

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE
CIENCIAS MARINAS

''PRODUCCION MASIVA DE *Tetraselmis suecica* (KYLIN)
B U T C H. (PRASINOPHYCEAE) BAJO DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE NUTRIENTES EN CONDICIONES
C O N T R O L A D A S''



T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

O C E A N O L O G O

PRESENTA:

ENRIQUE VALENZUELA ESPINOZA

"PRODUCCION MASIVA DE Tetraselmis suecica (KYLIN) BUTCH.
(PRASINOPHYCEAE) BAJO DIFERENTES CONCENTRACIONES
DE NUTRIENTES EN CONDICIONES CONTROLADAS"

TESIS

QUE PRESENTA

ENRIQUE VALENZUELA ESPINOZA

APROBADA POR:

Isai Pacheco R.

PRESIDENTE DEL JURADO
OC. ISAI PACHECO RUIZ

Gandog

SINODAL PROPIETARIO
OC. VICTOR GENDROP FUNES

Jose A. Zertuche

SINODAL PROPIETARIO
M.C. JOSE A. ZERTUCHE G.

Francisco Ley Lou

SINODAL SUPLENTE
M.C. FRANCISCO LEY LOU

Guillermo Torres M.

SINODAL SUPLENTE
M.C. GUILLERMO TORRES M.

RESUMEN

Se efectuaron diferentes experimentos en laboratorio con la microalga Tetraselmis suecica para conocer el rendimiento de producción en volúmenes de 1000 litros y salinidad de 28 o/oo. Con la ausencia o suplementación de tris y dióxido de carbono. Un flujo de aire de 25 l/min y tiempo promedio de adición de dióxido de carbono de dos minutos y medio a 50 Kg/cm² fue suficiente para mantener el pH en o debajo de 7.5. Usando estas condiciones, la máxima densidad de 536 000 cél/ml fue obtenida con la relación 75/5 gr/l de Na NO₃ / Na H₂ PO₄ comparada con el grupo control. La constante de crecimiento promedio fue 0.38 y 1.81 duplicaciones por día. Aunque con 37.5/2.5 gr/l de Na NO₃ / Na H₂ PO₄ se registró una constante de crecimiento promedio de 0.67 y 1.03 duplicaciones por día. Encontrándose que no difieren significativamente al nivel de 95% de confianza.

La productividad no fue afectada por la temperatura dentro del intervalo de 19.2-21.9 °C pero decrece si el suplemento de dióxido de carbono es insuficiente para mantener el pH dentro del intervalo 7.2-7.5.

La productividad por unidad de volumen de cultivo muestran que al utilizar bajas concentraciones de nutrientes más CO₂ se obtienen buenos rendimientos poblacionales respecto al control.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California por haberme facilitado el material y laboratorio de Acuacultura, sección microalgas.

Al OC. Isaf Pacheco Ruiz por su paciencia y dedicación en la dirección de la investigación.

A los sinodales del comité de tesis por sus atinados comentarios y sugerencias.

Al OC. Zaúl García Ezquivel por su valiosa ayuda en el procesado estadístico de la información.

Mi más sincero agradecimiento a los pasantes de oceanólogos Manuel Lutt M. y Diego Díaz C. por su colaboración como servicio social durante la investigación.

Agradezco a mis compañeros y amigos por su apoyo incondicional y a todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron para que este trabajo se realizara.

DEDICATORIA

A MIS PADRES

CARMEN VALENZUELA MENDOZA
BALVANEDA ESPINOZA VALENZUELA

De quienes he recibido amor, cariño, comprensión y que
con su esfuerzo lograron mi formación personal y
profesional.

A MI ESPOSA E HIJA

SANDRA WOOD DE VALENZUELA
PAULINA BALVANEDA VALENZUELA WOOD

Por su apoyo y cariño

A MIS HERMANOS Y CUÑADOS

Yolanda, Lupita, Isabel, Margarita, Jesús y Maria del
Carmen; Diana, Patricia, Lorena, Humberto, Jesús y Dario
quienes siempre me alentaron y apoyaron en mi formación
profesional.

A LA SEÑORA

PAULINA PERALTA ARCE

Por su apoyo y cariño en el transcurso de mis estudios

A LA MEMORIA DE MI CUÑADO

ENRIQUE WOOD PERALTA

DESCANSE EN PAZ

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS

CONTENIDO

	Página
1.- INTRODUCCION.....	1
1.1. Antecedentes.....	4
1.2. Objetivo.....	8
2.- MATERIALES Y METODOS.....	9
2.1. Medio de cultivo.....	9
2.2. Preparación y esterilización de los medios de cultivo.....	10
2.3. Medios experimentales.....	12
3.- RESULTADOS.....	14
3.1. Experimentos con la mitad de nutrientes y todos los nutrientes.....	15
3.2. Experimentos con la mitad de nutrientes y mitad de tris (hidroximetil) amino metano y todos los nutrientes más tris.....	15
3.3. Experimentos con la mitad de nutrientes e inyecciones de dióxido de carbono (CO ₂) y todos los nutrientes con inyección de CO ₂	19
3.4. Experimentos con la mitad de nutrientes, mitad de tris e inyección de dióxido de carbono (CO ₂) y todos los nutrientes, todo tris y CO ₂ (CONTROL).....	23

3.5. Experimento con un cuarto de nutrientes e inyecciones de dióxido de carbono (CO ₂).....	26
4.- DISCUSION.....	30
5.- CONCLUSIONES.....	37
6.- RECOMENDACIONES.....	38
7.- LITERATURA CITADA.....	39

LISTA DE TABLAS

Tabla IA-B. Valores poblacionales promedio de Tetraselmis suecica obtenidos en los experimentos utilizando la mitad de nutrientes (A); todos los nutrientes (B).....17

Tabla IIA-B. Valores poblacionales promedio de Tetraselmis suecica con la mitad de nutrientes, mitad de tris (hidroximetil) amino metano (A); y todos los nutrientes más tris (B).....20

Tabla IIIA-B. Valores poblacionales promedio de Tetraselmis suecica con la mitad de nutrientes, e inyecciones de dióxido de carbono (A); todos los nutrientes e inyecciones de CO₂ (B).....22

Tabla IVA-B. Valores poblacionales promedio de Tetraselmis suecica con la mitad de nutrientes, mitad de tris e inyecciones de dióxido de carbono (A); todos los nutrientes, todo tris y CO₂ (B).....25

Tabla V. Valores poblacionales promedio de Tetraselmis suecica con un cuarto de nutrientes e inyecciones de dióxido de carbono.....28

Tabla VI. Análisis de varianza dos vías de los diferentes medios de cultivo utilizados para el crecimiento de Tetraselmis suecica en volúmenes de 1 000 litros.....29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Curvas de crecimiento de Tetraselmis suecica cultivada en medio químico con la mitad de nutrientes (A); y todos los nutrientes (B).....16

Figura 2. Curvas de crecimiento de Tetraselmis suecica cultivada en medio químico con la mitad de nutrientes y mitad de tris (hidroximetil) amino metano (A); y todos los nutrientes más todo tris (B).....18

Figura 3. Curvas de crecimiento de Tetraselmis suecica cultivada en medio químico con la mitad de nutrientes e inyecciones de CO_2 (A); y todos los nutrientes e inyección de CO_2 (B).....21

Figura 4. Curvas de crecimiento de Tetraselmis suecica cultivada en medio químico con la mitad de nutrientes, mitad de tris (hidroximetil) amino metano e inyección de CO_2 (A); y todos los nutrientes, todo tris e inyección de CO_2 (B).....24

Figura 5. Curva de crecimiento de Tetraselmis suecica cultivada en medio químico con un cuarto de nutrientes e inyección de CO_2 27

1.- INTRODUCCION

Para el desarrollo de proyectos acuaculturales, tanto a nivel piloto como comercial, uno de los aspectos más importantes es la obtención de microalgas como fuente constante de alimento. La capacidad técnica para el manejo de un cultivo de algas unicelulares y la relación con su medio de cultivo, determinarán el éxito o fracaso del esfuerzo en la producción del alimento artificial.

El cultivo masivo puede llevarse a cabo mediante la utilización de sistemas cerrados o abiertos, y su diferencia se basa en la utilización de las diferentes fuentes de energía sea natural o artificial (Kinne, 1976). Así, las algas son potencialmente útiles como alimento para consumo humano, en la producción de químicos, en la acuicultura y en la bioconversión de la energía solar (Kharatyan, 1978; Goldman, 1979).

La microalga marina Tetraselmis suecica (Kylin) Butch (Prasinophyceae), es una especie ampliamente usada en acuicultura, de gran valor alimenticio para larvas, semilla y adultos de bivalvos (Walne, 1970; Helm et al., 1973; Helm, 1977), como para crustáceos. Esta responde a un amplio intervalo de concentración de nutrientes y de salinidad. Como resultado se pueden establecer algunos de

los parámetros para una producción masiva, obteniendo un máximo en la velocidad de crecimiento, densidad celular y concentración de proteínas. Este hecho ha permitido que la producción de alimentos de origen marino se haya ido incrementando, fomentando a la vez el establecimiento de laboratorios para el cultivo y producción masiva de "semilla" de invertebrados marinos de importancia comercial.

