



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA

CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

"EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NITROGENO
Y FOSFORO EN LA CALIDAD CELULAR DE Chaetoceros
muelleri (LEMMERMAN) BACILLARIOPHYCEAE
EN CULTIVOS ESTATICOS"



T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
O C E A N O L O G O

PRESENTA:

FILIBERTO NUÑEZ CEBRERO

ENSENADA, B.C.

FEBRERO DE 1994

"EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NITROGENO Y FOSFORO EN LA CALIDAD CELULAR DE Chaetoceros muelleri (LEMMERMAN) BACILLARIOPHYCEAE EN CULTIVOS ESTATICOS"

TESIS QUE PRESENTA:

FILIBERTO NUÑEZ CEBRERO

APROBADA POR:



PRESIDENTE DEL JURADO
Oc. ENRIQUE VALENZUELA ESPINOZA


SINODAL PROPIETARIO
Oc. MARCO AURELIO GONZALEZ


SINODAL PROPIETARIO
M.C. ROBERTO MILLAN NUÑEZ

RESUMEN

Se comparó el crecimiento y composición bioquímica de Chaetoceros muelleri cultivada con cinco concentraciones diferentes de nitrógeno, fósforo y el medio f/2 (Control). La microalga se cultivó en agua de mar natural fertilizada con nutrientes agrícolas (NH_4NO_3 y P_2O_5 , como fuente de nitrógeno y fósforo) que variaron en una razón de 3.22:0.39 a 25.79:3.09 mg at l^{-1} de N/P. Un flujo de aire de 7.5 L min^{-1} , salinidad de 32 o/oo e irradiancia de $199.20 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Las máximas densidades celulares promedio de 4,478,962 y 4,438,825 cél ml^{-1} fueron obtenidas con 19.71:2.31 y 25.79:3.09 mg at l^{-1} de N/P respectivamente. La tasa de crecimiento promedio varió entre 0.54 y 0.64 con 0.78 y 0.93 divisiones por día. El crecimiento promedio de Chaetoceros muelleri con los fertilizantes agrícolas fue mayor y significativo ($P>0.05$) respecto al control f/2 para concentraciones por arriba de 3.22:0.39 mg at l^{-1} de N/P excepto 6.44:0.79 mg at l^{-1} de N/P, el cual no es significativo respecto al control. El contenido de proteínas para la fase exponencial presentó valores máximos entre 8.89 y 9.39 pg cél $^{-1}$, la proteína está regulada por la concentración de nutrientes y disminuye de acuerdo a esta concentración. Valores máximos de carbohidratos (14.2 pg cél $^{-1}$) y lípidos (16.4 pg cél $^{-1}$) se encontraron en la fase estacionaria del cultivo, seguido por una disminución en el contenido de proteínas debido a la escasez de nitrógeno. Se concluye que la mejor calidad celular de Chaetoceros muelleri producidas con fertilizantes agrícolas se obtiene en la fase exponencial, así mismo, la producción máxima se encuentra con la relación 19.71:2.31 mg at l^{-1} de N/P y mostró diferencias ($P>0.05$) respecto al medio control.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Marinas por darme la oportunidad de cursar esta carrera.

A los maestros y compañeros que compartimos parte de una vida y a sus enseñanzas que me permitieron poder llegar hasta donde me encuentro.

Al Instituto de Investigaciones Oceanológicas por permitirme realizar este trabajo en sus instalaciones.

Principalmente al Oc. Enrique Valenzuela Espinoza por su amistad incondicional, por su empuje a seguir a delante y por dirigir, apoyar y detallar este trabajo hasta su culminación.

Al Oc. Marco Aurelio González por su amistad e insistencia a seguir con el objetivo planeado, además por sus sugerencias acertadas al trabajo como parte de su función de sinodal propietario.

Al M.C. Roberto Millan Nuñez por su confianza, por mejorar el trabajo con sus acertadas sugerencias como parte de su responsabilidad de sinodal propietario.

A todos y cada uno de mis compañeros, excompañeros y amigos principalmente el Chaca, que compartimos alegría y momentos desagradables.

Al Oc. Jorge G. Wilburn González por sus sugerencias, insistencia y empuje para culminar este requisito profesional.

DEDICATORIA

A MIS PADRES:

JUANA CEBRERO RAMOS Y ROBERTO NUÑEZ DE LOS SANTOS

Principalmente a ella que con dedicación y esfuerzo nos ha incurcionado por el lado bueno de la vida, a todos aquellos que somos sus hijos(as).

A MI ESPOSA E HIJO

VERONICA ZATARAIN GRACIANO Y ERBERT JOVANNY NUÑEZ ZATARAIN

Porque me han dado la felicidad y el apoyo que he requerido.

A MIS HERMANOS

Con mucho cariño y todo mi amor, para él, que en vida llevó el nombre de HUGO LORENZO NUÑEZ CEBRERO, ya que Dios no le permitió seguir sobre la faz de la tierra (descanse en paz).

A todos ellos que lograron en su momento colocar su granito de arena para la formación como hermano.

A todos aquellos que se han preocupado en algun momento por mí.

POR LOS SIGLOS DE LOS SIGLOS

A M E N

CONTENIDO

	PAGINA
1.- INTRODUCCION.....	1
2.- ANTECEDENTES.....	3
3.- OBJETIVO.....	7
4.- METODOS Y MATERIALES.....	7
4.1. Cultivo de microalgas.....	7
4.2. Análisis químico.....	9
5.- RESULTADOS.....	11
5.1. Cultivo de microalgas.....	11
5.2. Composición bioquímica.....	19
6.- DISCUSIONES.....	23
6.1. Crecimiento poblacional.....	23
6.2. Composición química.....	25
7.- CONCLUSIONES.....	29
8.- LITERATURA CITADA.....	30
9.- APENDICE I	35
10.- APENDICE II	36

LISTA DE TABLAS

PAGINA

TABLA	I. Concentraciones de nitrógeno y fósforo derivados de fertilizantes agrícolas y de jardinería. utilizando el f/2 como control (NaNO_3 y NaH_2PO_4).....9	9
TABLA	II. Parámetros de crecimiento promedio de <u>Chaetoceros muelleri</u> en 16 L de cultivo con 25.79:3.09 mg at l^{-1} de nitrógeno y fósforo.....13	13
TABLA	III. Parámetros de crecimiento promedio de <u>Chaetoceros muelleri</u> en 16 L de cultivo con 19.71:2.31 mg at l^{-1} de nitrógeno y fósforo.....13	13
TABLA	IV. Parámetros de crecimiento promedio de <u>Chaetoceros muelleri</u> en 16 L de cultivo con 12.92:1.53 mg at l^{-1} de nitrógeno y fósforo.....15	15
TABLA	V. Parámetros de crecimiento promedio de <u>Chaetoceros muelleri</u> en 16 L de cultivo con 06.44:0.79 mg at l^{-1} de nitrógeno y fósforo.....15	15
TABLA	VI. Parámetros de crecimiento promedio de <u>Chaetoceros muelleri</u> en 16 L de cultivo con 03.22:0.39 mg at l^{-1} de nitrógeno y fósforo.....17	17

TABLA VII.	Parámetros de crecimiento promedio de <u>Chaetoceros muelleri</u> en 16 L de cultivo con 12.35:1.29 mg at l ⁻¹ de nitrógeno y fósforo (Control).....	17
TABLA VIII.	Prueba de comparaciones múltiples de TUKEY para las concentraciones celulares de <u>Chaetoceros muelleri</u> con diferentes concentraciones de N/P al cuarto (fase exponencial) y séptimo día (fase estacionaria) de crecimiento. Al 95% de confianza.....	18
TABLA IX.	Composición Bioquímica, expresada en pg cél ⁻¹ <u>Chaetoceros muelleri</u> analizada al cuarto (fase exponencial) y séptimo día (fase estacionaria) de su cultivo, utilizando diferentes concentraciones de nitrógeno y fósforo.....	21

LISTA DE FIGURAS

	PAGINA
FIGURA 1. Crecimiento promedio de <u>Chaetoceros muelleri</u> en 16 L de cultivo: a) 25.79:3.09 y b) 19.71:2.31 mg at l ⁻¹ de N:P.....	12
FIGURA 2. Crecimiento promedio de <u>Chaetoceros muelleri</u> en 16 L de cultivo: a) 12.92:1.53 y b) 6.44:0.79 mg at l ⁻¹ de N:P.....	14
FIGURA 3. Crecimiento promedio de <u>Chaetoceros muelleri</u> en 16 L de cultivo: a) 3.22:0.39 y b) 12.23:1.29 (Ctrl) mg at l ⁻¹ de N:P.....	16
FIGURA 4. Composición bioquímica de <u>Chaetoceros muelleri</u> a diferentes concentraciones de nitrógeno y fósforo (mg at l ⁻¹) cosechados durante fase exponencial y estacionaria.....	20

1.- INTRODUCCION

La microalga marina *Chaetoceros muelleri* (LEMMERMAN), es una diatomea céntrica solitaria, perteneciente a la clase Bacillariophyceae. Es de forma rectangular y mide 8-12 X 7-10 micras excluyendo las setas. Es ampliamente utilizada como alimento para larvas protozoa de peneidos y bivalvos (Simon, 1978; Napolitano *et. al.*, 1990).

