

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA



## FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

### Crecimiento y consumo de macronutrientes por *Chlorella kessleri* en dos medios de cultivo

#### Tesis

Que para obtener el título de Licenciado en Biotecnología en  
Acuacultura

#### Presenta

Vincent Montes Orozco

Ensenada, B.C.

Agosto del 2012

# Crecimiento y consumo de macronutrientes por *Chlorella kessleri* en dos medios de cultivo

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN  
BIOTECNOLOGÍA EN ACUACULTURA

PRESENTA

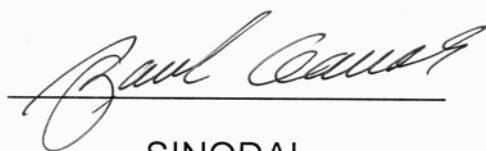
VINCENT MONTES OROZCO

APROBADA POR

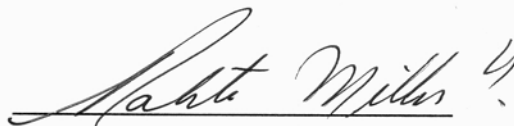


DIRECTOR DE TESIS

DR. ENRIQUE VALENZUELA ESPINOZA



SINODAL



SINODAL

DR. ZAUL GARCÍA EZQUIVEL DR. ROBERTO MILLÁN NÚÑEZ

## RESUMEN

*Chorella kessleri* es una microalga dulceacuícola, comúnmente usada como alimento de diversas especies de zooplancton, las cuales a vez, son un excelente alimento para larvas y juveniles de peces y crustáceos. En este estudio se evaluó el crecimiento y el consumo de nitrato y fosfato por *C. kessleri* en cultivos estáticos de 18 L con medio f/2 y Matthiessen y Torner. Las condiciones de cultivo experimental fueron de  $19 \pm 1^\circ\text{C}$ , 2 UPS, un flujo de aire de  $5 \text{ L min}^{-1}$ , adición puntual de  $\text{CO}_2$  en la mañana y en la tarde a razón de  $5 \text{ L min}^{-1}$  por 1:15 minutos e irradiación con cuatro lámparas fluorescentes de 75 W, las cuales suministraron  $300 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Muestras diarias de los cultivos fueron tomadas para conocer la densidad celular, así como el nitrato y fosfato residual durante 8 días. El crecimiento promedio de *C. kessleri* resultó similar y no significativo ( $t = 0.0823$ ;  $P = 0.9352$ ), en ambos medios de cultivo, con valores máximos en la tasa de crecimiento de  $1.02 \pm 0.130$  y  $0.84 \pm 0.010$  en el segundo día respectivamente. Durante el crecimiento exponencial, el nitrato residual en el medio fue inversamente proporcional a la densidad celular de *C. kessleri* y arriba del 95 % de nitrato fue removido del medio durante los primeros seis días en el medio f/2, mientras que en el medio Matthiessen y Torner fue el 40%. La cuota celular de nitrógeno de *C. kessleri* durante los primeros seis días varió de 17.74 a 6.39 y de 32 a 3.8  $\text{fmol célula}^{-1} \text{ día}^{-1}$  en el medio f/2, y Matthiessen y Torner respectivamente. La máxima remoción de fosfato en el medio f/2 y Matthiessen y Torner se presentó en el tercer (96.2%) y quinto (96.5%) día de cultivo respectivamente. Estos resultados coinciden con máximos en la tasa de crecimiento y cuota celular de *C. kessleri*. Se concluye que *C. kessleri* no mostró cambios importantes en la biomasa final en distintas concentraciones de nutrientes y puede ser usada en el sexto día de su cultivo, ya sea como inóculo para volúmenes mayores o como alimento para organismos acuáticos en acuicultura.

Palabras clave: *Chlorella kessleri*, crecimiento, consumo de macronutrientes.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por todas las bendiciones que me ha dado.

A mi madre Rosa María Orozco Flores, por ser la mejor mamá del mundo, por todos los años de sacrificios, preocupaciones, llantos .....en fin, por cuidarme y hacerme un hombre de bien.

A mi padre Vicente Montes Torres.

A mis hermanas Danely Vianey Gonzales Orozco y Rosa Evelin Montes Orozco, por enseñarme a ser responsable y por todos los momentos felices que he pasado junto a ustedes.

A mis tíos Norberto Mayoral López y Herlinda Alicia Orozco Flores, por abrirme las puertas de su casa y por tratarme como a un hijo más durante la realización de mis estudios universitarios.

A la UABC, por aceptarme y formarme.

A todos los profesores que tuve en la carrera.

Al Dr. Enrique Valenzuela Espinoza, por creer en mi, por enseñarme lecciones tanto profesionales, como de vida. Por todas esas pláticas motivacionales y recomendaciones.

Al IIO, por permitirme hacer mi proyecto de tesis en sus instalaciones.

A Dulce Guadalupe Guillen Matus y Edgardo López Rodelo, por su valiosa contribución en el desarrollo de este proyecto.

A mis primos Martha Alicia Mayoral Orozco y Fernando Pérez León, por su apoyo incondicional en estos años y por ser mis padrinos de beca.

A mis sobrinitos Denzel, Camila, Génesis y Mauro, por ser mi fuente de inspiración.

A toda mi familia.

A mis compañeros de carrera, por todos esos momentos que pasamos juntos, y por todos los favores que me hicieron.

A mis amigos Alejandro y Dani, por apoyarme y estar conmigo en las buenas, en las malas y en las peores.

A los profesores del CetMar # 26, por despertar ese gusto en mi por la Acuacultura, por todas las lecciones tanto escolares como de vida que me dieron.

A mis compañeros del CetMar # 26 Gustavo, Jonathan, José Alberto, Dante y Erick, por apoyarme en los momentos de mayor necesidad y por abrirme las puertas de su familia.

Al CetMar # 26, por enseñarme a ser un acuacultor.

A doña Isabel, por esas platicas amenas por la tarde y por llenar esta pequeña barriguita en los periodos de pobreza.

A todas las personas me han apoyado y han contribuido a que termine mis estudios profesionales con exito. Muchas Gracias!!!

## **DEDICATORIA**

**Sabes que este trabajo solo te lo puedo dedicar a ti, mi abuela querida:**

**MARÍA DE JESUS FLORES BERNAL**

**Espero que estés observando como cumplo mi promesa de llevarte un titulo,  
donde quiera que te encuentres. Espero que te sientas orgullosa de mí.**

**Te amo y siempre te llevaré en mi corazón.**

| <b>CONTENIDO</b>                      | <b>Pág.</b> |
|---------------------------------------|-------------|
| <b>1.- INTRODUCCIÓN</b>               | <b>1</b>    |
| 1.1.- Hipótesis                       | 3           |
| 1.2.- Objetivo general                | 3           |
| 1.21.- Objetivo particulares          | 3           |
| <b>2.- MATERIALES Y MÉTODOS</b>       | <b>4</b>    |
| 2.1.- Cultivo microalgal              | 4           |
| 2.2.- Análisis de nitratos y fosfatos | 7           |
| 2.3.- Análisis estadístico            | 7           |
| <b>3.- RESULTADOS</b>                 | <b>8</b>    |
| 3.1.- Cultivo microalgal              | 8           |
| 3.12.- Nivel Erlenmeyer               | 8           |
| 3.13.- Nivel Fernbach                 | 11          |
| 3.14.- Nivel garrafón                 | 14          |
| 3.2.- Consumo de nutrientes           | 18          |
| 3.21.- Nitratos                       | 18          |
| 3.22.- Fosfatos                       | 20          |
| <b>4.- DISCUSIÓN</b>                  | <b>23</b>   |
| 4.1.- Cultivo microalgal              | 23          |
| 4.2.- Consumo de nitrato              | 25          |
| 4.2.- Consumo de fosfato              | 27          |
| <b>5.- CONCLUSIONES</b>               | <b>28</b>   |
| <b>6.- REFERENCIAS</b>                | <b>29</b>   |

---

## LISTA DE FIGURAS

---

|                                                                                                                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Densidad celular promedio de <i>C. kessleri</i> cultivada en medio f/2 y Matthiessen y Torner en matraz Erlenmeyer de 150 mL. La barra vertical indica el error estándar (n=3).....    | 9  |
| Figura 2. Tasa de crecimiento promedio de <i>C. kessleri</i> cultivada en medio f/2 y Matthiessen y Torner en matraz Erlenmeyer de 150 mL. La barra vertical indica el error estándar (n=3)..... | 9  |
| Figura 3. Densidad celular promedio de <i>C. kessleri</i> cultivada en medio f/2 y Matthiessen y Torner en matraz Fernbach de 2 L. La barra vertical indica el error estándar (n=3).....         | 12 |
| Figura 4. Tasa de crecimiento promedio de <i>C. kessleri</i> cultivada en medio f/2 y Matthiessen y Torner en matraz Fernbach de 2 L. La barra vertical indica el error estándar (n=3).....      | 12 |
| Figura 5. Variación de pH en cultivos de <i>C. kessleri</i> con medio f/2 y Matthiessen y Torner en garrafón de 18 L. La barra vertical indica el error estándar (n=3).....                      | 14 |
| Figura 6. Densidad celular promedio de <i>C. kessleri</i> cultivada en medio f/2 y Matthiessen y Torner en garrafón de 18 L. La barra vertical indica el error estándar (n=3).....               | 16 |
| Figura 7. Tasa de crecimiento promedio de <i>C. kessleri</i> cultivada en medio f/2 y Matthiessen y Torner en garrafón de 18 L. La barra vertical indica el error estándar (n=3).....            | 16 |



Figura 8. Concentración promedio residual de nitrato en cultivo estático de *C. kessleri* en volumen de 18 L con el medio f/2 y Matthiessen y Torner. La barra vertical indica el error estándar (n=3).....22

Figura 9. Concentración promedio residual de fosfato en cultivo estático de *C. kessleri* en volumen de 18 L con el medio f/2 y Matthiessen y Torner. La barra vertical indica el error estándar (n=3).....22

---

## LISTA DE TABLAS

---

Tabla I. Constituyentes Inorgánicos y Orgánicos del medio f/2 de Guillard y Matthiessen y Torner.....4

Tabla II. Parámetros poblacionales promedio de *Chlorella kessleri* en nivel Erlenmeyer (150 mL) cultivada en: A) Medio f/2 de Guillard (1975) y B) Medio Matthiessen y Torner (1966). Donde T = Tiempo (días), DC = Densidad celular ( $\times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>),  $\mu$  = tasa de crecimiento específica, D = divisiones por día (div día<sup>-1</sup>), TD = tiempo de duplicación (días), PD = producción diaria ( $\times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>) y VP = valor porcentual de la PD (%). El error estándar se muestra como  $\pm$  (n=3).....10

Tabla III. Parámetros poblacionales promedio de *Chlorella kessleri* en nivel Fernbach (2L) cultivada en: A) Medio f/2 de Guillard (1975) y B) Medio Matthiessen y Torner (1966). Donde T = Tiempo (días), DC = Densidad celular ( $\times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>),  $\mu$  = tasa de crecimiento específica, D = divisiones por día (div día<sup>-1</sup>), TD = tiempo de duplicación (días), PD = producción diaria ( $\times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>) y VP = valor porcentual de la PD (%). El error estándar se muestra como  $\pm$  (n=3).....13

