofotómetro Busch y Lomb Spectronic 710. Se realizaron curvas de calibración con los siguientes estándares: Acido Esteárico (lípidos), Seroalbúmina bovina (proteínas), D-Glucosa (carbohidratos) (Platt y Brian, 1973). Las concentraciones se reportan en porcentaje de peso seco. La concentración de proteínas se estimó por el método de Bradfor (1976); previa extracción de la proteína con hidróxido de sodio 1 N. Los lípidos fueron extraídos por el método de Bligh y Dyer (1959) y cuantificados por el método de Pande *et al* (1963). Los carbohidratos se determinaron por el método del fenol sulfúrico descrito por Kocher (1978); previa hidrolización de la muestra con 5 ml de ácido sulfúrico 2 N.

Las pruebas estadísticas en la determinación de diferencias significativas al 95 % de confianza fueron: Prueba t de student, análisis de pendientes y la U de Mann Witney para aquellos datos que no presentaron distribución normal y/o homogenidad de varianzas (Zar, 1984).

.pa

RESULTADOS

La temperatura en los cultivos presentó un promedio de 20.5 C con un mínimo de 19.0 C y un máximo de 21.5 C. La salinidad se mantuvo constante en 33 o/oo.

El pH en los cultivos de los tres experimentos, etapa discontinua y semicontinua se reportan en la tabla I.

Tabla I. Valores de pH registrados en los cultivos de Tetraselmis suecica en las etapas discontinuos y semicontinuos.

MEDIO	ETAPA					
	DISCONTINUA			SEMICONTINUA		
	pH min	pH máx	\bar{X}	pH min	pH máx	\bar{X}
F	7.9	9.0	8.6	8.5	9.7	9.0
F/2	7.9	9.0	8.6	8.5	9.7	9.0
F/4	7.9	9.0	8.6	8.1	9.2	8.7

La luz incidente en los cultivos fue de 84 Watts/m² con un coeficiente de variación de 1.43 %.

Crecimiento del Cultivo

Los cultivos presentaron la fase de retardo de un día. Para el experimento F se obtuvo una constante de crecimiento promedio de 0.785 y un tiempo promedio de

duplicación de 0.883 días con una concentración máxima de 1,997,703 cél/ml, el experimento F/2 registró una constante de crecimiento promedio de 0.762 y tiempo de duplicación de 0.910 días, alcanzando una densidad final de 1,656,086 cél/ml, en el experimento con el medio F/4 se obtuvo una constante de crecimiento de 0.634 y un tiempo de duplicación de 1.093 días, con una concentración máxima de 961,271 cél/ml (Fig. 1). La Tabla II muestra los parámetros poblacionales del crecimiento de los cultivos, los tres experimentos presentaron la máxima tasa de producción al cuarto día de cultivo.

En el análisis estadístico del sistema discontinuo se usó una prueba de comparación de pendientes Snedecor y Cochran (1979) al 95 % de confiabilidad, encontrándose diferencias entre los experimentos con los medios F-F/4; F/2-F/4 (Tabla III).

Sistema Semicontinuo

El sistema semicontinuo presentó una estabilización similar en los tres experimentos, obteniéndose una mayor producción promedio en el experimento con el medio F (1,954,039 cél/ml), siendo menor en el medio F/2 (1,603,973 cél/ml) pero mayor este último que la del medio F/4 (1,034,159 cél/ml). La Fig.2 y la Tabla IV, muestran las fluctuaciones en la