El cultivo de bivalvos bajo condiciones controladas, requiere un suministro eficiente y grandes cantidades de microalgas, tanto para acondicionar progenitores como estadios larvarios (Loosanoff y Davis, 1963; Walne, 1964; Duarte y Andrade, 1987). Muchas algas crecen bajo amplios intervalos de temperatura, luz y concentración de nutrientes y todavía mantienen su composición elemental dentro de un intervalo más o menos limitado. Esto es porque las microalgas tienen mecanismos que regulan la asimilación de cada elemento y le sirven para mantener su composición y balancear su crecimiento (Stross y Pemrick, 1974).

Kinne (1976) menciona que el cultivo masivo de algas no es problema de infraestructura, sino que es esencialmente biológico, siendo indispensable determinar las condiciones necesarias para obtener los niveles máximos

de densidad poblacional, razón de crecimiento, producción y máxima eficiencia en la utilización de la luz y nutrientes.

Los cultivos de microalgas, es uno de los principales pilares sobre los que descansa el funcionamiento de un laboratorio, el desarrollar técnicas con sus potencialidades y limitaciones permite alcanzar la viabilidad técnica y económica de las empresas acuaculturales, ya que a su vez repercute en el desarrollo integral.

Desafortunadamente no se le ha dado la importancia que amerita y se ha convertido en un grave problema en la mayoría de los proyectos acuaculturales que requieren de dicho alimento vivo.

Actualmente, en el Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California, se llevan a cabo cultivos masivos de microalgas para la alimentación de moluscos bivalvos, pero debido a los altos costos involucrados en la producción de alimento vivo, que contribuye arriba del 40% de los gastos totales, se planteó la necesidad de reducir los costos a un nivel aceptable utilizando baja concentración de nutrientes. En este trabajo se planteó el desarrollo de nueve experimentos para investigar el efecto de la concentración de nutrientes e inyecciones de CO_2 sobre el crecimiento poblacional de T. suecica.

1.1. ANTECEDENTES

Son numerosas las investigaciones que se han llevado a cabo en diferentes países sobre la actividad del cultivo del fitoplancton con fines acuaculturales.

Estas investigaciones van desde la búsqueda de métodos para el cultivo, factores que inciden sobre el crecimiento, hasta bioensayos con organismos para probar la efectividad de las distintas especies como alimento.

Laing y Utting (1980); Laing y Helm (1981) establecen el efecto de los parámetros que disminuyen la producción semicontinua en *T. suecica*, los primeros concluyen que el intervalo óptimo de salinidad para esta especie se encuentra entre los 25 y 30 o/oo. Los segundos que la productividad no es afectada por la temperatura en un intervalo de 18 a 22°C pero decrece cuando el suplemento de dióxido de carbono es insuficiente para mantener un pH por debajo de 7.8.

Maddux y Jones (1964) encontraron que existe una relación directa entre la temperatura, luz y concentración de nutrientes y la producción, en los cuales las interacciones de los primeros dos parámetros con el tercero fueron modificados, y que esta relación no es aplicable a condiciones naturales.

Trick (1979) realizó estudios sobre el ciclo de vida de Platymonas impellucida en cultivo, y encontró que existen diferencias entre el agua de mar sintética y la enriquecida con respecto a la formación de cistos, la acelerada formación de cistos en el medio sintético se debe a una deficiencia de nutrientes, variaciones en el pH, y la lenta desecación, los cuales tienen efectos adversos en el cultivo.

Fabregas et al. (1984; 1985) trabajaron con diferentes concentraciones de nitratos, los cuales reportan que las máximas densidades celulares y contenido protéico en T. suecica son alcanzadas con 2, 4, y 16 mM de nitratos, las condiciones óptimas de crecimiento fueron entre 25 y 35 o/oo. La variación en la salinidad y las concentraciones tienen efecto en la biomasa final más que en la velocidad de crecimiento.

Diversas investigaciones han sido encaminadas a la producción de microalgas con medios de cultivo de bajo costo, utilizando fertilizantes inorgánicos (agrícolas) y orgánicos (De La Cruz y Alfonso, 1975; Alfonso y Leal, 1981; Leal, 1983; Alfonso y Nuñez, 1985).

Con el desarrollo de estos trabajos muchos investigadores se han dado a la tarea de cultivar algas planctónicas con vistas a utilizarlas como alimento para el

acondicionamiento de bivalvos, estadios larvales de moluscos, crustáceos y peces.

Helm et al. (1973) y Creekman (1977), sugieren que los organismos alimentados con T. suecica producen larvas de mejor calidad que las larvas de ostiones adultos recibiendo solo fitoplancton del agua de mar. Así mismo, Helm (1977) propone una dieta mixta para alimentación de larvas de Ostrea edulis (Linnaeus), siendo ésta más balanceada.

Griffith et al. (1973); Persoone y Sorgeloos (1975) desarrollaron técnicas de cultivo de T. suecica para la alimentación de crustáceos, y encontraron que cumple con los requerimientos en la alimentación de larvas de crustáceos.

Fabregas y Herrero (1986) hicieron estudios de varias especies de microalgas, incluyendo T. suecica, como fuente de minerales en la dieta de peces y esta especie contribuyó en un 3.8% de los requerimientos elementales de los peces.

Como consecuencia de las diversas aplicaciones de T. suecica y considerando que puede cultivarse con un mínimo de mantenimiento, se pueden efectuar una amplia gama de trabajos experimentales en laboratorio, ya que presenta un considerable potencial de cultivo a gran escala (Ukeles,

1973; Walne, 1974; Guillard, 1975; Padilla, 1975).

Se puede apreciar que los autores, citados anteriormente, han realizado investigaciones orientadas al estudio de los factores físicos y químicos, que intervienen en la producción de algas planctónicas. Sin embargo, la producción masiva de la microalga T. suecica a través de los métodos tradicionales, no ha sido optimizado debido fundamentalmente al hecho de que el método fue adoptado de otras especies para el cultivo de ésta. Esto a su vez repercute directamente en los costos de operación de la producción de microalgas a nivel masivo.

Por otra parte, en la práctica, en muchos cultivos a nivel masivo, no se ha considerado la importancia de la concentración de dióxido de carbono (CO_2) y oxígeno (O_2), y el efecto que estos tienen sobre la enzima carboxilasa ribulasa difosfato la cual cataliza las reacciones de asimilación del CO_2 a la ribulosa 1-5 difosfato para la formación de carbohidratos. Así la ocurrencia de la fotosíntesis se ve favorecida por altas concentraciones de CO_2 y ésta es inhibida en presencia de altas concentraciones de O_2 , llamándose este proceso fotorespiración, afectando de esta manera la producción de microalgas (Tolbert, 1974).

De acuerdo a lo anterior y considerando que en cultivos masivos se presenta el proceso de fotorespiración

y una inhibición de la fotosíntesis por la limitación del CO_2 . Cabrá la posibilidad de igualar las densidades poblacionales de T. suecica alcanzadas con el método tradicional, mediante la variación de las concentraciones de nutrientes y la adición directa de dióxido de carbono a medios de cultivos masivos.

1.2. OBJETIVO:

El presente trabajo tiene como objetivo:

La producción masiva de Tetraselmis suecica en volúmenes de 1000 litros bajo diferentes concentraciones de nutrientes e inyecciones de dióxido de carbono, para determinar bajo qué condiciones se tiene la máxima producción con el mínimo gasto de nutrientes.

2.- MATERIALES Y METODOS

Para esta investigación se utilizó T. suecica, cuya cepa se obtuvo del laboratorio de acuicultura del Instituto de Investigaciones Oceanológicas, lugar donde se efectuó el presente trabajo.

Para la preparación de los medios de cultivo se usó el método de Matthiessen y Torner (1966), cuyos constituyentes se describen a continuación:

2.1. MEDIO DE CULTIVO

CONSTITUYENTES	FORMULA	SOLUCION STOCK
NUTRIENTES MAYORES		(grs/lt)
Nitrato de sodio, granulado y refinado	NaNO_3	150
Fosfato de sodio monobásico, certificado	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10
METALES TRAZA		
Secuestrante	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $\text{Na}_2\text{.EDTA}$	3.15 4.36
Sulfato cúprico	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.96
Sulfato de zinc	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.40
Cloruro de cobalto	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.00
Cloruro de magnesio	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	36.00
Molibdato de sodio	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.26
VITAMINAS		
Biotina cristalizada	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$	1.0 mg
Cianocobalamina cristalina (B)	$\text{C}_{63}\text{H}_{88}\text{CoN}_{14}\text{P}$	1.0 mg
Tiamina clorhídrica	$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS}$	200.0 mg
Amortiguador (Tris)		200.0

El filtrado del agua de mar y agua dulce se realizó como lo menciona Islas et al. (1978). Posteriormente se mezcló el agua de mar con la dulce hasta obtener una salinidad de 28 o/oo, la cual se registró con un refractómetro (A. O. Golberg, cuyo intervalo es de 0 a 160 o/oo).

