



# UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

**CULTIVO DE LA MICROALGA Tetraselmis suecica  
KYLIN (1935) BUTCHER ALIMENTADA CON  
DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NITROGENO**

**CURSO DE TITULACION  
" BIOLOGIA MARINA "**



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

**CARMEN ANDREA FERNANDEZ SERRANO**

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MARZO DE 1988.

## RESUMEN.

Se llevó a cabo un experimento en el que se cultivó durante diez días la microalga Tetraselmis suecica, con la finalidad de conocer su variación en crecimiento bajo diferentes concentraciones de nitrógeno.

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

Se varió la concentración de nitrógeno, bajo las concentraciones de 75 mg/l a 67.5, 60.0, 52.5 y 46.2 mg/l, al décimo día del experimento se obtuvieron las densidades poblacionales de  $3.15 \times 10^6$  cél/ml,  $2.98 \times 10^6$ ,  $2.68 \times 10^6$ ,  $2.62 \times 10^6$  y  $2.06 \times 10^6$  cél/ml respectivamente.

A los valores de las densidades poblacionales para el décimo día se les aplicó la prueba de análisis de varianza no paramétrica de Kruskal-Wallis, encontrándose que no existen diferencias significativas al nivel del 5%, presentando un comportamiento similar en las tasas de crecimiento, entre las diferentes concentraciones y el control.

Con los resultados obtenidos es posible cultivar Tetraselmis suecica agregando una concentración de 46.2 mg/l de  $\text{NaNO}_3$  utilizando el medio modificado de Guillard (1973) y Matthiessen y Toner (1966); y lograr un adecuado crecimiento.

CULTIVO DE LA MICROALGA Tetraselmis suecica  
KYLIN (1935) BUTCHER ALIMENTADA CON DIFEREN  
TES CONCENTRACIONES DE NITROGENO.

M E M O R I A

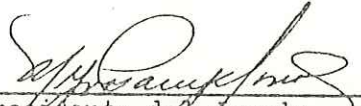
CURSO DE TITULACION

BIOLOGIA MARINA


QUE PRESENTA:

CARMEN ANDREA FERNANDEZ SERRANO

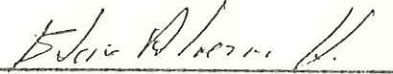
APROBADO POR:

  
Presidente del Jurado  
OC. MYRA PALOMERA SALAZAR

  
Sinodal Propietario  
M.C. ROBERTO MILLAN NUÑEZ

  
Sinodal Propietario  
M.C. ANTONIO SILVA LOERA

  
Sinodal Suplente  
OC. LUIS AGUILAR ROSAS

  
Sinodal Suplente  
OC. ELISEO ALMANZA HEREDIA

A MIS PADRES, ESOSO Y HERMANOS EN GRATITUD A SU APOYO,  
PACIENCIA Y CARLÑO.

## AGRADECIMIENTOS.

Mi agradecimiento a los OC. Myra Pamplona Salazar y Enrique Baltazar -  
Valenzuela por su guía y apoyo en la dirección de esta tesina, a mis  
Sinodales M.C. Roberto Millán, Oc. Luis Aguilar, Oc. Eliseo Almanza y  
M.C. Antonio Silva Loera por sus valiosos consejos y aportaciones al -  
presente trabajo.

A mis amigas Rosy y Teresita cuya ayuda fué siempre útil. De la misma  
manera doy mi agradecimiento a todas aquellas personas que de una u -  
otra forma colaboraron para la realización de este estudio.

## INDICE GENERAL

	Página
INTRODUCCION	1
OBJETIVO	4
MATERIALES Y METODOS	5
MEDIOS DE CULTIVO	5
REGISTRO DEL CRECIMIENTO DE MICROALGAS	8
ANALISIS ESTADISTICO	11
RESULTADOS	12
DISCUSION	25
CONCLUSION	29
RECOMENDACIONES	30
LITERATURA CITADA	31
ANEXO	36

LISTA DE TABLAS

TABLA		Página
I	Valores promedios de las lecturas en el hematocí- tómetro para cada tratamiento.	13
II	Valores poblacionales de <u>T. suecica</u> a nivel Er-- lenmeyer en el medio de cultivo control con 75 - mg/l de $\text{NaNO}_3$ . Tomando los valores promedio -- entre original y réplica.	14
III	Valores poblacionales de <u>T. suecica</u> a nivel Er-- lenmeyer en el medio de cultivo con 67.5 mg/l de $\text{NaNO}_3$ . Tomando los valores promedio entre origi- nal y réplica.	15
IV	Valores poblacionales de <u>T. suecica</u> a nivel Er-- lenmeyer en el medio de cultivo con 60 mg/l de - $\text{NaNO}_3$ . Tomando los valores promedio entre origi- nal y réplica.	16
V	Valores poblacionales de <u>T. suecica</u> a nivel Er-- lenmeyer en el medio de cultivo con 52.6 mg/l de $\text{NaNO}_3$ . Tomando los valores promedio entre origi- nal y réplica.	17
VI	Valores poblacionales de <u>T. suecica</u> a nivel Er-- lenmeyer en el medio de cultivo con 46.2 mg/l de $\text{NaNO}_3$ . Tomando los valores promedio entre origi- nal y réplica.	18

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Gráfica de la densidad poblacional de <u>T. suecica</u> en el medio de cultivo (control) con 75 mg/l . Tomando los valores promedio entre original y réplica.	20
2	Gráfica de la densidad poblacional de <u>T. suecica</u> en el medio de cultivo con 67.5 mg/l. Tomando los valores - promedios entre original y réplica.	21
3	Gráfica de la densidad poblacional de <u>T. suecica</u> en el medio de cultivo con 60 mg/l . Tomando los valores <u>pro</u> medio entre original y réplica.	22
4	Gráfica de la densidad poblacional de <u>T. suecica</u> en el medio de cultivo con 52.5 mg/l. Tomando los valores - promedio entre original y réplica.	23
5	Gráfica de la densidad poblacional de <u>T. suecica</u> en el medio de cultivo con 46.2 mg/l. Tomando los valores - promedio entre original y réplica.	24

## INTRODUCCION.

Una de las limitaciones en la acuicultura a nivel experimental o comercial es la producción de alimento vivo, el cual es utilizado por la mayoría de los estadios larvales de los moluscos, crustáceos y peces cultivables (Droop, 1975). Por lo cual se requiere producir varias especies de microalgas, ya sea para alimentar diversos organismos, diferentes estadios del ciclo de vida del mismo organismo, o porque la combinación de dos o más especies resulta un mejor alimento (Shiraishi y Provasoli, 1959; Walve, 1974).

Los cultivos de microalgas tienen gran importancia en la acuicultura debido a la posición que ocupan en la pirámide alimenticia. La capacidad que poseen de convertir sales inorgánicas en compuestos orgánicos por medio de la fotosíntesis las hace imprescindibles en la producción de alimento. Se ha probado además, que las microalgas son de gran valor nutritivo, siendo mayor su contenido en proteínas, grasas y vitaminas respectivamente que otras fuentes vegetales, es por eso también que en áreas sobrepobladas son consideradas como suplemento potencial de alimento para el consumo humano directo (Ukeles, 1976).

El sistema más utilizado en el cultivo de microalgas es aquél en el cual el volumen del medio es limitado, conteniendo los nutrientes orgánicos e inorgánicos, inoculado con un número relativamente pequeño de células y expuesto a condiciones favorables de luz y temperatura (Fogg, 1965).

Para iniciar el cultivo de microalgas primero se debe tener un medio adecuado para la especie a cultivar. Los medios más utilizados son

los formados con agua de mar enriquecida, de los cuales existe una gran diversidad de medios empezando con las fórmulas más sencillas basadas en la de Miquel (1892), hasta las mezclas actuales más complejas (Provasoli, Molaughlin y Droop, 1957; Guillard 1973).