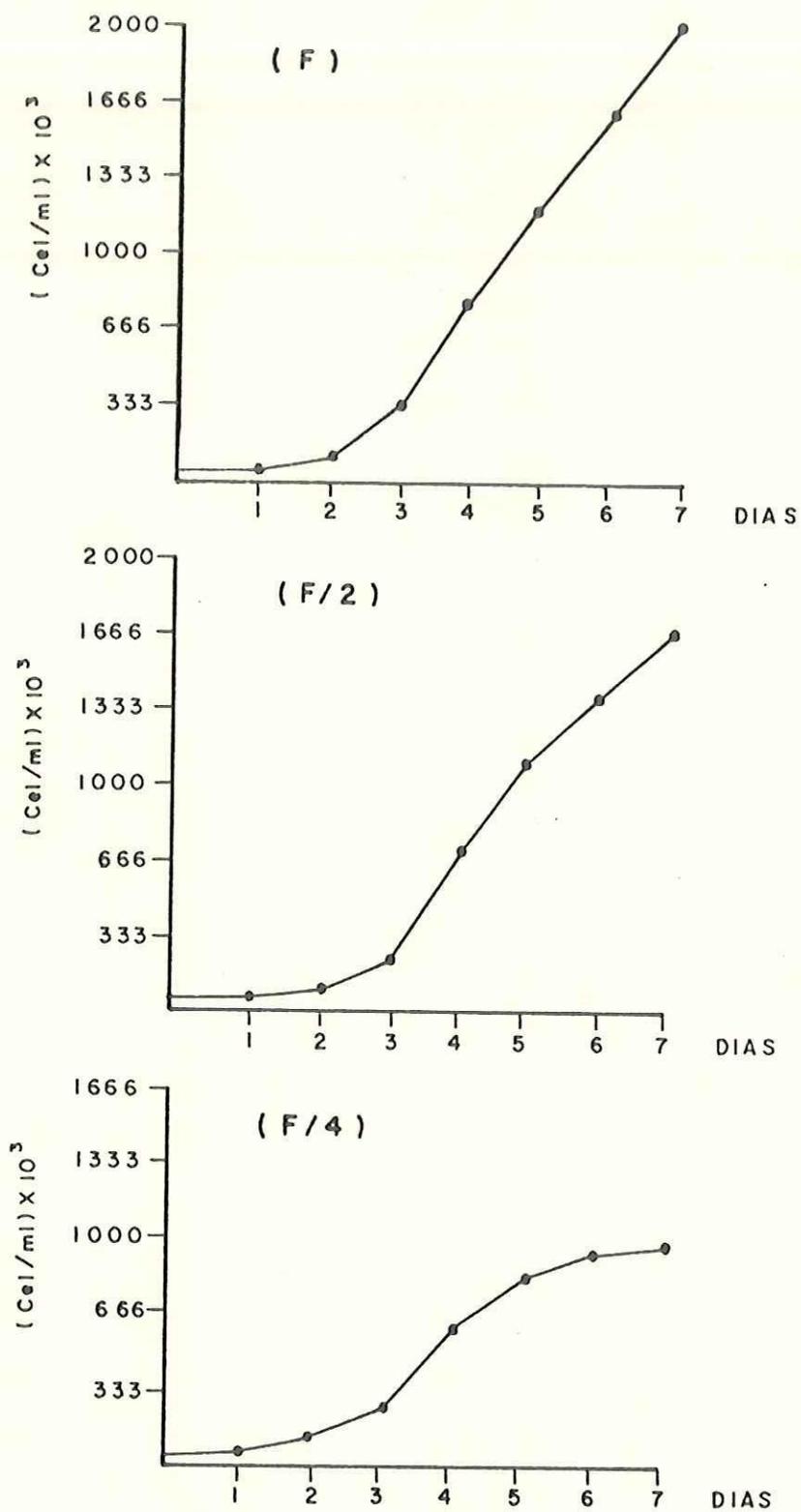


FIG. 1 - CURVAS DE CRECIMIENTO DE *T. suecica* CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NUTRIMENTOS.

TABLA II. Parámetros poblacionales de Tetraselmis suecica en cultivo discontinuo para los tres experimentos: medio F, medio F/2, medio F/4.

	T	Concentración	K	T.D	D	P.D	V.P
	(días)	(cél/ml)		(días)	(div/día)	(cél/ml)	(%)
	0	28661	---	---	---	---	---
	1	39243	0.31	2.21	0.45	10588	36.92
	2	114905	1.07	0.65	1.55	114905	292.80
	3	320210	1.03	0.68	1.48	205305	178.67
F)	4	806474	0.92	0.75	1.33	486264	151.86
	5	1210017	0.41	1.71	0.59	403545	50.04
	6	1616750	0.29	2.39	0.42	406733	33.61
	7	1999703	0.21	3.76	0.31	380954	23.56
	0	28661	---	---	---	---	---
	1	39243	0.31	2.21	0.45	10528	36.92
	2	112564	1.05	0.67	1.52	73321	186.84
	3	245579	0.78	0.89	1.13	133015	118.17
F/2)	4	639224	1.04	0.67	1.50	447645	182.28
	5	1107021	0.30	2.31	0.43	413797	59.70
	6	1394848	0.23	3.00	0.33	287827	26.00
	7	1656086	0.17	4.03	0.25	261214	18.73
	0	28661	---	---	---	---	---
	1	41397	0.37	1.89	0.53	12736	44.44
	2	126610	1.12	0.62	1.61	85213	205.84
	3	243610	0.61	1.29	0.89	107445	84.89
F/4)	4	616494	0.97	0.72	1.40	382439	163.40
	5	831854	0.30	2.31	0.43	215360	34.93
	6	932821	0.12	6.05	0.17	100976	12.14
	7	961271	0.03	23.07	0.04	28450	3.05