La secuencia del cultivo en todas sus etapas se llevó a cabo en un cuarto a temperatura de $18-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, la cual estuvo controlada con un aparato de aire acondicionado provisto de un termostato (Honeywell).

2.2 PREPARACION Y ESTERILIZACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Se inició en matraces Erlenmeyer de 250 ml con un volumen de medio de cultivo de 50 ml, y 1.5 lt en Fernbach con capacidad de 2800 ml.

El medio lo constituía agua de mar a 28 o/oo, soluciones de nutrientes inorgánicos, vitaminas y metales traza. Estos medios se esterilizaron en autoclave a 121°C y 15 lb/pulg² de presión durante 15 minutos.

Después de 24 Horas, los matraces se inocularon cada uno con 10 ml de la cepa, para posteriormente inocular los Fernbach con dos matraces Erlenmeyer bajo una atmósfera

aséptica generada con dos mecheros Bunsen. Los matraces inoculados fueron expuestos a condiciones de iluminación constante (1.008 Watts/m^2) con lámparas fluorescentes tipo luz fría (Sylvania de 40 Watts). En estos dos niveles no se incluyó aireación ya que basta la agitación manual diaria para que ocurra la completa difusión de nutrientes y evitar la precipitación de los cultivos.

La siguiente etapa consistió en la transferencia del cultivo logrado a recipientes de 20 lt (Carboy). Para su esterilización se utilizó un método químico, el cual requiere de una solución de cloro (416 ml de hipoclorito de sodio al 6% aforado a un litro con agua destilada) y tiosulfato de sodio (248.1 gr aforado a un lt) ambas soluciones se mantuvieron en oscuridad. Ya preparado el material, el carboy fue llenado con agua a 28 o/oo, se añadió 0.25 ml/lt de la solución de cloro y se dejó reposar por 12 hr. Posteriormente se dejaron 16 lt de agua por carboy y se agregó 0.1 ml/lt de tiosulfato de sodio para neutralizar el cloro, sometiendo a aireación por dos horas para completar la reacción (Pruder y Bolton, 1978).

Lograda la esterilización, se añadieron los nutrientes y vitaminas previamente esterilizadas, inoculando cada Carboy con dos Fernbach de los cultivos obtenidos anteriormente bajo una atmósfera aséptica.

A partir de esta etapa se suministró a los cultivos un flujo de aire de 7.5 lt/min (Flujómetro Gilmont) mediante un compresor de aire seco (Conde 12), para proporcionarle el CO₂ necesario en la fotosíntesis de las microalgas.

Finalmente, al obtener la máxima concentración de microalgas en el Carboy, se transfirió el cultivo a tanques de fibra de vidrio con capacidad de 1200 lt, en este nivel la iluminación fue proporcionada con lámparas de 500 Watts (Osram) provistas de un aro de metal. La intensidad lumínica superficial que recibieron los cultivos en este nivel fue de 82 Watts/m² (Biospherical Instruments Inc. Modelo QSL-100), así mismo el flujo de aire suministrado fue de 25 lt/min.

En los tanques antes mencionados se experimentó con diferente concentración de nutrientes e inyecciones directas de CO₂ hasta ajustar el pH en un intervalo de 7.2-7.5.

Los medios experimentados en el nivel masivo (1000 lt) se efectuaron por duplicado, siendo estos los siguientes:

2.3. MEDIOS EXPERIMENTALES

MEDIOS

CONSTITUYENTES

- 1.- Todos los nutrientes + Todo Tris + CO₂ (CONTROL)
- 2.- Todos los nutrientes + Todo Tris

- 3.- Todos los nutrientes + CO₂
- 4.- Todos los nutrientes
- 5.- Mitad de nutrientes + Mitad de Tris + CO₂
- 6.- Mitad de nutrientes + Mitad de Tris
- 7.- Mitad de nutrientes + CO₂
- 8.- Mitad de nutrientes
- 9.- Un cuarto de nutrientes + CO₂

Durante el desarrollo de los experimentos se llevaron registros de temperatura, la cual se midió con un termómetro (ERTCO de -1 a 51 °C con escala de 0.1) y el pH con un potenciómetro (Altex).

La reproducción de células se estimó diariamente con un espectrofotómetro (Modelo DREL/2) a una longitud de onda óptima de 680 nm (Pacheco Ruiz, comunicación personal). El tiempo que transcurrió en cada uno de los niveles fue de siete días, tiempo en el cual teóricamente los cultivos se encuentran en condiciones óptimas de crecimiento.

De los diferentes medios experimentales se graficaron sus densidades promedio de crecimiento y se compararon con el control. También se estimaron los valores poblacionales de la microalga *T. suecica* tales como: Constante de crecimiento (K), tiempo de duplicación (TD), divisiones celulares (D), producción diaria (PD) y variación porcentual (VP) (De La Cruz y Alfonso, 1975).

Para conocer si la concentración final de cada uno de los experimentos dependía de la densidad inicial del inóculo, se realizó una correlación polinomial al 95% de confiabilidad y para verificar si se presentaban diferencias significativas en los medios de cultivos y su concentración se realizó un análisis de varianza de dos vías al 95% de confianza (Snedecor y Cochran, 1980).

3.- RESULTADOS

Se experimentó el crecimiento de T. suecica en volúmenes de 1000 litros. La temperatura de los cultivos fluctuó entre los 19.2 y 21.9°C con una media de 20.1 °C. La salinidad se mantuvo en 28 o/oo. El pH al inicio de los cultivos fue de 7.2 y al final 8.7, con un promedio de 8.22. A los experimentos que se les suministró diariamente dióxido de carbono (CO₂), se encontró que a valores de pH entre 8.2 y 8.7 el tiempo promedio de inyección de CO₂ fue de 2:30 minutos a una presión de 50 Kg/cm² para ajustar el pH en un intervalo de 7.2-7.5.

3.1. EXPERIMENTOS CON LA MITAD DE NUTRIENTES Y TODOS LOS NUTRIENTES

Sus curvas de crecimiento se encuentran representadas en las figuras 1A-B; las concentraciones iniciales de dichos experimentos fueron de 6.5×10^3 y 5.0×10^3 cél/ml respectivamente, ambos presentaron una fase de retardo de un día, a partir del cual se inició la fase de crecimiento exponencial hasta el séptimo día, alcanzando concentraciones de 327×10^3 y 338×10^3 cél/ml. Sus valores poblacionales se encuentran en las tablas 1A-B. Las fases de crecimiento ocurrieron entre los días 1-6, con una constante de crecimiento promedio (K) de 0.73 para ambos; el tiempo de duplicación promedio (TD) fué de 0.94 y 0.95 días y las máximas producciones diarias (PD) se obtuvieron al tercer día.

3.2. EXPERIMENTOS CON LA MITAD DE NUTRIENTES, MITAD DE TRIS (HIDROXIMETIL) AMINO-METANO Y TODOS LOS NUTRIENTES MAS TRIS

En las figuras 2A-B se transfieren las densidades encontradas en los cultivos, los cuales empezaron con 14×10^3 y 17.5×10^3 cél/ml. Se observó en los medios experimentados una fase de retardo de un día, obteniéndose concentraciones de 411 752 y 494 750 cél/ml respectivamente. Los valores