En general los medios más utilizados actualmente se basan en el medio enriquecido "f" de Guillard y Ryther (1962). Así se han desarrollado los medios de Guillard (1973), y el de Matthiessen y Toner (1966), (Anexo I).

Para que un medio de cultivo de microalgas sea adecuado, es necesario controlar ciertos parámetros fisicoquímicos y ambientales ( PH , salinidad, bióxido de carbono, temperatura, iluminación y aireación ), así como los requerimientos nutricionales ( Nitratos, fosfatos, silica tos, elementos traza, agentes quelantes y vitaminas), si ambos requerimientos se satisfacen, el cultivo producirá el máximo de biomasa.

Para la preparación de los medios de cultivo tradicionales de microalgas se utilizan reactivos especiales, los cuales se obtienen en casas especiales a precios muy elevados, esto hace que el cultivar fitoplancton en estos medios resulte costoso ocasionando que los organismos alimentados con este, lleguen con un alto costo al mercado ( Grana dos-Machuca y Buckle-Ramírez, 1984).

Por otro lado (Eppley y Thomas, 1969 y Collos, 1982), postulan que el nitrógeno es uno de los nutrientes más limitantes en la producción y tasa de crecimiento de fitoplancton, debido a que se requiere como materia prima para el anabolismo de proteínas y formación de protoplasma celular.

(Aguirre-Muñoz, 1981) cultivando T. suecica encontró que considerando la interacción de los nutrientes con otros factores ambientales principalmente luz y temperatura, sobre el crecimiento, es posible decir que la concentración de nutrientes correspondientes al medio f/2, se encuentra cercana al punto óptimo de crecimiento para esta especie.

T. suecica pertenece al grupo Prasinophyceae (algas color verde) recientemente separadas de las algas propiamente verdes (Guillard, 1975), es un alga comprimida elipsoidal con el extremo posterior agudo y el extremo anterior de 4 lóbulos, y fué conocida también como Platymonas sp. tiene de 7-9 u de diámetro y de 10-16 u de largo y un color verde brillante con 4 flagelos móviles. Es una especie eurihalina, con capacidad de formar esporas cuyos límites de tolerancia a variables físicas son muy amplias. Posee una pared celular delgada formada principalmente de carbohidratos (Padilla, 1975), a la que (Epifanio, 1979), atribuye su lenta digestibilidad al compararla con Isochrysis galbana. Esta microalga crece bien en el rango de temperatura de 18-22°C, a PE de 7.5-8.0, a intensidad de luz de 1000-2000 lux y salinidad de 20-30 o/oo. Por estas razones, es una especie de considerable potencial de cultivo a gran escala.

## OBJETIVO.

Observar el comportamiento del patrón de crecimiento de la microalga Tetraselmis suecica, bajo diferentes concentraciones de nitrógeno.

## MATERIALES Y METODOS.

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

## MEDIOS DE CULTIVO.

Para iniciar el cultivo de microalgas, primero se debe tener un medio de cultivo adecuado para la especie a cultivar. Los medios de cultivo más utilizados actualmente son f/2 de Guillard (1973), y Matthiessen y Toner (1966), (Anexo I), por lo que fueron seleccionados para diseñar un medio de cultivo modificado utilizado como control, formado por macronutrientes de Guillard y los micronutrientes, EDTA, TRIS, vitaminas de Matthiessen y Toner (Anexo II) y la microalga seleccionada T. suecica para este experimento es una especie de alto valor nutritivo para la alimentación de larvas, semillas y adultos de crustáceos y moluscos (Davis y Guillard, 1958; Imai, 1967; Griffith et al., 1973, Laing y Helm, 1981).

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

## NUTRIENTES (Solución stock primaria).

Nitrato	75 gr/l
Fosfato monosódico	5 gr/l

Secuestrante	10 gr/l
Tris (buffer)	200 gr/l (ajustar PH a 7.5 con ácido clorhídrico concentrado).

METALES TRAZA:

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

Preparación del secuestrante (solución stock secundaria).- El secuestrante se prepara con 10 gr de EDTA Férrico, y un mililitro de cada una de las soluciones primarias de los metales traza y se afora a un litro.

VITAMINAS: (Soluciones stock primarias).

Biotina	10 mg/100 ml
B <sub>12</sub>	10 mg/100 ml
Tiamina	2 gr/100 ml

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

Los ajustes de PH se hacen agregando gotas de HCl, bajo lectura del potenciómetro.

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

Para la preparación del medio de cultivo control se utilizó un matraz aforado de un litro; se añadió agua de mar filtrada y pasada por luz ultravioleta (U.V.), y se agregó un mililitro de las siguientes soluciones stock:

1 ml de solución stock de  $\text{NaNO}_3$

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

1 ml de secuestrante

1 ml de tris.

Se procedió a aforar a un litro con agua de mar filtrada y pasada por U.V., y posteriormente se usaron 2 matraces Erlenmeyer (original y réplica) de 250 ml, en cada uno de ellos se añadieron 75 ml del medio preparado, los cuales se usaron como control.

PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE  $\text{NaNO}_3$ .

Los medios se prepararon utilizando el mismo procedimiento que el seguido en el control, cambiando solamente la concentración  $\text{NaNO}_3$  de la siguiente forma:

Las concentraciones utilizadas fueron 67.5, 60, 52.5, 46.2 mg/l, de  $\text{NaNO}_3$  cada uno de estos medios con diferentes concentraciones de  $\text{NaNO}_3$ ; se transfirieron 75 ml a cada uno de los 2 matraces Erlenmeyer de 250 ml utilizados en cada concentración.

Posteriormente los matraces Erlenmeyer con sus respectivos medios, fueron esterilizados en autoclave a 15 libras/pulg<sup>2</sup> por 15 minutos, concluido el procedimiento de esterilización, se dejó enfriar el medio de cultivo durante 24 horas. Después se añadieron las vitaminas cerca de la flama de los dos mecheros tipo Bunsen para prevenir la contaminación de los medios.

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

Todos los matraces fueron inoculados con un ml de cultivo monoaxónico de T. suecica en estadio de crecimiento exponencial. La densidad inicial promedió fué de  $34 \times 10^3$  cél/ml. Los matraces permanecieron en el cuarto de cultivo bajo condiciones de iluminación constante proporcionada por tubos de luz fluorescente, blanca fría. La temperatura del laboratorio se mantuvo aproximadamente constante (  $20^{\circ}\text{C} \pm 2$  ) por medio de aire acondicionado.

#### REGISTRO DEL CRECIMIENTO DE MICROALGAS.

Después de inocular los matraces de cultivo, se llevó a cabo el registro del crecimiento para identificar las diferentes fases que presenta un cultivo en el proceso de crecimiento. Diariamente a las 13:00 horas se extrajeron muestras de un ml de cada uno de los 10 matraces (original y réplica) de cultivo, utilizando pipetas esterilizadas y

cerca de la flama de dos mecheros de gas tipo Bunsen para evitar la contaminación de los medios. El método para estimar la densidad de las microalgas consistió en contar directamente al microscopio con--- puesto, con un hematocitómetro tipo Neubauer de 0.1 mm de profundidad, el cual es recomendado para el conteo de algas pequeñas ( 2 a 30 U ) y para cultivos que lleguen a densidades de  $5 \times 10^4$  a  $10^6$  cél/ml . Las muestras se fijaron con una gota de lugol para fitoplancton marino versión ácida, a fin de inmovilizarlos y lograr un mejor conteo.

SECUENCIA PARA CONTAR LAS CELULAS ES LA SIGUIENTE:

- 1.- El cultivo se agita para que las células tengan una distribución uniforme.
- 2.- Una vez uniformada la muestra se succiona de la parte media del tubo de ensaye con una pipeta Pasteur.
- 3.- Las cámaras del hematocitómetro con su portaobjetos encima, se llenan con la pipeta Pasteur haciendo un ángulo de  $45^\circ$  con respecto al plano horizontal.
- 4.- Luego se coloca el hematocitómetro en la placa de barrido del microscopio.
- 5.- El registro se hizo observando al microscopio y contando las células del cuadro central (25 divisiones).
- 6.- Para cada muestra (original y réplica) se efectuó la lectura de 6 cámaras determinando posteriormente su promedio.