Tabla III. Comparación de pendientes Snedecor y Cochran (1979) en el sistema de cultivo discontinuo de Tetraselmis suecica al 95 % de confiabilidad.

	EXPERIMENTO		
	F	F/2	F/4
E			
X	F	NS	S
P			
E			
M	F/2		S
I			
M			
E			
N			
T			
O			

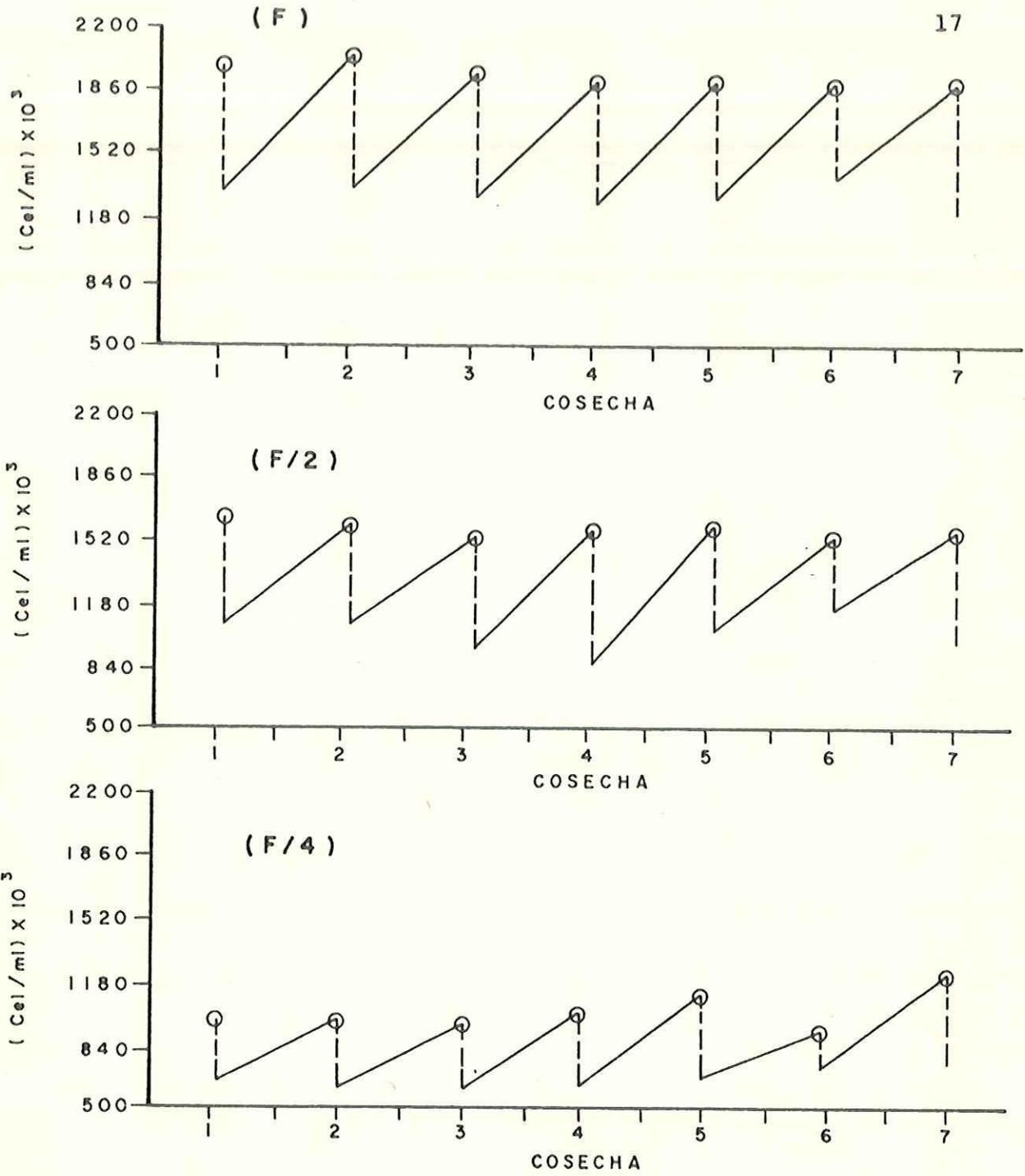


FIG. 2 - COSECHA Y RECUPERACION DEL SISTEMA DE CULTIVO SEMICONTINUO DE *T. suecica* CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NUTRIMENTOS Y COSECHADA CADA DOS DIAS.

