



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

EFFECTO DE LA VARIACION EN LA CONCENTRACION
DE NITRATO DE AMONIO EN EL CRECIMIENTO
DE LA MICROALGA Tetraselmis suecica
KYLIN (1935) BUTCHER

CURSO DE TITULACION
" BIOLOGIA MARINA "



M E M O R I A
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
OCEANOLOGO
PRESENTA

RAMON AVILES SANCHEZ

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MARZO DE 1988.

RESUMEN

Este estudio forma parte de una serie de experimentos llevados a cabo en cultivos de la microalga Tetraselmis suecica a nivel Erlenmeyer, durante ocho días; utilizando nitrato de amonio como fuente de nitrógeno.

Se prepararon volúmenes de 75 ml de los medios de -- Matthiessen y Torner (1966) y f/2 de Guillard (1973) usando los macronutrientes de Guillard y EDTA, tris, micronutrientes y vitaminas de Matthiessen y Torner.

Se varió la concentración de nitrógeno de 75 mg/L a 67.5, 60.0, 52.5 y 45.0 mg/L, al octavo día del experimento las densidades poblacionales fueron 2.30×10^6 , 2.71×10^6 , 1.96×10^6 , 2.03×10^6 , y 1.83×10^6 cel/ml respectivamente.

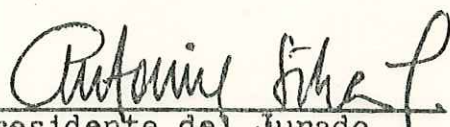
A los valores de las densidades poblacionales se les aplicó la prueba de análisis de varianza no paramétrica de Kruskal-wallis, encontrando que no existen diferencias significativas al nivel del 5% presentando un comportamiento similar en las tasas de crecimiento de T. suecica tanto en el control como en las diferentes concentraciones.

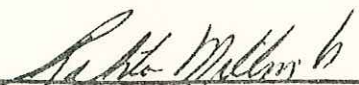
EFFECTO DE LA VARIACION EN LA CONCENTRACION
DE NITRATO DE AMONIO EN EL CRECIMIENTO DE
LA MICROALGA Tetraselmis suecica KYLIN ---
(1935) BUTCHER

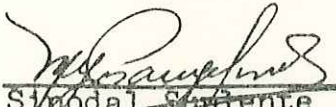
M E M O R I A
CURSO DE TITULACION
BIOLOGIA MARINA
QUE PRESENTA:

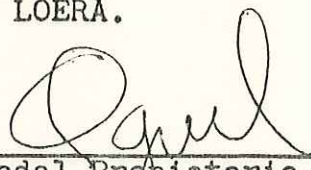
RAMON AVILES SANCHEZ.

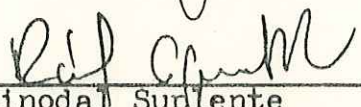
APROBADO POR:


Presidente del Jurado
M.C. ANTONIO SILVA LOERA.


Sinodal Propietario
M.C. ROBERTO MILLAN NUÑEZ.


Sinodal Suplente
OC. MYRA PAMPLONA SALAZAR.


Sinodal Propietario
OC. LUIS AGUILAR ROSAS.


Sinodal Suplente
OC. RAUL AGUILAR ROSAS.

A G R A D E C I M I E N T O S

Mi agradecimiento al M.C. Antonio Silva Loera por su guía en la dirección de esta tesina, a mis Sinodales M.C. Roberto Millan Nunez, Oc. Luis Aguilar Rosas, Oc. Myra Pamplona Salazar y Oc. Raul Aguilar Rosas; por sus valiosas aportaciones para la realización del presente trabajo.

A mi tia: Inocencia Aviles Vda. de Mora, por su valioso apoyo economico y moral durante mi carrera.

A mis amigos y a todos los que me acompañaron durante esta - etapa de mi vida.

DEDICATORIAS

A mis padres: Oscar Aviles Flores y Maria Raquel Sanchez de Aviles por su comprension, paciencia y confianza y porque a ellos debo todo cuanto soy.

A mi esposa: Rosa Elva Robles de Aviles, por el amor y la -
confianza siempre dada.

A mis hijas: Gretchen J., Danna Livier y Silvia G. Aviles -
Robles; quienes me dan los animos necesarios para seguir --
adelante.

A mis suegros: Antonio Robles P. y Rosa Marina Quezada de -
Robles, por su valiosa ayuda.

A mis hermanos: Merced Lorenzo, Sara Josefina, Oscar F., --
Ma. Dolores, Ma. Raquel, Inocencia, Edmundo y Adriana Aviles
Sanchez.

CONTENIDO

	PAGINA
INTRODUCCION	1
OBJETIVO	5
MATERIALES Y METODOS	6
MEDIOS DE CULTIVO	6
REGISTRO DEL CRECIMIENTO DE MICROALGAS	9
RESULTADOS	12
FIGURA	17
DISCUSION	18
CONCLUSION	20
RECOMENDACIONES	21
LITERATURA CITADA	22
APENDICE	25

APENDICE

	PAGINA
I.- Medios de cultivo mas usados.	25
II Rutina seguida en la preparacion de los macronutrientes para los medios de cultivo	26
III Diseno del medio modificado f?2 de Guillard (1973) y Matthiessen (1966) utilizado como medio basico.	27
IV Rutina a seguir en la preparacion stock primaria de vitaminas para los medios de cultivo.	28
V Curva de crecimiento ideal de microalgas en medios de volumen limitados.	29
VI Calculos de densidad	30
VII Calculo de parametros poblacionales	31

LISTA DE TABLAS

TABLA	PAGINA
I Valores poblacionales promedio entre original y réplica de las lecturas observadas en el hematómetro para cada uno de los tratamientos.	14
II Valores poblacionales promedio entre original y réplica de las lecturas observadas en el hematómetro para la concentración de 75mg/L de NaNO_3 (control).	14
III Valores poblacionales promedio entre original y réplica de las lecturas observadas en el hematómetro para la concentración de 67mg/L de NH_4NO_3	15
IV Valores poblacionales promedio entre original y réplica de las lecturas observadas en el hematómetro para la concentración de 60.0 mg/L de NH_4NO_3	15
V Valores poblacionales promedio entre original y replica de las lecturas observadas en el hematómetro para la concentración de 52.5 mg/L de NH_4NO_3	16
VI Valores poblacionales promedio entre original y replica para las lecturas observadas en el hematocitómetro para la concentración de 45.0 mg/L de NH_4NO_3	16

INTRODUCCION.