Los valores obtenidos fueron registrados para cálculos posteriores

de la densidad de las microalgas y parámetros poblacionales.

#### - CALCULOS DE DENSIDAD.

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

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

donde:

- D= Densidad del cultivo.
- M= Mililitros de muestra utilizados.
- 10= Factor de multiplicación debido a la profundidad del hematocitómetro.
- 1000= Valor para convertir a mililitros.

#### - PARAMETROS POBLACIONALES.

Los parámetros poblacionales que se calcularon fueron:

La constante de crecimiento (K), tiempo de generación (Tg), la producción diaria (P.D.) y la tasa de crecimiento específico ( $\mu$ ).

La constante de crecimiento se calculó de la siguiente manera:

$$K = \frac{\ln (N_1/N_0)}{t_1 - t_0}$$

donde:

- $N_1$  = Concentración de las células iniciales.
- $N_0$  = Número de células al final.
- T = Tiempo en días.

El tiempo de generación ( $T_g$ ) se determinó como lo recomienda Eppley y Strickland, 1968.

$$T_g = \frac{\log 2 (t_2 - t_1)}{\log N_2 - \log N_1}$$

La producción diaria (P.D.) de microalgas se valoró según De la Cruz y Alfonso, 1975.

$$P.D. = \frac{N_2 - N_1}{t_2 - t_1}$$

La tasa de crecimiento específico ( $U$ ) se estimó como lo recomienda E.P.A., 1971 para ensayos con microalgas.

$$\mu = \frac{\log (N_2/N_1)}{t_2 - t_1} \text{ día}^{-1}$$

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para conocer si la densidad de células estimadas en el noveno día del cultivo que es el que corresponde al término de la fase exponencial, varió significativamente entre los tratamientos, se aplicó el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis (Sokal y Rohlf, 1979), debido a que los datos no presentan una distribución normal; utilizando los valores de las lecturas promedio entre original y réplica, obtenidos en el hematocitómetro.

## RESULTADOS.

La Tabla I corresponde a los valores promedio entre original y réplica de las lecturas tomadas en el hematocitómetro para calcular la densidad de células en cada tratamiento.

La Tabla II corresponde a la concentración de 75 mg/l de  $\text{NaNO}_3$  (control), en donde se observa que la máxima densidad se obtuvo el décimo día, el valor máximo para K y  $\mu$  se presentó el tercer día, la PD máxima fué el noveno día y el valor mínimo para TG se presentó el tercer día.

La Tabla III corresponde a la concentración de 67.5 mg/l de  $\text{NaNO}_3$  en donde se observa que la máxima densidad se obtuvo el décimo día, el valor máximo para K y  $\mu$  se presentó el tercer día, la PD máxima fué el noveno día y el valor mínimo de TG se presentó el tercer día.

La Tabla IV corresponde a la concentración de 60 mg/l de  $\text{NaNO}_3$ , en donde se observa que la máxima densidad se obtuvo el décimo día, el valor máximo para K y  $\mu$  se presentó el tercer día, la PD máxima se obtuvo el noveno día y el valor mínimo para TG se presentó el tercer día.

La Tabla V corresponde a la concentración de 52.5 mg/l de  $\text{NaNO}_3$ , en donde se observa que la máxima densidad se obtuvo el décimo día, el valor máximo para K y  $\mu$  se presentó el tercer día, la PD máxima fué el noveno día y el valor mínimo de TG se presentó el tercer día.

La Tabla VI corresponde a la concentración de 46.2 mg/l de  $\text{NaNO}_3$ , en donde se observa que la máxima densidad se obtuvo el décimo día el valor máximo para K y  $\mu$  fué el tercer día, la PD máxima se presentó el

TABLA I.- Valores promedios de las lecturas en el  
hematocitómetro para cada tratamiento.

TIEMPO EN DIAS	TESTIGO (75 mg/l.)	CONCENTRACION DE $\text{NaNO}_3$			
		67.5 mg/l.	60 mg/l.	52.5 mg/l.	46.2 mg/l.
0	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4
1	5.5	4.8	4.5	3.5	3.55
2	14.0	11.15	10.08	9.41	9.16
3	44.25	29.41	29.3	28.5	28.07
4	74.16	66.53	63.56	61.59	59.23
5	104.08	103.66	97.83	93.03	90.47
6	140.00	114.5	113.14	107.5	105.35
7	182.74	146.66	143.58	133.66	120.15
8	208.40	202.83	201.12	170.83	162.5
9	283.33	272.83	265.24	261.03	202.83
10	315.50	298.65	268.14	262.27	206.16

TABLA II.- Valores poblacionales de T. suecica  
a nivel Erlenmeyer en el medio de  
cultivo control con 75 mg/l de  $\text{NaNO}_3$

DIA	DEN X 10000 (CEL./ml)	K # DIV/DIA	$\mu$ CEL/ML DIA	TG DIAS	PD CEL/DIA
0	3.40				
1	5.50	0.6939	0.2089	1.4411	2.1000
2	14.00	1.3480	0.4058	0.7419	8.5000
3	44.25	1.6603	0.4998	0.6023	30.2500
4	74.16	0.7450	0.2243	1.3423	29.9100
5	104.08	0.4890	0.1472	2.0450	29.9200
6	140.00	0.4277	0.1288	2.3379	35.9200
7	182.74	0.3844	0.1157	2.6016	42.7400
8	208.40	0.1896	0.0571	5.2752	25.6600
9	283.33	0.4431	0.1334	2.2566	74.9300
10	315.50	0.1552	0.0467	6.4450	32.1700

TABLA III.- Valores poblacionales de *T. suecica* a nivel Erlenmeyer en el medio de cultivo con 67.5 mg/l de  $\text{NaNO}_3$

DIA	DEN X 10000 (CEL./ml)	K # DIV/DIA	J CEL/ML DIA	TG DIAS	PD CEL/DIA
0	3.40				
1	4.80	0.4975	0.1498	2.0100	1.4000
2	11.15	1.2160	0.3660	0.8224	6.3500
3	29.41	1.3993	0.4212	0.7146	18.2600
4	66.53	1.1777	0.3545	0.8491	37.1200
5	103.66	0.6398	0.1926	1.5630	37.1300
6	114.50	0.1435	0.0432	6.9691	10.8400
7	146.66	0.3571	0.1075	2.8001	32.1600
8	202.83	0.4678	0.1408	2.1376	56.1700
9	272.83	0.4277	0.1288	2.3379	70.0000
10	298.65	0.1305	0.0393	7.6654	25.8200

TABLA IV.- Valores poblacionales de T. suecica a nivel Erlenmeyer en el medio de cultivo con 60 mg/l de  $\text{NaNO}_3$

DIA	DEN X 10000 (CEL./ml)	K # DIV/DIA	$\mu$ CEL/ML DIA	TG DIAS	PD CEL/DIA
0	3.40				
1	4.50	0.4044	0.1217	2.4728	1.1000
2	10.08	1.1635	0.3502	0.8595	5.5800
3	29.30	1.5394	0.4634	0.6496	19.2200
4	63.56	1.1172	0.3363	0.8951	34.2600
5	97.83	0.6222	0.1873	1.6073	34.2700
6	113.14	0.2098	0.0631	4.7672	15.3100
7	143.58	0.3438	0.1035	2.9091	30.4400
8	201.12	0.4862	0.1464	2.0567	57.5400
9	265.24	0.3993	0.1202	2.5047	64.1200
10	268.14	0.0157	0.0047	63.7432	2.9000

TABLA V.- Valores poblacionales de T. suecica a nivel Erlenmeyer en el medio de cultivo con 52.5 mg/l. de  $\text{NaNO}_3$