Tabla IV. Fluctuaciones del cultivo semicontinuo
 en la concentración de Tetraselmis
suecica en los tres
 experimentos con una dilución del 33.3 %

No Cosecha	EXPERIMENTO					
	F		F/2		F/4	
	Concentración (cél/ml)					
	Antes	Despues	Antes	Despues	Antes	Despues
1	1997703	1320780	1656086	1050898	961271	643261
2	2054229	1303374	1629658	1035406	1020431	674904
3	1962013	1238334	1554187	964235	990183	605949
4	1915374	1237579	1579714	877997	1035722	616444
5	1944186	1255537	1620322	1005047	1107021	680605
6	1911147	1333733	1558184	1165782	918605	698868
7	1893582	1218860	1629658	1036988	1205862	756719
Promedio	1954039	1272928	1603973	1011947	1034159	668107

concentración de los tres experimentos por efectos de dilución. Los parámetros poblacionales promedio de estos se presentan en la (Tabla V).

La prueba U de Mann-Whitney del sistema semicontinuo mostró que existen diferencias significativas en la densidad alcanzada de microalgas entre los experimentos F, F/2, F/4 (Tabla VI).

Composición Bioquímica

El porcentaje en peso seco de proteínas, lípidos y carbohidratos de los siete muestreos se reportan en la (Tabla VII).

El análisis estadístico de estos constituyentes presentó normalidad y homogeneidad de varianzas. Se usó la prueba T-Student en la determinación de diferencias significativas a un 95 % de confianza, mostrándose estos resultados en la Tabla VIIIa, b, c.

En los tres experimentos no existen diferencias significativas en el contenido protéico (Tabla VIII a). Se observa un incremento gradual entre el primero y el último día de cosecha (Tabla VII). Cuyos valores correspondiente para cada experimento son los siguientes: medio F; 7.10 - 13.84 %; medio F/2; 6.80 - 14.02; medio F/4; 7.10 - 12.42 %.

Tabla V. Parámetros poblacionales promedio de Tetraselmis suecica de los tres experimentos durante la etapa del sistema semicontinuo. Utilizando concentración promedio cél/ml de la recuperación y dilución del cultivo.

	concentración Promedio (cél/ml)	K	T.D. (días)	D (div/día)	P.D. (cél/ml)	V.P. (%)
F	A) 1272928	0.21	3.23	0.31	681111	53.51
	D) 1954039					
F/2	A) 1011947	0.23	3.06	0.33	5844942	57.33
	D) 1603973					
F/4	A) 668107	0.22	3.17	0.32	366049	54.79
	D) 1034159					

Tabla VI. Análisis estadístico de la concentración de Tetraselmis suecica, en el sistema semicontinuo. Se analizan las diferencias entre los tres experimentos prueba U Mann-Whitney, 95 % de confianza (U de tablas= 141).

		EXPERIMENTO		
		F	F/2	F/4
E X P E R I M E N T O	F		S	S
	F/2	U=147		S
	F/4	U=196	U=172	

Tabla VII. Porcentaje en peso seco de proteínas, lípidos y carbohidratos de Tetraselmis suecica en los tres experimentos de las siete cosechas.