Los cultivos de fitoplancton representan a la fecha la fuente mas promisoría de alimento vivo requerido por la gran mayoría de los estadíos larvarios de especies de importancia para la acuicultura (crustáceos, moluscos y peces) Droop (1975). Debido a la posición que ocupa en la cadena trófica, ademas del papel que desempeñan en el reciclaje del bióxido de carbono, el fitoplancton tiene la capacidad de convertir sales inorgánicas en compuestos orgánicos por medio de la fotosíntesis, cualidad que lo hace imprescindible en la producción de alimento.

El fitoplancton, en general, se distribuye, desarrolla y crece de acuerdo a los factores físico-químicos del medio. Desde finales del siglo pasado existen estudios sobre la variación de riqueza de biomasa que demuestran que esas variaciones, son debidas a diferencias en contenido de nitrógeno. Raben en 1905, observó que el nitrógeno, silicio y fósforo se hayan en el mar en pequenísimas cantidades y concluyó que la densidad de las algas marinas fluctua de acuerdo con la proporción de dichos nutrientes, Lozano Cabo F. (1978)

El nitrógeno es introducido al mar como un resultado del lavado de tierra aunque una gran proporción es aportado por la atmósfera debido a la evaporación del amonio desde la superficie terrestre y fijado "in situ". Lozano C. F. (1978) En la acuicultura, se han desarrollado métodos de cultivo de microalgas ya que tienen un alto valor nutritivo, siendo ma-

por su contenido en proteínas, grasas y vitaminas respectivamente que otras fuentes vegetales, por ello es que en -- areas sobrepobladas son consideradas como suplemento potencial de alimento para el consumo humano directo (Ukeles, - 1976)

Dentro de los métodos de producción de microalgas se han estudiado los sistemas de cultivo discontinuos y continuos, - los mas usuales son los métodos discontinuos que parten de inocular las celulas en un recipiente con agua de mar enriquecida (medio de cultivo) conteniendo los nutrientes orgánicos e inorgánicos, el inóculo posee un número relativamente pequeño de celulas el cual es expuesto a condiciones favorables de luz y temperatura (Foog (1965).

Los medios de cultivo mas usuales, estan conformados con agua de mar enriquecida cuyas formulas provienen desde Miquel (1892) hasta las mezclas actuales mas complejas (Pravasoli, Molaughlin y Droop, 1957; Guillard, 1973) en la actualidad los medios de cultivo se basan en el medio enriquecido "f" de Guillard y Ryther (1962), los medios de Guillard (1973) y el de Matthiessen y Torner (1966)

Los medios de cultivo de microalgas requieren de un adecuado control de ciertos parametros físico-químicos y ambientales (ph, salinidad, bióxido de carbono, temperatura, iluminación y aereación) así como los requerimientos nutricionales (nitratos, fosfatos, silicatos, elementos traza agentes quelantes y vitaminas) si se lleva el control debido de --

estas condiciones; el cultivo producirá el máximo de biomasa. Los reactivos usados en la preparación de los medios de cultivo tradicionales, son de elevado precio, es por esto - que los organismos alimentados con estos cultivos llegan con un alto costo al mercado (Granados-Machuca y Buckle-Ramirez 1984). El medio de cultivo seleccionado es una combinación de los medios de Guillard (1973) y Matthiessen y Torner -- (1966) (apéndice II).

La microalga T. suecica seleccionada para este experimento - es considerada como una especie de alto valor nutritivo (por su composición química) para la alimentación de larvas, semillas y adultos de crustáceos y moluscos.

El nitrógeno es uno de los nutrientes mas limitantes en la producción y tasa de crecimiento de fitoplancton, debido a que se requiere como materia prima para el anabolismo de -- proteínas y formación del protoplasma celular (Davis y ---- Guillard 1958; Imai 1967; Griffit et al 1973; Laing y Helm 1981)

Aguirre-Muñoz (1981) cultivando T. suecica (Kyllin-Butcher), encontró que los nutrientes correspondientes al medio f/2 se aproximan al punto óptimo de crecimiento de esta especie.

T. suecica, pertenece al grupo Prasinophyceae (algas color verde) recientemente separadas de las algas propiamente verdes Guillard (1975)

El genero Tetraselmis fue descrito originalmente por Stein (1878), Kyllin (1935) describió a Platimonas suecica por pri

mera vez, Butcher (1959) ubicó a la especie Platimonas sue-
cica en el género Tetraselmis.

OBJETIVO

Determinar si existe una concentración mas baja de nitrato de amonio como fuente de nitrógeno que los 75 mg/L - Na NO_3 descrita por (Guillard 1973), para lograr la misma producción.

MATERIALES Y METODOS.

El experimento fue realizado en las instalaciones del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (I.I.O) de la U.A.B.C., en Ensenada, B.C. México. El agua de mar utilizada (filtrada y pasada por U.V.) así como la cepa de Tetraselmis suecica, se obtuvieron del laboratorio de microalgas de este mismo Instituto.

MEDIO DE CULTIVO.

Para iniciar el cultivo de microalgas, primero se debe tener un medio de cultivo adecuado para la especie a cultivar. Los medios de cultivo mas utilizados actualmente son f/2 de Guillard (1973), y Matthiessen y Torner (1966) (ver tabla 1 del anexo), por lo que fueron seleccionados para diseñar un medio de cultivo modificado, utilizado como control, formado por macronutrientes de Guillard y los micronutrientes, EDTA, TRIS, vitaminas de Matthiessen y Torner (ver tabla II del anexo).