El cultivo de esta especie, es parte de la biotecnología del crecimiento de moluscos marinos y crustáceos, los cuales requieren de grandes cantidades de biomasa algal para su desarrollo y crecimiento. Sin embargo, la producción de esta biomasa es frecuentemente citada como crítica y ha sido llevada acabo usando nutriente grado reactivo para la formulación clásica de los medios, que presentan un elevado costo de operación (Soeder, 1980; De Pauw *et. al.*, 1983; Fabregas *et al.*, 1985).

Una alternativa para disminuir los costos de producción es la utilización de fertilizantes agrícolas comerciales como sustitutos de los nutrientes químicos grado reactivo para promover el cultivo a gran escala (De Pauw *at. al.*, 1983). Para ello es necesario conocer las concentraciones óptimas de nutrientes, cambios en las tasas de crecimiento y variaciones de la composición bioquímica, cuando se utilizan estos fertilizantes.

Respecto a la composición bioquímica, la concentración total de proteínas, lípidos y carbohidratos en microalgas pueden ser modificadas bajo diferentes condiciones de crecimiento, nutrientes y fases de crecimientos del alga (Webb y Chu, 1982; Fabregas et. al., 1985). Aunque la composición, no es solo el factor que debe ser considerado cuando se estudia el valor nutricional de una especie de fitoplancton, otros factores tales como el tamaño de la célula, digestibilidad y aún su toxicidad han sido sugerida como una explicación del valor nutricional entre diferentes especies (Fernández-Reiriz et. al., 1989).

Un preciso conocimiento de la composición microalgal podría, teóricamente, hacer posible dietas algales específicas para los requerimientos nutricionales de diferentes especies de filtroalimentadores marinos.

Existen pocos estudios sobre cambios en la composición química de Chaetoceros muelleri, con distintas concentraciones de nitrógeno y fósforo, derivados de fertilizantes agrícolas comerciales durante diferentes fases de crecimiento, los datos publicados son usualmente referidos a un punto dado del cultivo (Fabregas et. al., 1985-1986; Utting, 1985; Whyte, 1987). A la luz de este hecho, una evaluación de los fertilizantes sobre el crecimiento y composición de células algales, permitirán

implementar sistemas de cultivos masivos de bajo costo y obtener densidades y calidad celular iguales o mayores a las obtenidas con los métodos tradicionales. Su importancia estriba, en que un aumento en la calidad de producción de microalgas, es directamente proporcional a la producción de semilla de bivalvos y crustáceos.

2.- ANTECEDENTES

El uso de fertilizantes agrícolas para el cultivo de microalgas marinas, se practica desde la segunda guerra mundial. En 1942, grandes volúmenes de algas fueron cultivadas al exterior con fertilizantes de jardinería en estanques de 3,000 galones (Loosanoff y Engle, 1942, Loosanoff, 1951). Este método fue simple y económico. Sin embargo, la composición del fitoplancton fue inconsistente y no adecuada como alimento para larvas y juveniles de moluscos.

Estudios efectuados por González-Rodríguez y Maestrini (1984) indican que el uso de fertilizantes para la producción masiva de algas marinas no estan estandarizadas a nivel mundial en cuanto a su composición de nitrógeno, fósforo, potasio y silice. Estos elementos varían entre marcas de fertilizantes y aún entre lotes del mismo fertilizante.

Se han realizado diversos trabajos encaminados al conocimiento de la variabilidad bioquímica del fitoplancton. Parsons *et. al.*, (1961), realizaron un análisis proximal solo para la fase exponencial para once especies fitoplanctónicas marinas, y reportan que las proteínas se encuentran en mayor cantidad que los materiales de reserva. Además, encuentran que el fitoplancton marino presenta composición orgánica muy similar cuando se desarrollan bajo condiciones químicas y físicas similares, no importando el tamaño o la clase a la cual pertenezca.

La variación en la composición de los medios de cultivos pueden causar cambios en el contenido de microalgas marinas, especialmente en proteínas, lípidos y carbohidratos (Myklestad y Haug, 1972; Parsons y Takahashi, 1973; Shifrin y Chisholm, 1981; Fabregas *et. al.*, 1985, 1986_{a,b}).

Cultivos de microalgas con medios no convencionales basados en fertilizantes agrícolas y extractos de suelo han sido realizados por Fabregas, *et. al.* (1987); Herrero, *et. al.*, (1991) quienes reportan máximas densidades celulares en concentraciones de $14 \mu\text{g N ml}^{-1}$ y máxima concentración de proteínas con $28 \mu\text{g N ml}^{-1}$. Así mismo, los medios no convencionales siempre produjeron mayor biomasa microalgal en comparación de los medios ES-

Provasoli, f/2 y Walne. Parrish y Wangersky (1990), examinaron el crecimiento y composición en clases de lípidos de Chaetoceros gracilis en volúmenes de 250 ml y 200 L. La máxima densidad celular obtenida fue 2×10^6 cél ml⁻¹ y la producción de lípidos fue claramente afectada por la razón de suplemento de nitrógeno. Altas producciones de triglicéridos fueron obtenidos con bajas concentraciones de nitrógeno.

Otros estudios han revelado que el contenido de carbohidratos es generalmente más alto en diatomeas que en fitoflagelados (Whyte, 1987), y que la composición bioquímica y contenido energético depende de la fase de crecimiento en que se encuentre el cultivo. Por otro lado, Fabregas-Reiriz et al., (1989) reportan que el contenido de carbohidratos y lípidos se incrementan con el desarrollo del cultivo, mientras que los niveles de proteínas se incrementan en la última fase del cultivo en el caso de diatomeas y Rhodomonas sp. y disminuye en fitoflageladas.

Estudios sobre la producción de carbohidratos por diatomeas marinas planctónicas en cultivos estáticos bajo seis relaciones atómicas de N/P fueron realizadas por Myklestad (1977). Los resultados mostraron que un incremento en la relación N/P del medio conduce a una

disminución en la razón de proteínas celular a carbohidratos en la fase exponencial. Chaetoceros affinis produce grandes cantidades de polisacaridos extracelular a alta razón de N/P y bajo extremada deficiencia de fósforo, esta producción probablemente constituye la principal actividad fotosintética.

Gallego y Mann (1981), reportan que los carbohidratos son asimilados primeramente por los filtroalimentadores, a su vez Duarte y Andrade (1987), realizaron estudios de maduración de reproductores con Ostraea edulis alimentados a partir de Tetraselmis suecica y almidón de maíz como fuente suplementaria de carbohidratos. Encontraron que la dieta adicional proporcionada en el laboratorio permitió mantener a los organismos en un índice de condición significativamente más alto que los del campo.

A pesar de todo el conocimiento del uso de fertilizantes para el cultivo intensivo de microalgas, todavía se necesitan estudios sobre el efecto de diferentes concentraciones de nitrógeno y fósforo para determinar los requerimientos nutricionales de Chaetoceros muelleri. Así mismo, también se requiere información sobre el efecto de las diferentes condiciones de nitrógeno y fósforo sobre la calidad celular de Chaetoceros muelleri en cultivos estáticos.

3.- OBJETIVO

Conocer bajo que concentraciones de nitrógeno y fósforo se obtiene la mejor respuesta en crecimiento y calidad celular de Chaetoceros muelleri en cultivos estáticos, con relación al medio f/2.

4.0.- MATERIALES Y METODOS

4.1.- CULTIVO DE MICROALGAS

La microalga marina Chaetoceros muelleri, ha sido mantenida en la colección de cultivos de laboratorio de producción de microalgas del Instituto de Investigaciones Oceanológicas fue utilizada para los experimentos.

El cultivo se llevó a cabo en un laboratorio a temperatura controlada, $20 \pm 1^\circ\text{C}$. El medio utilizado en las dos primeras etapas fue el desarrollado por Guillard (1975). La secuencia del cultivo general se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo cada uno 150 ml de medio con agua de mar filtrada como lo mencionan Islas-Olivares et.al., (1978), continuandose en Fernbach con capacidad de 2.8 L, con volumen de medio de 1.5 L. Estos se esterilizaron en autoclave a 121°C y 15 lb/pulg² de presión durante 10 minutos. Cada Erlenmeyer se inoculó con 7 ml de cepa de Chaetoceros muelleri, para posteriormente transferir 150 ml del cultivo a los

Fernbach bajo condiciones controladas. Los cultivos en Erlenmeyer y Fernbach crecieron en iluminación continua a una irradiancia de 82.70 y 174.37 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ respectivamente, proporcionadas por lámparas fluorescentes Sylvania de 45 y 75 watts.