	Cosecha	EXPERIMENTO		
		F	F/2	F/4
Proteínas (% en peso seco).	1	7.10	6.80	7.10
	2	8.07	8.12	7.07
	3	11.01	10.13	7.90
	4	10.60	10.36	9.14
	5	11.22	10.91	9.50
	6	13.05	11.85	13.83
	7	13.84	14.02	12.42
Lípidos (% en peso seco)	1	20.82	20.35	16.00
	2	22.23	20.27	16.97
	3	22.22	23.58	18.78
	4	23.77	22.68	22.26
	5	24.52	24.73	22.28
	6	25.17	24.73	22.80
	7	24.87	24.25	23.61
Carbohidratos (% en peso seco)	1	15.07	35.78	57.80
	2	20.52	34.62	59.50
	3	18.69	34.91	46.12
	4	19.01	33.38	52.22
	5	20.42	33.92	53.81
	6	21.19	34.03	48.96
	7	17.87	30.49	31.80

Tabla VIII. Prueba t de student al 95 % de confianza entre los tres experimentos de los componentes bioquímicos de Tetraselmis suecica:
 a) proteínas; b) Lípidos
 c) carbohidratos.

		EXPERIMENTO			
		F	F/2	F/4	
E X P E R I M E N T O	(a)	F	NS	NS	
		F/2	T=0.366		NS
		F/4	T=1.856	T=1.528	NS
E X P E R I M E N T O	(b)	F	NS	NS	
		F/2	T=0.453		NS
		F/4	T=0.683	T=0.245	NS
E X P E R I M E N T O	(c)	F	S	S	
		F/2	T=6.970		S
		F/4	T=10.790	T=3.680	S

Los lípidos al igual que las proteínas no presentaron diferencias significativas entre los distintos experimentos (Tabla VIII b). Se obtuvo un incremento entre el primero y el último día de muestreo (Tabla VII). Se obtuvieron los siguientes valores iniciales y finales por experimento: medio F; 20.82 - 24.8 %; medio F/2; 20.35 - 24.25; medio F/4; 16.00 - 23.61 %.

Los carbohidratos son el constituyente bioquímico que presentó diferencias significativas entre experimentos (Tabla VIII c). El valor más alto se obtuvo en el experimento con menor concentración de nutrimentos que corresponde al medio F/4 (59.50 %) y el más bajo porcentaje en el experimento con el medio F (15.07 %), el experimento con el medio F/2 tiene un valor intermedio (30.49%). Los valores porcentuales de carbohidratos se describen en la (Tabla VII).

Los valores de la relación carbohidratos/proteínas para cada uno de los experimentos se indican en la tabla IX. Cuyos valores mínimos y máximos para cada tratamiento son los siguientes: F; 1.3-2.5; F/2; 2.2-5.4; F/4; 2.6-8.4. El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los tres experimentos (Tabla X).

Tabla IX. Valores de la razón carbohidratos/proteínas de Tetraselmis suecica para los tres experimentos.

EXPERIMENTO			
Cosecha	F	F/2	F/4
1	2.2	5.4	8.2
2	2.5	4.3	8.4
3	1.7	3.5	5.9
4	1.8	3.2	5.7
5	1.8	3.1	5.7
6	1.6	3.0	3.6
7	1.3	2.2	2.6

Tabla X. Análisis estadístico de la proporción Carbohidratos/Proteínas de Tetraselmis suecica; prueba U de Mann Whitney al 95 % de confianza (U de tablas = 141).

EXPERIMENTO			
	F	F/2	F/4
E			
X			
P			
E			
R	F	S	S
I	F/2	U=190	S
M	F/4	U=195	U=162
E			
N			
T			
O			

DISCUSIONES

La temperatura, la intensidad de luz incidente en los cultivos y la salinidad, son factores que pueden modificar las fases de crecimiento de los cultivos de microalgas y la composición bioquímica de estas, Goldman (1979); Caceres (1982); Laing y Helm (1981). En la presente investigación, son variables que no fluctuaron y se mantuvieron dentro de los rangos óptimos, por lo que de tener esto algún efecto es el mismo para todos los experimentos.

El pH no fue un factor limitante para el crecimiento de los cultivos discontinuos, sin embargo, en el sistema semicontinuo se registraron valores de pH más elevados en los experimentos con la mayor concentración de nutrimentos (Tabla I). Estas diferencias posiblemente se deban al incremento poblacional, puesto que entre mayor sea la producción en biomasa, el consumo de CO_2 se incrementa, y la disminución de éste trae como consecuencia un incremento en el pH (Darley, 1987).