Medio modificado a partir de los medios de Guillard (1973) y Matthiessen y Torner (1966).

NUTRIENTES (Solución stock primaria).

Nitrato	75 gr/l
Fosfato monosodico	5 gr/l
Secuestrante	10 gr/l
Tris (buffer)	200 gr/l (ajustar PH a 7.5 con ácido clorhidrico concentrado).

METALES TRAZA:

Sulfato de cobre	1.96 gr/l
Sulfato de Zinc	4.40 gr/l
Cloruro de cobalto	2.00 gr/l
Cloruro de manganeso	36.90 gr/l
Molibdato de sodio	1.26 gr/l

Preparación del secuestrante (solución stock secundaria).

El secuestrante se prepara con 10 gr de EDTA Férrico, y un mililitro de cada una de las soluciones primarias de los metales traza y se afora a un litro.

VITAMINAS: (soluciones stock primarias).

Biotina	10 mg/100 ml
B ₁₂	10 mg/100 ml
Tiamina	2 gr/100 ml

De esta solución stock primaria o concentrada, se realizaron diluciones tomando 0.075 ml. de esta, aforado a 100 ml con agua destilada, para obtener la solución stock secundaria, de la cual se utilizó un ml. por cada 75 ml del medio de cultivo.

Los ajustes de PH se hacen agregando gotas de HCL, bajo -- lectura de potenciómetro.

Las rutinas de trabajo de vitaminas y nutrientes se expresan en las tablas III y IV del anexo.

Para la preparación del medio de cultivo control, se utilizó un matraz aforado de un litro; se añadió agua de -- mar filtrada y pasada por luz ultravioleta (U.V.), y se --

agrego un mililitro de las siguientes soluciones stock:

1 ml de solución stock de NaNO_3

1 ml de solución stock de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

1 ml de secuestrante

1 ml de tris.

Se procedió a aforar a un litro de agua de mar filtrada y pasada por U.V.

Posteriormente se usaron 2 matraces Erlenmeyer (original y replica) de 250 ml

En cada uno de ellos se añadieron 75 ml del medio preparado los cuales se usaron como control.

PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NH_4NO_3 .

Los medios se prepararon utilizando el mismo procedimiento que el seguido en el control, cambiando solamente la concentración de NH_4NO_3 de la siguiente forma:

Las concentraciones utilizadas fueron 67.5, 60, 52.5 45.0 mg/l, de NH_4NO_3 ; se transfirieron 75 ml a cada uno de los matraces Erlenmeyer de 250 ml utilizados en cada concentración.

Posteriormente los matraces Erlenmeyer con sus respectivos medios, fueron esterilizados en autoclave a 15 libras/pulg² por 15 minutos; concluido el procedimiento de esterilización se dejó enfriar el medio de cultivo durante 24 horas después se añadieron las vitaminas cerca de la flama de los mecheros tipo Bunsen para prevenir la contaminación de los - - - -

medios.

Las inoculaciones se hicieron en presencia de los mecheros de gas tipo Bunsen que permanecieron encendidos durante el periodo en que se llevo a cabo la operación; la boca de los matraces inoculados se acerca a la flama del mechero para eliminar cualquier impureza antes de colocarle su respectivo tapon.

Todos los matraces fueron inoculados con 1 ml de cultivo de monoaxenico de T. suecica en estadio de crecimiento exponencial.

La densidad inicial promedio fue de 21.2×10^3 cel/ml. Los matraces permanecieron en el cuarto de cultivo bajo condiciones de iluminación constante proporcionada por tubos de luz fluorecente, blanca fría.

La temperatura del laboratorio se mantuvo aproximadamente constante ($20^{\circ}\text{C} \pm 2$) por medio de aire acondicionado.

REGISTRO DEL CRECIMIENTO DE MICROALGAS

Despues de inocular los matraces de cultivo, se llevó a cabo el registro del crecimiento para identificar las diferentes fases que presenta un cultivo en el proceso de crecimiento. Diariamente a las 13:00 horas se extrajeron muestras de 1 ml. de cada uno de los 10 matraces (original y réplica de cultivo), utilizando pipetas esterilizadas y cerca de la flama de dos mecheros de gas tipo Bunsen para evitar la contaminación de los medios. El método para estimar la densidad de las microalgas consistió en contar

directamente al microscopio compuesto, con un hematocitómetro tipo Neubauer de 0.1 mm de profundidad, el cual es recomendado para el conteo de algas pequeñas (2 a 30) y para cultivos que lleguen a densidades de 5×10^4 a 10^6 -- cel/ml

Las muestras se fijaron con una gota de lugol para fito---plancton marino versión ácida, a fin de inmovilizarlos y -lograr un mejor conteo.

La secuencia para contar las células es la siguiente:

- 1.- El cultivo se agita para que las células tengan una - distribución uniforme.:
- 2.- Una vez uniformada la muestra se succiona de la parte media del tubo de ensaye con una pipeta Pasteur.
- 3.- Las camaras del hematocitómetro con su portaobjetos en cima, se llenan con la pipeta Pasteur haciendo un angulo de 45° con respecto al plano horizontal.
- 4.- Luego se coloca el hematocitómetro en la placa de barrido del microscopio.
- 5.- El registro se hizo observando al microscopio y contando las células del cuadro central (25 divisiones).
- 6.- Para cada muestra (original y réplica) se efectuó la - lectura de 5 camaras determinando posteriormente su promedio. Los valores obtenidos fueron registrados para calculos posteriores de la densidad de las microalgas y parametros poblacionales. -
- Cálculos de densidad.

Cuando se utiliza un hematocitómetro de 0.1 mm. de profundidad, la densidad se calcula de acuerdo a la siguiente relación:

$$D = M \times C \times 10 \times 1000 \text{ cel/ml.}$$

donde:

D= Densidad del cultivo

M= Mililitros de muestra utilizados

10= Factor de multiplicación debido a la profundidad del hematocitómetro.

1000= Valor para convertir a mililitros.

RESULTADOS.