Al cuarto día, se realizó la transferencia del cultivo logrado en Fernbach a recipientes de 20 L (Carboy) de capacidad, con 16 L de medio de cultivo; previamente desinfectados por el método de Pruder y Bolton (1978). Se inocularon con 1.5 L de cultivo bajo las mismas condiciones descritas con anterioridad. En esta etapa, se suministró un flujo de aire de 7.5 l min^{-1} (Flujómetro Gilmont), mediante un compresor de aire seco (Conde 12), y fueron expuestos a una irradiancia de 199.20 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ proporcionadas por lámparas fluorescentes Sylvania de 75 watts.

En los Carboy antes mencionados, se experimentó con fertilizantes agrícolas comerciales (FERTIMEX) utilizando cinco concentraciones diferentes de nitrógeno y fósforo.

Los medios experimentales se realizaron por duplicado y se compararon con el control (f/2 de Guillard, 1975). Las concentraciones utilizadas se describen en la tabla I.

TABLA I Concentraciones de Nitrógeno y Fósforo derivados de fertilizantes agrícolas y de jardinería. Utilizando el f/2 como control (NaNO_3 y NaH_2PO_4).

Tratamiento	Fuente de N	Conc. mg at N l ⁻¹	Fuente de P	Conc. mg at P l ⁻¹	Razón N/P
A1	NH_4NO_3	25.79	P_2O_5	3.09	8.35
A2	NH_4NO_3	19.71	P_2O_5	2.31	8.53
A3	NH_4NO_3	12.92	P_2O_5	1.53	8.44
A4	NH_4NO_3	06.44	P_2O_5	0.79	8.15
A5	NH_4NO_3	03.22	P_2O_5	0.39	8.21
f/2 (Ctrl)	NaNO_3	12.35	NaH_2PO_4	1.29	9.57

Cuantificación de células: Se estimaron con un espectrofotómetro Spectronic 21 a una longitud de onda de 675 nm (Sorokin, 1973). Para lo cual se realizó previamente una curva de calibración mediante conteos directos en una cámara Neubauer de 0.1 mm de profundidad. La tasa de crecimiento (μ), duplicaciones por día (D), tiempo de Duplicación (TD) y producción diaria se calculó de acuerdo a Guillard (1973). Se llevaron registros de temperatura (termómetro ERTCO con escala de -10 a 260°C) y pH (potenciómetro ALTEX).

4.2.- ANALISIS QUIMICO

Los cultivos en Carboy se cosecharon al cuarto día (fase exponencial), y al séptimo día (Fase estacionaria). de los cuales se filtraron 250 ml de muestra de densidad celular conocida a través de filtros de fibra de vidrio Gelman A/E (1 μ) previamente incinerados a 450°C durante

24 Horas, que fueron analizádos inmediatamente de acuerdo a las fases de crecimiento correspondiente.

Para la determinación de proteínas, lípidos y carbohidratos, se realizaron curvas estandares utilizando: Seroalbúmina bovina (proteínas), D-glucosa (carbohidratos) y ácido esteárico (lípidos) (Platt y Brian, 1973). Tales determinaciones se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Busch y Lomb Spectronic 2000.

Las proteínas fueron extraídas de acuerdo al procedimiento descrito por Rausch (1981), y cuantificadas por el método de Bradford (1976). Para Carbohidratos se utilizó el fenol sulfúrico descrito por Kocher (1978), previa hidrólisis de la muestra con 10 ml de ácido sulfúrico 2 N. La cuantificación de lípidos se estimó por el método de Pande et. al., (1963), la extracción se realizó de acuerdo a Brigh y Dyer (1959).

Las pruebas estadísticas para la determinación de diferencias significativas al 95 % de confianza en el crecimiento poblacional fue, un ANOVA de una vía y la prueba a posteriori de Tukey (Comparaciones múltiples) para encontrar en que tratamientos había diferencias. Para el contenido bioquímico, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis y una prueba a posteriori de Tukey (comparaciones múltiples) no paramétrica (Zar, 1984) para encontrar cuales tratamientos difieren entre sí.

5.0.- RESULTADOS

5.1.- CULTIVO DE MICROALGAS

La microalga fitoplanctónica Chaetoceros muelleri se cultivó a una temperatura promedio de $20 \pm 1^\circ\text{C}$. La salinidad se mantuvo en 32 o/oo. El pH en los cultivos tuvo un promedio de 8.7, un mínimo 8.2 y 9.5 como máximo. En estas condiciones el crecimiento de Chaetoceros muelleri con las distintas concentraciones de nitrógeno y fósforo, indican la presencia de la fase de retardo en los cultivos (Figuras 1, 2, 3). Después de la cual, las células entran al ciclo de crecimiento exponencial, el cual dura hasta el cuarto día de cultivo, denotándose una disminución en la producción a partir de este día. Al variar la concentración de N/P, el tratamiento de menor concentración (A5) registró la densidad celular más baja y fue estadísticamente diferente ($P > 0.05$) al resto de los tratamientos durante su ciclo exponencial de crecimiento (tabla VIII). Para la fase estacionaria se encontró que los tratamientos: A4 comparado con el A3 y el control (f/2) no difieren estadísticamente entre sí. Las concentraciones de nitrógeno y fósforo que producen las máximas densidades celulares fueron: 25.79/3.09; 19.71/2.31 y 12.92/1.53 mg at l^{-1} de N/P las cuales generaron 4,438,825; 4,478,962 y 4,148,265 cél ml^{-1} respectivamente (Figuras 1,2; Tablas II,III,IV) además no

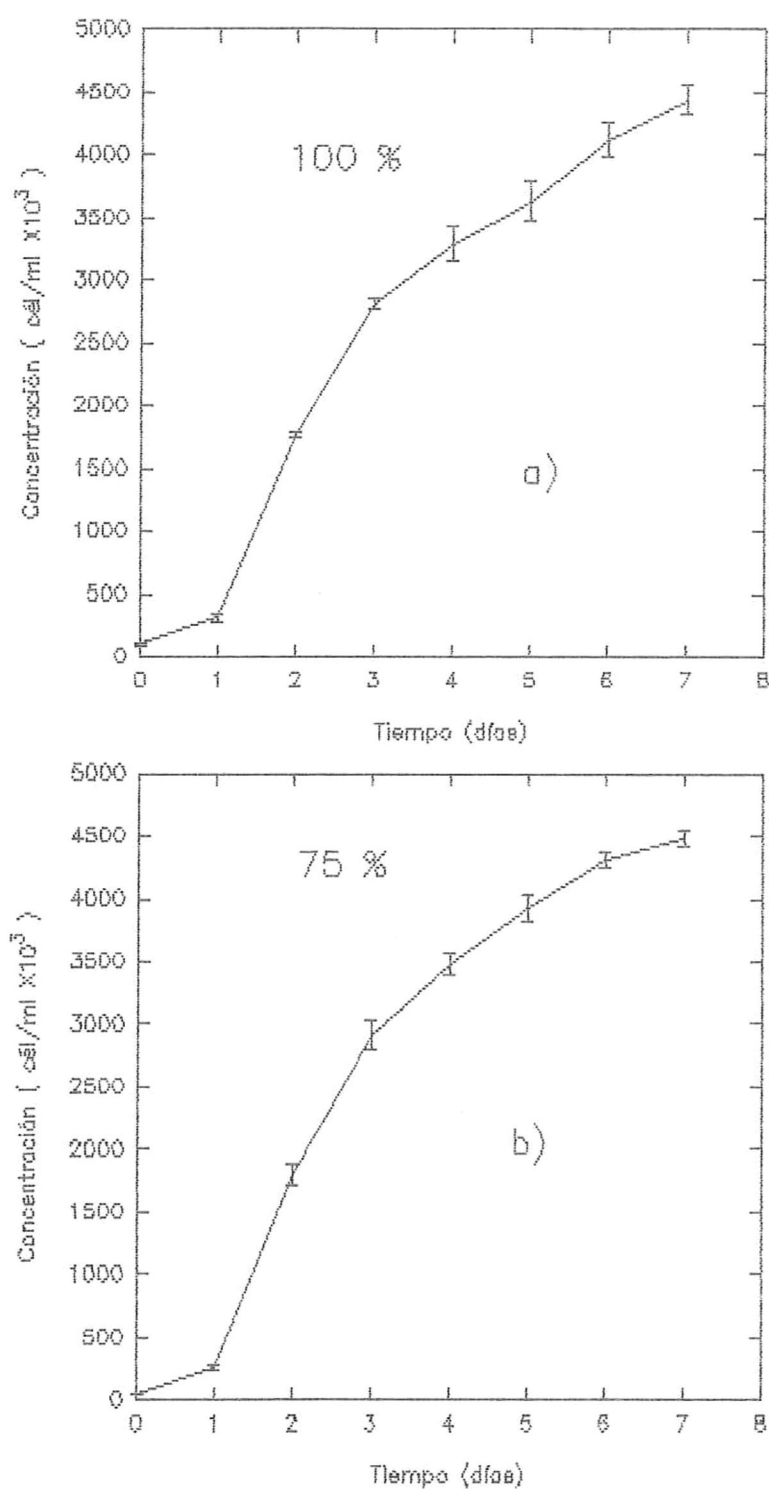


Fig. 1.— Crecimiento promedio de *Chaetoceros muelleri* en 16 litros de cultivo: a) 25.79:3.09 y b) 19.71:2.31 mg at l^{-1} de N:P. Las barras indican el error estandar.