DIA	DEN X 10000 (CEL./ml)	K # DIV/DIA	$\frac{H}{DIA}$ CEL/ML	TG DIAS	PD CEL/DIA
0	3.40				
1	3.50	0.0418	0.0126	23.9114	0.1000
2	9.41	1.4269	0.4295	0.7008	5.9100
3	28.50	1.5987	0.4813	0.6255	19.0900
4	61.59	1.1118	0.3347	0.8995	33.0900
5	93.03	0.5950	0.1791	1.6806	31.4400
6	107.50	0.2086	0.0628	4.7945	14.4700
7	133.66	0.3142	0.0946	3.1823	26.1600
8	170.83	0.3540	0.1066	2.8248	37.1700
9	261.03	0.6117	0.1841	1.6349	90.2000
10	262.27	0.0068	0.0021	146.2611	1.2400

TABLA VI.- Valores poblacionales de T. suecica a nivel Erlenmeyer en el medio de cultivo con 46.2 mg/l de  $\text{NaNO}_3$

DIA	DEN X 10000 (CEL./ml)	K # DIV/DIA	$\mu$ CEL/ML DIA	TG DIAS	PD CEL/DIA
0	3.40				
1	3.55	0.0623	0.0187	16.0551	0.1500
2	9.16	1.3676	0.4117	0.7312	5.6100
3	28.07	1.6156	0.4863	0.6189	18.9100
4	59.23	1.0773	0.3243	0.9282	31.1600
5	90.47	0.6111	0.1840	1.6363	31.2400
6	105.35	0.2197	0.0661	4.5520	14.8800
7	120.15	0.1897	0.0571	5.2729	14.8000
8	162.50	0.4356	0.1311	2.2956	42.3500
9	202.83	0.3198	0.0963	3.1266	40.3300
10	206.16	0.0235	0.0071	42.5647	3.3300

octavo día y el valor mínimo para TG fué el tercer día.

Se construyeron cinco gráficas las cuales nos muestran el crecimiento de T. suecica para cada día de cultivo, correspondiendo la figura 1 (control) a una concentración de 75 mg/l de  $\text{NaNO}_3$ . Las figuras 2, 3, 4 y 5 corresponden a las concentraciones de 67.5, 60.0, 52.5 y 46.2 mg/l de  $\text{NaNO}_3$  respectivamente.

Los resultados obtenidos en las pruebas de Ji cuadrada y Kolgomorov-Smirnov, nos indican que los datos no presentan una distribución normal, por lo cual se utilizó la prueba de análisis de varianza no paramétrico de Kruskall-Wallis, utilizándose los valores promedio entre original y réplica de las lecturas obtenidas en el hematocitómetro para el noveno día y aplicando un nivel de significancia de 5%, no se presentaron diferencias significativas, entre el medio control y las diferentes concentraciones de  $\text{NaNO}_3$  utilizadas en el experimento.

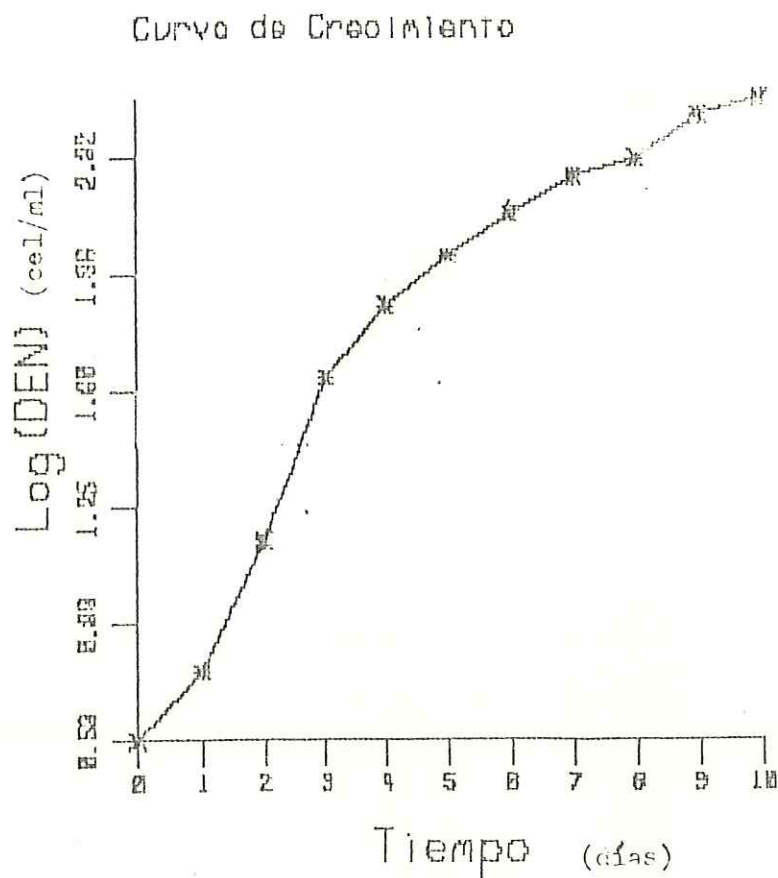


FIGURA 1.- Densidad poblacional de T. suecica en el medio de cultivo con 75 mg/l de  $\text{NaFO}_3$  (testigo). Tomando los valores promedio entre original y réplica.

## Curva de Crecimiento

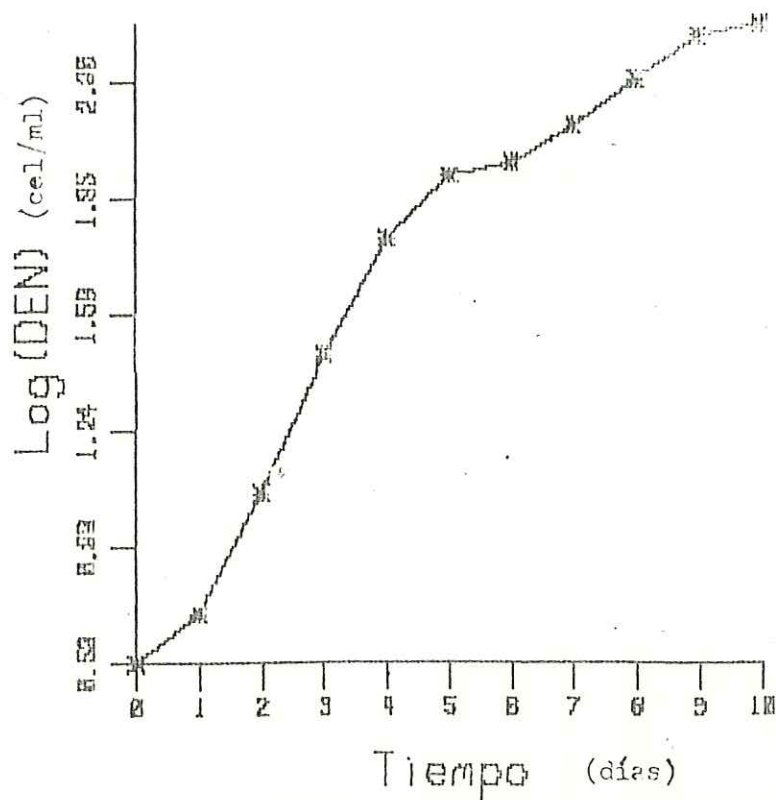


FIGURA 2.- Densidad poblacional de T. suecica en el medio de cultivo con 67.5 mg/l de  $\text{NaNO}_3$ . Tomando los valores promedio entre original y réplica.