La Tabla I, corresponde a los valores promedio entre original y réplica de las lecturas observadas en el hematómetro para el cálculo de la densidad en cada tratamiento.

La tabla II, corresponde a la concentración de 75 mg/L de NaNO_3 (control) la cual muestra la máxima densidad al octavo día, el valor máximo para K y MU se presentó al segundo día, la PD máxima fué al quinto día y el valor mínimo para TG se presentó el segundo día.

La tabla III, corresponde a la concentración de 67.5mg/L de NH_4NO_3 , la cual muestra la máxima densidad al octavo día, el valor máximo para K y MU se presentó al segundo día la PD máxima fué al quinto día y el valor mínimo para TG -- se presentó al segundo día.

La tabla IV, corresponde a la concentración de ----- 60.0 mg/L de NH_4NO_3 la cual muestra la máxima densidad al sexto día, el valor máximo para K y MU se presentó al segundo día, la PD máxima fué al cuarto día y el valor mínimo para TG se presentó al segundo día.

La tabla V, corresponde a la concentración de 52.5mg/L de NH_4NO_3 la cual muestra la máxima densidad al séptimo día el valor máximo para K y MU se presentó al cuarto día, la PD máxima fué al sexto día y el valor mínimo para TG se presentó al segundo día.

La tabla VI, corresponde a la concentración de 45.0 - mg/L de NH_4NO_3 la cual muestra la máxima densidad al séptimo día, el valor máximo para K y MU se presentó al segundo día, la PD máxima fué al quinto día y el valor mínimo para TG se presentó al segundo día.

TABLA I.- Valores promedio de las lecturas en el hematocítómetro para cada tratamiento.

Dia	control (75 mg/L)	Concentración de NH_4NO_3			
		67.5 mg/L	60 mg/L	52.5 mg/L	45.0mg/L
0	21.200	21.200	21.200	21.200	21.200
1	25.500	33.300	20.800	65.800	20.500
2	239.900	239.100	184.100	229.900	186.600
3	419.900	559.900	438.300	447.500	466.600
4	780.000	767.500	1100.000	960.800	765.800
5	1609.100	1491.600	1700.800	1491.600	1604.100
6	2020.000	1985.000	2353.400	2221.600	1961.600
7	1896.600	2357.400	2152.400	2647.000	2069.100
8	2307.500	2710.799	1960.000	2035.800	1830.800

TABLA II.-Valores poblacionales de T. suecica a nivel Erlenmeyer en el medio de cultivo con 75 mg/L (control) tomando los valores promedios entre original y - réplica.

Dia	DENx1000 (cel/ml)	K (div/dia)	MU (cel/ml/dia)	PD x 100 (cel/dia)	TG (Día)
0	21.200				
1	25.500	0.2664	0.0802	4.3000	1.1298
2	239.900	3.2339	0.9735	214.4000	0.0931
3	419.900	0.8076	0.2431	180.0000	0.3727
4	780.000	0.8934	0.2689	360.1000	0.3369
5	1609.100	1.0447	0.3145	829.0996	0.2881
6	2020.000	0.3281	0.0988	410.9004	0.9175
7	1896.600	-0.0909	-0.0274	-123.4004	-3.3101
8	2307.500	0.2829	0.0852	410.9004	1.0640

TABLA III.- Valores poblacionales de T. suecica a nivel --
Erlenmeyer en el medio de cultivo con 67.5 mg/L
de NH_4NO_3 tomando los valores promedio entre --
original y réplica.

Día	DEN x 1000 (cel/ml)	K (div/día)	MU (cel/ml/día)	PDx1000 (cel/día)	TG (Día)
0	21.200				
1	33.300	0.6515	0.1961	12.1000	0.4621
2	239.100	2.8441	0.8561	205.8000	0.1058
3	559.900	1.2276	0.3695	320.7999	0.2452
4	767.500	0.4550	0.1370	207.6001	0.6616
5	1491.600	0.9586	0.2886	724.0996	0.3140
6	1985.000	0.4123	0.1241	493.4004	0.7321
7	2357.400	0.2481	0.0747	372.3999	1.2135
8	2710.799	0.2015	0.0607	353.3994	1.4938

TABLA IV.- Valores poblacionales de T. suecica a nivel --
Erlenmeyer en el medio de cultivo con 60.0 /L
de NH_4NO_3 . Tomando los valores promedio entre --
original y réplica.

Día	DENx1000 (cel/ml)	K (div/día)	MU (cel/ml/día)	PDx1000 (cel/día)	TG (día)
0	21.200				
1	20.800	-0.0275	-0.0083	-0.4000	-10.9540
2	184.100	3.1459	0.9470	163.3000	0.0957
3	438.300	1.2515	0.3767	254.2000	0.2405
4	1100.000	1.3275	0.3996	661.7001	0.2268
5	1700.800	0.6287	0.1893	600.7998	0.4788
6	2353.400	0.4685	0.1410	652.6001	0.6425
7	2152.400	-0.1288	-0.0388	-201.0000	-2.3371
8	1960.000	-0.1351	-0.0407	-192.3999	-2.2283

TABLA V.- Valores poblacionales de T. suecica a nivel --
Erlenmeyer en el medio de cultivo con 52.5 mg/L -
de NH_4NO_3 , tomando los valores promedio entre ori-
ginal y réplica.

Día	DENx1000 (cel/,l)	K (div/día)	MU (cel/ml/día)	PDx1000 (cel/día)	TG (día)
0	21.200				
1	65.800	1.6341	0.4919	44.6000	0.1842
2	229.900	1.8049	0.5433	164.1000	0.1618
3	447.500	0.9609	0.2893	217.6000	0.3133
4	960.800	1.1024	0.3318	513.2998	0.2731
5	1491.600	0.6346	0.1910	530.7998	0.4744
6	2221.600	0.6005	0.1808	770.0000	0.5013
7	2647.000	0.2270	0.0683	385.3999	1.3260
8	2035.800	-0.3788	-0.1140	-611.1997	-0.7948

TABLA VI.- Valores poblacionales de T. suecica a nivel --
Erlenmeyer en el medio de cultivo con 45.0 mg/L
de NH_4NO_3 , tomando los valores promedio entre ori-
ginal y réplica.