Tabla IV. Parámetros poblacionales promedio de *Chlorella kessleri* en nivel Garrafón (18L) cultivada en: A) Medio f/2 de Guillard (1975) y B) Medio Matthiessen y Torner (1966). Donde T = Tiempo (días), DC = Densidad celular ( $\times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>),  $\mu$  = tasa de crecimiento específica, D = divisiones por día (div día<sup>-1</sup>), TD = tiempo de duplicación (días), PD = producción diaria ( $\times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>) y VP = valor porcentual de la PD (%). El error estándar se muestra como  $\pm$  (n=3).....17

Tabla V. Densidad celular promedio y consumo de nitrato por *Chlorella kessleri* en garrafón (18 L) cultivada en: A) Medio f/2 de Guillard (1975) y B) Medio Matthiessen y Torner (1966). Donde T = Tiempo (días), DC = Densidad Celular ( $\times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>), NR = Nitrato residual ( $\mu$ M), V = razón de consumo de nitrato ( $\mu$ M día<sup>-1</sup>), VA = consumo acumulado (%), VC = razón de consumo de nitrato por célula (femtoMolar cél<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>) y Q = Cuota celular (femtoMolar cél<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>). El error estándar se muestra como  $\pm$  (n=3).....19

Tabla VI. Densidad celular promedio y consumo de fosfato por *Chlorella kessleri* en garrafón (18 L) cultivada en: A) Medio f/2 de Guillard (1975) y B) Medio Matthiessen y Torner (1966). Donde T = Tiempo (días), DC = Densidad Celular ( $\times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>), FR = Fosfato residual ( $\mu$ M), V = razón de consumo de fosfato ( $\mu$ M día<sup>-1</sup>), VA = consumo acumulado (%), VC = razón de consumo de fosfato por célula (femtoMolar cél<sup>-1</sup>día<sup>-1</sup>) y Q = Cuota celular (femtoMolar cél<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>). El error estándar se muestra como  $\pm$  (n=3).....21

## 1.- INTRODUCCIÓN

*Chlorella kessleri* es una microalga de agua dulce, perteneciente al phylum Chlorophyta cuyo diámetro promedio varía entre  $2.8 \pm 0.551$  y  $3.2 \pm 0.717$   $\mu\text{m}$ . Este género posee un alto contenido proteico (Romero-López y Hernández-Martínez, 2002), y es comúnmente usada como alimento en la acuicultura para diversas especies de zooplancton, como son *Moina* sp. (Romero-López et al. 2009), *Daphnia* sp. (Yin et al. 2010) y *Brachionus* sp. (Fu et al. 1997; Suantika et al. 2000; Kobayashi et al. 2008). Estos últimos a su vez se utilizan como alimento para diferentes estadios de crecimiento de larvas de peces y crustáceos e incluso *Chlorella* es usada en la alimentación humana (Romero-López y Hernández-Martínez, 2002). Además de su valor nutricional, esta especie de fitoplancton es importante por su gran cantidad de lípidos, especialmente ácido linoleico, lo que la convierte en una candidata ideal en la biotecnología para la producción de Biodiesel (Xiong et al. 2008).

Las microalgas del género *Chlorella* también son usadas en la remoción de nutrientes en sistemas de tratamiento de aguas residuales (Romero-López y Hernández-Martínez, 2002; Lee y Lee, 2001; Cléber-Bertoldi et al. 2006). Además, producen metabolitos que tienen propiedades anti-bacteriales, los cuales se utilizan en el cultivo larval de peces en los sistemas llamados de “agua verde”.

En la actualidad es común el cultivo semi-intensivo de fitoplancton natural en granjas de producción comercial, donde se promueve la productividad primaria y secundaria con la adición de fertilizantes agrícolas. Sin embargo, este modo de cultivo presenta inconvenientes porque se desconocen las especies que crecen en los estanques, así como también la cantidad de estas. A su vez, con la fertilización se promueven organismos indeseados que afectan la inocuidad de los cultivos y que

pueden inclusive acabar con estos (Cortés-Altamirano y Licea-Duran, 1999). Con base a esta problemática, los laboratorios de producción comercial de alevines de peces y de postlarvas de camarones peneideos han optado por el cultivo de microalgas en condiciones de laboratorio, principalmente utilizando el sistema intensivo en el cual se usa agua previamente filtrada y tratada, y se conoce la cantidad de nutrientes que se incorporan al cultivo. Pero en el caso de cultivos de *Chlorella kessleri*, la mayoría de los estudios han usado medios descritos para especies dulceacuícolas y pocos trabajos han utilizado medios nutritivos empleados para especies marinas. Por esta razón, se considera importante conocer el consumo de macronutrientes (nitrato y fosfato) en distintos medios de crecimiento de *C. kessleri*, y los tiempos en los cuales se produce la máxima biomasa y consumo de nutriente. Esto permitirá realizar programas de producción comercial donde esta especie es usada como alimento. Por este motivo, se realizó el presente estudio, con el fin de conocer el tiempo en que se produce la máxima biomasa de *C. kessleri*, al cultivarla con dos medios comerciales: f/2 de Guillard (1975) y Matthiessen y Torner (1966). Así como también, conocer la relación entre la tasa de crecimiento específica y la concentración de nutrientes limitantes (nitratos y fosfatos) en el medio. En este sentido, un cambio en la concentración de nutrientes, podría producir un cambio proporcional en la densidad celular. Esto permitirá conocer si alguno de los dos medios limita o no el óptimo desarrollo de esta especie bajo condiciones de laboratorio.

### **1.1.- Hipótesis**

Se considera que cambios en la concentración de nutrientes en el cultivo de *Chlorella kessleri* modificaran su crecimiento y producción celular al usar distintos medios de cultivo.

### **1.2.- Objetivo general**

Comparar el crecimiento, producción celular y consumo de macronutrientes por *Chlorella kessleri*, al cultivarla en dos medios con distinta concentración de nutrientes.

#### **1.21.- Objetivos particulares**

- Conocer si existen diferencias en la tasa de crecimiento específica y densidad celular de *C. kessleri* al cultivarla con los medios comerciales f/2 de Guillard (1975) y Matthiessen y Torner (1966).
- Determinar el consumo de nitrato y fosfato por *C. kessleri* al cultivarla con dos medios diferentes en un sistema estático.
- Conocer que relación existe entre la tasa de crecimiento específica de *C. kessleri* y el consumo de nitratos y fosfatos por esta especie en dos medios de cultivo diferentes.

## 2.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1.- Cultivo microalgal

La microalga *Chlorella kessleri* fue proporcionada por la colección de cultivos del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California. Esta especie se mantuvo en el laboratorio con el medio f/2 de Guillard (1975), a una temperatura de  $19 \pm 1^\circ\text{C}$ . Los nutrientes usados en los experimentos para el cultivo de *C. kessleri* fueron adicionados a un litro de agua dulce previamente filtrada a  $1 \mu\text{m}$ . La concentración de nutrientes en los medios experimentales se describe en la tabla 1.

Tabla I. Constituyentes Inorgánicos y Orgánicos del medio f/2 de Guillard y Matthiessen y Torner.

| Constituyentes                                      | Medio f/2 Guillard (1975) | Medio Matthiessen y Torner (1966) |
|-----------------------------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| <b>Nutrientes mayores</b>                           | $\text{Mg L}^{-1}$        | $\text{Mg L}^{-1}$                |
| $\text{NaNO}_3$                                     | 75                        | 150                               |
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4$                           | 5                         | 10                                |
| <b>Metales traza</b>                                | $\text{Mg L}^{-1}$        | $\text{Mg L}^{-1}$                |
| $\text{Fe Cl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$          | 3.15                      | 3.15                              |
| $\text{Na}_2\text{EDTA}$                            | 4.36                      | 4.36                              |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$           | 0.01                      | 0.002                             |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$           | 0.022                     | 0.0044                            |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$           | 0.01                      | 0.002                             |
| $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$           | 0.18                      | 0.036                             |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.006                     | 0.0012                            |
| <b>Vitaminas</b>                                    | $\mu\text{g L}^{-1}$      | $\mu\text{g L}^{-1}$              |
| Cianocobalamina                                     | 0.5                       | 1                                 |
| Biotina                                             | 0.5                       | 1                                 |
| Timaina·HCl                                         | 100                       | 200                               |
| Agua filtrada de la llave                           | Aforado a 1L              | Aforado a 1L                      |

El ensayo experimental inició en frascos Erlenmeyer de 250 mL que contenían cada uno 150 mL de medio por triplicado. Este medio se esterilizó en autoclave a 121 °C, 15 libras pulgada<sup>-2</sup> de presión durante 15 minutos. Una vez esterilizados, se enfriaron a temperatura ambiente, para después agregarles asépticamente las vitaminas estériles con micro-pipetas. Cada Erlenmeyer recibió un inóculo de 100 µL de cepa. Durante siete días de cultivo se suministró una irradianza fotosintéticamente activa de 150 µmol quanta m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, proporcionada por lámparas fluorescentes Osram de 75 W. La luz fue medida con un irradiómetro (Biospherical Instruments Inc. Modelo QSL-100, con sensor de 4π). Diariamente se cuantificó por triplicado las células de cada medio experimental en un contador de partículas Multisizer 3.

Después, el cultivo continuó en unidades de evaluación Fernbach para cada medio experimental, los cuales se prepararon por triplicado con 1.85 L de medio de cultivo y se esterilizaron de acuerdo al procedimiento arriba mencionado. Cada Fernbach, recibió 2 mL de vitaminas estériles y un inóculo de 150 mL (obtenido del nivel Erlenmeyer) en condiciones asépticas. Los cultivos en Fernbach, se colocaron en la misma condición de irradianza y temperatura antes descrita. Durante siete días de cultivo, se tomaron muestras por triplicado para su cuantificación en un contador de partículas Multisizer 3. La biomasa obtenida en el nivel Fernbach se usó como inóculo para el nivel garrafón. Antes de la inoculación, el agua que se utilizó fue filtrada hasta una micra y posterior a esto, se trató con hipoclorito de sodio y tiosulfato de sodio, para lo cual se prepararon soluciones primarias de hipoclorito de sodio (416 mL de NaOCl al 6% aforado a 1 L con agua destilada). De esta solución se adicionó 0.25 mL L<sup>-1</sup> al garrafón aforado con agua dulce y se dejó reposar por 24 horas; transcurrido este tiempo, se neutralizó el cloro mediante la adición de 0.1 mL



L<sup>-1</sup> de tiosulfato de sodio (248.1 g aforado a 1 L con agua destilada). Se introdujo aireación por dos horas y al término de este tiempo, se adicionaron los nutrientes a tres unidades de evaluación de cada medio experimental respectivamente. Las condiciones de cultivo en este nivel fueron de  $19 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , 2 UPS, un flujo de aire de  $5 \text{ L min}^{-1}$ , adición puntual de  $\text{CO}_2$  en la mañana y en la tarde a razón de  $5 \text{ L min}^{-1}$  por 1:15 minutos e irradianza con cuatro lámparas fluorescentes de 75 W, las cuales suministraron  $300 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Los cultivos se evaluaron por 9 días, durante los cuales se cuantificó la densidad celular por triplicado de cada medio de cultivo en un contador de partículas Multisizer 3. Además, se llevaron registros de pH antes y después de la adición de  $\text{CO}_2$ . Con los resultados de la densidad celular se calculó la tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ) y el número de divisiones por día (D) mediante las ecuaciones descritas por Guillard (1973), También se calcularon el tiempo de duplicación (TD), la producción diaria (PD) y la variación porcentual de la producción diaria (VP), estos últimos mediante las ecuaciones descritas por De la cruz y Alfonso, (1975). Estos parámetros son una estimación de la eficiencia del crecimiento de *C. kessleri*.