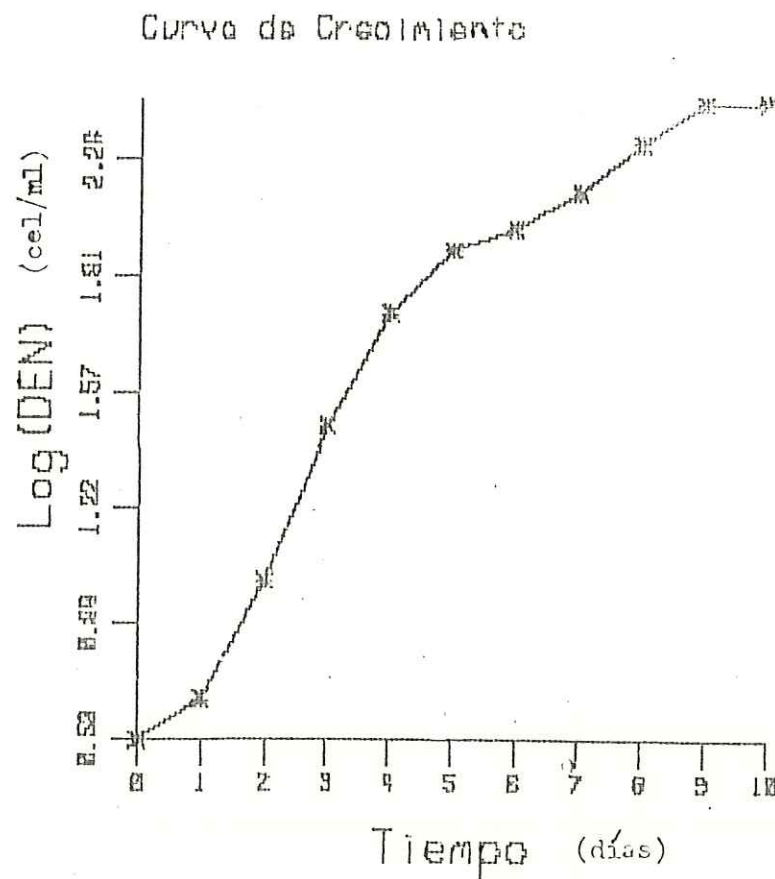


FIGURA 3.- Densidad poblacional de T. suecica en el medio de cultivo con 60 mg/l de  $\text{NaNO}_3$ . Tomando los valores promedio entre original y réplica.

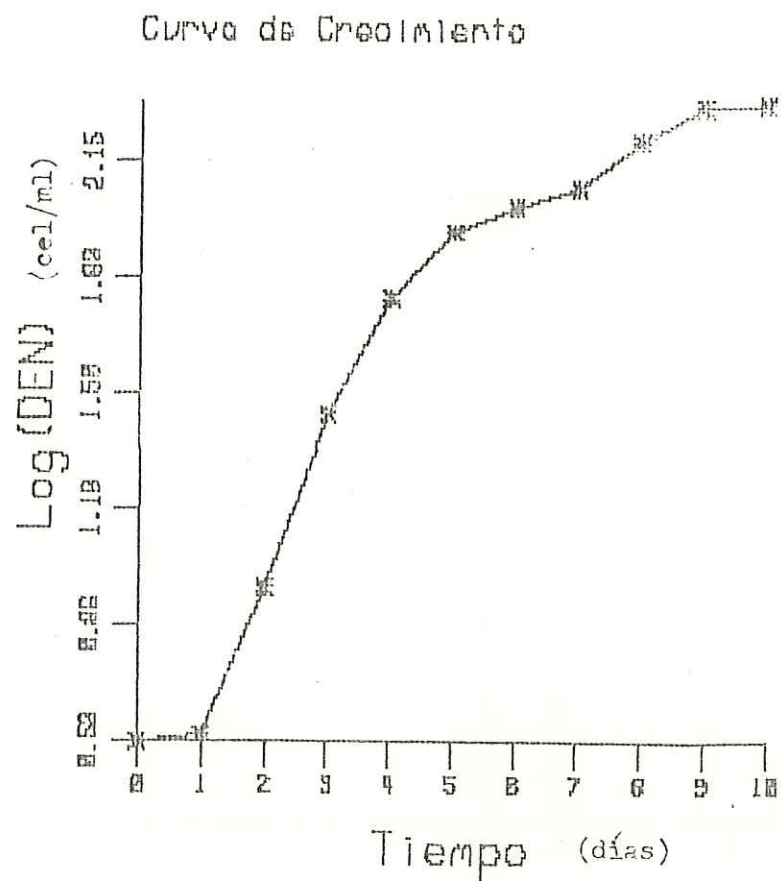


FIGURA 4 .- Densidad poblacional de T. suecica en el medio de cultivo con 52.5 mg/l de  $\text{NaNO}_3$ . Tomando los valores promedio entre original y réplica.

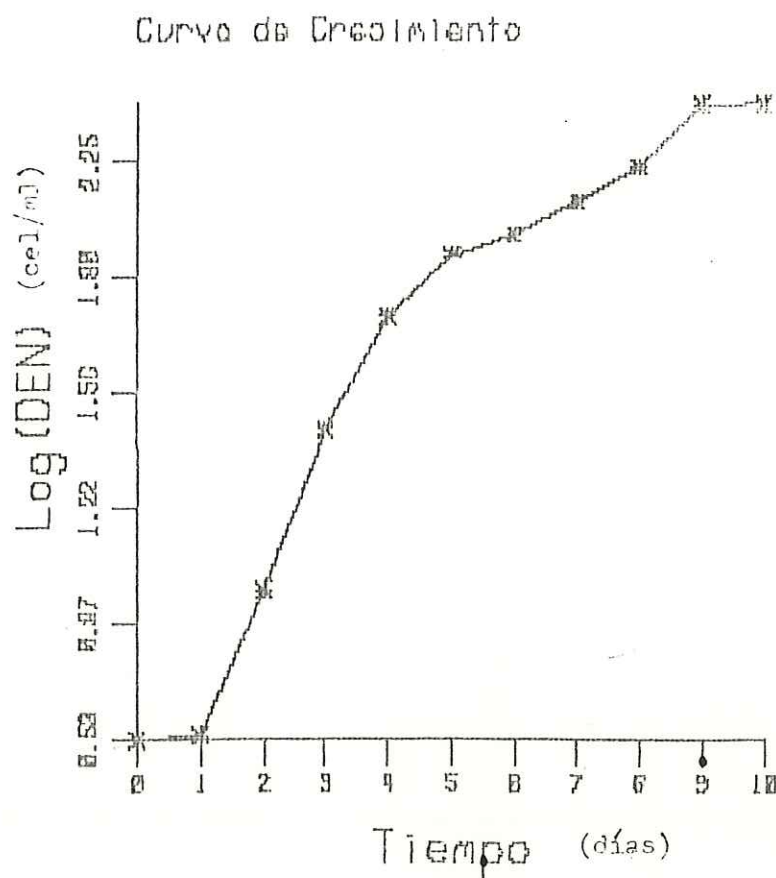


FIGURA 5.- Densidad poblacional de T. suecica en el medio de cultivo con 46.2 mg/l de  $\text{NaNO}_3$ . Tomando los valores promedio entre original y réplica.

## DISCUSION.

Se han realizado muchos estudios sobre la nutrición del fitoplancton como un intento para entender las condiciones ideales de su crecimiento.

Uno de los requerimientos nutricionales más limitantes en la producción y tasa de crecimiento del fitoplancton es el nitrógeno, debido a que se requiere como materia prima para el anabolismo de las proteínas y formación del protoplasma celular (Eppley y Thomas 1969 y Collos, 1982).

La intensidad de luz a la cual el nitrato es mejor asimilado ocurre a los 300 pies candelas (Grant, 1967), intensidad que corresponde a la utilizada en nuestro experimento.

Paniagua Michel et al., (1976) describen cuatro fases en la curva típica de crecimiento (Fig. 1 del anexo).