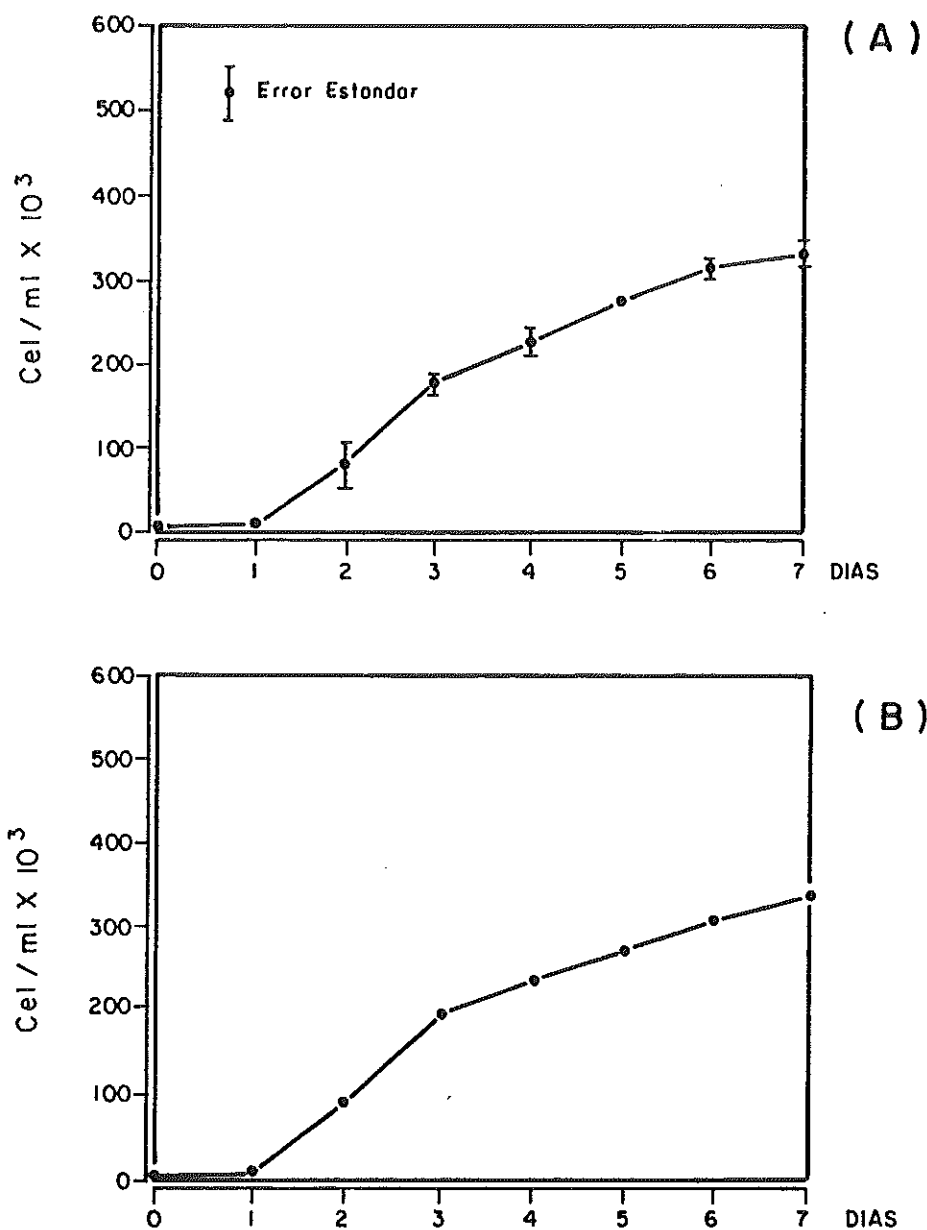


FIGURA 1 - CURVAS DE CRECIMIENTO DE *Tetraselmis suecica* CULTIVADA EN MEDIO QUIMICO CON LA MITAD DE NUTRIENTES (A) ; Y CON TODOS LOS NUTRIENTES (B).

TABLA I. Valores poblacionales promedio de Tetraselmis suecica obtenidos en los experimentos utilizando la mitad de nutrientes (A); todos los nutrientes (B).

(A)						
TIEMPO (días)	CONCENTRACION (cél/ml)	K	T D (días)	D (div/día)	P D (cél/ml)	V P (%)
0	6 500	----	----	----	----	----
1	8 000	0.21	3.34	0.30	1 500	23.08
2	79 500	2.30	0.30	3.31	71 500	893.75
3	178 500	0.81	0.86	1.17	99 000	124.53
4	225 250	0.23	2.98	0.34	46 750	26.19
5	272 000	0.19	3.70	0.27	46 250	20.75
6	313 250	0.14	4.91	0.20	41 250	15.17
7	327 000	0.04	16.14	0.06	13 750	4.39

(B)						
TIEMPO (días)	CONCENTRACION (cél/ml)	K	T D (días)	D (div/día)	P D (cél/ml)	V P (%)
0	5 000	----	----	----	----	----
1	8 000	0.47	1.47	0.68	3 000	60.00
2	92 750	2.45	0.28	3.54	84 750	1059.38
3	197 750	0.76	0.92	1.09	105 000	113.21
4	239 000	0.19	3.66	0.27	41 250	20.86
5	275 850	0.14	4.83	0.21	36 850	15.42
6	310 500	0.12	5.86	0.17	34 650	12.56
7	338 000	0.08	8.17	0.12	27 500	8.86

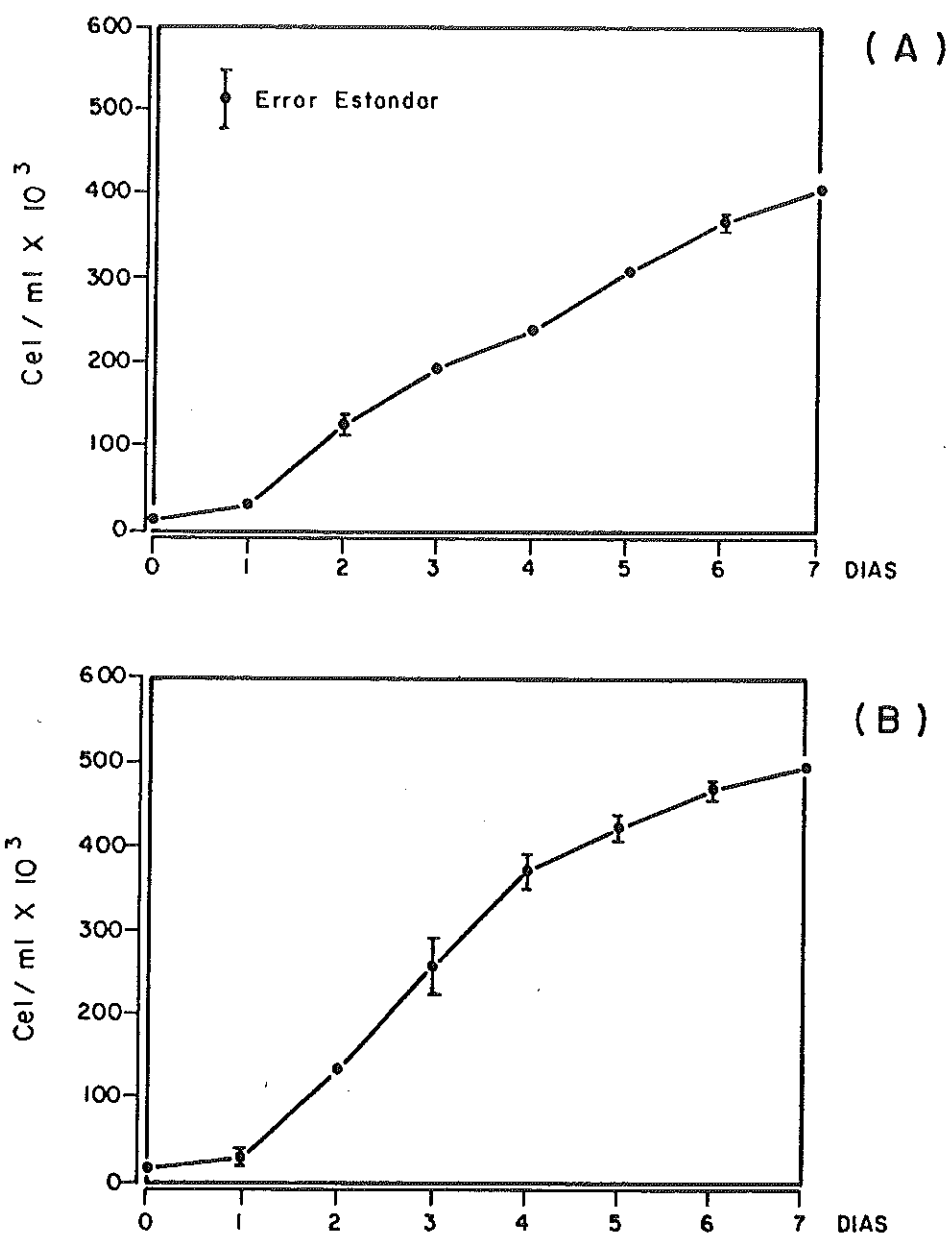


FIGURA 2 - CURVAS DE CRECIMIENTO DE *Tetraselmis suecica* CULTIVADA EN MEDIO QUIMICO CON LA MITAD DE NUTRIENTES Y MITAD DE TRIS (HIDROXIMETIL) AMINOMETANO (A); Y TODOS LOS NUTRIENTES MAS TODO EL TRIS (B).

poblacionales de la citada microalga se muestran en las tablas IIA-B, la cual presentó una fase de crecimiento entre los días 1-6, con una constante de crecimiento promedio de 0.49 para el primero y 0.55 para el segundo. Sus respectivos tiempos de duplicación fueron de 1.43 y 1.27 días y las máximas producciones diarias ocurrieron entre el segundo y tercer día respectivamente.