## 2.2.- Análisis de nitratos y fosfatos

Muestras diarias de 10 mL del agua de cultivo fueron tomadas de cada unidad experimental y filtradas a través de filtros GF/F de 25 mm de diámetro y 0.7 µm de paso de partícula, para cuantificar nitrato y fosfato. El agua filtrada fue inmediatamente almacenada a -20 °C para su posterior análisis. Antes de llevar a cabo los análisis, se realizaron curvas de calibración tanto para nitratos como fosfatos utilizando los procedimientos descritos en Parsons *et al.* (1985). El consumo de nitrato y fosfato se determinó mediante la medición diaria del nutriente residual en cada medio de cultivo experimental. El consumo de nitrato se calculó de acuerdo a la expresión descrita en Valenzuela *et al.* (2011).

$$V = C_i - C_f / t$$

Donde V es la razón de consumo diario (µM día<sup>-1</sup>), C<sub>i</sub> y C<sub>f</sub> son la concentración inicial y final de nutriente respectivamente (µM) y t es el periodo de tiempo de consumo (d<sup>-1</sup>).

La cantidad de nutriente requerido por célula o la cuota celular (Q), se calculó de acuerdo a la expresión descrita en Meseck *et al.* (2005).

## 2.3.- Análisis estadístico

Los datos de densidad celular fueron transformados a Logaritmo Base 10. Después, se realizó una prueba t para muestras independientes (α = 0.05) empleando el paquete estadístico SigmaStat 3.5. Estos análisis estadísticos se emplearon para conocer el efecto de distintos medios de cultivo en la variable densidad celular.

### 3.- RESULTADOS

#### 3.1.- Cultivo microalgal

##### 3.12.- Nivel Erlenmeyer

La diferencia en la densidad celular de *C. kessleri* en nivel Erlenmeyer, con los dos medios de cultivo no fue significativa ( $t = -0.0091$ ;  $P = 0.9928$ ). Esta variable inició con  $0.07 \pm 0.009 \times 10^6$  y  $0.07 \pm 0.002 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup> en el medio f/2 de Guillard y Matthiessen y Torner respectivamente (figura 1). Se observó un retraso en el crecimiento (fase Lag) durante los primeros dos días. Después, comenzó la fase exponencial hasta el sexto día. En el séptimo día se distinguió la fase de crecimiento lento, donde se observó la máxima densidad celular, con valores promedio de  $10.99 \pm 0.1212 \times 10^6$  y  $10.81 \pm 0.1920 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup> en f/2 y Matthiessen y Torner respectivamente. Con respecto a la tasa de crecimiento específica, en el primer día, se observó un valor bajo ( $0.34 \pm 0.086$  y  $0.25 \pm 0.024$ ) en los dos medios (figura 2). Después este se incrementó hasta el tercer día con valores máximos de  $1.89 \pm 0.066$  y  $1.83 \pm 0.040$  en el medio f/2 y Matthiessen y Torner respectivamente. Del cuarto al séptimo día de cultivo se distinguió una notable disminución en este parámetro. En cuanto a las divisiones por día presentaron la misma tendencia que la tasa específica de crecimiento. El tiempo de duplicación se comportó de manera inversa a la tasa de crecimiento y a las divisiones por día (Tabla II), presentando su valor mínimo en el día 3 ( $0.4 \pm 0.01$  en los dos medios) y su máximo en el día 7 ( $17.6 \pm 5.61$  y  $14.4 \pm 2.82$ ) en f/2 y Matthiessen y Torner respectivamente. La máxima producción diaria varió en los dos medios, en el medio f/2 se observó en el cuarto día ( $2.87 \pm 0.20 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>), mientras que, en el medio Matthiessen y Torner se observó en el quinto ( $3.05 \pm 0.22 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>).

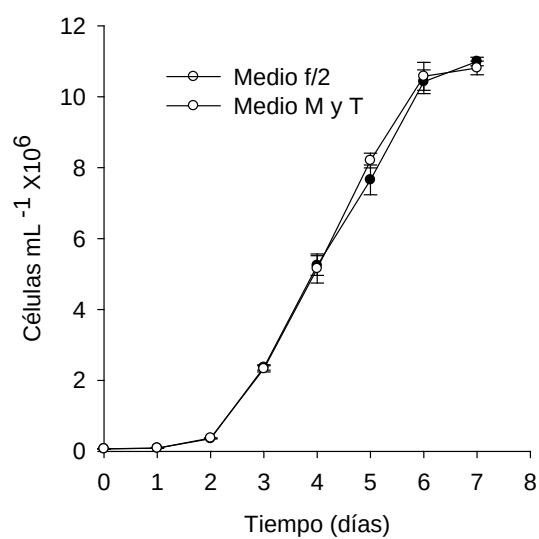


Figura 1. Densidad celular promedio de *C. kessleri* cultivada en medio f/2 y Matthiessen y Torner en matraz Erlenmeyer de 150 mL. La barra vertical indica el error estándar (n=3)

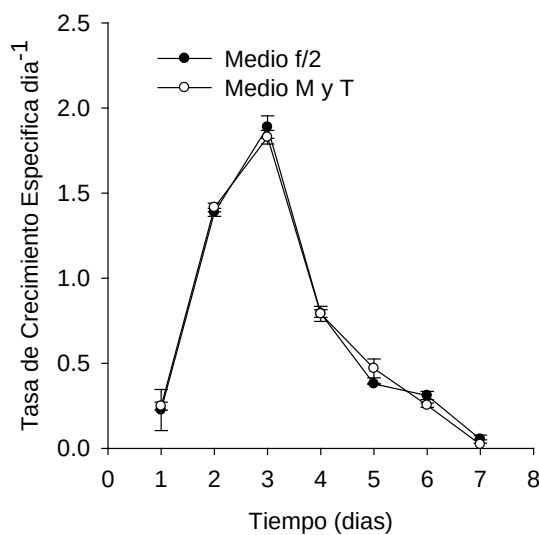


Figura 2. Tasa de crecimiento promedio de *C. kessleri* cultivada en medio f/2 y Matthiessen y Torner en matraz Erlenmeyer de 150 mL. La barra vertical indica el error estándar (n=3)

Tabla II. Parámetros poblacionales promedio de *Chlorella kessleri* en nivel Erlenmeyer (150 mL) cultivada en: A) Medio f/2 de Guillard (1975) y B) Medio Matthiessen y Torner (1966). Donde T = Tiempo (días), DC= Densidad celular ( $\times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>),  $\mu$  = tasa de crecimiento específica, D = divisiones por día (div día<sup>-1</sup>), TD = tiempo de duplicación (días), PD = producción diaria ( $\times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>) y VP = valor porcentual de la PD (%). El error estándar se muestra como  $\pm$  (n=3).

| A) |                   |                  |                |                 |                 |                  |
|----|-------------------|------------------|----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| T  | DC                | $\mu$            | D              | TD              | PD              | VP               |
| 0  | 0.07 $\pm$ 0.009  | -                | -              | -               | -               | -                |
| 1  | 0.08 $\pm$ 0.004  | 0.34 $\pm$ 0.086 | 0.5 $\pm$ 0.12 | 2.2 $\pm$ 0.57  | 0.03 $\pm$ 0.01 | 40.4 $\pm$ 12.1  |
| 2  | 0.36 $\pm$ 0.012  | 1.39 $\pm$ 0.023 | 2.0 $\pm$ 0.03 | 0.5 $\pm$ 0.01  | 0.27 $\pm$ 0.01 | 300.5 $\pm$ 9.4  |
| 3  | 2.37 $\pm$ 0.076  | 1.89 $\pm$ 0.066 | 2.7 $\pm$ 0.10 | 0.4 $\pm$ 0.01  | 2.01 $\pm$ 0.09 | 563.2 $\pm$ 42.5 |
| 4  | 5.24 $\pm$ 0.278  | 0.79 $\pm$ 0.022 | 1.1 $\pm$ 0.03 | 0.9 $\pm$ 0.03  | 2.87 $\pm$ 0.20 | 120.9 $\pm$ 4.9  |
| 5  | 7.66 $\pm$ 0.421  | 0.38 $\pm$ 0.003 | 0.5 $\pm$ 0.00 | 1.8 $\pm$ 0.02  | 2.41 $\pm$ 0.14 | 46.0 $\pm$ 0.5   |
| 6  | 10.42 $\pm$ 0.335 | 0.31 $\pm$ 0.024 | 0.4 $\pm$ 0.03 | 2.3 $\pm$ 0.16  | 2.77 $\pm$ 0.09 | 36.5 $\pm$ 3.3   |
| 7  | 10.99 $\pm$ 0.121 | 0.05 $\pm$ 0.024 | 0.1 $\pm$ 0.03 | 17.6 $\pm$ 5.61 | 0.57 $\pm$ 0.24 | 5.6 $\pm$ 2.5    |
| B) |                   |                  |                |                 |                 |                  |
| T  | DC                | $\mu$            | D              | TD              | PD              | VP               |
| 0  | 0.07 $\pm$ 0.002  | -                | -              | -               | -               | -                |
| 1  | 0.09 $\pm$ 0.003  | 0.25 $\pm$ 0.024 | 0.4 $\pm$ 0.03 | 2.9 $\pm$ 0.30  | 0.02 $\pm$ 0.00 | 28.2 $\pm$ 3.0   |
| 2  | 0.37 $\pm$ 0.003  | 1.41 $\pm$ 0.025 | 2.0 $\pm$ 0.04 | 0.5 $\pm$ 0.01  | 0.28 $\pm$ 0.00 | 312.1 $\pm$ 10.2 |
| 3  | 2.33 $\pm$ 0.087  | 1.83 $\pm$ 0.040 | 2.6 $\pm$ 0.06 | 0.4 $\pm$ 0.01  | 1.95 $\pm$ 0.09 | 523.2 $\pm$ 25.1 |
| 4  | 5.16 $\pm$ 0.410  | 0.80 $\pm$ 0.044 | 1.1 $\pm$ 0.06 | 0.9 $\pm$ 0.05  | 2.83 $\pm$ 0.33 | 120.8 $\pm$ 9.7  |
| 5  | 8.20 $\pm$ 0.209  | 0.46 $\pm$ 0.055 | 0.7 $\pm$ 0.06 | 1.5 $\pm$ 0.18  | 3.05 $\pm$ 0.22 | 60.4 $\pm$ 8.9   |
| 6  | 10.57 $\pm$ 0.393 | 0.25 $\pm$ 0.013 | 0.4 $\pm$ 0.02 | 2.7 $\pm$ 0.14  | 2.37 $\pm$ 0.19 | 28.9 $\pm$ 1.6   |
| 7  | 10.81 $\pm$ 0.192 | 0.05 $\pm$ 0.010 | 0.1 $\pm$ 0.01 | 14.4 $\pm$ 2.82 | 0.53 $\pm$ 0.11 | 5.1 $\pm$ 1.0    |

### 3.13.- Nivel Fernbach

Al igual que en el nivel de cultivo anterior, en Fernbach, no hubo diferencias significativas en la densidad celular promedio entre los tratamientos ( $t = -0.0012$ ;  $P = 0.9990$ ). Esta variable inició con un valor promedio de  $0.91 \pm 0.012 \times 10^6$  y  $0.88 \pm 0.022 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup> en el medio f/2 de Guillard y Matthiessen y Torner respectivamente. En el primer día de cultivo, se observó la fase Lag (figura 3). Después, se distinguieron dos incrementos en la fase exponencial: El primero del segundo al tercer día y el segundo del cuarto hasta el sexto día. En el séptimo día, se observó la fase de crecimiento lento y se registró la máxima densidad celular en ambos medios, con un valor promedio de  $20.99 \pm 0.152 \times 10^6$  y  $21.93 \pm 2.302 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup> en f/2 y Matthiessen y Torner respectivamente.