TABLA II. Parámetros de crecimiento promedio de Chaetoceros muelleri en 16 L de cultivo con 25.79:3.09 mg at l⁻¹ de nitrógeno y fósforo.

TIEMPO (días)	CONC (cél/ml)	μ	TD (días)	D (div/día)	PD (cél/ml)
0	97 016	--	--	--	
1	312 536	1.170	0.592	1.688	215 520
2	1 766 640	1.732	0.400	2.499	1 454 104
3	2 811 955	0.465	1.491	0.671	1 045 315
4	3 290 113	0.157	4.415	0.227	478 158
5	3 624 735	0.097	7.146	0.140	334 622
6	4 111 618	0.126	5.501	0.180	486 883
7	4 438 825	0.077	9.002	0.111	327 207
PROMEDIOS		0.546	4.078	0.778	

TABLA III. Parámetros de crecimiento promedio de Chaetoceros muelleri en 16 L de cultivo con 19.71:2.31 mg at l⁻¹ de nitrógeno y fósforo.

TIEMPO (Días)	CONC (cél/ml)	μ	TD (días)	D (div/día)	PD (cél/ml)
0	48 589	--	--	--	--
1	268 908	1.711	0.405	2.468	220 319
2	1 798 052	1.900	0.365	2.741	1 529 144
3	2 908 372	0.481	1.441	0.695	1 110 320
4	3 481 201	0.180	3.851	0.260	572 829
5	3 930 128	0.121	5.728	0.175	448 927
6	4 315 359	0.094	7.374	0.136	385 231
7	4 478 962	0.037	18.734	0.053	163 603
PROMEDIOS		0.646	5.414	0.932	

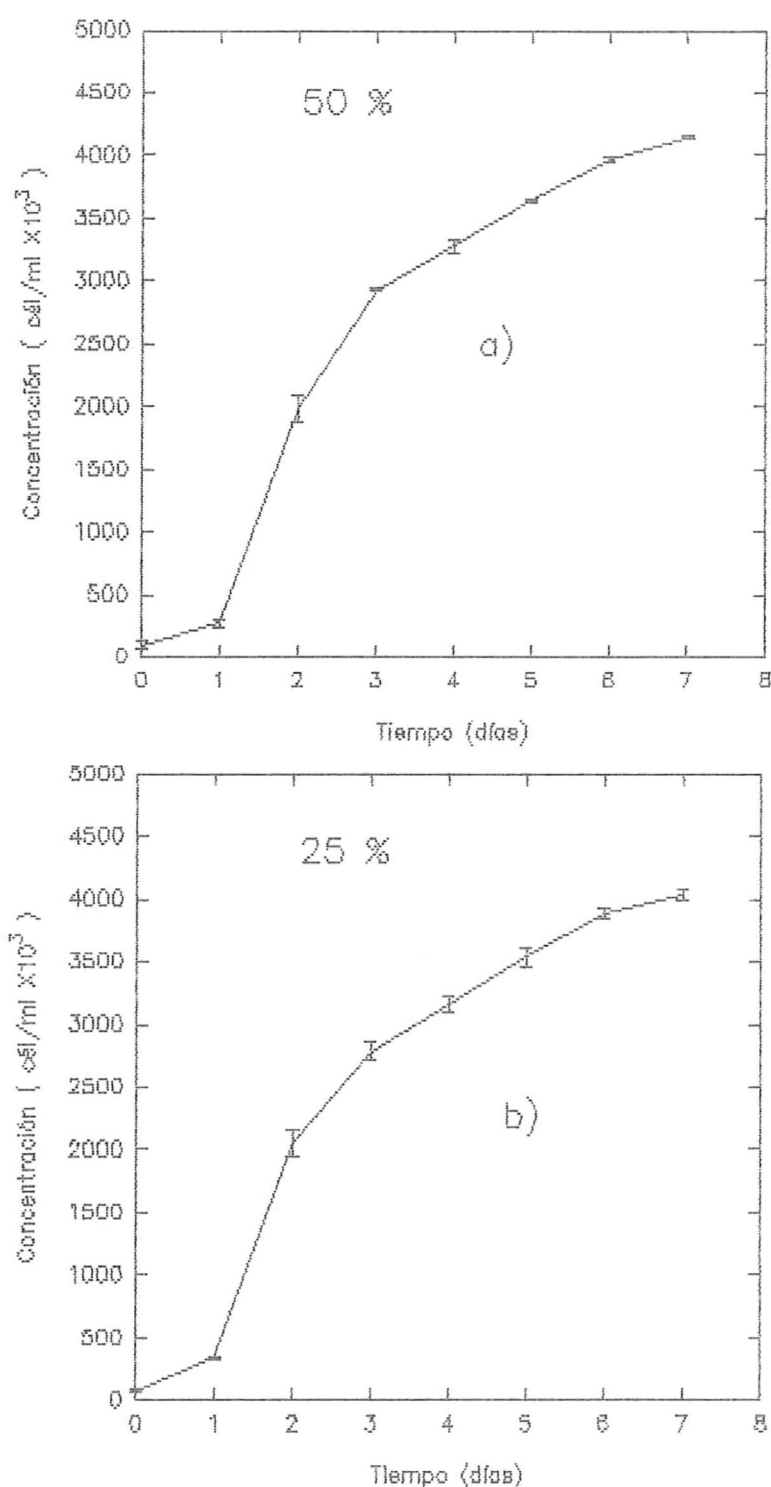


Fig. 2.- Crecimiento promedio de *Chaetoceros muelleri* en 16 litros de cultivo: a) 12.92:1.53 y b) 6.44:0.79 mg at l^{-1} de N:P. Las barras indican el error estandar

TABLA IV. Parámetros de crecimiento promedio de Chaetoceros muelleri en 16 L de cultivo con 12.92:1.53 mg at l⁻¹ de nitrógeno y fósforo.

TIEMPO (días)	CONC (cél/ml)	μ	TD (días)	D (div/día)	PD (cél/ml)
0	96 579	--	--	--	--
1	268 908	1.024	0.677	1.477	172 329
2	1 990 013	2.002	0.346	2.888	1 721 105
3	2 932 367	0.388	1.786	0.560	942 354
4	3 279 206	0.112	6.188	0.162	346 839
5	3 639 568	0.104	6.665	0.150	360 362
6	3 966 339	0.086	8.060	0.124	326 771
7	4 148 265	0.048	14.441	0.070	181 926
PROMEDIOS		0.538	5.452	0.776	

TABLA V. Parámetros de crecimiento promedio de Chaetoceros muelleri en 16 L de cultivo con 6.44:0.79 mg at l⁻¹ de nitrógeno y fósforo.

TIEMPO (días)	CONC (cél/ml)	μ	TD (días)	D (div/día)	PD (cél/ml)
0	76 947	--	--	--	--
1	338 712	1.482	0.468	2.138	261 765
2	2 051 091	1.801	0.385	2.598	1 712 379
3	2 785 778	0.306	2.265	0.441	734 687
4	3 157 049	0.125	5.545	0.180	371 271
5	3 534 862	0.113	6.134	0.163	377 813
6	3 886 064	0.095	7.297	0.137	351 202
7	4 031 780	0.037	18.734	0.053	145 716
PROMEDIOS		0.565	5.833	0.816	