Comparando esta descripción con los valores de densidad obtenidos para las 5 diferentes concentraciones de  $\text{NaNO}_3$  en el cultivo de T. suecica, encontramos que estas fueron muy bajas durante los dos primeros días del cultivo (fase de inducción), incrementándose rápidamente hasta el noveno día (fase exponencial), y el décimo día se presenta una densidad poblacional muy semejante a la del noveno día (fase estacionaria); la fase de muerte no se presentó debido a que no se prolongó el tiempo de cultivo.

La constante de crecimiento (K) y la tasa de crecimiento específico

co (U) presentaron su máximo valor el tercer día del experimento, esto es debido a que las algas se han adaptado al medio y comienzan a multiplicarse. El aumento de microalgas se acelera continuamente en progresión geométrica (Paniagua Michel et al., 1976).

La fase exponencial es la más importante porque nos indica cuando el cultivo debe cosecharse, diluirse o transferirse, y puede prolongarse hasta cuatro días (Paniagua Michel et al., 1976). Si se controla la dilución del cultivo esta fase puede prolongarse por semanas (Morris, 1980). Además esta fase está directamente relacionada con el tamaño del inóculo inicial y el estado fisiológico del alga (Fogg, 1975). Los valores máximos de (K) para el control y las concentraciones de 67.5, 60.0, 52.5 y 46.2 mg/l de  $\text{NaNO}_3$  fueron 1.66, 1.39, 1.53, 1.59 y 1.61 divisiones/por día respectivamente y se comparan favorablemente con los resultados obtenidos por otros autores. Por ejemplo Maddux y Jones (1964) obtuvieron un valor máximo de 0.85 divisiones/por día para Tetraselmis suecica; Yanase e Imai (1968) encontraron un valor máximo optimizando los niveles de luz y temperatura de 1.8 divisiones/por día para Platymonas sp; Persoone y Sorgeloos (1975) reportaron datos de crecimiento equivalente a 0.69 divisiones/por día; Aguirre Muñoz (1981) encontró 1.7 divisiones/por día; trabajando con Tetraselmis suecica.

El tiempo medio de generación ( $T_g$ ) presenta su mínimo valor en todos los tratamientos el tercer día del inóculo. El ( $T_g$ ) tiene un comportamiento inversamente proporcional a los parámetros (K y U); esto

nos indica que cuando un cultivo presenta un número máximo de divisiones por día, su crecimiento también será máximo, mientras que el tiempo que tarda en generarse las células se hace mínimo.

La producción diaria (PD) máxima, se presentó el noveno día en to dos los tratamientos, esto es debido a que el cultivo se encuentra en la última parte de la fase exponencial; el décimo día el valor de (PD) disminuye lo cual nos indica que el cultivo se encuentra en la fase es tacionaria.

Cuando el cultivo entra en la fase estacionaria, los valores de (K y U) disminuyen debido a la reducción de nutrientes, pero el valor de (Tg) se incrementa; en esta fase el número de células permanece apro ximadamente igual.

En base a los resultados obtenidos al noveno día del experimento podemos suponer que la variación en la concentración de nitrógeno, no afectó el crecimiento de la microalga T. suecica en ninguno de los tra tamientos, aunque en cada uno de ellos se hayan obtenido diferentes den sidades celulares.

En los medios con concentraciones de  $\text{NaNO}_3$  menores al control, al parecer el nitrógeno no fué limitante al crecimiento.

No se presentaron diferencias estadísticamente significativas a ni vel del 5% en el crecimiento entre el cultivo control y las diferentes concentraciones de  $\text{NaNO}_3$  .

Esto nos hace suponer que probablemente la especie puede crecer normal-

mente a concentraciones menores que las del medio control. Al respecto, hay que tomar en cuenta que la microalga tiene un pool interno de nitratos, lo cual permite que el organismo siga creciendo aun cuando la concentración externa de la sal nutritiva llegue a un punto crítico. Debido a lo anterior, la microalga pudo no agotar su reserva interna, por consiguiente no necesitar los nitratos del medio.

Caperon y Meyer (1972) indicaron que las tasas de crecimiento del fitoplancton no dependen de las concentraciones ambientales, sino de la concentración de nitratos durante el período precedentes al cultivo en el cual se hizo la estimación del crecimiento. A este respecto, el inóculo de la microalga posiblemente traía previamente una reserva de nitrógeno suficiente para crecer adecuadamente en nuevos medios independientemente de la concentración de nitratos. Esto puede explicar el hecho de no presentarse diferencias en el crecimiento. Probablemente a volúmenes mayores sea más factible detectar diferencias en el crecimiento de cultivos sometidos a variaciones en la concentración de nitrógeno.

## CONCLUSIONES.

Las densidades poblacionales obtenidas el noveno día del cultivo, no presentaron diferencias significativas al nivel del 5% entre el medio de cultivo control y las concentraciones de (67.5, 60, 52 y 46.2 mg/l de  $\text{NaNO}_3$ ), encontrándose que la microalga T. suecica puede cultivarse a concentración de 46.2 mg/l de  $\text{NaNO}_3$ , utilizando el medio de cultivo modificado Guillard (1973) y Matthiessen y Toner (1966).

## RECOMENDACIONES.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el experimento cultivando T. suecica utilizando el medio modificado Guillard (1973) y Matthiessen y Toner (1966) con una concentración de 46.2 mg/l de nitratos, se observó un crecimiento favorable, por lo que se recomienda que al utilizar este medio, se cultive la microalga bajo las mismas condiciones físicas y nutritivas, así como la edad de la cepa con que se inoculo este experimento.

Considerando que la cepa inoculada se encontraba en un medio más rico en nitrato, se recomienda probar inoculando con una cepa que haya estado en un medio con una concentración de 46.2 mg/l de nitratos, - para observar si el crecimiento es el mismo que se presenta utilizando el inculo de una cepa en un medio con 75 mg/l de nitrato.

## LITERATURA CITADA

- Aguirre Muñoz Alfonso, (1981). Estudios con un cultivo semicontinuo de Tetraselmis suecica KYLIN (1935): nutrientes, vitaminas, desinfección del medio con UV y producción del sistema a largo plazo. Tesis de Licenciatura, Escuela Superior de Ciencias Marinas de la U.A.B.C., Ensenada, B.C., México. pp 66.
- Caperon, J. y J. Meyer (1972) Nitrogen-limited growth of Marine phytoplankton II. Uptake kinetic and their role in nutrient limited growth. Deep-Sea-Res. 19: 619-632
- Chu, S.P. (1943) The influence of the mineral composition of the medium on the growth of plankton algae. J. Ecol Vol. 30: 284-355
- Collos, Y. (1982). Transient situations in nitrate assimilation by marine diatom II. Short term uncoupling of nitrate uptake and reduction. J. Exp. Mar. Biol. Ecol 62(1): 285-295
- Davis, H.C. and Guillard, R.R. (1958). Relative value of ten genera of microorganisms as foods for aysters and clam larvae. U.S. Fish Wildl. Serv., Fish. Bull, 136 (58): 293-304.
- De la Cruz, S.A. y E. Alfonso (1975). Cultivo masivo de algas planctónicas marinas mediante fertilización Ciencias, 8: 1-25
- Droop, M.R. (1975) The chemostat in mariculture. In: 10th European Sump. Mar. Biol. Ostend, Belgium, 1:17-23 .