La tasa de crecimiento específica de *C. kesleri* en nivel Fernbach se presenta en la figura 4. La cual mostró un valor de  $0.11 \pm 0.018$  y  $0.22 \pm 0.031$  en el primer día, esta se incrementó en el segundo día a valores máximos de  $1.69 \pm 0.014$  y  $1.59 \pm 0.025$  en el medio f/2 y Matthiessen y Torner respectivamente. Después, en el tercer día de cultivo se distinguió una disminución abrupta en este parámetro y en el día 4 mostró un pequeño incremento, a partir del cual disminuyó con el tiempo de cultivo.

El valor máximo de divisiones por día y el mínimo de tiempo de duplicación respectivamente, se registraron en el día 2 (tabla III) en los dos medios ( $2.44 \pm 0.02$  y  $0.41 \pm 0.00$  en el medio f/2 y  $2.30 \pm 0.04$  y  $0.44 \pm 0.01$  en Matthiessen y Torner respectivamente). La máxima producción diaria se observó en el día 4 en los dos medios, con valores de  $5.81 \pm 0.37 \times 10^6$  y  $6.30 \pm 0.14 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup> respectivamente.

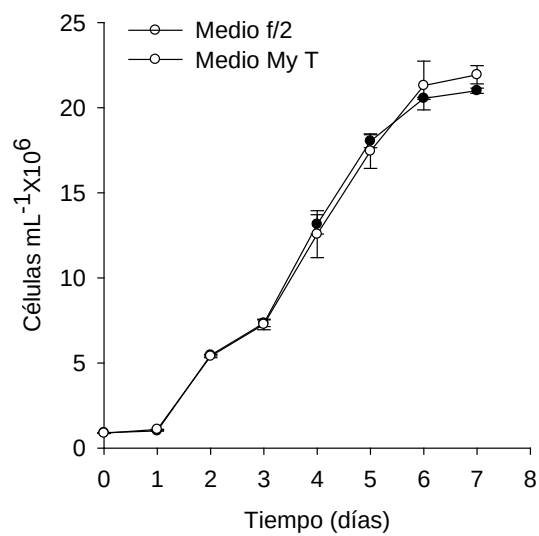


Figura 3. Densidad celular promedio de *C. kessleri* cultivada en medio f/2 y Matthiessen y Torner en matraz Fernbach de 2 L. La barra vertical indica el error estándar (n=3)

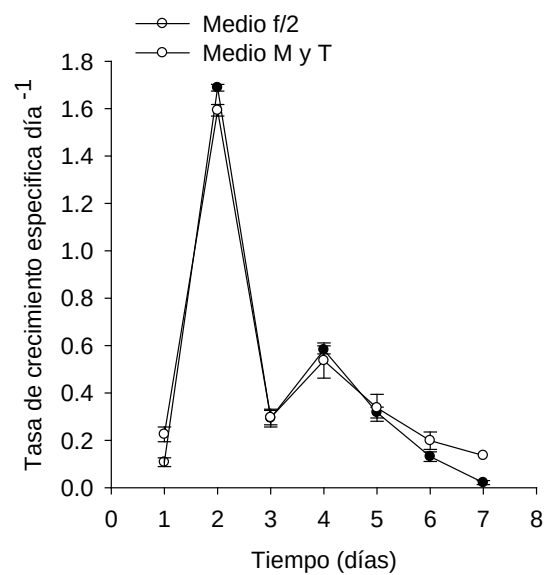


Figura 4. Tasa de crecimiento promedio de *C. kessleri* cultivada en medio f/2 y Matthiessen y Torner en matraz Fernbach de 2 L. La barra vertical indica el error estándar (n=3)

Tabla III. Parámetros poblacionales promedio de *Chlorella kessleri* en nivel Fernbach (2L) cultivada en: A) Medio f/2 de Guillard (1975) y B) Medio Matthiessen y Torner (1966). Donde T = Tiempo (días), DC = Densidad celular ( $\times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>),  $\mu$  = tasa de crecimiento específica, D = divisiones por día (div día<sup>-1</sup>), TD = tiempo de duplicación (días), PD = producción diaria ( $\times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>) y VP = valor porcentual de la PD (%). El error estándar se muestra como  $\pm$  (n=3).

| A) |                   |                  |                 |                   |                 |                  |
|----|-------------------|------------------|-----------------|-------------------|-----------------|------------------|
| T  | DC                | $\mu$            | D               | TD                | PD              | VP               |
| 0  | 0.91 $\pm$ 0.012  | -                | -               | -                 | -               | -                |
| 1  | 1.01 $\pm$ 0.007  | 0.11 $\pm$ 0.018 | 0.16 $\pm$ 0.03 | 6.82 $\pm$ 1.17   | 0.10 $\pm$ 0.02 | 11.4 $\pm$ 2.0   |
| 2  | 5.46 $\pm$ 0.056  | 1.69 $\pm$ 0.014 | 2.44 $\pm$ 0.02 | 0.41 $\pm$ 0.00   | 4.45 $\pm$ 0.06 | 441.2 $\pm$ 7.6  |
| 3  | 7.34 $\pm$ 0.198  | 0.29 $\pm$ 0.037 | 0.42 $\pm$ 0.05 | 2.45 $\pm$ 0.35   | 1.87 $\pm$ 0.25 | 34.4 $\pm$ 4.9   |
| 4  | 13.14 $\pm$ 0.056 | 0.58 $\pm$ 0.017 | 0.84 $\pm$ 0.02 | 1.19 $\pm$ 0.04   | 5.81 $\pm$ 0.37 | 79.01 $\pm$ 3.0  |
| 5  | 18.03 $\pm$ 0.380 | 0.32 $\pm$ 0.023 | 0.46 $\pm$ 0.03 | 2.20 $\pm$ 0.15   | 4.89 $\pm$ 0.19 | 37.4 $\pm$ 3.1   |
| 6  | 20.55 $\pm$ 0.060 | 0.13 $\pm$ 0.020 | 0.19 $\pm$ 0.03 | 5.53 $\pm$ 0.80   | 2.52 $\pm$ 0.36 | 14.0 $\pm$ 2.3   |
| 7  | 20.99 $\pm$ 0.152 | 0.02 $\pm$ 0.008 | 0.03 $\pm$ 0.01 | 41.46 $\pm$ 11.93 | 0.45 $\pm$ 0.18 | 2.2 $\pm$ 0.8    |
| B) |                   |                  |                 |                   |                 |                  |
| T  | DC                | $\mu$            | D               | TD                | PD              | VP               |
| 0  | 0.88 $\pm$ 0.023  | -                | -               | -                 | -               | -                |
| 1  | 1.10 $\pm$ 0.010  | 0.22 $\pm$ 0.031 | 0.33 $\pm$ 0.04 | 3.19 $\pm$ 0.40   | 0.19 $\pm$ 0.00 | 25.4 $\pm$ 4.0   |
| 2  | 5.40 $\pm$ 0.084  | 1.59 $\pm$ 0.025 | 2.30 $\pm$ 0.04 | 0.44 $\pm$ 0.01   | 4.40 $\pm$ 0.03 | 392.2 $\pm$ 12.0 |
| 3  | 7.27 $\pm$ 0.310  | 0.30 $\pm$ 0.031 | 0.43 $\pm$ 0.04 | 2.39 $\pm$ 0.25   | 2.02 $\pm$ 0.13 | 34.6 $\pm$ 4.1   |
| 4  | 12.57 $\pm$ 1.310 | 0.55 $\pm$ 0.074 | 0.77 $\pm$ 0.11 | 1.35 $\pm$ 0.22   | 6.30 $\pm$ 0.14 | 72.0 $\pm$ 12.2  |
| 5  | 17.44 $\pm$ 1.014 | 0.33 $\pm$ 0.057 | 0.49 $\pm$ 0.08 | 2.16 $\pm$ 0.32   | 4.56 $\pm$ 0.08 | 40.6 $\pm$ 8.2   |
| 6  | 21.30 $\pm$ 1.433 | 0.20 $\pm$ 0.037 | 0.29 $\pm$ 0.05 | 3.75 $\pm$ 0.70   | 4.59 $\pm$ 0.91 | 22.1 $\pm$ 4.5   |
| 7  | 21.93 $\pm$ 0.536 | 0.14 $\pm$ 0.000 | 0.20 $\pm$ 0.00 | 5.10 $\pm$ 0.00   | 2.73 $\pm$ 0.00 | 14.6 $\pm$ 0.0   |



### 3.14.- Nivel garrafón

Durante el cultivo de *C. kessleri* en volumen de 18 L, La temperatura ( $19 \pm 1^\circ\text{C}$ ) y salinidad (2UPS) mostraron poca variación en los dos medios de cultivo. Sin embargo, el pH presentó variaciones importantes de  $7.24 \pm 0.04$  a  $9.38 \pm 0.05$  en el medio f/2 y de  $7.26 \pm 0.05$  a  $9.5 \pm 0.02$  en Matthiessen y Torner. Esta variable se incrementó conforme transcurrió el tiempo de cultivo y disminuyó cuando se administró el pulso de  $\text{CO}_2$ . También se observó que los valores de pH registrados por la mañana siempre fueron mayores que aquellos registrados por la tarde (fig. 5).