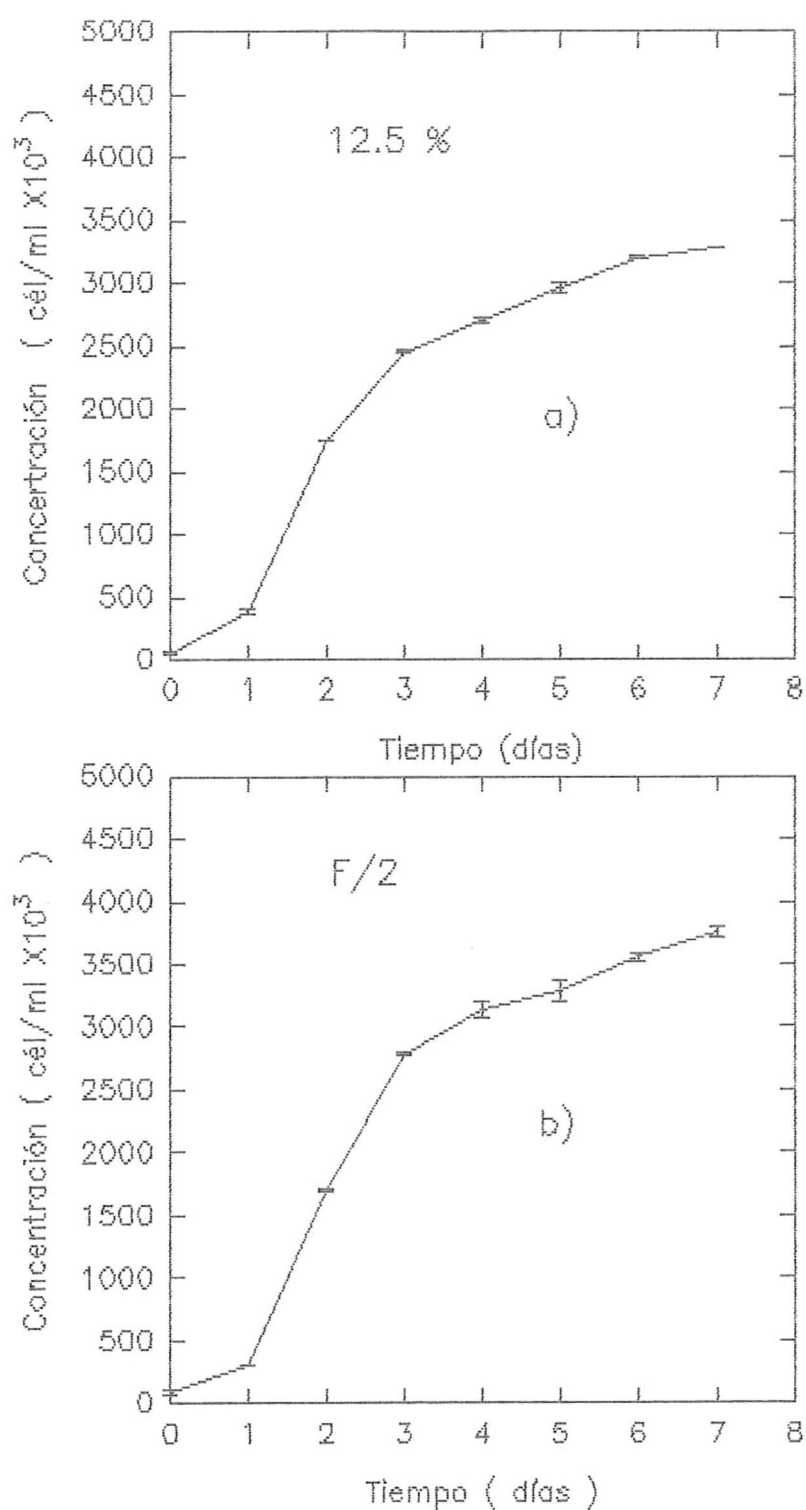


Fig. 3.- Crecimiento promedio de *Chaetoceros muelleri* en 16 litros de cultivo: a) 3.22:0.39 y b) 12.36:1.29 (Ctrl) mg at l^{-1} de N:P. Las barras indican el error estandar.

TABLA VI. Parámetros de crecimiento promedio de Chaetoceros muelleri en 16 L de cultivo con 3.22:0.39 mg at l⁻¹ de nitrógeno y fósforo.

TIEMPO (días)	CONC (cél/ml)	μ	TD (días)	D (div/día)	PD (cél/ml)
0	51 282	--	--	--	--
1	388 884	2.026	0.342	2.923	337 602
2	1 751 370	1.505	0.461	2.171	1 362 486
3	2 457 700	0.339	2.045	0.489	706 330
4	2 701 141	0.094	7.374	0.136	243 441
5	2 970 759	0.095	7.296	0.137	269 618
6	3 202 857	0.075	9.242	0.108	232 098
7	3 281 387	0.024	28.881	0.035	78 530
PROMEDIOS		0.594	7.949	0.857	

TABLA VII. Parámetros de crecimiento promedio de Chaetoceros muelleri en 16 L de cultivo con 12.35:1.29 mg at l⁻¹ de nitrógeno y fósforo (control).

TIEMPO (días)	CONC (cél/ml)	μ	TD (días)	D (div/día)	PD (cél/ml)
0	97 016	--	--	--	--
1	301 628	1.134	0.611	1.636	204 612
2	1 702 508	1.731	0.400	2.497	1 400 880
3	2 782 734	0.491	1.412	0.708	1 080 226
4	3 137 416	0.120	5.775	0.173	354 682
5	3 290 112	0.040	14.441	0.069	152 696
6	3 561 912	0.079	8.774	0.114	271 800
7	3 759 544	0.054	12.836	0.078	197 632
PROMEDIOS		0.521	6.321	0.753	

TABLA VIII. Prueba de comparaciones múltiples de TUKEY para las concentraciones celulares de *Chaetoceros muelleri* con diferentes tratamientos de N/P al cuarto (fase exponencial) y séptimo día (fase estacionaria) de crecimiento. al 95% de confianza.

(fase exponencial)

TRATAMIENTOS	A1	A2	A3	A4	A5	F/2 (Ctrl)
A1	---					
A2	NS	---				
A3	NS	NS	---			
A4	NS	NS	NS	---		
A5	S	S	S	S	---	
f/2 (ctrl)	NS	NS	NS	NS	S	---

(fase estacionaria)

TRATAMIENTOS	A1	A2	A3	A4	A5	F/2 (ctrl)
A1	---					
A2	NS	---				
A3	NS	NS	---			
A4	S	S	NS	---		
A5	S	S	S	S	---	
f/2 (ctrl)	S	S	S	NS	S	---

A1 (25.79:3.09), A2 (19.71:2.31), A3 (12.92:1.53),
 A4 (06.44:0.79), A5 (03.22:0.39) y f/2 (12.35:1.29),
 la letra y el numero indica la concentracion expresada en
 mg at l⁻¹ de N:P para cada tratamiento.

difieren estadisticamente entre sí. Densidades celulares de 4,031,780 y 3,281,387 cél ml⁻¹ fueron obtenidas con los tratamientos A4 y A5 respectivamente (Figuras 2, 3: Tablas V,VI). El medio control f/2 produjo una densidad celular de 3,759,544 cél ml⁻¹, la cual es menor que la mayoria de los tratamientos experimentales, excepto para

el experimento A5 cuya concentración celular fue menor que aquella obtenida con el control f/2 de Guillard.

La máxima tasa de crecimiento promedio y divisiones por día ($\mu=0.64$; $0.93 \text{ div. día}^{-1}$), se obtuvieron con el tratamiento A2 (Figura 1b, Tabla III). Para el cultivo con el medio A1 la tasa de crecimiento promedio fue $\mu=0.54$ con $0.78 \text{ div. día}^{-1}$ (Tabla II). Estos últimos valores principalmente la tasa de crecimiento promedio fueron similares para todos los tratamientos (Tablas II-VII). Para el experimento A5 se registró un máximo crecimiento en las primeras 24 horas ($\mu=2.026$ y $D=2.9$) en cambio, para el resto de los experimentos el máximo crecimiento ocurrió hasta las 48 Horas (Figuras 1,2,3; Tablas II-VII). Por otro lado, es importante señalar que las tasas de crecimiento empiezan a disminuir a partir del cuarto día y el tiempo de duplicación aumenta. En todas las concentraciones ensayadas incluyendo al control f/2 se obtuvo la máxima producción diaria en el segundo día del ciclo de crecimiento.

5.2.-COMPOSICION BIOQUIMICA

La figura 4 y tabla IX muestra los resultados de la composición bioquímica (proteínas, lípidos y carbohidratos) de Chaetoceros muelleri ensayadas durante dos periodos de crecimiento con diferentes