- Epifanio, C.E. (1979). Growth in bivalve molluscs: nutritional effects of two or more species of algae in diets fed to the american oyster Crassostrea virginica (GMBELIN) and the hard clam Mercenaria mercenaria (L) *Aquaculture*, 18:1-12 .
- Eppley R.W. and Strickland, J.D. (1968). Kinetics of marine plankton growth, p. 23-62. En: *Advances in microbiology of the sea* (M.R. Droop y E.J. Ferguson, eds.) Academic Press, New York. 540 Pp.
- Eppley, R.W. y W.H. Thomas (1969) comparison of half Saturation constant for growth and nitrate uptake by Marine Phytoplankton. *J. Phycol* 5: 375-379 .
- Fabregas, J., Abalde, J. Herrero, C. Cabezas, B. and Veiga M. (1984). Growth of the Marine Microalga Tetraselmis suecica in bath cultures with different salinities and nutrient concentration. *Agua culture*, 42:207-215.
- Fogg, G.E., (1965). *Algal cultures and Phytoplankton ecology* 2nd. edition. The University of Wisconsin Press., 175 pp.
- Fogg, G.E. (1975). *Algal cultures and phytoplankton ecology* 2nd. Ed. The University of Wisconsin, Press, 175 pp.
- Granados C. Machuca y L.F. Buckle-Ramírez (1984) Cultivo de las microalgas Monochrysis lutheri y Skeletonema costatum con nutrientes producidos por estiércoles digeridos. *An Inst. Ciencs. Del Mar y limnol. Univ. Auton. México*, 11(1) 241-256.

- Grant, B.R. (1967) The action of light on nitrate and nitrite asimila-  
tion by the marine chlorophyte, Dunaliella tertiolecta (Butcher).  
J. Gan. Microbiol. 48, 379-389.
- Griffith, G.W. M.A. Kenslow and L.A. Ross, (1973). A mass sulture  
method for tetraselmis sp. a promissing food for larval cursta--  
ceans. In: Proc 4th Ann. Workshop Wld Mar. So., Monterrey, Méxi-  
co. J. Avault (ed) pp 209-194 .
- Guillard, R.R.L. (1973) Division rates. In: J.R. Stein (ed) Handbook  
of phycological methods. Culture methods and growth measurements  
London, Cambridge Univ. Press. pp 289-311.
- Guillard, R.R.L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine  
invertebrates. In: W.L. Smith and M.H. Chanley (Eds), Culture of  
Marine Invertebrate animals. Plenum Press. U.S.A. pp 29-60 .
- Guillard, R.R.L. and Ryther, J.H. (1962) Studies on marine planktonic  
diatoms. I Cyclotella nana Husted and Detonula confervaceae  
(clave). Can. J. Microbiol. 8:229-239 .
- Imai, t. (1967). Mass production of molluscs by means of rearing the  
larvae in tanks. Venus. 25: 159-167 .
- Laing, I. and M.M. Helm (1981) Factors affecting the semicontinuos  
production of tetraselmis suecica (kylin) Butch. in 200 l vessels  
Aquaculture. 22:137-148 .

- Maddux, W.S. and R.F. (1964). Some interactions of temperature, light intensity and nutrient concentration during the continuous culture of Nitzschia closterium and Tetraselmis sp. *Limnol Oceanogr.* 9:79-86 .
- Matthiessen, G.C. and Toner, R.C. (1966) Possible methods of improving the shellfish industry of Martha S, Vineyard, Duke S. country, Massachusetts. Marine Research Foundation, Edgartown, Mass. 139 pp.
- Miquel, P. (1982) De la culture artificielle des diatomees. *La diatomiste.* 1-18 pp.
- Morris, I., (1980). *The Physiological Ecology of Phytoplankton.* University of California Press, Berkley and Los Angeles. 9:329-368.
- Padilla, M.G. (1975) Crecimiento poblacional de Tetraselmis suecica - (Chlorophyceae) en ambiente controlado. *Rev. Biol. Mar. Valparaiso,* 15 (3): 287-296 .
- Paniagua Michel J. Buckle Ramírez, F., Granados Machuca, C. y Loya Salinas, D., (1986) Manual de Metodologías y Alternativas para el cultivo de microalgas. Informe especial O C-86-01 CICESE, Ensenada , B.C., México 94 p.
- Persoone, G. and P. Sorgeloos (1975) Technological improvements for the cultivation of invertebrates as food for fishes and crustaceans. *I Dkvice and Methods. Aquaculture.* 6:275-289 .

- Provasoli, L.J., J.J. Molaughling y K.R. Droop (1957). The development of artificial media for marine algae. Arch Microbiol. 25: 392-428.
- Shiraishi, K. and Provasoli, L., (1959) Growth factors as supplements to inadequate algae food for Tigriopus japonicus. Tohku Y. Agr. Res. 10 (1): 89-96 .
- Sokal, R.R. and F.J. Rohlf, (1979) Biometría. Principios y Métodos estadísticos en la investigación, biológica. H. Blume Ediciones. Primera Edición española 1979 832 pp.
- Ukeles, R. (1976) Cultivation of unicellular plants. p. 375-465 en: Marine Ecology, Vol. III (O. Kinne; ed.) Wiley Interscience, London 577 pp.
- Walne, P.R. (1974) Culture of Bivalve Mollusc 50 years experience of conow. Fishing News Books. West byfleet, 173 pp.
- Yanase, R. and T. Imai. (1968) The effects of light intensity and temperature on the growth of several marina algae useful for maring molluscan larvae. Tohoku J. Agr. Res. 19: 75-82 .

Tabla	Página
I.- Medios de cultivo más usados.	37
II.- Diseño del medio modificado f/2 de Guillard, 1973 y Mattihessen y Torner, 1966, utilizado como control y/o testigo.	38
III.- Rutina seguida en la preparación de los macronutrientes para los medios de cultivo.	39
IV.- Rutina a seguir en la preparación de la solución -- stock primaria de vitaminas para los medios de cultivo.	40
Figura	
1.- Curva de crecimiento ideal de microalgas en medio de volumen limitado.	41

TABLA I.- Medios de cultivo más usados; cantidades para un litro de -  
 agua de mar filtrada.

	GUILLARD	MATTHESSEN Y TORNER
Nutrientes Mayores	75 mg.	150.0 mg
$\text{NaNO}_3$	5 mg	10.0 mg
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	15-30 mg	30.0 mg
Metales traza		
$\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA}$	4.36 mg	Fe. EDTA 10.0 mg
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3.15 mg	- - -
$\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.01 mg	1.96 mg
$\text{ZnDO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.022 mg	4.4 mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.01 mg	2.0 mg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.18 mg	36.9 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.006 mg	1.26 mg
Vitaminas		
$\text{B}_1$	0.10 mg	200 $\mu\text{g}$
Biotina	0.50 mg	1.0 $\mu\text{g}$
$\text{B}_{12}$	0.50 mg	1.0 $\mu\text{g}$

TABLA II.- Diseño del medio modificado F/2 de Guillard, 1973 y  
 Mattihessen y Torner, 1966 utilizado como control y/o tes-  
 tigo.

( Cantidades para un litro de agua de mar filtrada ).

INGREDIENTES	CANTIDADES
Nutrientes mayores:	
$\text{NaNO}_3$	75 mg
$\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5 mg
Metales traza	
Fe. EDTA	10.0 mg
$\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.96 mg
$\text{Zn SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.4 mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.0 mg
$\text{Mn Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	36.9 mg
$\text{Na}_2\text{M}_2\text{O}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.26 mg
Vitaminas	
$\text{B}_1$	200 $\mu\text{g}$
Biotina	1.0 $\mu\text{g}$
$\text{B}_{12}$	1.0 $\mu\text{g}$

TABLA III.- Rutina seguida en la preparación de los macronutrientes para los medios de cultivo.