Día	DENx1000 (cel/ml)	K (div/día)	MU (cel/ml/día)	PDx1000 (cel/día)	TG (Día)
0	21.200				
1	20.500	-0.0484	-0.0146	-0.7000	-6.2143
2	186.600	3.1863	0.9592	166.1000	0.0945
3	465.600	1.3223	0.3980	279.9999	0.2277
4	765.800	0.7148	0.2152	299.1999	0.4211
5	1604.100	1.0667	0.3211	838.2998	0.2822
6	1961.600	0.2903	0.0874	357.5000	1.0371
7	2069.100	0.0770	0.0232	107.5000	3.9108
8	1830.800	-0.1765	-0.0531	-238.2998	-1.7052

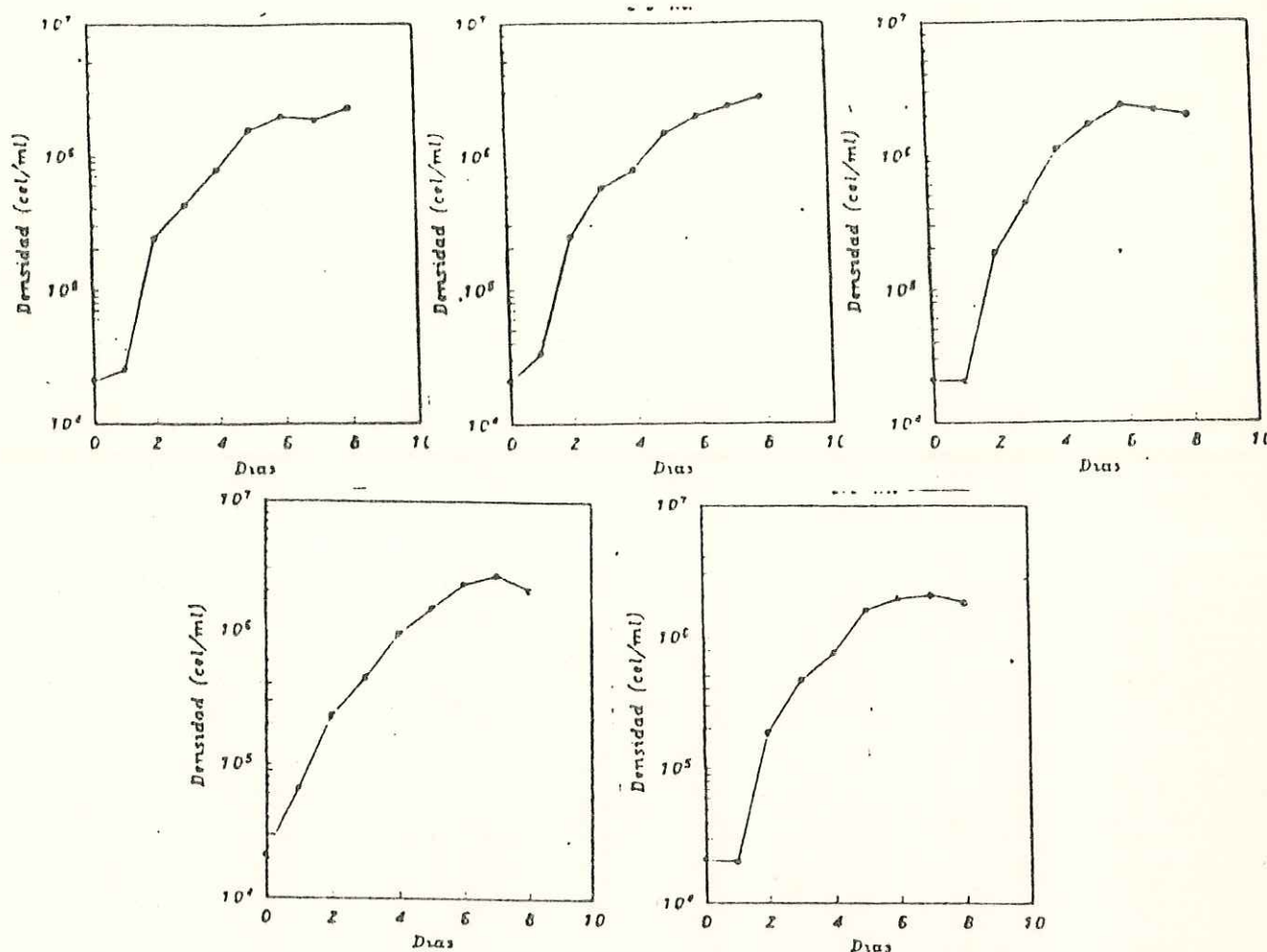


Figura 1

Curvas de crecimiento para la microalga *Tetraselmis suecica* correspondientes a las diferentes concentraciones de NH_4NO_3 75 mg/L (control), 67.5 mg/L, 60.0 mg/L, 52.5 mg/L y 45.0 mg/L respectivamente.

DISCUSION

Mediante el análisis de los datos mostrados en las tablas II, III, IV, V, VI; que corresponden a los parametros poblacionales de cada uno de los diferentes tratamientos del cultivo de T. suecica se demuestra que el número máximo de divisiones por día (K) y la tasa de crecimiento específico (MU) guardan una relacion directamente proporcional.

Estas mismas tablas así como la figura I, muestran que la fase exponencial del cultivo se presentó al segundo día, que corresponde a la adaptación de T. suecica al medio, esto es la microalga aprovecha en su totalidad los nutrientes del medio, comenzando a multiplicarse en progresion geometrica.

La relación entre los parametros anteriores (K y MU) y el tiempo medio de generacion (TG) es inversamente proporcional pues cuando el cultivo presenta un número máximo de divisiones por día su crecimiento específico tambien es máximo, pero el tiempo de generación de células es mínimo.