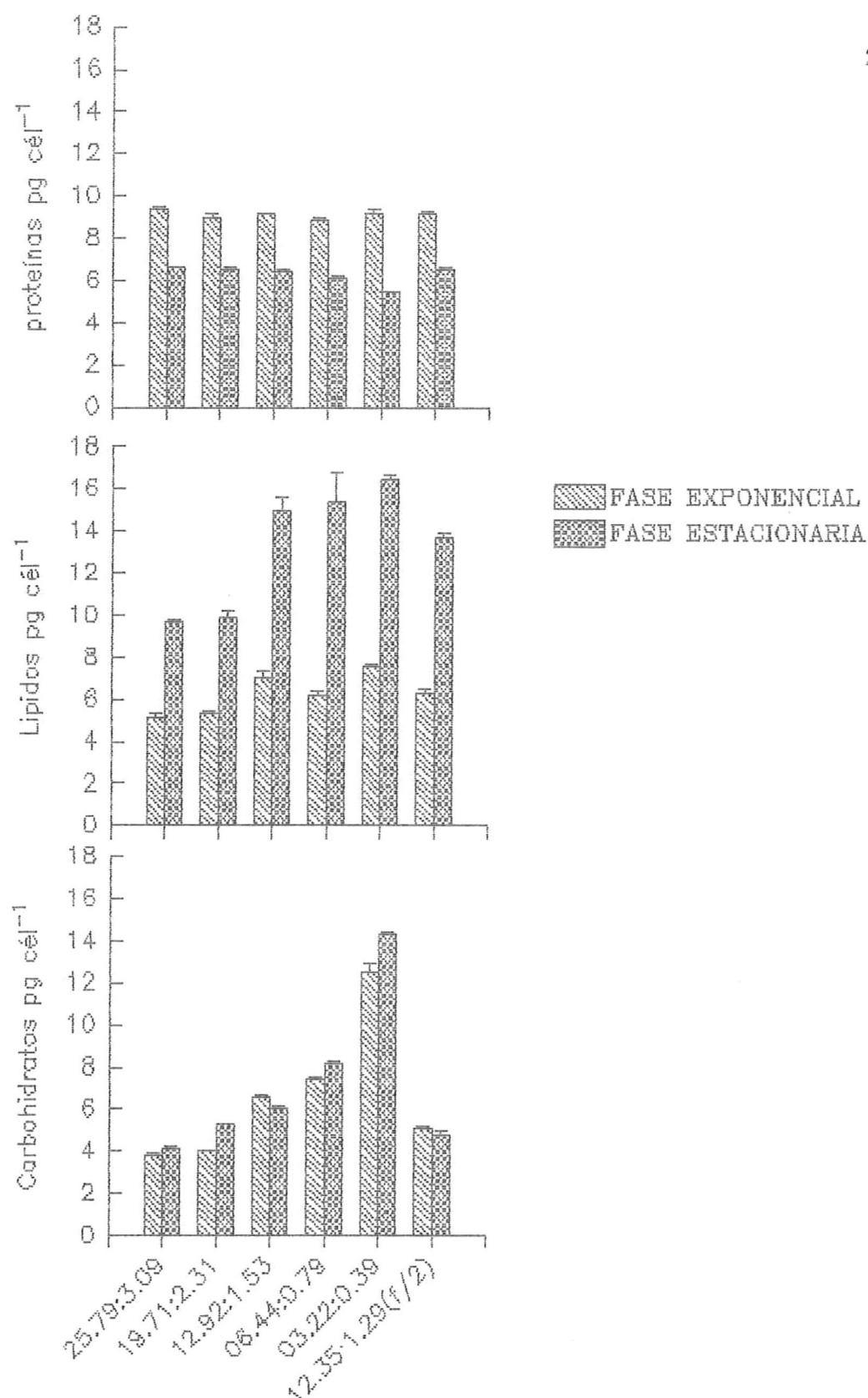


Fig. 4.— Composición bioquímica de *Chaetoceros muelleri* a diferentes concentraciones de nitrógeno y fósforo (mg at L⁻¹) cosechados durante fase exponencial y estacionaria.

TABLA IX. Composición Bioquímica, expresada en pg cél⁻¹ de Chaetoceros muelleri analizada al cuarto (fase exponencial) y séptimo día (fase estacionaria) de su cultivo, utilizando diferentes concentraciones de nitrógeno y fósforo. Los parentesis indican el error estandar.

TRAT.	CONC DE N/P mg at l ⁻¹	TIEMPO DE COSECHA (día)	PROTEINAS (pg/cél)	LIPIDOS (pg/cél)	CARBOH. (pg/cél)
A1	25.79:3.09	4	9.39 (0.079)	5.16 (0.154)	3.85 (0.044)
A1		7	6.62 (0.056)	9.64 (0.148)	4.17 (0.015)
A2	19.71:2.31	4	9.01 (0.126)	5.31 (0.077)	4.00 (0.041)
A2		7	6.55 (0.040)	9.86 (0.353)	5.27 (0.045)
A3	12.92:1.53	4	9.15 (0.030)	7.04 (0.257)	6.58 (0.046)
A3		7	6.40 (0.084)	14.98 (0.603)	6.01 (0.166)
A4	06.44:0.79	4	8.89 (0.070)	6.18 (0.222)	7.39 (0.123)
A4		7	6.14 (0.081)	15.44 (1.338)	8.12 (0.101)
A5	03.22:0.39	4	9.22 (0.179)	7.54 (0.148)	12.52 (0.412)
A5		7	5.42 (0.061)	16.46 (0.163)	14.28 (0.089)
f/2	12.35:1.29	4	9.15 (0.107)	6.31 (0.220)	5.13 (0.039)
f/2(Control)		7	6.65 (0.073)	13.66 (0.240)	4.79 (0.173)

concentraciones de nitrógeno y fósforo. En la fase exponencial (cuarto día) el contenido de proteínas con las distintas concentraciones de nitrógeno y fósforo registró un valor máximo de 9.39 pg cél⁻¹ con una concentración de 25.79:3.09 mg at L⁻¹ de N/P (A1). En las demás concentraciones ensayadas el contenido de proteínas varió entre 8.89-9.22 pg cél⁻¹. El análisis estadístico (Kruskal-Wallis) mostró que no hubo diferencias significativas (P>0.05) en el contenido de proteínas de Chaetoceros muelleri para esta fase de cultivo. A su vez,

los lípidos y carbohidratos registraron valores máximos de 7.54 y 12.52 pg cél⁻¹ para el tratamiento A5, disminuyendo hasta 5.16 y 3.85 pg cél⁻¹ en la concentración más elevada de nitrógeno y fósforo. Estos constituyentes son estadísticamente significativos ($P > 0.05$) (Apéndice I).

Al final del período del cultivo (fase estacionaria) el contenido de proteínas disminuyó y registró valores entre 6.62 y 5.42 pg cél⁻¹ (Figura 4, Tabla IX) que corresponden a la concentración de nutrientes máximas y mínimas (A1 y A5) respectivamente. Estadísticamente hubo diferencias ($P > 0.05$) entre estas dos concentraciones de proteínas (Apéndice II). En contraste, los niveles de lípidos y carbohidratos tienden a incrementarse al utilizar concentraciones bajas de nitrógeno y fósforo, denotándose valores máximos de 16.46 y 14.28 pg cél⁻¹ con la concentración del tratamiento A5. En cambio disminuyen hasta 9.64 y 4.17 pg cél⁻¹ con el experimento de concentración mayor (figura 4, tabla IX). Estos niveles de lípidos y carbohidratos muestran diferencias significativas (Apéndice II), para las concentraciones máximas y mínimas antes citadas. Sin embargo, para el tratamiento A3 y su alterno f/2 de Guillard no mostraron diferencias significativas ($P > 0.05$) para proteínas, lípidos y carbohidratos en las dos fases de crecimiento experimentales (Apéndice I, II).

6.0.- DISCUSIONES

6.1.- CRECIMIENTO POBLACIONAL

Todos los parámetros del cultivo se mantuvieron constantes, dado que la variación de más de un parámetro produce una interrelación en la respuesta microalgal. Por ejemplo, la asimilación de nitrógeno en forma de nitrato y amonio es afectada por la salinidad (Dohler y Biermann, 1985), en este trabajo la salinidad se mantuvo constante en 32 o/oo la cual está por arriba del intervalo óptimo para *Chaetoceros muelleri* (Liao, et al., 1983). La luz se mantuvo a un nivel de saturación. Esta puede tener efectos secundarios sobre la producción primaria como un agente modificador de los requerimientos nutricionales, además, influye en el proceso de fotosíntesis (Wynne y Rhee, 1986). En todos los niveles de cultivo, el medio fue amortiguado con TRIS y el pH promedio fue 8.7 el cual está dentro del intervalo óptimo para esta especie.

Los resultados obtenidos de la experimentación para la fase exponencial indicaron que el tratamiento de menor concentración (Tabla VI) registró una densidad celular menor al resto de los ensayos; del mismo modo, presentó diferencias significativas (Tabla VIII). Esta diferencia probablemente se deba a la deficiencia de N/P que forman parte de los macroelementos limitantes de medio de cultivo para el desarrollo algal. En base al concepto de Droop (1975), en cultivos estáticos, la tasa de

crecimiento disminuye o cesa cuando el abastecimiento de nutrientes es escaso para las necesidades metabólicas de la población algal, la población entra posteriormente a la fase estacionaria del ciclo de crecimiento. En este estudio los intervalos de concentración de N/P (Tabla I) variaron notablemente para el cultivo de Chaetoceros muelleri, denotandose una disminución en la tasa de crecimiento conforme la relación de N/P disminuye (Tabla V, VI, VII). Así mismo, la biomasa microalgal al séptimo día del cultivo, fue afectada por la concentración de nutrientes (N/P) solo para aquellos experimentos cuya concentración estuvo por debajo del tratamiento A3. Estudios de limitación de nutrientes realizados por Ryther y Dunstan (1971) y Rhee (1978) demuestran que la proporción óptima de N:P varía de 5 a 30, arriba de la cual las tasas de crecimiento son limitadas por P y por debajo de la cual el N es el factor limitante.

Los resultados, mostraron que la producción de Chaetoceros muelleri se incrementa conforme aumenta la concentración de nitrógeno y fósforo en el intervalo ensayado. Con un máximo de 4,478,962 cél ml⁻¹ cuya tasa de crecimiento promedio fue 0.64 y 0.93 duplicaciones por día (figura 1b, Tabla III). Este resultado es mayor al obtenido por Parrish y Vangersky (1990) quienes obtienen valores de crecimiento que oscilan entre 0.3×10^6 y 2×10^6 cél ml⁻¹ en cultivos estáticos y continuos. Así

mismo, la producción resultante de las diferentes concentraciones ensayadas son superiores a los obtenidos con el medio control (f/2 de Guillard, 1975). La diferencia quizá se debe a que el medio control contiene iones NO_3^- los cuales son reducidos por procesos enzimáticos hasta NH_4^+ antes de incorporarlo en los aminoácidos. En cambio cuando el amonio está presente en el medio, las algas no invierten energía (Syrett, 1981). Estudios realizados por Lui y Roels (1972), demuestran que la tasa de asimilación del amonio es 2.3 a 2.4 veces más rápido que los nitratos y nitritos. A su vez, cuando se utilizan formas combinadas de nitrógeno (NH_4NO_3), concentraciones por arriba de $0.5\text{-}1.0 \mu\text{moles L}^{-1}$ el amonio es preferentemente consumido por la microalga (Darley, 1987).