3.3. EXPERIMENTOS CON LA MITAD DE NUTRIENTES E INYECCIONES DE DIOXIDO DE CARBONO (CO_2) Y TODOS LOS NUTRIENTES CON INYECCION DE CO_2

El crecimiento de la microalga bajo las condiciones anteriores se indican en las figuras 3A-B, ambos experimentos comenzaron con 5×10^3 cél/ml, los cuales también presentaron la fase de retardo de un día, iniciando posteriormente el crecimiento exponencial hasta el séptimo día, obteniéndose densidades celulares de 450 750 y 437 000 cél/ml. Por otra parte sus valores poblacionales se muestran en las tablas IIIA-B. Sus fases de crecimiento se produjeron entre los días 1-7 y 1-6, con una constante de crecimiento promedio de 0.67 y 0.77; tiempos de duplicación de 1.03 y 0.90 días, siendo sus máximas producciones en el segundo y tercer día.

TABLA IIA-B. Valores poblacionales promedio de *Tetraselmis suecica* con la mitad de nutrientes, mitad de tris (Hidroximetil) amino-metano (A); y todos los nutrientes más tris (B).

(A)

TIEMPO (días)	CONCENTRACION (cél/ml)	K	T D (días)	D (div/día)	P D (cél/ml)	V P (%)
0	14 000	----	----	----	----	----
1	32 750	0.85	0.82	1.23	18 750	133.93
2	129 000	1.37	0.51	1.98	96 250	293.89
3	200 500	1.81	0.38	2.61	71 500	55.43
4	241 750	0.19	3.70	0.27	41 250	20.57
5	313 250	0.26	2.68	0.37	71 500	29.58
6	370 750	0.17	4.11	0.24	57 500	18.36
7	411 750	0.10	6.61	0.15	41 000	11.06

(B)

TIEMPO (días)	CONCENTRACION (cél/ml)	K	T D (días)	D (div/día)	P D (cél/ml)	V P (%)
0	17 500	----	----	----	----	----
1	30 500	0.56	0.80	1.25	13 000	74.29
2	134 500	1.48	0.47	2.14	104 000	340.98
3	261 000	0.66	1.05	0.96	126 500	94.05
4	371 000	0.35	1.97	0.51	110 000	42.15
5	420 500	0.13	5.53	0.18	49 500	13.34
6	467 250	0.11	6.58	0.15	46 750	11.12
7	494 750	0.06	12.12	0.08	27 500	5.89

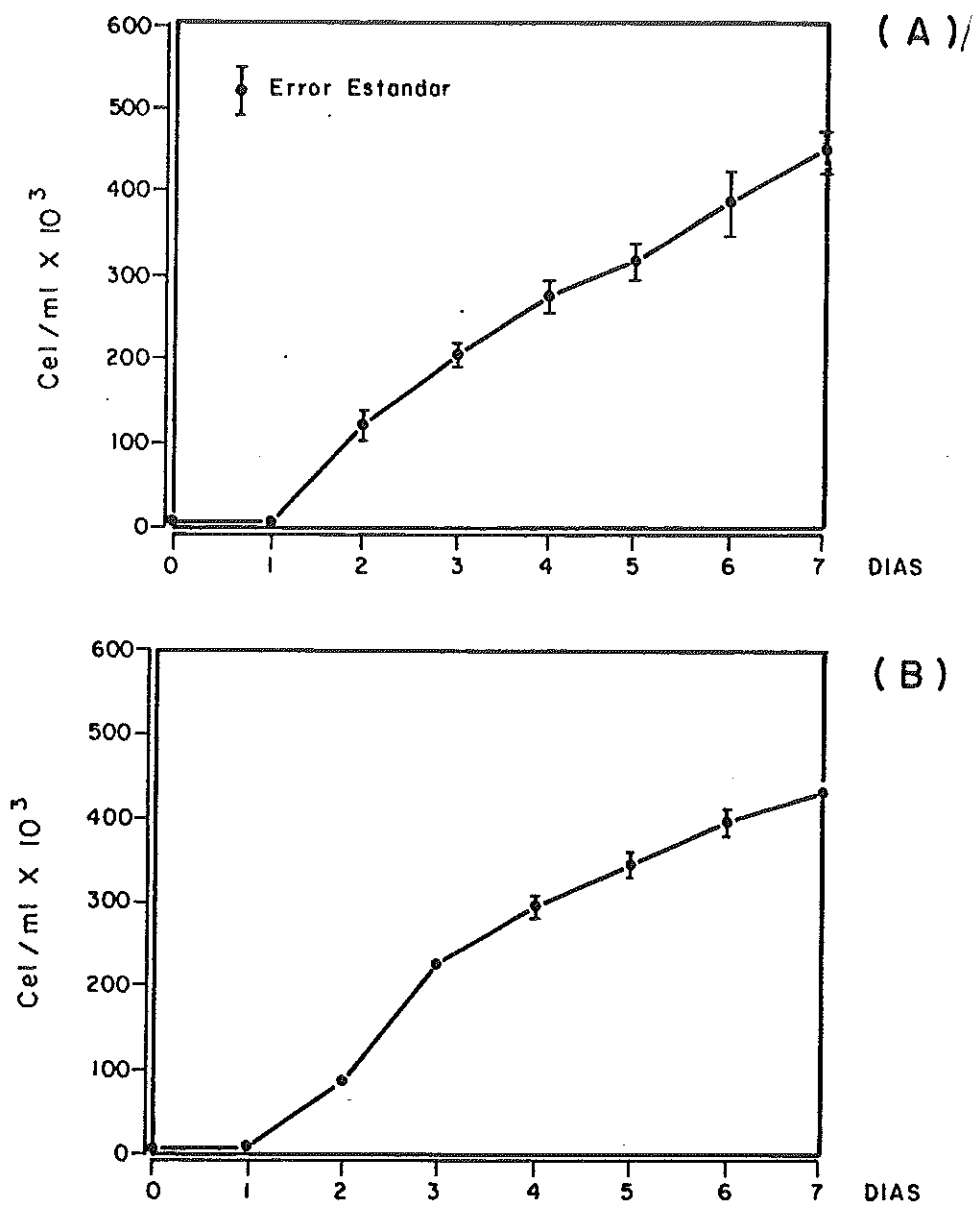


FIGURA 3 - CURVAS DE CRECIMIENTO DE *Tetraselmis suecica* CULTIVADA EN MEDIO QUIMICO CON LA MITAD DE NUTRIENTES E INYECCION DE CO₂ (A) ; Y TODOS LOS NUTRIENTES E INYECCION DE CO₂ (B).

TABLA IIIA-B. Valores poblacionales promedio de Tetraselmis suecica con la mitad de nutrientes e inyecciones de dióxido de carbono (A); todos los nutrientes e inyecciones de CO₂(B).

(A)

TIEMPO (días)	CONCENTRACION (cél/ml)	K	T D (días)	D (div/día)	P D (cél/ml)	V P (%)
0	5 000	----	-----	-----	-----	-----
1	8 000	0.47	1.47	0.68	3 000	60.00
2	123 500	2.74	0.25	3.95	115 500	1443.75
3	206 000	0.51	1.35	0.74	82 500	66.80
4	274 750	0.29	2.41	0.42	68 750	33.37
5	316 000	0.14	4.96	0.20	41 250	15.01
6	387 500	0.20	3.40	0.29	71 500	22.63
7	450 750	0.15	4.58	0.22	63 250	16.32

(B)

TIEMPO (días)	CONCENTRACION (cél/ml)	K	T D (días)	D (div/día)	P D (cél/ml)	V P (%)
0	5 000	----	-----	-----	-----	-----
1	8 500	0.53	1.31	0.77	3 500	70.00
2	90 500	2.37	0.29	3.41	82 000	964.71
3	230 750	0.94	0.74	1.35	140 250	154.97
4	296 750	0.25	2.76	0.36	66 000	28.60
5	349 000	0.16	4.27	0.23	52 250	17.61
6	398 500	0.13	5.23	0.19	49 500	14.18
7	437 000	0.09	7.52	0.13	38 500	9.66

3.4. EXPERIMENTOS CON LA MITAD DE NUTRIENTES,
MITAD DE TRIS E INYECCIONES DE DIOXIDO DE
CARBONO (CO₂) Y TODOS LOS NUTRIENTES, TODO
TRIS Y CO₂ (CONTROL)

En las figuras 4A-B se muestran los crecimientos de T. suecica. los cultivos principiaron con 39.5×10^3 y 41×10^3 cél/ml, denotándose prácticamente la ausencia de la fase de retardo. este flagelado creció rápidamente llegando a una densidad de 53.6×10^3 y 508.5×10^3 cél/ml. Los valores poblacionales calculados se reportan en las tablas IVA-B. Estos experimentos tuvieron su fase de crecimiento entre los días 1-6 y 1-7, con una constante de crecimiento promedio de 0.38 y 0.42, sus tiempos de duplicación fueron 1.81 y 1.65 días y presentaron sus máximas producciones al tercer día.