Los valores de los parametros poblacionales son de suma importancia para conocer y comprender el comportamiento de un cultivo de microalgas y compararlo con las fases presentadas por un cultivo ideal (Foog, 1975), utilizando el medio modificado de Guillard (1973) y Matthiessen y Torner (1966) entre el cultivo y las diferentes concentraciones de NH_4NO_3 . No se presentaron diferencias significativas al nivel de confianza de 5% en el crecimiento esto es debido posiblemente

te al pool interno de nutrientes el cual permite (al menos en las primeras generaciones) que las células sigan creciendo aun cuando la concentracion externa de sal nutritiva llegue a un punto crítico Q. Dortch et al 1984

CONCLUSION:

El efecto de variar las concentraciones de nitrato de amonio para el cultivo de T. suecica no alteró el crecimiento poblacional de una primera generación.

Si sobreponemos las gráficas de crecimiento estas tienden a formar una misma curva.

RECOMENDACIONES:

Aunque en el análisis de los datos obtenidos en este experimento, se demuestra que no existen diferencias significativas, esto es que si suministramos la misma concentración de nutrientes, obtenemos los mismos resultados; se sugiere para próximos cultivos no trabajar con las mínimas -- concentraciones ni omitir los nutrientes establecidos, pues se puede dar el caso del agotamiento de las reservas internas, y repercutir esto directamente, en la calidad de nuestro cultivo.

LITERATURA CITADA

- Aguirre Muñoz, Alfonso, 1981. Estudios con un cultivo semi continuo de Tetraselmis suecica Kylin (1935): nutrientes, vitaminas, desinfección del medio con uv y producción del sistema a largo plazo. Tesis de Licenciatura, Escuela Superior de Ciencias Marinas de la U.A.B.C. Ensenada, B.Cfa., Mexico. pp 66.
- Caperon, J. y J. Mayer, 1972, Nitrogen-limited growth of - Marine phytoplankton II. Uptake kinetic and their role in nutriente limited growth. Deep-Sea-Res. 19: 619-632
- Davis, H.C. and Guillard, R.R., 1958. Relative value of ten genera of microorganisms as foods for oysters and clam larvae. U.S. Fish Wild. Ser., Fish. Bull, 136 (58): - 293-304.
- Dugdale R.C. 1976. Nutrient cycles 141-172 in: Cushing, -- D.H. and Walsh J.J. (eds) The Ecology of the Sea, W.B. Sanders Co.
- Droop, M.R. 1975 The chemostat in mariculture. In: 10th - European Sump. Mar. Biol. Detend, Belgium, 1:17-23.
- Foog, Q.E., 1965. Algal cultures and phytoplankton ecology 2nd. edition. The University of Wisconsin Press., -- 175 pp

- Granados C. Machuca y L.F. Buckle-Ramírez 1984. Cultivo de las microalgas *Monochrysis lutheri* y *Skeletonema costatum* con nutrientes producidos por estiercoles digeridos An Inst. Ciens. del Mar y limnol. Univ. Auton. México, 11 (1) 241-256.
- Guillard, R.R.L. 1973. Division rates. In: J.R. Stein (ed) Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements. London, Cambridge Univ. Press. - pp. 289-311.
- Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: W.L. Smith and M.H. Chanley (eds), Culture of Marine Invertebrate animals. Plenum Press. U.S.A. pp 29-60
- Guillard, R.R.L. and Ryther, J.H. 1962. Studies on marine planktonic diatoms. I *Cyclotella nana* Husted and *Datula confervaceae* (clavé). Can. J. Microbiol 8:229-239.
- Imei, T. 1967. Mass production of molluscs by means of --- rearing the larvae in tanks. Venus. 25: 159-167.
- Laing, I. and M.M. Helm 1981. Factors affecting the semicontinuous production of *Tetraselmis suecica* (Kyllin Butch. in 200 1 vessels. Aquaculture. 22:137-148
- Lozano Cabo F. Oceanografía Biológica, Marina y Pesca 44-56 Ed. Paraninfo Madrid, España 1978