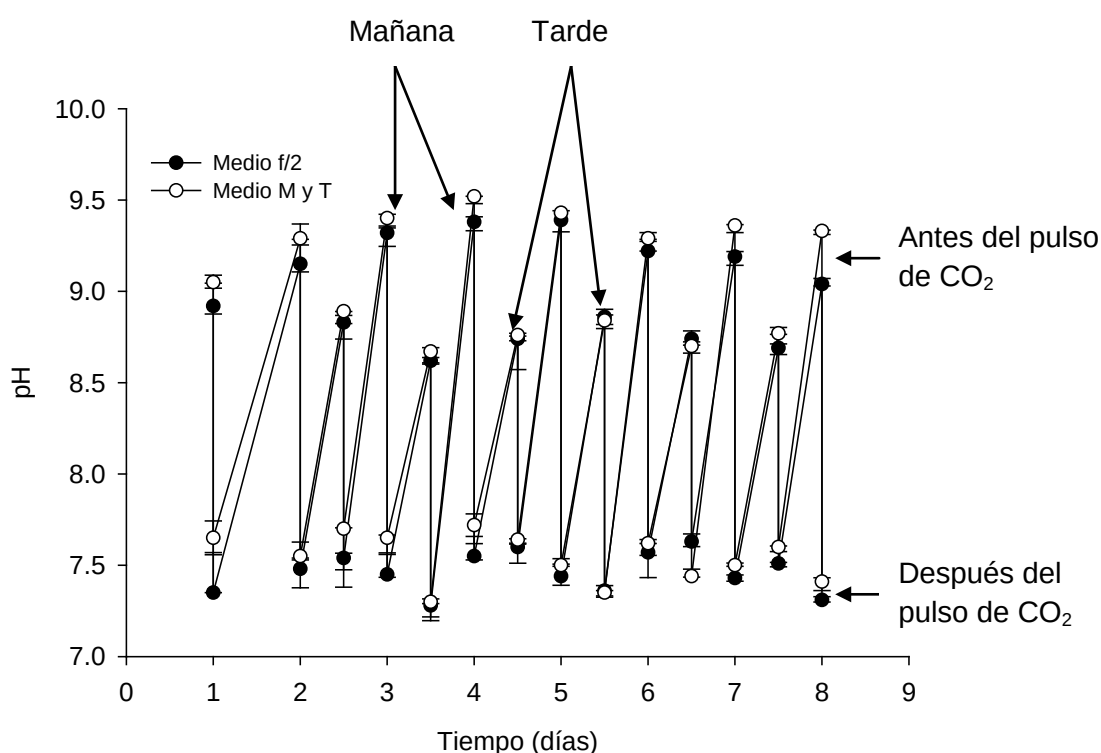


Figura 5. Variación de pH en cultivos de *C. kessleri* con medio f/2 y Matthiessen y Torner en garrafón de 18 L. La barra vertical indica el error estándar (n=3)

La densidad inicial promedio en el cultivo de 18 L fue de  $2.42 \pm 0.189 \times 10^6$  y  $2.68 \pm 0.079 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup> en el medio f/2 de Guillard y Matthiessen y Torner respectivamente. Durante el primer día, se observó la fase Lag en ambos medios, y del segundo al cuarto día *C. kessleri* se denota un incremento similar en la densidad celular en ambos medios de cultivo. A partir del quinto día se observó mayor densidad celular en el medio f/2 (figura 6) y una fase de crecimiento lento a partir del octavo día. Sin embargo, tales diferencias no son significativas ( $t = 0.0823$ ;  $P = 0.9352$ ). La máxima densidad celular reportada en este nivel fue de  $37.03 \pm 0.670 \times 10^6$  y  $34.71 \pm 0.667 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup> en el medio f/2 de Guillard y Matthiessen y Torner respectivamente.

La tasa específica de crecimiento en los dos medios de cultivo fue similar (figura 7). En el primer día se observaron valores de  $0.13 \pm 0.045$  y  $0.12 \pm 0.018$ , con valores máximos de este parámetro en el segundo día ( $1.02 \pm 0.130$  y  $0.84 \pm 0.010$ ). Del segundo al quinto día se observó una notable disminución. A partir de este tiempo, la tasa de crecimiento específica presentó poca variación y en el noveno día disminuyó a un valor mínimo de  $0.07 \pm 0.029$  en el medio f/2. Las divisiones por día tuvieron la misma tendencia que la tasa específica de crecimiento, con valores máximos de  $1.48 \pm 0.19$  y  $1.21 \pm 0.01$  en el segundo día. La máxima producción diaria se obtuvo en el tercer día con valores de  $6.72 \pm 0.18 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup> en el medio f/2 y  $6.96 \pm 0.14 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup> en Matthiessen y Torner.

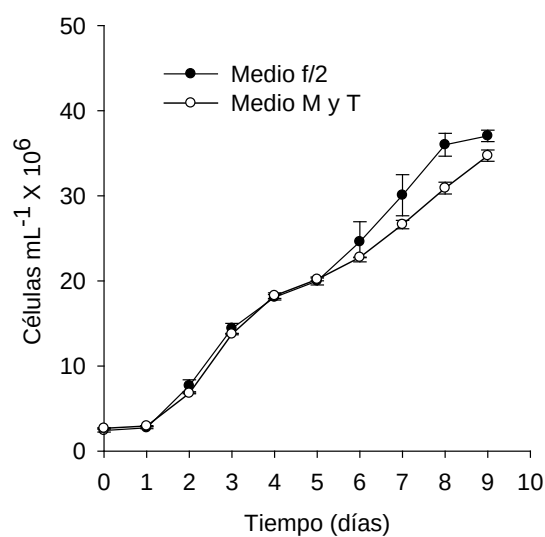


Figura 6. Densidad celular promedio de *C. kessleri* cultivada en medio f/2 y Matthiessen y Torner en garrafón de 18 L. La barra vertical indica el error estándar (n=3)

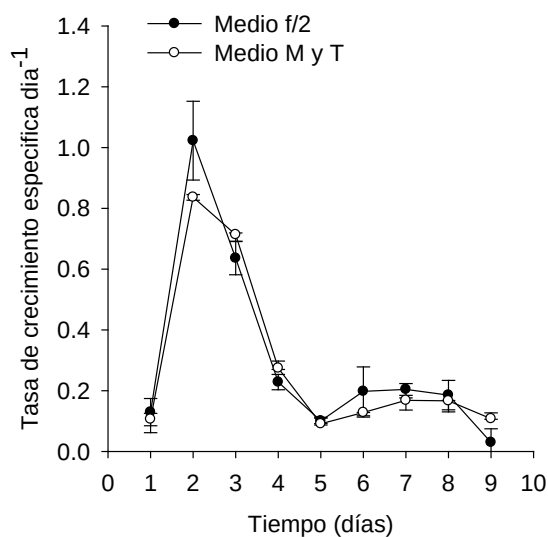


Figura 7. Tasa de crecimiento promedio de *C. kessleri* cultivada en medio f/2 y Matthiessen y Torner en garrafón de 18 L. La barra vertical indica el error estándar (n=3)

Tabla IV. Parámetros poblacionales promedio de *Chlorella kessleri* en nivel Garrafón (18L) cultivada en: A) Medio f/2 de Guillard (1975) y B) Medio Matthiessen y Torner (1966). Donde T = Tiempo (días), DC = Densidad celular ( $\times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>),  $\mu$  = tasa de crecimiento específica, D = divisiones por día (div día<sup>-1</sup>), TD = tiempo de duplicación (días), PD = producción diaria ( $\times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>) y VP = valor porcentual de la PD (%). El error estándar se muestra como  $\pm$  (n=3).

| A) |                   |                  |                 |                  |                 |                  |
|----|-------------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|
| T  | DC                | $\mu$            | D               | TD               | PD              | VP               |
| 0  | 2.42 $\pm$ 0.189  | -                | -               | -                | -               | -                |
| 1  | 2.74 $\pm$ 0.109  | 0.13 $\pm$ 0.045 | 0.19 $\pm$ 0.06 | 6.67 $\pm$ 1.98  | 0.32 $\pm$ 0.09 | 14.1 $\pm$ 5.2   |
| 2  | 7.68 $\pm$ 0.698  | 1.02 $\pm$ 0.130 | 1.48 $\pm$ 0.19 | 0.70 $\pm$ 0.10  | 4.94 $\pm$ 0.79 | 182.6 $\pm$ 34.4 |
| 3  | 14.41 $\pm$ 0.609 | 0.64 $\pm$ 0.055 | 0.92 $\pm$ 0.08 | 1.11 $\pm$ 0.09  | 6.72 $\pm$ 0.18 | 89.5 $\pm$ 10.6  |
| 4  | 18.07 $\pm$ 0.321 | 0.23 $\pm$ 0.025 | 0.33 $\pm$ 0.04 | 3.11 $\pm$ 0.32  | 3.67 $\pm$ 0.29 | 25.7 $\pm$ 3.2   |
| 5  | 19.99 $\pm$ 0.473 | 0.10 $\pm$ 0.009 | 0.15 $\pm$ 0.01 | 6.99 $\pm$ 0.58  | 1.92 $\pm$ 0.20 | 10.6 $\pm$ 1.0   |
| 6  | 24.59 $\pm$ 2.354 | 0.20 $\pm$ 0.080 | 0.29 $\pm$ 0.12 | 7.88 $\pm$ 5.39  | 4.60 $\pm$ 1.94 | 22.6 $\pm$ 9.4   |
| 7  | 30.06 $\pm$ 2.409 | 0.20 $\pm$ 0.020 | 0.29 $\pm$ 0.03 | 3.46 $\pm$ 0.34  | 5.47 $\pm$ 0.29 | 22.7 $\pm$ 2.4   |
| 8  | 35.99 $\pm$ 1.342 | 0.19 $\pm$ 0.048 | 0.27 $\pm$ 0.07 | 4.23 $\pm$ 0.95  | 5.93 $\pm$ 1.17 | 20.6 $\pm$ 5.9   |
| 9  | 37.03 $\pm$ 0.670 | 0.07 $\pm$ 0.029 | 0.10 $\pm$ 0.04 | 11.67 $\pm$ 4.75 | 2.55 $\pm$ 0.97 | 7.4 $\pm$ 3.1    |
| B) |                   |                  |                 |                  |                 |                  |
| T  | DC                | $\mu$            | D               | TD               | PD              | VP               |
| 0  | 2.68 $\pm$ 0.079  | -                | -               | -                | -               | -                |
| 1  | 2.94 $\pm$ 0.050  | 0.12 $\pm$ 0.018 | 0.18 $\pm$ 0.03 | 5.71 $\pm$ 0.81  | 0.34 $\pm$ 0.06 | 13.2 $\pm$ 2.0   |
| 2  | 6.79 $\pm$ 0.050  | 0.84 $\pm$ 0.010 | 1.21 $\pm$ 0.01 | 0.83 $\pm$ 0.01  | 3.85 $\pm$ 0.00 | 130.7 $\pm$ 2.2  |
| 3  | 13.75 $\pm$ 0.088 | 0.71 $\pm$ 0.014 | 1.02 $\pm$ 0.02 | 0.98 $\pm$ 0.02  | 6.96 $\pm$ 0.14 | 102.5 $\pm$ 2.8  |
| 4  | 18.26 $\pm$ 0.329 | 0.28 $\pm$ 0.014 | 0.41 $\pm$ 0.02 | 2.45 $\pm$ 0.11  | 4.51 $\pm$ 0.27 | 32.8 $\pm$ 1.8   |
| 5  | 20.17 $\pm$ 0.163 | 0.10 $\pm$ 0.013 | 0.14 $\pm$ 0.02 | 7.15 $\pm$ 0.83  | 1.91 $\pm$ 0.22 | 10.5 $\pm$ 1.4   |
| 6  | 22.76 $\pm$ 0.037 | 0.12 $\pm$ 0.008 | 0.17 $\pm$ 0.01 | 5.79 $\pm$ 0.39  | 2.59 $\pm$ 0.15 | 12.8 $\pm$ 0.9   |
| 7  | 26.62 $\pm$ 0.490 | 0.16 $\pm$ 0.020 | 0.23 $\pm$ 0.03 | 4.61 $\pm$ 0.66  | 3.86 $\pm$ 0.52 | 17.0 $\pm$ 2.3   |
| 8  | 30.90 $\pm$ 0.695 | 0.15 $\pm$ 0.019 | 0.21 $\pm$ 0.03 | 4.83 $\pm$ 0.70  | 4.58 $\pm$ 0.57 | 16.1 $\pm$ 2.2   |
| 9  | 34.71 $\pm$ 0.667 | 0.12 $\pm$ 0.011 | 0.17 $\pm$ 0.02 | 6.04 $\pm$ 0.50  | 3.81 $\pm$ 0.33 | 12.4 $\pm$ 1.2   |

### 3.2.- Consumo de nutrientes

#### 3.21.- Nitratos

En el medio f/2 se observó un consumo de 1014  $\mu\text{M}$  del nitrato en los primeros seis días (fig. 8), lo cual equivale al 95.40 %. En ese momento restaban solamente  $48 \pm 24.3 \mu\text{M}$  (4.52%). Como se puede ver en la tabla VA, en el día 1 el consumo fue relativamente bajo ( $84 \pm 16.184 \mu\text{M}$ ), conforme transcurrieron los días de cultivo este se incrementó hasta tener su valor máximo en el día 4 ( $259 \pm 44.1 \mu\text{M}$ ). Después, se observó una continua disminución del consumo hasta el octavo día ( $10 \pm 6.1 \mu\text{M}$ ). El mayor consumo por célula se observó en el día 1 ( $1.68 \pm 0.28 \text{ fM}$ ).