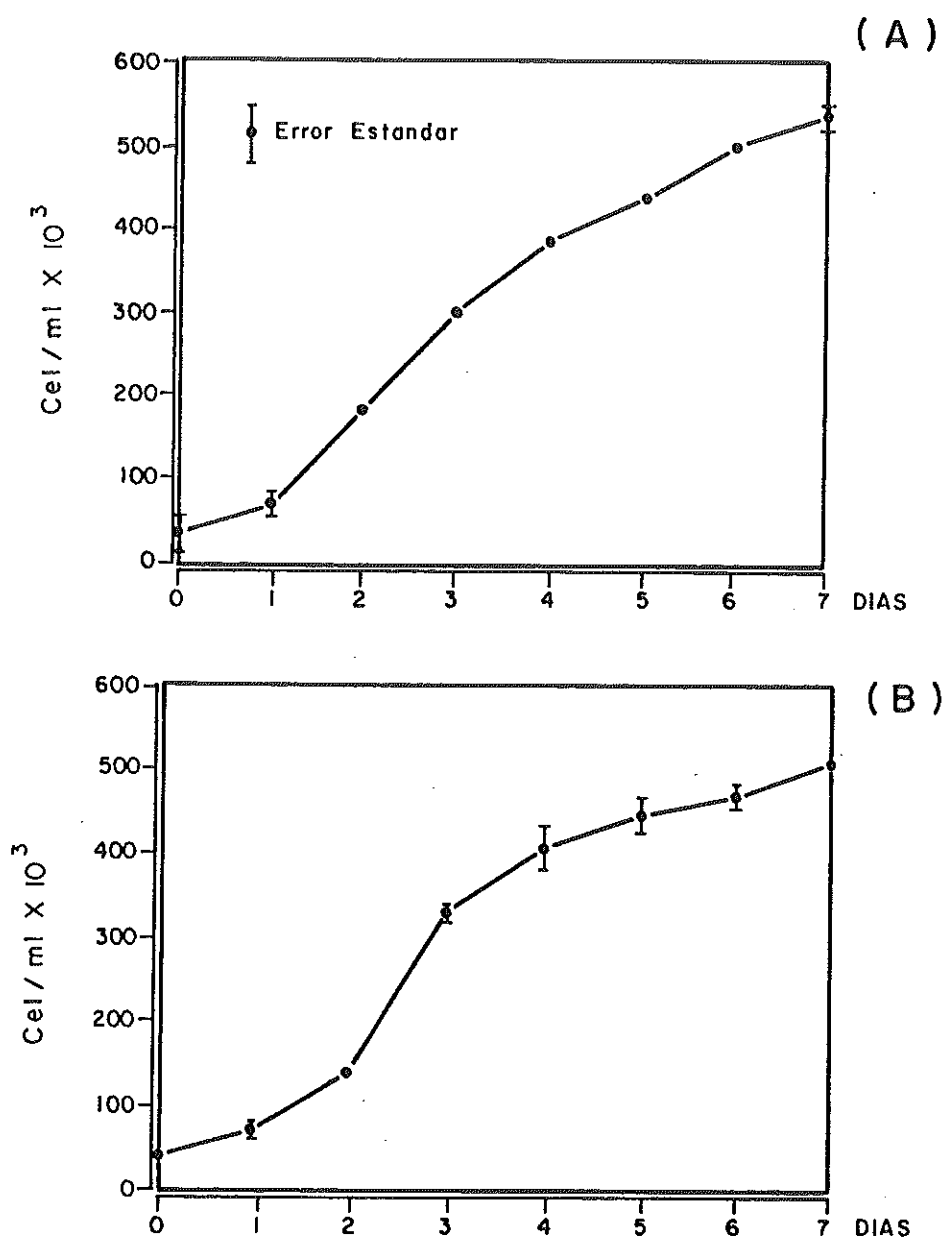


FIGURA 4 - CURVAS DE CRECIMIENTO DE *Tetraselmis suecica* CULTIVADA EN MEDIO QUIMICO CON LA MITAD DE NUTRIENTES, MITAD DE TRIS (HIDROXIMETIL) AMINOMETANO E INYECCION DE CO₂ (A); Y TODOS LOS NUTRIENTES, TODO EL TRIS E INYECCION DE CO₂(B)

TABLA IVA-B. Valores poblacionales promedio de Tetraselmis suecica con la mitad de nutrientes, mitad de tris e inyecciones de dióxido de carbono (A); todos los nutrientes, todo tris y CO₂(B).

(A)

TIEMPO (días)	CONCENTRACION (cél/ml)	K	T D (días)	D (div/día)	P D (cél/ml)	V P (%)
0	39 500	----	-----	-----	-----	-----
1	74 000	0.63	1.10	0.91	34 500	87.34
2	184 000	0.91	0.76	1.31	110 000	39.64
3	303 350	0.50	1.39	0.72	119 350	64.86
4	386 950	0.24	2.85	0.35	83 600	27.56
5	437 000	0.12	5.70	0.18	50 050	12.93
6	500 250	0.14	5.30	0.20	63 250	14.47
7	536 000	0.07	10.04	0.10	35 750	7.15

(B)

TIEMPO (días)	CONCENTRACION (cél/ml)	K	T D (días)	D (div/día)	P D (cél/ml)	V P (%)
0	41 000	----	-----	-----	-----	-----
1	71 250	0.55	1.25	0.80	30 250	73.78
2	140 000	0.68	1.03	0.97	68 750	96.49
3	332 500	0.86	0.80	1.25	192 500	137.50
4	409 500	0.21	3.33	0.30	77 000	23.16
5	448 000	0.09	7.71	0.13	38 500	9.40
6	470 000	0.05	14.46	0.07	22 000	4.91
7	508 500	0.08	8.80	0.11	38 500	8.19

3.5. EXPERIMENTO CON UN CUARTO DE NUTRIENTES E INYECCIONES DE DIOXIDO DE CARBONO (CO_2)

La figura 5 refleja el crecimiento de T. suecica, la cual inició con 5×10^3 cél/ml. Tuvo una fase de retardo de veinticuatro horas y una fase exponencial hasta el séptimo día, alcanzando una concentración de 431 500 cél/ml. Sus valores poblacionales se representan en la tabla V. La fase de crecimiento se produjo entre los días 1-6 con un valor promedio de $K=0.67$, la población se duplicó cada 1.03 días y la máxima producción diaria fue al segundo día.

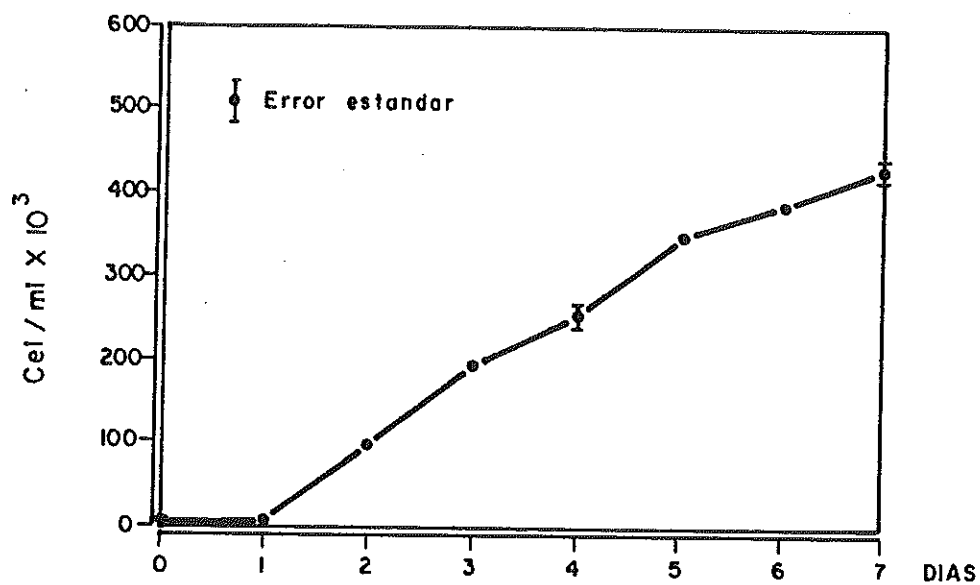


FIGURA 5 - CURVA DE CRECIMIENTO DE *Tetraselmis suecica* CULTIVADA EN MEDIO QUIMICO CON UN CUARTO DE NUTRIENTES E INYECCION DE CO₂ .

TABLA V. Valores poblacionales promedio de Tetraselmis suecica con un cuarto de nutrientes e inyecciones de dióxido de carbono.