De acuerdo a los resultados obtenidos en el sistema discontinuo los experimentos con mayor concentración de nutrimentos F-F/2 no presentaron diferencias significativas al 95 % de confiabilidad (Tabla III). Solo existieron diferencias entre estos y el experimento con la menor concentración de nutrimentos

F/4. Se obtuvo además una mayor diferencia en la concentración de microalgas entre los experimentos F-F/4, siendo la del experimento F casi el doble que la del F/4. Los experimentos con la mayor cantidad de nutrimentos se encuentran en la fase de crecimiento exponencial, mientras que el de menor concentración está definitivamente en la fase estacionaria al séptimo día como lo muestra la figura 1 y la tabla II. Estas diferencias probablemente se deban a la cantidad de nutrimentos pues no se tiene influencia de los parámetros físicos. Moal et al (1978) encontraron resultados similares para I. suecica.

En el sistema semicontinuo las constantes de crecimiento promedio para los tres experimentos fueron muy similares (Tabla V). Esta similitud se debió al efecto de dilución el cual permaneció constante en todos los experimentos. Sin embargo, se tuvieron diferencias en la concentración de microalgas entre los distintos ensayos (Tabla VI), esto es debido a la concentración de nutrimentos utilizados para cada uno de ellos, ya que el de mayor concentración de nutrimentos presentó una mayor producción. Esto concuerda con lo establecido por Moal et al (1978) quienes postulan que a mayor cantidad de nutrimentos se incrementa la producción de microalgas.

Según los datos obtenidos el porcentaje de peso seco de proteínas (Tabla VII) no presentó diferencias significativas entre experimentos (Tabla VIII a), no se tuvo efecto por las diferentes cantidades de nutrimentos empleados ya que estos solo modificaron la biomasa de los cultivos. Aunque Fabregas et al (1985) mencionan que la concentración de nitratos tienen efecto sobre la concentración de proteínas en I. suecica, dichos investigadores emplean concentraciones de dos a dieciseis veces superiores de nitratos a las empleadas en este trabajo. Sin embargo, Moal et al (1978) mencionan que altas concentraciones de nutrimentos inhiben el crecimiento por resultar tóxicas para las microalgas.

Es también notorio que la concentración porcentual de lípidos no presentó diferencias significativas (Tabla VIIIb) en las microalgas cultivadas con las diferentes concentraciones de nutrimentos. Posiblemente debido a que la síntesis de lípidos es una ruta metabólica que se activa a largo plazo cuando existe deficiencia de nutrimentos. Este caso extremo ocurre en cultivos discontinuos cuando el nitrógeno es limitante en la fase estacionaria. Esto también ha sido observado por Whikfors (1986) en I. maculata.

Los carbohidratos fueron el único componente que presentó diferencias significativas entre los tres experimentos (Tabla VIII c). Al parecer este constituyente de las microalgas es el único que se modificó por las diferentes concentraciones de nutrimentos, los cuales a su vez modificaron las fases de crecimiento de los cultivos (Figura 1). Se obtuvo un menor porcentaje de carbohidratos que en el experimento con el medio F/4. Este resultado es similar a los obtenidos por Moal *et al* (1978); Gallagher y Mann (1981); Fabregas *et al* (1985); Whikfors (1986). Lo cual podría ser un reflejo directo de la concentración de nitratos ya que estos pueden desviar las rutas metabólicas a la formación de otros constituyentes como glucosamina o aminoácidos.

La relación carbohidratos/proteínas presentó también diferencias significativas entre experimentos como resultado directo de las diferencias entre carbohidratos (Tabla IX; X). Esta relación es útil en la elaboración de dietas para organismos y permite establecer los requerimientos nutricionales de los mismos.

Con los resultados obtenidos es posible afirmar que los medios de cultivo empleados no tienen influencia en la concentración de proteínas y lípidos

determinados en T. suecica. Modificando estos solamente las fases de crecimiento de los cultivos y la cantidad de carbohidratos. Así como la concentración final (cél/ml) para cada experimento.

El medio F/4 es el de menor costo y las microalgas obtenidas con esta cantidad de nutrimentos tienen las mismas cantidades de proteínas y lípidos, así como una mayor cantidad de carbohidratos los cuales son asimilados primero por los filtroalimentadores (Gallager y Mann, 1981). Para fines acuaculturales este medio de cultivo puede ser considerado adecuado, debido a que durante la maduración de reproductores son empleadas fuentes suplementarias de carbohidratos (Duarte y Andrade, 1987). Es posible alimentar también larvas y juveniles de moluscos ya que se tiene el mismo contenido de proteínas y lípidos que con los otros medios, siempre y cuando T. suecica llene los requerimientos nutricionales y de tamaño de estos.