En el medio Matthiessen y Torner se consumió el  $69.95 \pm 3.42 \%$  en los ocho días de cultivo (fig. 8), momento en el cual restaban  $587 \pm 70.7 \mu\text{M}$ . En el día 1 se observó un consumo de  $218 \pm 15.2 \mu\text{M}$  (tabla V B)), este valor disminuyó hasta el cuarto día. Por último se notó un aumento gradual en el consumo hasta el octavo día, cuando se presentó el mayor consumo ( $339 \pm 31.9 \mu\text{M}$ ). Al igual que el medio f/2 el mayor consumo por célula fue observado en el día 1 ( $4.13 \pm 0.32 \text{ fM}$ ). En ambos medios se apreció que la cantidad de nitrato inicial ( $1062 \pm 13.6$  y  $1951 \pm 16.8 \mu\text{M}$ ) es mayor a la estipulada en la formulación de los mismos ( $883$  y  $1766 \mu\text{M}$  en f/2 y Matthiessen y Torner respectivamente). En ambos medios se observó que la cuota celular mostró su valor más alto en el primer día, después del cual disminuyó con el tiempo de cultivo.

Tabla V. Densidad celular promedio y consumo de nitrato por *Chlorella kessleri* en garrafón (18 L) cultivada en: A) Medio f/2 de Guillard (1975) y B) Medio Matthiessen y Torner (1966). Donde T = Tiempo (días), DC = Densidad Celular ( $\times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>), NR = Nitrato residual ( $\mu$ M), V = razón de consumo de nitrato ( $\mu$ M día<sup>-1</sup>), VA = consumo acumulado (%), VC = razón de consumo de nitrato por célula (femtoMolar cél<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>) y Q = Cuota celular (femtoMolar cél<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>). El error estándar se muestra como  $\pm$  (n=3).

| A) |                   |                 |                |                  |                 |                  |
|----|-------------------|-----------------|----------------|------------------|-----------------|------------------|
| T  | DC                | NR              | V              | VA               | VC              | Q                |
| 0  | 2.42 $\pm$ 0.189  | 1062 $\pm$ 13.6 | -              | -                | -               | -                |
| 1  | 2.74 $\pm$ 0.109  | 978 $\pm$ 19.8  | 84 $\pm$ 16.1  | 7.91 $\pm$ 1.51  | 1.68 $\pm$ 0.28 | 17.74 $\pm$ 7.12 |
| 2  | 7.68 $\pm$ 0.698  | 908 $\pm$ 26.5  | 70 $\pm$ 19.0  | 14.56 $\pm$ 1.43 | 0.53 $\pm$ 0.16 | 0.56 $\pm$ 0.22  |
| 3  | 14.40 $\pm$ 0.609 | 746 $\pm$ 32.3  | 162 $\pm$ 58.7 | 29.68 $\pm$ 3.94 | 0.61 $\pm$ 0.20 | 1.01 $\pm$ 0.37  |
| 4  | 18.07 $\pm$ 0.321 | 487 $\pm$ 30.0  | 259 $\pm$ 44.1 | 54.14 $\pm$ 2.88 | 0.80 $\pm$ 0.15 | 3.47 $\pm$ 0.33  |
| 5  | 19.98 $\pm$ 0.473 | 241 $\pm$ 37.7  | 246 $\pm$ 58.7 | 77.17 $\pm$ 2.84 | 0.68 $\pm$ 0.16 | 6.92 $\pm$ 1.98  |
| 6  | 24.59 $\pm$ 2.354 | 48 $\pm$ 24.3   | 193 $\pm$ 13.3 | 95.40 $\pm$ 2.37 | 0.45 $\pm$ 0.08 | 6.39 $\pm$ 5.06  |
| 7  | 30.06 $\pm$ 2.409 | 19 $\pm$ 6.1    | 29 $\pm$ 19.0  | 98.20 $\pm$ 0.59 | 0.06 $\pm$ 0.04 | 0.27 $\pm$ 0.18  |
| 8  | 35.99 $\pm$ 1.342 | 9 $\pm$ 0.0     | 10 $\pm$ 6.1   | 99.09 $\pm$ 0.01 | 0.02 $\pm$ 0.01 | 0.07 $\pm$ 0.04  |
| B) |                   |                 |                |                  |                 |                  |
| T  | DC                | NR              | V              | VA               | VC              | Q                |
| 0  | 2.68 $\pm$ 0.079  | 1951 $\pm$ 16.8 | -              | -                | -               | -                |
| 1  | 2.94 $\pm$ 0.050  | 1733 $\pm$ 25.5 | 218 $\pm$ 15.2 | 11.19 $\pm$ 0.81 | 4.13 $\pm$ 0.32 | 32.06 $\pm$ 6.80 |
| 2  | 6.79 $\pm$ 0.050  | 1646 $\pm$ 39.7 | 87 $\pm$ 56.7  | 15.57 $\pm$ 2.73 | 0.70 $\pm$ 0.46 | 0.85 $\pm$ 0.56  |
| 3  | 13.74 $\pm$ 0.088 | 1548 $\pm$ 16.9 | 98 $\pm$ 54.1  | 20.67 $\pm$ 0.23 | 0.40 $\pm$ 0.22 | 0.55 $\pm$ 0.30  |
| 4  | 18.26 $\pm$ 0.329 | 1475 $\pm$ 18.1 | 73 $\pm$ 4.1   | 24.41 $\pm$ 0.28 | 0.22 $\pm$ 0.02 | 0.79 $\pm$ 0.09  |
| 5  | 20.17 $\pm$ 0.163 | 1364 $\pm$ 29.8 | 111 $\pm$ 44.9 | 30.05 $\pm$ 2.02 | 0.30 $\pm$ 0.12 | 3.06 $\pm$ 1.31  |
| 6  | 22.76 $\pm$ 0.037 | 1177 $\pm$ 55.6 | 187 $\pm$ 74.9 | 39.72 $\pm$ 2.35 | 0.46 $\pm$ 0.18 | 3.80 $\pm$ 1.42  |
| 7  | 26.61 $\pm$ 0.490 | 926 $\pm$ 74.7  | 251 $\pm$ 74.2 | 52.56 $\pm$ 3.61 | 0.53 $\pm$ 0.16 | 3.67 $\pm$ 1.47  |
| 8  | 30.89 $\pm$ 0.695 | 587 $\pm$ 70.7  | 339 $\pm$ 31.9 | 69.95 $\pm$ 3.42 | 0.61 $\pm$ 0.06 | 4.37 $\pm$ 107   |

### 3.22.- Fosfatos

En el medio f/2 se observó un rápido consumo de fosfato en los tres primeros días (fig. 9), momento en el cual restaba  $1.35 \pm 0.64 \mu\text{M}$  (3.72%). Este comportamiento coincide con la fase exponencial del cultivo. El mayor consumo se distinguió en el día 1 ( $14.52 \mu\text{M}$ ), además el mayor consumo por célula se observó en este mismo día ( $0.30 \pm 0.01 \text{ fM}$ ).

El fosfato fue consumido en un 96.51 % en los cinco primeros días de cultivo en el medio Matthiessen y Torner. Al igual que el medio f/2, el mayor consumo y el mayor consumo por célula se mostraron en el día 1 ( $29.01 \pm 0.03 \mu\text{M}$  y  $0.55 \pm 0.01 \text{ fM}$  respectivamente). En ambos medios de cultivo el valor máximo de la cuota celular se observó en el primer día de cultivo y conforme transcurrió el cultivo disminuyó.

Tabla VI. Densidad celular promedio y consumo de fosfato por *Chlorella kessleri* en garrafón (18 L) cultivada en: A) Medio f/2 de Guillard (1975) y B) Medio Matthiessen y Torner (1966). Donde T = Tiempo (días), DC = Densidad Celular ( $\times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>), FR = Fosfato residual ( $\mu$ M), V = razón de consumo de fosfato ( $\mu$ M día<sup>-1</sup>), VA = consumo acumulado (%), VC = razón de consumo de fosfato por célula (femtoMolar cél<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>) y Q = Cuota celular (femtoMolar cél<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>). El error estándar se muestra como  $\pm$  (n=3).