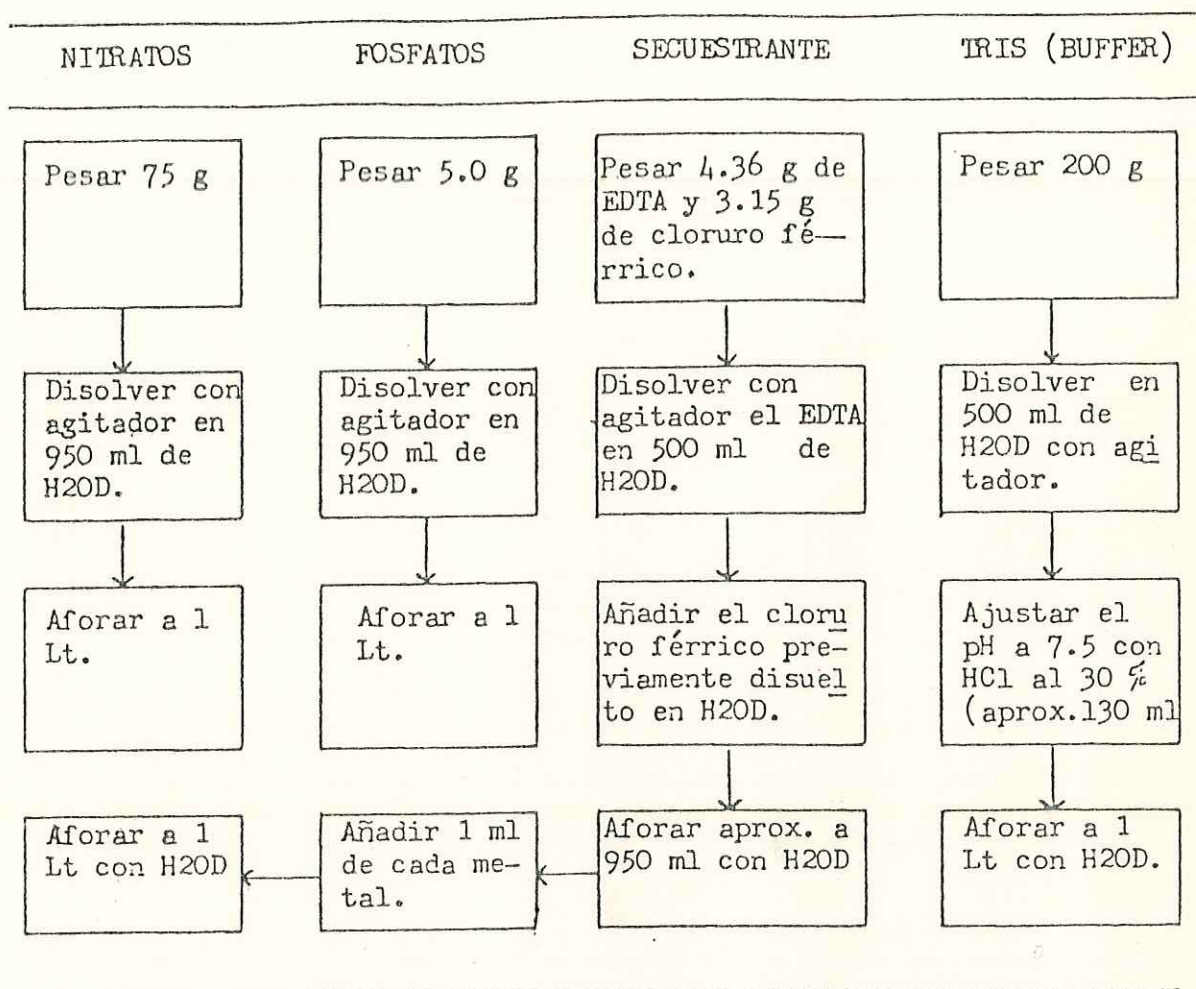
- Maddux, W.S. and R.F. Jones 1964. Some interaction of temperature, light intensity and nutrient concentration -- during the continuous culture of Nitzschia closterium and Tetraselmis sp. Limnol Oceanogr. 9:79-86.
- Matthiessen, G.C. and Torner, R.C. 1966. Possible methods of improving the shellfish industry of Martha S. Vineyard, Duke S. country, Massachusetts. Marine Research Foundation, Edgartown, Mass 138 pp.
- Miguel, P. 1982. De la culture artificielle des diatomees La diatomiste. 1-18 pp.
- Provasoli, L.J., J.J. Molaughlin y M.R. Droop 1957. The development of artificial media for marine algae. Arch -- Microbiol. 25: 392-428
- Q. Dortch, J.R. Clayton. Jr. S.S. Thoresen and S.I. Ahmed 1984. Species differences in accumulation fo nitrogen pools in phytoplankton. School of Oceanography, University of Washington: Seattle, Washington USA
- Ukeles, R. 1976. Cultivation of unicellular plants. p. 375-465 en: Marine Ecology, Vol. III (D. Kinne; ed.) Wile Interscience, London 577 pp
- Wheeler P.A. 1983. Phytoplankton Nitrogen Metabolism. School of Oceanography, Oregon State University, Corvallis, - Oregon.

APENDICE I.- Medios de cultivo mas usados. (Cantidades para un litro de agua de mar filtrada).

	GUILLARD	MATTHIESSEN Y TORNER
Nutrientes mayores	75 mg	150.0 mg
NaNO ₃	5 mg	10.0 mg
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	15-30 mg	30.0 mg
Metales traza		
Na ₂ . EDTA	4.36 mg	Fe. EDTA 10.0 mg
FeCl ₃ . 6H ₂ O	3.15 mg	- - -
Cu SO ₄ .5H ₂ O	0.01 mg	1.96 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.022 mg	4.4 mg
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.01 mg	2.0 mg
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.18 mg	36.9 mg
Na ₂ MoO ₄ .4H ₂ O	0.006 mg	1.26 mg
Vitaminas		
B1	0.10 mg	200 μ g
Biotina	0.50 g	1.0 μ g
B12	0.50 g	1.0 μ g

APENDICE II.- Rutina seguida en la preparación de los macronutrientes para los medios de cultivo.

Preparación de Nutrientes.



APENDICE III.- Diseño del medio modificado f/2 de Guillard
(1973) y Matthiessen (1966) utilizado como
medio basico.

(cantidades para un litro de agua de mar --
filtrada).

INGREDIENTES:

CANTIDADES:

Nutrientes mayores:

NaNO_3	75 mg
$\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{a}$	5 mg

Metales traza

Fe. EDTA	10.0 mg
$\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.96 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.4 mg
$\text{Co Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.0 mg
$\text{Mn Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	36.9 mg
$\text{Na}_2\text{M}_2\text{O}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.26 mg