TIEMPO (días)	CONCENTRACION (cél/ml)	K	T D (días)	D (div/día)	P D (cél/ml)	V P (%)
0	5 000	----	----	----	-----	-----
1	6 750	0.30	2.31	0.43	1 750	35.00
2	101 500	2.71	0.26	3.91	94 750	1403.70
3	195 000	0.65	1.06	0.94	93 500	92.12
4	255 500	0.27	2.57	0.39	60 500	31.03
5	346 250	0.30	2.28	0.44	90 750	35.52
6	384 750	0.11	6.57	0.15	38 500	11.12
7	431 500	0.11	6.04	0.17	46 750	12.15

La prueba de correlación polinomial al 95% de confianza mostró que no existe correlación entre los inoculos iniciales y la concentración final. Así mismo se realizó un análisis de varianza de dos vías (Tabla VI); para determinar si existían diferencias significativas en relación a los diferentes medios experimentados, en el cual solo se presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) con el tipo de nutriente utilizado.

TABLA VI. Análisis de varianza de dos vías de los diferentes medios de cultivos utilizados para el crecimiento de Tetraselmis suecica en volúmenes de mil litros.

MEDIO DE CULTIVO G.L. F POR TABLAS F CALCULADA SIGNIFICANCIA				
DEBIDO A AL 5%				
=====				
NUTRIENTE	3	2.68	3.25	S
CONCENTRACION	1	3.92	0.34	NS
NUTRIENTE Y				
CONCENTRACION	3	2.68	0.26	NS

4.- DISCUSIONES

La intensidad de luz que recibieron los cultivos en el nivel masivo fue de 82 watts/m^2 , esto permitió alcanzar concentraciones de 327 000 a 536 000 cél/ml (Tabla IA, IVA), siendo superiores a las reportadas por Griffith, et al. (1973) de 275 000 a 450 000 cél/ml en volúmenes de 340 lt con una intensidad de luz de 107 watts/m^2 . Ellos trabajaron en volúmenes más pequeños por lo que es de esperarse mayor producción que en niveles superiores como los realizados en este trabajo. Estas diferencias pueden ser atribuídas al efecto que tiene la intensidad de luz sobre la razón de crecimiento de T. suecica, ya que a intensidades altas de luz se presenta una reducción en el tiempo de duplicación, lo cual no sucede cuando se trabaja con bajas intensidades de luz (Maddux y Jones, 1964) lo que permitió una rápida división celular.

En todos los medios experimentados se observó desarrollo adecuado de T. suecica, por lo que cualquiera de estos puede ser empleado para el cultivo de esta microalga.

En los experimentos con la mitad de nutrientes y todos los nutrientes, se encontró para ambos una densidad similar (Fig. IA-B). Así mismo, sus constantes de crecimiento promedio fueron iguales ($K=0.73$) así como la velocidad máxima de crecimiento ($TD=0.94$ y 0.95). En lo

que respecta a su rendimiento en producción fue de 64.3 y 66.4 % respectivamente. Esto denota que al usar la mitad de nutrientes, da el mismo rendimiento que utilizar todos los nutrientes, ya que los requerimientos de sales nutritivas para el séptimo día no presentaron efectos significativos en la razón de crecimiento.

Fabregas, et al. (1984) reportan que las condiciones óptimas de crecimiento para este flagelado se dan cuando la concentración de nitratos se encuentra en el orden de 170 a 680 gr/lt, con un tiempo de duplicación de 0.55 div/día y una máxima densidad celular de 1 300 000 cél/ml. En este trabajo, el tiempo de duplicación es superior (TD=0.95) a lo reportado por estos autores. En estos experimentos la concentración de nutrientes es inferior a la utilizada por ellos, lo cual implica que las células son capaces de utilizar eficientemente una menor cantidad de nutrientes para mantener su ritmo de crecimiento. Cabe señalar también que ellos trabajaron en volúmenes muy inferiores (40 ml) lo que pudo haber originado que la concentración misma de metabolitos generados por las microalgas y la alta concentración de nutrientes influyeran sobre la velocidad de crecimiento, lo cual no sucedió en los medios de cultivo que se utilizaron para esta investigación.

Cuando el amortiguador tris (hidroximetil) amino-metano fue incorporado al cultivo, se presentó una mayor producción de *T. suecica* (Fig. 2A-B; Tabla IIA-B). En estos cultivos las constantes de crecimiento promedio fueron $K=0.49$ y 0.55 y las velocidades de crecimiento promedio fueron $TD=1.43$ y 1.27 . Su rendimiento en producción fue de 80.9 y 97.2% . Las diferencias se deben que al no utilizar el amortiguador en el primer experimento afectó la disponibilidad de ciertos elementos traza, ya que la asimilación de nitrógeno tiende a incrementar el pH, disminuyendo de esta manera la productividad. Esto no ocurre cuando se incorpora el amortiguador al medio de cultivo, el cual establece un equilibrio químico para contrarestar las variaciones de pH e incrementar la producción y evitar así, la precipitación de metales como el hierro y manganeso, que son esenciales para la síntesis del protoplasma celular, por ser los constituyentes de varias enzimas y transportadores que operan en el mecanismo de la respiración celular, como por ejemplo en el pigmento respiratorio citocromo (Mc Elory y Nason, 1953) citado por Paniagua y Buckle (1985).

En los cultivos con inyecciones directas de dióxido de carbono con la mitad y todos los nutrientes (Fig 3A-B; Tabla IIIA-B) registraron constantes de crecimiento promedio de $K=0.67$ y 0.77 , con tiempos de duplicación

promedio de 1.03 y 0.90. Se encontró el 88.6 y 85.9 % de su rendimiento en producción. Estos parámetros nos reflejan que los cultivos estuvieron en mejores condiciones ecológicas que los anteriores. Al adicionar CO_2 en cultivos masivos, éste actúa como un amortiguador efectivo, que controla de manera más estable las variaciones de pH. Permite además un mejor aprovechamiento de nutrientes dando como resultado una mejor respuesta en el incremento poblacional de *T. suecica*, originando así, células de mayor calidad nutritiva (Fabregas *et al.*, 1985)

Es evidente que cuando se usa la mitad de nutrientes y CO_2 se alcanzan mayores concentraciones que al utilizar todos los nutrientes y CO_2 . Esto también ha sido observado por otros autores como Fabregas, *et al.* (1984) quienes postulan que el CO_2 es un factor limitante y que un incremento en la concentración de nutrientes, no produce un incremento en la biomasa final. Sin embargo la adición de CO_2 a cultivos con baja concentración de nutrientes, aumenta la producción de biomasa final, lo cual concuerda con lo encontrado en esta investigación.

Como se observa en las figuras 4A-B, el grupo control que representa el 100 %, presentó concentraciones finales de 508 500 cél/ml y constante de crecimiento promedio de 0.42 y tiempo de duplicación de 1.65 días. Mientras que el cultivo con la mitad de nutrientes, mitad

de tris e inyección de CO_2 , registró densidades finales de 536 000 cél/ml y constante de crecimiento promedio de 0.38 y tiempo de duplicación de 1.81 días (Tabla IVA-B), este último registró un rendimiento del 105.4%, lo cual nos indica un nivel mayor de producción respecto al control. Estos dos tratamientos fueron los que alcanzaron mayores producciones de biomasa final en relación a los demás experimentos. Esto se debió a que se utilizó en conjunto Tris y CO_2 , los cuales contrarrestaron más eficientemente las variaciones de pH.

El tris en estos experimentos solo funciona como estabilizador de pH, ya que no es utilizado por las células como nutriente. Sin embargo la incorporación de CO_2 al medio de cultivo, altera el pH del mismo, debido a que en solución es considerado un ácido débil. Este efecto se ve disminuido por la presencia del tris, a la vez que el CO_2 es incorporado en el metabolismo como un nutriente más para la síntesis de material celular y parte de éste es liberado a la atmósfera por procesos de mezcla (aireación).

Aunque Duggan, et al. (1964), mencionan que el Tris puede tener interacciones con enzimas, particularmente donde existe un grupo carbonilo libre; la inhibición asociada con el Tris parece ser considerada limitante y puede ser debida en parte a la reducción del carbón disponible ya que puede formar complejos con el CO_2 . Es

evidente que estos factores no alteraron las condiciones del cultivo. Ya que de existir reducción del dióxido de carbono, se inhibe la acción enzimática de la carboxilasa (Tolbert, 1974), lo cual se hubiera reflejado en la producción.

De acuerdo a los resultados obtenidos utilizando un cuarto de nutrientes e inyecciones de CO_2 (Fig. 5; Tabla V), se obtuvo un rendimiento del 84.8 % respecto al grupo control, con una máxima densidad de 431 500 cél/ml y constante de crecimiento promedio de $K=0.67$, y tiempo de duplicación de 1.03 días. Se puede notar que este experimento tuvo una producción muy similar a los anteriores en cuanto a densidad se refiere. Según el concepto de Droop (1975), la razón de crecimiento disminuye cuando el abastecimiento de nutrientes es relativamente escaso para las necesidades metabólicas de la población algal. La población entonces entra a la fase estacionaria del ciclo de crecimiento. En el presente estudio esto no ocurrió debido a que el tiempo de cultivo es relativamente corto (siete días), lo cual favorece que la concentración de nutrientes no sea limitante en el crecimiento.