Utilizando como el 100 % la producción de microalgas con el medio F y con la misma cantidad de nutrientes empleando dos bolsas con el medio F/2 se produce el 170 % y con el medio F/4 se obtiene el 190 % empleando cuatro bolsas.

CONCLUSIONES

Las concentraciones de nutrimentos empleados afectan el crecimiento de los cultivos de I. suecica.

En la etapa discontinua y semicontinua con una mayor cantidad de nutrimentos se obtiene una mayor producción de microalgas.

Las cantidades de nutrimentos empleadas no tienen efecto en el contenido de proteínas y lípidos de I. suecica.

El medio de cultivo con menor concentración de nutrimentos produce una mayor cantidad de carbohidratos.

Los carbohidratos fueron el único constituyente bioquímico que presentó diferencias significativas entre experimentos, debido a la cantidad de nutrimentos utilizados.

RECOMENDACIONES

1.- Realizar cultivos masivos exteriores e interiores y analizar los constituyentes bioquímicos de los mismos.

2.- Determinar si existen diferencias en los constituyentes bioquímicos de I. suecica cuando se emplean diferentes fuentes de nitrógeno.

3.- Alimentar filtroalimentadores con microalgas obtenidas con diferente cantidad y fuente de nutrimentos y ver el efecto causado.

4.- Determinar si existen diferencias en los constituyentes bioquímicos de I. suecica con diferentes medios de cultivo a una misma constante de crecimiento.

LITERATURA CITADA

- Bardach, J.E., Ryther, J.H. y Mc.Larney, W. O., 1972. Aquaculture the farming and husbandry of freshwater and marine organisms: Wiley, Interscience, New York, 686 p.
- Bligh, E. G., y W. I. Dyer, 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. Biochem. Physiol. 37: 911-917
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. Anal. Biochem., 72: 248-254.
- Caceres, C. J., 1982. Compositioin en Glucides, Proteines, Lipides Et en pigments totaux chez L' algue monocellulaire Tetraselmis suecica, en culture semicontinue. University de Bretagne Occidentale Faculte des Sciences et Techniques of Brest, Tesis, 27 pp.
- Darley, W. M., 1987. Biologia de las algas enfoque fisiológico. Ed. Limusa, 236 pp.
- De la Cruz, A. y E. Alfonso, 1975. Cultivo masivo de algas planctonicas marinas mediante fertilización. Ciencias, Universidad de la Habana, serie B, (17), 1-25.

- De Pauw, N., 1981. Use and production of microalgae as food for nursery bivalves. In c. Claus, N. de Pauw and E. Jaspers (eds.) Eur. Maric. Spec. Pub. 7, Brendene, Belgium, p. 35-69.
- Duarte Moreno, J. H. y R., Andrade., 1987. Determinación del ciclo reproductivo del ostion Europeo (Ostrea edulis) en Bahía de San Quintín, B. C. y bajo condiciones de laboratorio. Tesis de Lic. F. C. M., U. A. B. C. 94 pp.
- Fabregas, J. Abalde, J., Herrero, C. Cabezas, B. y Veiga., M., 1984. Growth of the Marine Microalgae Tetraselmis suecica in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Acuaculture*, 42: 207-215.
- Fabregas, J., Herrero, C., Cabezas, B. y Abalde, J., 1985. Mass culture and biochemical variability of the marine Microalgae Tetraselmis suecica Kylin (Butch) with high nutrient concentrations. *Acuaculture*, 49: 231-244.
- Fabregas, J. y Herrero, C., 1986. Marine Microalgae as potential source of minerals in fish diets. *Acuaculture*, 51: 237-243.

- Gallager, S. M. y Mann, R., 1981. The effect of varying carbon/nitrogen ratio in the phytoplankter Thalassiosira Pseudonana (3H) on it's food value to bivalve Tapes japonica. Aquaculture, 26: 95-105.
- Goldman, C. J., 1979. Temperature effects on steady-state growth, phosphorus uptake and the Chemical composition of Marine Phytoplankter. Microbial Ecology 5: 153-166.
- Griffith, G. W., Murphy, Kenslow, M. A., y Ross, L. A., 1973. A mass Culture Method for Tetraselmis sp a promising food for larval crustaceans. Proceeding of the Fourt Annual Worksphop Mariculture Society 289-294 p.
- Guillard, R. R. L., 1974. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. p. 29-60. En: Culture of Marine Invertebrata Animals. Smith, W. L. and M. H. Chanley (Eds.). Plenum Publishing Corp., New York, 338p.
- Kocher, G., 1978. Carbohidrate determination by phenol-sulfuric acid method. En: Handbook of Physiological and Biochemical methods, Hellebust and Craigie (Ed), Cambridge Univ. Press, Cambridge, p. 96-97.