Vitaminas

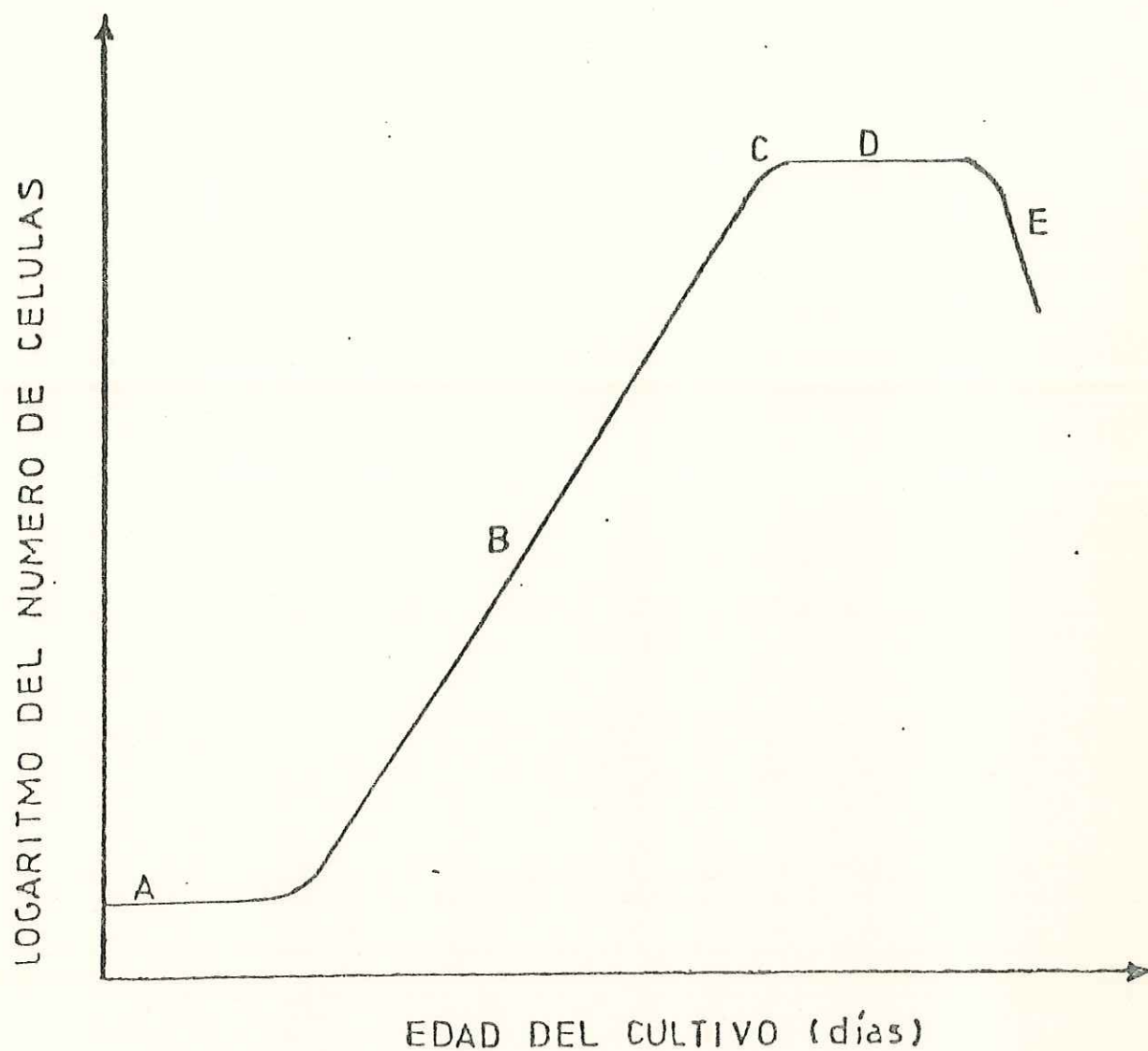
B1	200 μg
Biotina	1.0 μg
B ₁₂	1.0 μg

APENDICE IV.- Rutina a seguir en la preparaci3n stock primaria de vitaminas para los medios de cultivo.

Concentrado (solucion stock primaria).

B ₁₂	BIOTINA	TIAMINA
Pesar 10 mg con balanza analitica. Disolver en 50 ml de H₂O. Aforar a 100 ml.	Pesar 10 mg con balanza analitica. Disolver en 50 ml de H₂O. Aforar a 100 ml.	Pesar 2 g con balanza analitica. Disolver en 50 ml de H₂O. Aforar a 100 ml.

Ajustar el pH a 5.0 con HCl al 10% y esterilizar por 5 minutos a 15 libras de presi3n por pulgada cuadrada. Se guarda en recipientes peque1os y se congela.



APENDICE V.- Curva de crecimiento ideal de microalgas en medios de volúmen limitado. A. fase de inducción; B. fase de crecimiento exponencial; -- C. fase de declinamiento relativo del crecimiento; D. fase estacionaria y E. fase de --- muerte (Tomado de Fogg, 1975).

APENDICE VI.-CALCULOS DE DENSIDAD.

Con un Hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad, la densidad de microalgas se calcula de acuerdo a la siguiente relación:

$$D = (F + F.D. + M) \times C \times 10 \times 1000 \text{ cels/ml} \quad (1)$$

Donde:

D= densidad del cultivo.

F= fijador (mls)

F.D.= factor de dilución (mls)

$$F.D. = \frac{V_f}{v_i}$$

Vf= Volumen final de la muestra diluida (mls)

vi= volumen inicial de la muestra (mls)

M= Mililitros de muestra utilizados

C= Número de células promedio contadas

10= factor de multiplicación debido a la profundidad del Hematocitómetro

1000= valor para convertir a milímetros

Con el fijador Utermohl o lugol no es necesario hacer correcciones para incrementos de volumen, así que F no se utiliza. Si el Hematocitómetro es de 0.2 mm de profundidad la densidad se calcula de la siguiente forma:

$$D = (F.D. + M) \times C \times 1000 \text{ cels / ml}$$

En este caso, C es el número de células de la cuantificación de los 5 cuadros de cada cámara. Si se cuentan varias cámaras se debe calcular un promedio del número de -- cámaras contadas.

APENDICE VII.- CALCULO DE PARAMETROS POBLACIONALES

Los principales parametros del crecimiento de un cultivo de células se calculan como a continuación.

1.- Las divisiones por día (K) se calculan de acuerdo a Guillard (1973):

$$k = (3.322/T2-T1) * (\log N2/N1)$$

Donde:

3.22= Factor de conversión del logaritmo base 2 a base 10 ($3.322 = \log_2 10$)

N1= Concentración celular al tiempo T1

N2= Concentración celular al tiempo T2

2.- La tasa de crecimiento específico (μ) estimada como lo recomienda E.P.A. (1971) para ensayos con microalgas:

$$\mu = \frac{\log (N2/N1)}{T2 - T1} \text{ día}^{-1}$$

3.- El tiempo medio de generación (Tg) se determina como lo recomienda Eppley y Strickland (1968):

$$Tg = \frac{\log 2 (T2-T1)}{\log N2 - \log N1} = \frac{\log 2}{k}$$

4.- La producción diaria de microalgas se valora según De la Cruz y Alfonso, 1975:

$$P.D. = \frac{N2 - N1}{T2 - T1}$$