Chu (1943) citado por Paniagua y Buckle (1985), menciona que las bajas concentraciones de nutrientes afectan el crecimiento de los cultivos ocasionando entre otras cosas, decoloración de las microalgas. Esto no

sucedió con la adición de dióxido de carbono, el cual modifica el pH pudiéndose presentar un efecto directo en la especiación química de los nutrientes. Esto ocasiona una mejor asimilación de constituyentes del medio, evitando por otra parte el proceso de fotorespiración en el medio de cultivo de T. suecica.

5.- CONCLUSIONES

1.- En todos los medios experimentados se observó desarrollo aceptable de Tetraselmis suecica por lo que cualquier medio puede ser empleado para su cultivo.

2.- La adición de dióxido de carbono por un tiempo de dos minutos y medio a $50 \text{ Kg} / \text{cm}^2$ fue suficiente para mantener el pH en o debajo de 7.5.

3.- La incorporación de dióxido de carbono a los medios de cultivo generó mayor productividad.

4.- La máxima producción se obtuvo con la mitad de nutrientes, Tris y dióxido de carbono.

5.- La productividad no fue afectada por la temperatura.

6.- RECOMENDACIONES

Para futuros trabajos es conveniente:

a) Determinar la composición bioquímica en cuanto a proteínas, lípidos y carbohidratos de Tetraselmis suecica en estos sistemas de cultivo.

b) Determinar la cantidad de pigmentos (clorofilas A y feofitinas) de esta especie, bajo este sistema de cultivo.

c) Realizar estudios sobre el contenido calórico de Tetraselmis suecica en estos sistemas de cultivo.

7.- LITERATURA CITADA

- Alfonso, E. y S. Leal., 1981. Influencia de diferentes factores en el volumen celular de algas planctónicas en cultivo. Univ. de la Habana, Rev. de Invest. Mar., 2(1): 3- 26.
- Alfonso, E. y C. N. Mariel., 1985. Uso de nuevos fertilizantes para cultivar fitoplancton. Univ. de la Habana, Rev. de Invest. Mar., 6(1): 3-12.
- Creekman, L. L., 1977. The effect of conditioning the american oyster (Crassostrea virginica) with Tetraselmis suecica and cornstach on the growth, vigor and survival of its larvae. M. S. Thesis. University of Virginia, Charlottesville, Va. 58 pp.
- Chu, S. P., 1943. The influence of the mineral composition of the medium on the growth to planktonic algae. J. Ecol., 30: 284-325.
- De la Cruz, S. A. y E. Alfonso., 1975. Cultivo masivo de algas planctónicas marinas mediante fertilización. Ciencias, Univ. de la Habana, Serie 8(17): 1-24.
- Duggan, P. F., Donnelly, D. M. X. y Melody, D. P., 1964. The reaction of glyoxylate with tris buffer under physiological conditions. Ir. J. Med. Sci. (6th Ser), 460, 163-168.
- Droop, M. R., 1975. The nutrient status of alga cells in batch culture. J. Mar. Biol. Assok. U. K., 55: 541-555.

- Duarte-Moreno, J. H. y R. Andrade., 1987. Determinación del ciclo reproductivo del ostion europeo (Ostrea edulis) en Bahía San Quintín, B. C. y bajo condiciones de laboratorio. Tesis de licenciatura F. C. M., U.A.B.C. 94 pp.
- Fabregas, J., Herrero, C., Cabezas, B. y Viega, M., 1984. Growth of the marine microalga (Tetraselmis suecica) in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture*, 42: 207-215.
- Fabregas, J., Herrero, C., Cabezas, B. y Albade, J., 1985. Mass culture and biochemical variability of the marine microalga Tetraselmis suecica Kylin (Butch) with high nutrient concentration. *Aquaculture*, 49: 231-244.
- Fabregas, J. y Herrero, C., 1986. Marine microalgae as a potential source of minerals in fish diets. *Aquaculture*, 51: 237-243.
- Guillard, R. R. l., 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. p. 29-60. In culture of marine invertebrate animals. Smith W. L. and M. H. Chanley (Eds). Plenum Publishing Corp., New York. 338 p.
- Goldman, J. C., 1979. Outdoor algal mass cultures. I. Applications. *Watter Res.*, 13: 1-9.

- Griffith, G. W., M. A. Murphy Kenslow y L. A. Ross., 1973. A mass culture method for Tetraselmis sp. a promising food for larval crustaceans. Proceeding of the Fourth Annual Workshop World Mariculture Society, 289-284.
- Helm, M. M., Holland, D. L. y Stephenson, R. R., 1973. The effects supplementary algal feeding on a hatchery breeding stock of Ostrea edulis L. on larval vigour. J. Mar. Biol. Assoc. U. K., 53: 673-684.
- Helm, M. M., 1977. Mixed algal feeding of Ostrea edulis larvae with Isochrysis galbana and Tetraselmis suecica J. Mar. Biol. Assoc. U. K., 57: 1019-1029.
- Islas-Olivares, R., V. Gendrop-Funes y M. Miranda., 1978. Infraestructura básica para la obtención de larvas (semilla) de ostion japones (Crassostrea gigas) y ostion europeo (Ostrea edulis) en Baja California. Ciencias Marinas, 5(2): 73-86.
- Kharatyan, S. G., 1978. Microbes as food for humans. Annu. Rev. Microbiol., 32: 301-324.
- Kinne, O., 1976. Marine ecology, 3(1) Wiley-Interscience. Londres, 578 pp.
- 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.

- Laing, I. y Helm, M. M., 1981. Factors affecting the semi-continuous production of Tetraselmis suecica Butch. (Kylin) Butch. in 200-L vessels. *Aquaculture*, 22: 137-148.
- Leal, Silvia., 1983. Volumen celular en dos especies de algas planctónicas en cultivo. Univ. de la Habana, *Rev. de Inv. Marinas*, 4(2): 17-39.
- Loosanoff, V. L. y H. C. Davis, 1963. Rearing of bivalve mollusk. *Advances in Marine Biology*, 1: 55-69.
- Maddux, W. S. y R. F. Jones., 1964. Some interactions of temperature, light intensity, and nutrient concentrations during the continuous culture of Nitzschia closterium and Tetraselmis sp. *Limnol. Oceanogr.* 9(1): 79-86.
- Matthiessen, G. C. y R. C. Torner, 1966. Possible methods of improving the shellfish Industry of Martha's Vineyard, Duke's Country, Massachusetts, *Mar. Res. Fuond. Mass.*, IV + 138.
- McElroy, W. D. y Nason, 1953. Mechanisms of action of micro nutrients elements in enzyme systems. *Annu. Rev. pl. Physiol.* 1-30.
- Padilla, G. M., 1975. Crecimiento poblacional de Tetraselmis suecica (Chlorophyceae) en ambiente controlado. *Rev. Biol. Mar. Valparaiso*, 15(3): 287-296.

- Paniagua, J. M. y L. F. Buckle R., 1985. Cultivo en condiciones controladas de Monochrysis lutheri y Skeletonema costatum con extractos de macrofitas marinas (Fitoplancton). An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. México. 12(1): 59-70.
- Persoone, G. y Sorgeloos, P., 1975. Technological improvements for the cultivation of invertebrates as food fishes and crustaceans. I. Devices and Methods. Aquaculture, 6: 275-289.
- Pruder, G. D. y Bolton, E. T., 1978. System configuration and performance: Bivalve molluscan mariculture. Proc. of the Nineth Annual Meeting World Mariculture Society, 747-759.
- Snedecor, G. W. y W. G. Cochran, 1980. Métodos estadísticos C.E.C.S.A. México, 703 p.
- Stross, R. G. y Pemrick, S. M., 1974. Nutrient uptake kinetics in phytoplankton: A basis for niche separation. J. Phycol., 10: 164-169.
- Tolbert, N. E., 1974. Photorespiration. Pages 474-504 in W. D. P. Stewart, ed., Algal Physiology and Biochemistry. Black Well, Oxford.
- Tric, C. G., 1979. The life cycle of Platymonas impellucida McLachlan et Parke (Prasinophyceae) in culture. Proc. N. S. Inst. SCI. volume 29: 215-222.

- Ukeles, R., 1973. Continuous culture - a method for the production of unicellular algal food. In: J. R. Stein (Editor). Handbook and Growth Measurements. Cambridge, pp. 233-254.
- Walne, P. R., 1964. The culture of marine bivalve larvae. In: Physiology of mollusca. Wilbury, K. M. y C. M. Yonge. (Eds.) Academic Press. New York 206 p. L Foog.
- Walne, P. R., 1970. Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera Ostrea, Crassostrea, Mercenaria and Mytilus. Fish. Invest. Lond., Ser. 2 26(5), 62 pp.
- Walne, P. R., 1974. Culture of bivalve molluscs, 50 years experience at Conwy. Fishing News (Books) Ltd., West Byfleet, Great Britain. 173 p.