6.2- COMPOSICION QUIMICA

Los resultados de la composición bioquímica de *Chaetoceros muelleri* con las diferentes concentraciones de nitrógeno y fósforo en las distintas fases de crecimiento del cultivo mostraron dos tendencias generales; una en la cual, el contenido de proteínas para la fase exponencial presentó sus valores máximos comprendidos entre 8.89 y $9.39 \text{ pg } \text{cél}^{-1}$. En cambio el contenido de carbohidratos y lípidos para esta fase es

menor que el contenido de proteínas (Figura 4, Tabla IX). Esta tendencia, concuerda con datos reportados por Flaak y Epifanio (1978); Whyte (1987) quienes demuestran que los cultivos en fase exponencial contiene más proteínas y menos carbohidratos y lípidos.

Por otro lado, el contenido de carbohidratos y lípidos tienden a incrementarse con el desarrollo del cultivo (Fase estacionaria), con valores máximos de 14.28 pg cél⁻¹ para carbohidratos y 16.46 pg cél⁻¹ para lípidos (Figura 4, Tabla IX), seguido por una disminución en el contenido de proteínas en todas las concentraciones estudiadas.

Estos cambios en los constituyentes bioquímicos, obedecen a cambios en la concentración de nitrógeno y fósforo, ya que, la vía metabólica de producción de carbohidratos y lípidos son inhibidos o cambiados por la síntesis de proteínas. Cuando la concentración de nitrógeno no es limitante para el crecimiento algal, la síntesis de proteína toma lugar, y toda la energía que es producto de la fotosíntesis es canalizada al crecimiento y producción de Chaetoceros muelleri (Milner, 1953; Antia *et al.*, 1963; Myklestad 1974) En cambio cuando existe deficiencia de nitrógeno y fósforo las células permanecen metabólicamente activas y, aunque no se dividen, frecuentemente continúan fijando carbono, y la energía es dirigida a la acumulación de productos de reserva en

forma de lípidos y carbohidratos. Este hecho también ha sido observado por Myklestad (1974;1977); Wikfors (1986) quienes al utilizar diferentes concentraciones de nitrógeno y fósforo obtienen diferencias en el contenido de proteínas y carbohidratos en Chaetoceros affinis, Dunaliella tertiolecta y Tetraselmis maculata. Por otro lado, Parrish y Wangersky (1990) encuentran un contenido de lípidos de 2.11 ± 0.28 pg cél⁻¹ para la fase exponencial e indican que el efecto principal de limitación por nitrógeno se traduce en un cambio mayor en la producción de productos de reserva (lípidos). Esta información concuerda con los datos encontrados en este trabajo.

La variación en la composición bioquímica de Chaetoceros muelleri, en cultivos estáticos, está estrechamente relacionado con cambios en la concentración de nutrientes. El contenido de proteínas mostró diferencias solo para el tratamiento A5 en la fase exponencial del cultivo. Este dato en general concuerda con aquellos de otros autores quienes encuentran que el contenido de proteínas disminuye a concentraciones baja de nutriente en la fase exponencial (Fabregas et al., 1975). Sin embargo, los valores reportados en este trabajo son mayores que aquellos obtenidos por Utting (1975) quien reporta 7.10, 2.07 y 2.98 pg cél⁻¹ de proteínas, lípidos y carbohidratos respectivamente, aunque sus valores hacen referencia a Chaetoceros

calcitras. Mykestad y Haug (1972) encuentran $0.2 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$ de prote\i{nas} y $0.11 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$ de carbohidratos en Chaetoceros affinis en la fase de crecimiento exponencial del medio f/2. Por su parte Concepci3n Herrero (1991) experiment3 el medio algal-1, con nutriente comercial y encontr3 para Phaeodactylum tricornutum un valor de prote\i{nas} de $4.20 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$; para l\i{pidos} $5.98 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$ y carbohidratos $5.79 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$ en la fase estacionaria, estos valores son inferiores a los encontrados en el presente trabajo para la fase de crecimiento exponencial.

Las concentraciones celulares m\i{aximas} (Figura 1a, b; Tabla II; III) y el contenido de constituyentes principales de Chaetoceros muelleri, se obtuvo en las concentraciones comprendidas entre los experimentos A2-A3. Estos tratamientos generaron una calidad celular balanceada en constituyentes, en comparaci3n con aquellas obtenidas con el medio control (f/2) donde existi3 una variaci3n notoria en el contenido de l\i{pidos} para la fase estacionaria del cultivo. Esta informaci3n sugiere que el conocer la composici3n bioqu\i{mica} por c\acute{e}lula en diferentes momentos del crecimiento, es un factor determinante en el uso de Chaetoceros muelleri para la alimentaci3n de organismos en sistemas de producci3n acuacultural.

7.-CONCLUSIONES

- 1.- Concentraciones mayores de 3.22:0.39 mg at L⁻¹ de N/P generan mayor biomasa microalgal que el medio control.
- 2.- El contenido de proteínas en la fase exponencial es mayor que en la estacionaria.
- 3.- El contenido de lípidos y carbohidratos se incrementa en la fase estacionaria.
- 4.- Los lípidos y carbohidratos aumentan cuando disminuye la concentracion de nutrientes.
- 5.- La mejor calidad celular se presenta en la fase exponencial, en la cual el alimento debe ser utilizado para la dieta de larvas de filtroalimentadores marinos.

LITERATURA CITADA

- Antia, N.J., McAllister, C.D., Stephens, T.R. and Strickland, J.D.H., 1963. Further measurements of primary production using a large volume plastic sphere. *Limnol. Oceanogr.*, 8: 166-183.
- Bligh, E.G. y W.J. Dyer, 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal Biochem.*, 72: 248-254.
- Darley, W.M., 1978. *Biología de las algas enfoque fisiológico*. Ed. Limusa, 236 pp.
- De Pauw, N., Jan Verboven y Christine Claus, 1983. Large-scale microalga production for nursery rearing of marine bivalve. *Aquacultural Engineering*, 2: 27-47.
- Dohler, G. y Biermann, I., 1975. Effect of salinity on N-ammonia and N-nitrate assimilation of Bellerophes yucatannensis and Thalassiosira rotula. *Biochem. Biophysiol. Pflanzen*, 180: 589-598.
- Droop, M.R., 1975. The nutrient status of algal cell in batch culture. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 541-555.
- Duarte Moreno, J.H. y R., Andrade., 1987. Determinación del ciclo reproductivo del ostión Europeo (Ostreaa edulis) en bahía de San Quintín, B.C. y bajo condiciones de laboratorio. Tesis de lic. F.C.M., U.A.B.C. 94 pp.
- Fabregas, J. y Herrero, C., 1986. Marine microalgae as a potential source of minerals in fish diets. *Aquaculture*, 51: 237-243.
- Fabregas, J., Herrero, C., Cabezas, B. Abalde, J., 1985. Mass culture and biochemical variability of the marine microalga Tetraselmis suecica Kylin (Butch) with high nutrient concentrations. *Aquaculture*, 49: 231-244.

- Fabregas, J., Herrero, C., Cabezas, B. y Abalde, J., 1986b. Biomass production and biochemical composition in mass cultures of the marine microalga Isochrysis galbana (Parke) at varying nutrient concentration. *Aquaculture*, 53: 101-113.
- Fabregas, J., Herrero, C., Abalde, J., Liao, R. y Cabezas, B., 1986a. Biomass production and biochemical variability of the marine microalga Dunaliella tertiolecta (Butcher) with high nutrient concentrations. *Aquaculture*, 53: 187-199.
- Fabregas, J., Toribio, L., Abalde, J., Cabezas, B. y Herrero, C., 1987. Approach to biomass production of the marine microalga Tetraselmis suecica (Kyllin) Butch using common garden fertilizer and soil extract as cheap nutrient supply in batch cultures. *Aquacultural Engineering*, 6: 141-150.
- Fernández-Reiriz, M.J., Pérez-Camacho, A., Ferreiro, M.J., Blanco, J. Planas, M., Campos, M.J. y Labarta, U., 1989. Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture*, 83: 17-37.
- Flaak, A.R. and Epifanio, C.E., 1978. Dietary protein levels and growth of the oyster Crassostrea virginica. *Mar. Biol.*, 45: 157-163.
- Gallego, S.M. y Mann, R., 1981. The effect of varying carbon/nitrogen ratio in the phytoplankton Thalassiosira pseudonana (3H) on its food value to the bivalve Tapes japonica. *Aquaculture*, 26: 95-105.
- González-Rodríguez, E. y Maestrini, S.Y., 1984. The use of some agricultural fertilizer for the mass production of marine algae. *Aquaculture*, 36: 245-256.
- Guillard, R.R.L., 1973. Division rates. En: *Handbook of Phycological Methods*. Stein, J.R. (ED). Cambridge University press, p. 181-194.
- Guillard, R.R.L., 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: W.L. Smith and M.H. Chanley (Editors), *Culture of marine invertebrate Animals*. Plenum, New York, pp. 29-60.