| A) |                   |                  |                  |                  |                 |                 |
|----|-------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|
| T  | DC                | FR               | V                | VA               | VC              | Q               |
| 0  | 2.42 $\pm$ 0.189  | 36.30 $\pm$ 0.00 | -                | -                | -               | -               |
| 1  | 2.74 $\pm$ 0.109  | 21.78 $\pm$ 0.00 | 14.52 $\pm$ 0.00 | 40.00 $\pm$ 0.00 | 0.30 $\pm$ 0.01 | 2.80 $\pm$ 0.80 |
| 2  | 7.68 $\pm$ 0.698  | 9.23 $\pm$ 1.14  | 12.55 $\pm$ 1.14 | 74.56 $\pm$ 3.14 | 0.09 $\pm$ 0.00 | 0.09 $\pm$ 0.01 |
| 3  | 14.40 $\pm$ 0.609 | 1.35 $\pm$ 0.64  | 7.89 $\pm$ 0.04  | 96.29 $\pm$ 1.75 | 0.03 $\pm$ 0.00 | 0.05 $\pm$ 0.00 |
| 4  | 18.07 $\pm$ 0.321 | 0.61 $\pm$ 0.33  | 0.73 $\pm$ 0.37  | 98.31 $\pm$ 0.90 | 0.03 $\pm$ 0.00 | 0.01 $\pm$ 0.00 |
| 5  | 19.98 $\pm$ 0.473 | 0.29 $\pm$ 0.00  | 0.33 $\pm$ 0.33  | 99.20 $\pm$ 0.00 | 0.00 $\pm$ 0.00 | 0.01 $\pm$ 0.01 |
| 6  | 24.59 $\pm$ 2.354 | 0.29 $\pm$ 0.00  | 0.00 $\pm$ 0.00  | 99.20 $\pm$ 0.00 | 0.00 $\pm$ 0.00 | 0.00 $\pm$ 0.00 |
| 7  | 30.06 $\pm$ 2.409 | 0.29 $\pm$ 0.00  | 0.00 $\pm$ 0.00  | 99.20 $\pm$ 0.00 | 0.00 $\pm$ 0.00 | 0.00 $\pm$ 0.00 |
| 8  | 35.99 $\pm$ 1.342 | 0.29 $\pm$ 0.00  | 0.00 $\pm$ 0.00  | 99.20 $\pm$ 0.00 | 0.00 $\pm$ 0.00 | 0.00 $\pm$ 0.00 |
| B) |                   |                  |                  |                  |                 |                 |
| T  | DC                | FR               | V                | VA               | VC              | Q               |
| 0  | 2.68 $\pm$ 0.079  | 72.57 $\pm$ 0.03 | -                | -                | -               | -               |
| 1  | 2.94 $\pm$ 0.050  | 43.56 $\pm$ 0.00 | 29.01 $\pm$ 0.03 | 39.97 $\pm$ 0.03 | 0.55 $\pm$ 0.01 | 4.52 $\pm$ 0.77 |
| 2  | 6.79 $\pm$ 0.050  | 40.10 $\pm$ 1.41 | 3.46 $\pm$ 1.41  | 44.74 $\pm$ 1.96 | 0.03 $\pm$ 0.01 | 0.03 $\pm$ 0.01 |
| 3  | 13.74 $\pm$ 0.088 | 29.53 $\pm$ 1.63 | 10.57 $\pm$ 2.93 | 59.31 $\pm$ 2.23 | 0.04 $\pm$ 0.01 | 0.06 $\pm$ 0.02 |
| 4  | 18.26 $\pm$ 0.329 | 13.26 $\pm$ 1.02 | 16.26 $\pm$ 1.14 | 81.72 $\pm$ 1.40 | 0.05 $\pm$ 0.00 | 0.17 $\pm$ 0.01 |
| 5  | 20.17 $\pm$ 0.163 | 2.53 $\pm$ 0.00  | 10.73 $\pm$ 1.02 | 96.51 $\pm$ 0.00 | 0.03 $\pm$ 0.00 | 0.30 $\pm$ 0.05 |
| 6  | 22.76 $\pm$ 0.037 | 0.94 $\pm$ 0.33  | 1.59 $\pm$ 0.33  | 98.71 $\pm$ 0.45 | 0.00 $\pm$ 0.00 | 0.03 $\pm$ 0.01 |
| 7  | 26.61 $\pm$ 0.490 | 0.61 $\pm$ 0.33  | 0.33 $\pm$ 0.33  | 99.15 $\pm$ 0.45 | 0.00 $\pm$ 0.00 | 0.00 $\pm$ 0.00 |
| 8  | 30.89 $\pm$ 0.695 | 0.61 $\pm$ 0.33  | 0.00 $\pm$ 0.56  | 99.15 $\pm$ 0.45 | 0.00 $\pm$ 0.00 | 0.00 $\pm$ 0.01 |



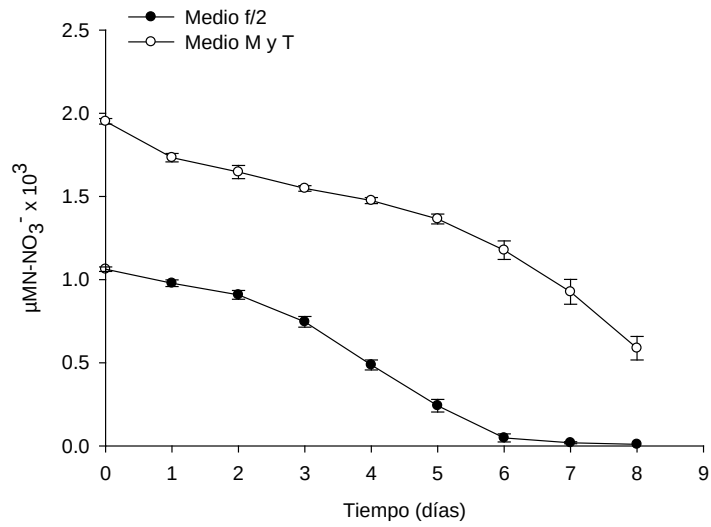


Figura 8. Concentración promedio residual de nitrato en cultivo estático de *C. kessleri* en volumen de 18 L con el medio f/2 y Matthiessen y Torner. La barra vertical indica el error estándar (n=3)

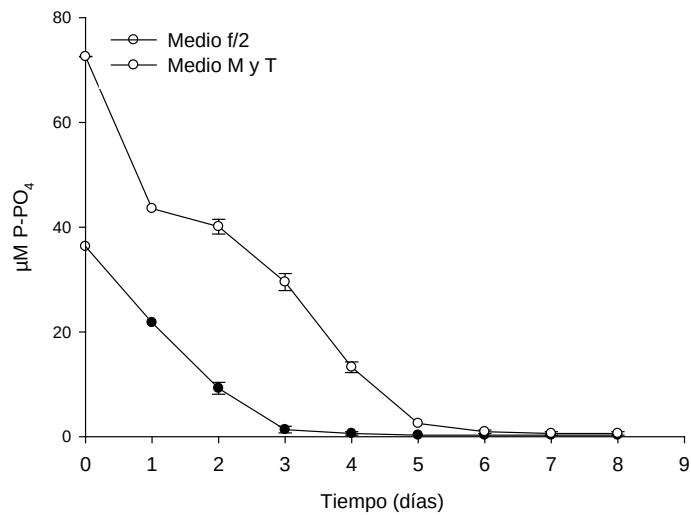


Figura 9. Concentración promedio residual de fosfato en cultivo estático de *C. kessleri* en volumen de 18 L con el medio f/2 y Matthiessen y Torner. La barra vertical indica el error estándar (n=3)

## 4.- DISCUSIÓN

### 4.1.- Cultivo microalgal

El crecimiento de *C. kessleri* observado en los dos primeros niveles de cultivo (Erlenmeyer y Fernbach) comprueba que los dos medios pueden ser usados para el mantenimiento y escalamiento de cepas de esta especie, debido a que no hubo diferencias significativas ( $t = -0.0091$ ;  $P = 0.9928$ ) en la densidad celular obtenida en ambos medios durante siete días de cultivo (Figs. 1 y 3). También es importante, mencionar que la cantidad de nutrientes usados para el cultivo de *C. kessleri* es menor en el medio f/2, ya que esta formulación requiere la mitad de nutrientes que aquella especificada en el medio Matthiessen y Torner (1966). Asimismo, se observó un patrón similar en la tasa de crecimiento de *C. kessleri* con valores máximos al tercer día en ambos medios de cultivo (Figs. 2 y 4), lo cual indica que esta especie puede crecer en distintas concentraciones de nutrientes sin cambios importantes en la biomasa final.

Estudios realizados por Lee y Lee (2001) en volumen limitado (Erlenmeyer) reportan  $10^7$  cél mL<sup>-1</sup> en el tercer día de cultivo y en el presente estudio se observó esta densidad en el séptimo día. La diferencia puede ser debido a que estos autores cultivaron esta especie a mayor temperatura (30 °C - 100 mL) y en menor volumen que en el presente estudio (20 °C - 150 mL). Por otra parte la densidad celular en nivel Fernbach se incrementó casi 2 veces (Fig. 3) y la máxima tasa de crecimiento durante la fase exponencial fue similar en ambos medios de cultivo (Fig. 4, Tabla III). La densidad celular en este estudio fue cuatro veces mayor que la reportada por De la Cruz (1985), quien obtiene  $5.2 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>. Cabe destacar que en su estudio, De la Cruz mantuvo sus unidades de cultivo bajo condiciones naturales de luz y temperatura y usó harina de pescado como fuente de nutrientes.

Al analizar el patrón de crecimiento en los tres niveles de cultivo, los resultados indican la presencia de una fase de inducción de 48 h en el nivel Erlenmeyer, mientras que en el nivel Fernbach y garrafón fue de 24 h (Figs. 1, 3 y 6). Esta diferencia puede ser atribuida a que en el nivel Erlenmeyer, el inoculo usado probablemente contenía una menor proporción de células viables, por lo cual se observa que el número de células permaneció sin cambios importantes durante 48 h, hasta que la progenie de las células capaces de dividirse registraron un número comparable con el inoculo inicial, dando lugar un crecimiento exponencial (Fogg y Take, 1987).

Del nivel Fernbach al nivel garrafón se observó un incremento promedio de 1.6 veces en la densidad celular de *C. kessleri*. Esto significa que conforme se escala el cultivo se obtiene una mayor biomasa por unidad de volumen. Sin embargo, cabe señalar que el pH (Fig. 5) es una de las variables que modifican la biomasa por unidad de volumen. Al respecto, la variación de pH tiene su origen en dos principios básicos. El primero es la forma en que se encuentra disponible el CO<sub>2</sub> en el medio de cultivo. De la Lanza-Espino y Hernández-Pulido (1998) mencionan que el CO<sub>2</sub> atmosférico que ingresa al agua reacciona y forma ácido carbónico inestable. Este compuesto forma dos condiciones iónicas: el bicarbonato y el carbonato, los cuales cambian de acuerdo a las variaciones del pH. El segundo principio es que el fitoplancton en cultivo requiere de carbono inorgánico para formar compuestos orgánicos. Particularmente *Chlorella* tiene la capacidad de obtener CO<sub>2</sub> del aire, o de iones bicarbonato dado que esta forma de carbono inorgánico predomina en pH alcalinos (Camiro-Vargas *et al.* 2005).

Al cultivar *C. kessleri* en ambos medios uno de los nutrientes más críticos fue el carbono inorgánico disuelto. Este se suministró por pulsos durante la mañana y

tarde, y la falta de un pulso de CO<sub>2</sub> durante la noche incrementó el pH hasta 9.5. Esto puede ser atribuido al incremento en la densidad celular en las microalgas. Esta hipótesis no fue comprobada en el presente estudio, pero no puede ser excluida como una posible explicación de altos valores de pH registrados en la mañana (Fig. 5). También los altos valores de pH indican que *C. kessleri* utilizó una fracción importante de iones bicarbonato, debido al incremento en el número de células. Estos resultados ayudan a entender que, al cultivar microalgas fotoautotróficamente, consumen en mayor proporción iones bicarbonato, lo cual modifica el sistema de carbonatos y disminuye la eficiencia fotosintética de la microalga por la disposición de carbón inorgánico disuelto (Lafarga- De la Cruz *et al.* 2006).