- Laing, I. y Helm, M. M., 1981. Factors affecting the semicontinuous production of Tetraselmis suecica (Kyllin) Butch. In 200 - l vessels. Aquaculture, 22: 173-248
- Laing, I., y Utting, S. D., 1980. The influence of salinity on the production of two commercially important unicellular marine algae. Aquaculture, 21: 79-86
- Moal, J., Samain, J. F. y LeCooz, J. R., 1978. C/N et controle de la physiologie des cultures de phytoplancton. From Mc. Crusky, D. S., Berry, A. S., Physiology and Behaviour of Marine Organisms, Pergamon, Press, 388 p.
- Pande, S. V., Parvin, R. y Venkitasubramanian, T. A., 1963. Microdetermination of lipids and serum total fatty acids. Analytical Biochemistry, 6: 415-425.
- Parés, S. G. y Leyva, G. A., 1982. Cultivo semicontinuo de las microalgas Isochrysis galbana y Tetraselmis suecica para su uso como alimento de larvas y adultos de Mytilus californianus. Ensenada, B. C., F. C. M., U. A. B. C., Tesis Profesional, 57 pp.

- Parsons, T. R., Stephens, K. y Strickland, J. D. H., 1961. On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankter. *J. Fish. Bd. Canada* 18 (6): 1001-1016.
- Parsons, T. R., 1961. On the pigment composition of eleven species of marine phytoplankters. *J. Fish. Res. Bd. Canada* 18(6): 1017-1025.
- Pitt, G. A. J., 1971. Vitamin A. En: O. Isler (Editor), *Carotenoids*. Birkhauser Verlag, Basel pp. 717- 742.
- Platt, T. y Brian, I., 1973. Caloric content of phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 18, (2) 306-310.
- Provasoli, L., D. E., Conklin y A. S., Dagostino, 1970. Factor inducing fertility in aseptic crustacea. *Helgolander, Wiss. Weresumters*. 20: 443-454.
- Snedecor, G. W. y Cochran, W. G., 1979. *Método estadísticos*, Ed. C. E. C. S. A. segunda edición. 703 pp.
- Sorokin, C., 1973. Dry weight, packed cells volume an optical density. En: J. R. Stein (Ed), *Handbook of phycological methods*. Cambridge Univ. Press, London. 321-342

- Whikfors, G. H., 1986. Altering growth and gross chemical composition of two microalgal molluscan food species by varying nitrate and phosphate. *Aquaculture*, 59: 1-14.
- Whyte, J. N. C., 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture*, 60: 231 - 241.
- Zar, J. H., 1984. *Biostatistical analysis*. Ed Prentice-Hall (second edition). 718 pp.

APENDICE I

Para la cuantificación espectrofotométrica del crecimiento (Sorokin, 1973) y recuperación de los cultivos se determinó la longitud de onda óptima (680 nm) donde se realizaron mediciones para la obtención de las siguientes ecuaciones con diez pares de datos, por el método de mínimos cuadrados.

$$i) Y=1872.8236 (X) + 3.9401$$

$$r=0.9978$$

$$ii) Y=2585.8014 (X) - 96.5238$$

$$r=0.9986$$

(Y=concentración cél/ml (1000), X=absorbancia)

La regresión (i) fue empleada de 90 a 85 % de transmitancia y la (ii) de 84.5 a 8 % de transmitancia.

Las ecuaciones para el cálculo de a) proteínas, b) lípidos, c) carbohidratos, son las siguientes:

$$a) Y=134.64688 (X) + 1.96995$$

$$r=0.9951$$

$$b) Y=2.498158 (X) + 0.022754$$

$$r=0.9969$$

$$c) Y=199.8367 (X) + 4.6860$$

$$r=0.9968$$

(Y=concentración, X=absorbancia)

APENDICE II

El costo de los nutrimentos para mil litros de medio de cultivo es el siguiente: Medio F 10.8 dls, medio F/2 5.4 dls, medio F/4 2.7 dls. Cotizados a 2 350 pesos por cada dolar en 1989.