- Herrero-Concepción, A.C., J. Fabregas y J. Abalde., 1991. Yields in biomass and chemical constituents of four commercially important marine microalgae with different culture media. *Aquacultural Engineering*, 10: 99-110.
- Islas-Olivares, R.V. Gendrop-Funes y M Miranda., 1978. Infraestructura básica para la obtención de larvas (semilla) en baja california. *Ciencias Marinas*, 5 (2): 73-86.
- Kochert, G., 1978. Carbohydrate determination by phenol-sulfuric acid method. En: *Handbook of Physiological and Biochemicals Methods*, Hellebust and Craigie (Ed), Cambridge Univ. Press, Cambridge, p. 96-97.
- Liao, J.C., H.M. Su y J.H. Lin., 1983. Larval goods for penaeid prawns. In: J. McVey (ED), *CRC. Handbook of Mariculture. Vol. I Crustacean Aquaculture*, 43-69.
- Loosanoff, V.L., 1951. Culturing phytoplankton on a large scale. *Ecology*, 32(4): 148-163.
- Loosanoff, V.L. y Engle, J.B. 1942. Use of fertilizer in cultivation of micro-organisms. *Science*, 95: 487-488.
- Lui, N.S.T. y Roels, O.A., 1972. Nitrogen metabolism of aquatic organisms. II. Assimilation of nitrate, nitrite, and ammonia by *Biddulphia aurita*. *Journal of Phycology*, 8: 259-264.
- Milner, H.W., 1953. The chemical composition of algae. In: J.S. Burlew. (Editor), *Algal Culture, from Laboratory to Pilot Plant*. Carnegie Institute Washington Publication No. 600, Washington, DC. pp. 285-302.
- Myklestad, S. y A. Haug, 1972. Production of carbohydrate by the marine diatom *Chaetoceros affinis* Var. *willei* (Gran) Hustedt, J. Effect of the concentration of nutrients in the culture medium. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, Vol. 9, pp. 125-136.
- Myklestad, S., 1974. Production of carbohydrates by marine planktonic diatoms. I. Comparison of nine different species in culture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 15: 261-274.

- Myklestad, S., 1977. Production of carbohydrate by marine planktonic diatoms. II. Influence of the N/P ratio in the growth medium on the assimilation ratio, growth rate, and production of cellular and extracellular carbohydrates by Chaetoceros affinis Var. Willi (Gran) Hustedt and Skeletonema costatum (Grev) Cleve. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., Vol. 29, pp. 161-179.
- Napolitano, G.E., R.G. Ackman y W.M.N. Raynayake., 1990. Fatty acid composition of three cultured algal species (Isochrysis galbana, Chaetoceros gracilis and Chaetoceros Chaetoceros calcitrans) used as food for bivalve larvae. Journal of the World Aquaculture Society, Vol. 21 (2): 122-130.
- Pande, S.V., R. Parvin y A.T. Venkitasubramanian., 1963. Microdetermination of lipids and serum total fatty acids. Analytical Biochemistry, 6: 415-425.
- Parrish, C.C., Wangersky, P.J., 1990. Growth and lipid class composition of the marine diatom, Chaetoceros gracilis, in laboratory and mass culture turbidostats. J. Plankt. Res. 12: 1011-1021.
- Parsons, T.R., K. Stephens y J.D.H. Strickland, 1961. On the chemical composition of eleven species of marine phytoplanktons. J. Fish. Res. Bd Can., Vol. 18, pp. 1001-1016.
- Parsons, T.R., Takahashi, M., 1973. Biological Oceanographic Processes. Pergamon Press, New York.NY, pp. 39-49.
- Platt, Treacor y Brian I., 1973. Caloric content of phytoplankton. Limnology and Oceanography, 18(2) 306-310.
- Pruder, G.D. y E.T. Bolton., 1978. System configuration and performance: Bivalve Molluscan Mariculture. Proceeding of the Ninth Annual Meeting World Mariculture Society. p. 747-759.
- Rausch, T., 1981. The estimation of micro-algal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomass I. Hidrobiologia, 78: 237-251.
- Rhee, G.Y., 1978. Effects of N:P atomic ratio and nitrate limitation on algal, cell composition, and nitrate uptake. Limnol. Oceanogr., 23: 10-25.

- Ryther, J.H. y Dunstan, W.M., 1971. Nitrogen, phosphorus, and eutrophication in the coastal marine environment. *Science*, 171: 1008-1013.
- Shifrin, N.S. y S.W. Chisholm, 1981. Phytoplankton lipids: interspecific difference and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles. *J. Phycol.*, 374-384.
- Simon, C.M., 1978. The culture of the diatom *Chaetoceros gracilis* and its use as a food for peneids protozoal larvae. *Aquaculture*, 14: 105-113.
- Soeder, C.J., 1980. Massive cultivation of microalgae: results and prospects. *Hydrobiologia*, 72: 197-209.
- Syrett, P.J., 1981. Nitrogen metabolism of microalgae. *Cam. Bull. Fish. Aquat. Sci.* 210: 182-210.
- Utting, S.D., 1985. Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular marine algae of commercial importance. *Aquacult. Eng.*, 4: 175-190.
- Webb, K.L. y Chu, F.L., 1982. Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. In: G. Pruder, C.J. Langdon and D.E. Conklin (Editors), *Proceeding of the Second International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition*, 2. Louisiana State University, Baton Rouge, LA, pp. 272-291.
- Whyte, J.N.C., 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture*, 60: 231-241.
- Wikfors, G.H., 1986. Altering growth and gross chemical composition of two microalgal molluscan food species by varying nitrate and phosphate. *Aquaculture*. 59:1-14.
- Wynne, D. y Rhee, G.Y., 1986. Effects of light and quality on relative N and P requirement (The optimum N:P ratio) of marine planktonic algae. *J. Plankton Res.*, 8: 91-103.
- Zar, J.H., 1984. *Bioestatistical Analysis*. Englewood Clift, Prentice Hall. 718 p.

APENDICE I

Prueba de comparaciones múltiples de TUKEY para el contenido Bioquímico de Chaetoceros muelleri en la fase exponencial a diferentes concentraciones de nitrógeno y fósforo; lípidos (L) y carbohidratos (C), con el 95% de confianza

(lípidos)

TRATAMIENTOS	A1	A2	A3	A4	A5	f/2 (ctrl)
A1	---					
A2	NS	---				
A3	S	S	---			L
A4	NS	NS	NS	---		
A5	S	S	NS	NS	---	
f/2 (ctrl)	NS	NS	NS	NS	NS	---

(carbohidratos)

TRATAMIENTOS	A1	A2	A3	A4	A5	f/2 (ctrl)
A1	---					
A2	NS	---				
A3	S	NS	---			C
A4	S	S	NS	---		
A5	S	S	NS	NS	---	
f/2 (ctrl)	NS	NS	NS	NS	S	---

A1 (25.79:3.09), A2 (19.71:2.31), A3 (12.92:1.53),
A4 (06.44:0.79), A5 (03.22:0.39) y f/2 (12.35:1.29),
la letra y el número indica la concentración expresada en
mg at l⁻¹ de N:P para cada tratamiento.

APENDICE II

Prueba de comparaciones múltiples de TUKEY para el contenido Bioquímico de *Chaetoceros muelleri* en la fase estacionaria a diferentes concentraciones de nitrógeno y fósforo: proteínas (P), lípidos (L) y carbohidratos (C), con el 95% de confianza

(proteínas)

TRATAMIENTOS	A1	A2	A3	A4	A5	f/2 (ctrl)
A1	---					
A2	NS	---				
A3	NS	NS	---			P
A4	NS	NS	NS	---		
A5	S	S	NS	NS	---	
f/2 (ctrl)	NS	NS	NS	NS	S	---

(lípidos)

TRATAMIENTOS	A1	A2	A3	A4	A5	f/2 (ctrl)
A1	---					
A2	NS	---				
A3	S	S	---			L
A4	S	S	NS	---		
A5	S	S	NS	NS	---	
f/2 (ctrl)	NS	NS	NS	NS	NS	---

(carbohidratos)

TRATAMIENTOS	A1	A2	A3	A4	A5	f/2 (ctrl)
A1	---					
A2	NS	---				
A3	S	NS	---			C
A4	S	NS	NS	---		
A5	S	S	NS	NS	---	
F/2 (ctrl)	NS	NS	NS	NS	S	---

A1 (25.79:3.09), A2 (19.71:2.31), A3 (12.92:1.53),
 A4 (06.44:0.79), A5 (03.22:0.39) y f/2 (12.35:1.29),
 la letra y el numero indica la concentracion expresada en
 mg at l⁻¹ de N:P para cada tratamiento.