#### **4.2.- Consumo de nitrato**

El consumo de nitrato por *C. kessleri* no fue constante y el nitrato residual disminuyó con respecto al tiempo como se muestra en la tabla VA, VB. Esto sugiere que durante periodos cortos de tiempo, esta especie puede estar almacenado nitrógeno como consecuencia de la alta concentración de nitrato en el medio (Fig.8; Tabla VB). Durante el crecimiento exponencial, el nitrato residual en el medio fue inversamente proporcional a la densidad celular de *C. kessleri* y arriba del 95 % de nitrato fue removido del medio durante los primeros seis días en el medio f/2, mientras que en el medio Matthiessen y Torner fue el 40% (Fig. 8; Tabla V). Resultados similares para *C. kessleri* fueron obtenidos por Lee y Lee (2002), quienes reportan un consumo de nitrato mayor al 98% después de 10 días de cultivo en fotobiorreactores, utilizando el medio N/8. Mientras que al cultivarla a doble concentración con el medio N/8, observaron que el nitrato no es consumido

totalmente, esto concuerda con los resultados de este estudio al utilizar el medio Matthiessen y Torner (Fig. 8). Asimismo, Otros estudios (Li *et al.* 2011) mencionan que las algas verdes demandan más nitrógeno y fosforo que otras especies y estas además pueden tener un consumo innecesario de nitrógeno cuando el contenido de fosforo es relativamente alto.

Por otra parte, la cuota celular de nitrógeno de *C. kessleri* durante los primeros seis días varió de 17.74 a 6.39 fmol célula<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> en el medio f/2, y en el medio Matthiessen y Torner de 32 a 3.8 fmol célula<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>. Existen diferencias en las cantidades de cuota celular de nitrógeno y se observó que en el medio f/2, estas cuotas cambian en concentración después del sexto día cuando las células están limitadas de nitrógeno (Tabla VIA, B). En cambio, los resultados de la cuota celular de *C. kessleri* creciendo en el medio Matthiessen y Torner muestran que las células tuvieron suficiente nitrógeno. En referencia a estos resultados Dortch *et al.* (1984) ha documentado que el contenido de nitrógeno celular es extremadamente variable en diferentes especies de fitoplancton y que muchos de los cambios ocurren como resultado de la deficiencia de nitrógeno, sin embargo, las células continúan creciendo a expensas del reservorio de nitrato aculado en su volumen celular, aún cuando el nitrógeno en el medio externo esta agotado.

#### 4.4.- Consumo de fosfato

En ambos medios de cultivo se observó un consumo similar de fosfato. Al igual que el nitrato, el mayor consumo de este nutriente ocurrió durante el crecimiento exponencial de *C. kessleri* (Fig. 9; Tabla VI). La máxima remoción de fosfato en el medio f/2 y Matthiessen y Torner se presentó en el tercer (96.2%) y quinto (96.5%) día de cultivo respectivamente. Estos resultados coinciden con máximos en la tasa de crecimiento y cuota celular de *C. kessleri*. Además, cultivos en esta fase, incrementan su promedio de duplicación celular y demandan mayor consumo de nutrientes. El elevado consumo de fosfato indica que, en cortos periodos de tiempo esta especie adquiere una cantidad importante de fosfato y aumenta sus reservas de este nutriente. Estas reservas son entonces usadas para sostener el crecimiento cuando en el medio externo existe limitación de fosfato. Como se muestra en la figura 9, el fosfato residual empieza a ser limitante en el tercer y quinto día de cultivo y a partir de ese tiempo, la tasa de crecimiento y la cuota celular de *C. kessleri* disminuyen debido a la limitación de fosfato (Tabla VI A; B). Aunque el crecimiento de esta especie continuó hasta el noveno día, es probablemente que las células estuvieron utilizando las reservas endógenas de fosfato. Al respecto, Darley (1987) y El-Sheek y Rady (1995) indican que una adaptación de las microalgas a los ambientes limitantes de fosfato consiste en el almacenamiento de fosforo excesivo en forma de polifosfato en gránulos citoplasmáticos, los cuales sirven como reserva cuando en el medio no se dispone del mismo.

## 5.- CONCLUSIONES

- La densidad celular de *C. kessleri* en ambos medios de cultivo no fue significativa. Lo cual comprueba la hipótesis que la concentración de nutrientes para el cultivo de esta especie no modificó su densidad celular.
- *C. kessleri* fue limitada por nitrato y fosfato en el medio f/2 a partir del sexto y tercer día respectivamente. Mientras que, en el medio Matthiessen y Torner solo se observó limitación por fosfato a partir del quinto día.
- La remoción de nitrato y fosfato por *C. kessleri* tomó lugar en menor tiempo en el medio f/2.
- La cuota celular de *C. kessleri* varió en función del consumo de nitrato y fosfato durante los primeros cinco días del cultivo.
- Los resultados de este estudio sugieren que *C. kessleri* puede ser usada en el sexto día de su cultivo, ya sea como inóculo para volúmenes mayores o como alimento para organismos acuáticos en acuicultura.

## 6.- REFERENCIAS

- Camiro-Vargas T. K., J. M. Hernández-Ayón, E. Valenzuela-Espinoza, F. Delgadillo-Hinojosa, R. Cajal-Medrano. Dissolved inorganic carbon uptake by *Rhodomonas* sp. and *Isochrysis aff. galbana* determined by a potentiometric technique. *Aquacultural Engineering* 33. 53-95.
- Cortés-Altamirano R. y S. Licea-Duran. 1999. Florecimientos de microalgas nocivas en estanques para cultivo semi-intensivo de camarón en México. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 41:157-166.
- Cléber-Bertoldi F., E Sant'-Anna, M. Villela-da Costa Braga and J. L. Barcelos-Oliveira. (2006). Lipids, fatty acids composition and carotenoids of *Chlorella vulgaris* cultivated in hydroponic wastewater. *GRASAS Y ACEITES*, 57 (3), JULIO-SEPTIEMBRE, 270-274, ISSN: 0017-3495.
- Darley, W.M. 1987. *Biología de las algas: enfoque fisiológico*. Ed. Limusa, México D.F., 236pp.
- 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.+
- De la Cruz S. A. 1985. Crecimiento de fitoplancton en cultivo bialgal. *Revista Investigaciones Marinas* vol. VI, N. 2-3.
- De la Lanza-Espino y S. Hernández-Pulido. 1998. Nutrientes y Productividad primaria en sistemas acuícolas en: *Ecología de los sistemas acuícolas*. Ed. A.G.T, México D.F., 27-51pp.
- Dorch Q., J. R. Clayton Jr., S. S. Thoresen and S. I. Ahmed. 1984. Species differences in accumulation of nitrogen pools in phytoplankton. *Marine Biology* 81. 237-250.



- El-Sheek M. M. and A. A. Rady. 1995. Effect of phosphorus starvation on growth, photosynthesis and some metabolic processes in the cellular green alga *Chorella kessleri*. *Phyton* (Horn, Austria) 35(1): 139-151.
- Fogg, G. E. and B. Take. 1987. *Algal Cultures and Phtoplankton Ecology*. Third Ed. University of Wisconsin Prees. 257 p.
- Fu, Y. Hada, A., Yamashita, T., Yoshida, Y. & Hino, A. 1997. Development of a continues culture system for stable mass production of the marine rotifer *Brachionus*. *Hydrobiologia*, 358, 145-151.
- Guillard, R.R.L. 1973. Growth measurements-Division rates. In Janet R. Stein (ed). *Handbook of phycological methods-Culture methods and growth measurements*. Cambridge University Press. New York., pp 289-320.
- Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith, W.L. and M.H. Chanley (ed.). *Culture of marine invertebrates animals*. Plenum Publishing Corp. New York., pp.29-60.
- Kim M. H., W. T. Chung, M.K. Lee, J.Y. Lee, S.J. Ohh, J.H. Lee, D.H. Park, D.J. Kim and H.Y. Lee. 2002. Kinetics of Removing Nitrogenous and Phosphorus Compounds form Swine Waste by Growth of Microalga, *Spirulina platensis*. Korea. *Journal of Microbiol. and Biotechnol.* 10(4) 455-461pp.
- Kobayashi T., T. Nagase, A. Hino and T. Takeuchi. 2008. Effect of combination feeding of *Nannochloropsis* and freshwater *Chlorella* on the fatty acid composition of rotifer *Brachionus plicatilis* in a continuous culture. *FISHERIES SCIENCE*; 74: 649–656.

- Lafarga- De la Cruz F., E. Valenzuela-Espinoza, R. Millán-Núñez, C. C. Trees, E. Santamaria-del-Ángel, F. Nuñez-Cebrero. Nutrient uptake, chlorophyll a and carbon fixation by *Rhodomonas* sp. (Cryptophyceae) cultured at different irradiance and nutrient concentrations. *Aquacultural Engineering* 35. 51-60.
- Lee K. and C. G. Lee. 2001. Effect of Light/dark Cycles on Wastewater Treatments by Microalgae. *Biotechnol. Bioprocess Eng*, 6: 194-199.
- Lee K. and C. G. Lee. 2002. Nitrogen Removal from Wastewaters by Microalgae Without Consuming Organic Carbon Sources. *J. Microbiol. Biotechnol.* 12(6), 979-985.
- Li Y., Y. F. Chen, P. Chen, M. Min, W. Zhou, B. Martinez, J. Zhu, R. Ruan. 2011. Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. *Bioresource Technology* 102. 5138–5144.
- Matthiessen, G.C. and R.C. Torner. 1966. possible methods of improving the shellfish industry of Martha's Vineyard, Duke's Country, Massachusetts, Marine Research Found. Mass., IV +138.
- Meseck L. S., J. H. Alix and G. H. Wikfors. 2005. Photoperiod and light intensity effects on growth and utilization of nutrients by the aquaculture feed microalga *Tetraselmis chui* (PLY429), *Aquaculture* 246, 393-404.
- Parson, T.R., Y. Maita and C.M. Lalli. 1985. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. First edition. Ed. Pergamon Press. Inc. New York. 173 pp.
- Romero-López. T. de J. y D. Hernandez-Martínez. 2002. Contenido proteico y digestibilidad de la pasta de *Chlorella* acidulada. *Rev. Invest. Mar.* 23(3):215-219.

- Romero-López. T. de J., J. V. Castellanos-Sandeliz, A. Torre-Pentón, M. Claro-Rodríguez y R. López-Martínez. 2009. Balance de la producción de *Chlorella* sp y *Moina* sp en la UEB PISPAVÓN, Villa Clara, Cuba. Revista electrónica de Veterinaria. ISSN: 1695-7504. Vol. 10, Nº 4
- Suantika, G., Dhert, P., Nurhudah, N. & Sorgeloos, P. 2000 High-density production of rotifer *Brachionus plicatilis* in recirculated system: consideration of water quality, zootechnical and nutrient aspects, *Aquacult. Eng.*, 21, 201-214.
- Valenzuela-Espinoza, E., R. Millán-Núñez, E. Santamaría-del- Ángel y C. C. Trees. 2011. Macronutrient uptake and carotenoid/chlorophyll a ratio in the dinoflagellate *Amphidinium carteri* Hulburt, cultured under different nutrient and light conditions. *Hidrobiologica*, 21 (1): 34-48.
- Xiong W., X.Li, J. Xiang y Q. Wu. 2008. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. *Appl Microbiol Biotechnol* 78:29–36.
- Yin X. W., P. F. Liu, S. S. Zhu and X. X. Chen. 2010. Food selectivity of the herbivore *Daphnia magna* (Cladocera) and its impact on competition outcome between two freshwater green algae. *Hydrobiologia* (2010) 655:15–23.