PREPARACION DE NUTRIENTES

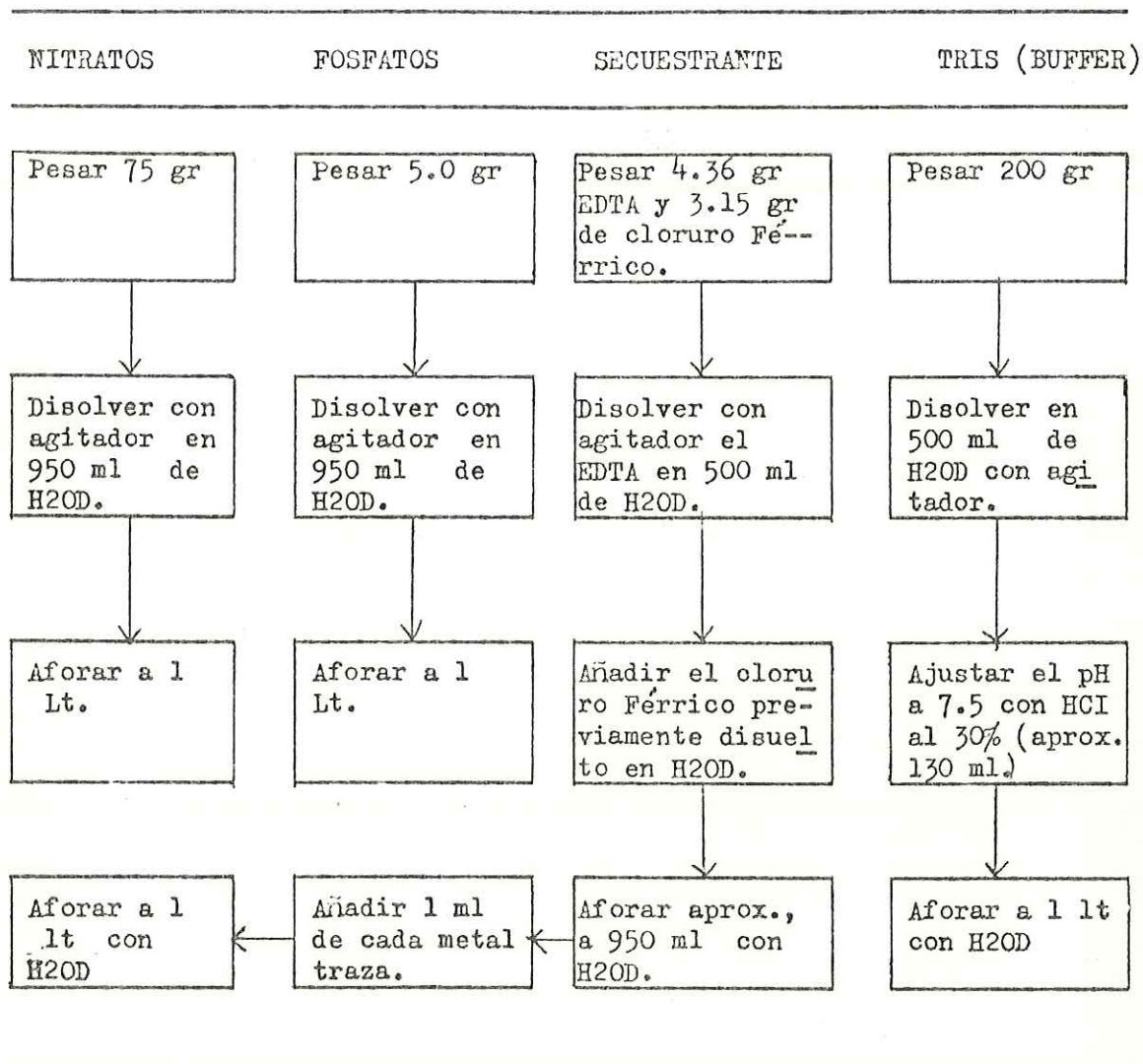


TABLA IV.- Rutina a seguir en la preparación de la solución STOCK primaria de Vitaminas para los medios de cultivo.

CONCENTRADO  
( SOL. STOCK PRIMARIA )

$B_{12}$	BIOTINA	TIAMINA
Pesar 10 mg. con balanza analítica	Pesar 10 mg con balanza analítica.	Pesar 2 g con balanza analítica.
Disolver en 50 ml de H <sub>2</sub> O	Disolver en 50 ml de H <sub>2</sub> O	Disolver en 50 ml de H <sub>2</sub> O
Aforar a 100 ml	Aforar a 100 ml	Aforar a 100 ml

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

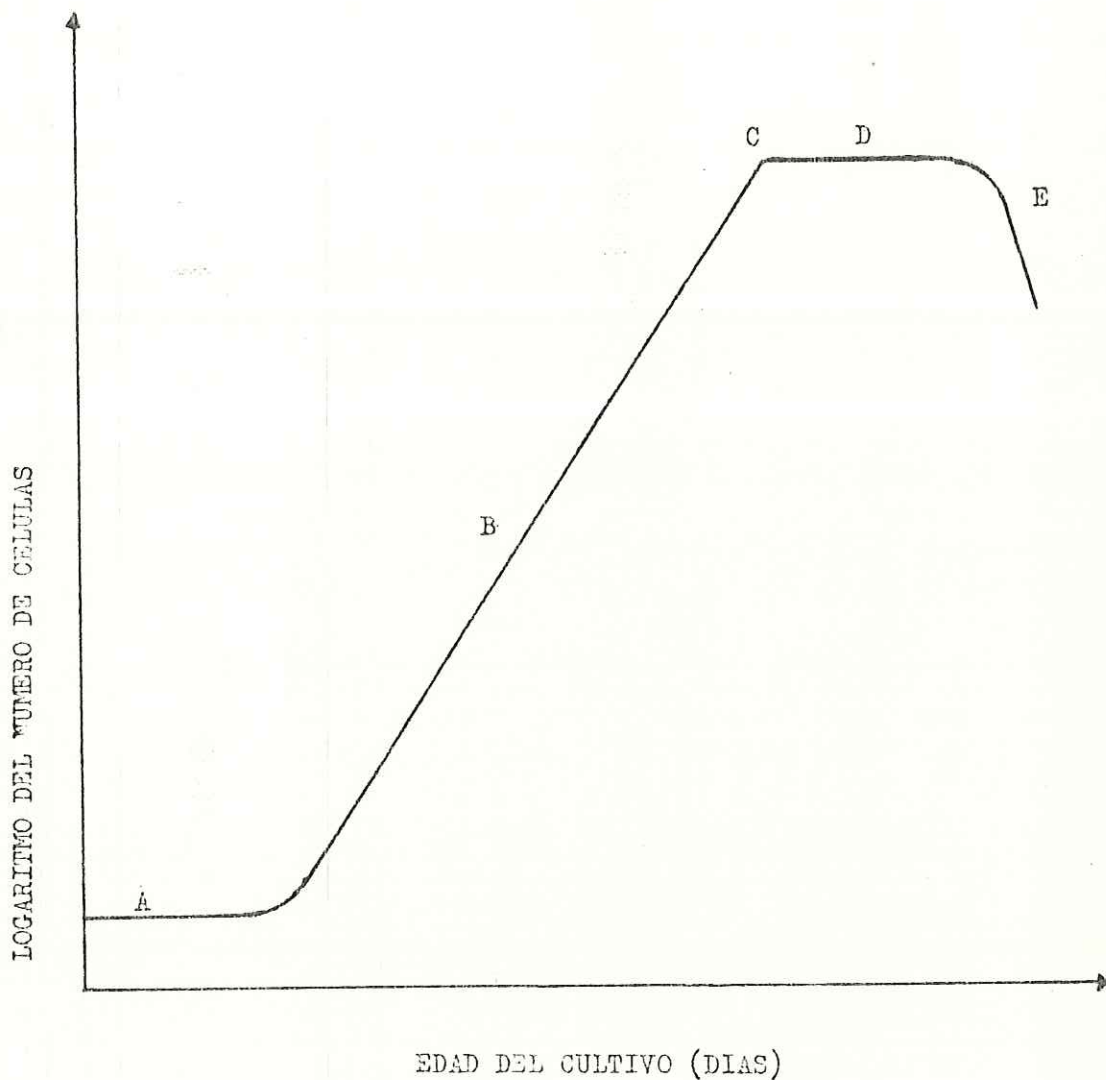


FIGURA 1.- Curva de crecimiento ideal de microalgas en medios de volumen limitado. A. fase de inducción; B. fase de crecimiento exponencial; C. fase de declinamiento relativo del crecimiento; D. fase estacionaria y E. fase de muerte .