



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE
CIENCIAS MARINAS

''CULTIVO MASIVO DE *Pavlova lutheri* (DROOP) GREEN. CON
FERTILIZANTES AGRICOLAS COMO FUENTE DE NITROGENO
Y BIOXIDO DE CARBONO''



T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

O C E A N O L O G O

PRESENTA:

JORGE GERARDO WILBURN GONZALEZ

ENSENADA, B.C.

ABRIL DE 1990

"CULTIVO MASIVO DE *Pavlova lutheri* (DROOP) GREEN.CON
FERTILIZANTES AGRICOLAS COMO FUENTE DE NITROGENO
Y BIOXIDO DE CARBONO"

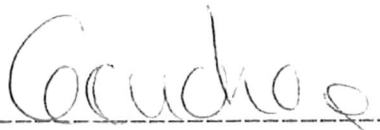
TESIS QUE PRESENTA

JORGE GERARDO WILBURN GONZALEZ

APROBADA POR:



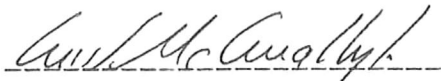
PRESIDENTE DEL JURADO
OC. ENRIQUE VALENZUELA ESPINOZA



SINODAL PROPIETARIO
OC. VICTOR GENDROP FUNES



SINODAL PROPIETARIO
M.C. GUILLERMO TORRES MOYE



SINODAL SUPLENTE
OC. LEWIS S. McANALLY SALAS



SINODAL SUPLENTE
OC. ARTURO SIQUEIROS VALENCIA

RECONOCIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Marinas por haberme permitido ingresar a sus filas y cursar esta carrera con la cual me identifiqué plenamente.

A cada uno de mis maestros que durante cinco años contribuyeron grandemente para mi formación personal y profesional, los cuales me enseñaron más de los que ellos mismos se pudiesen imaginar.

A mi "Dire" Dc. Enrique Valenzuela Espinoza por creer en mí como tesista, por darme la oportunidad de trabajar con él en el laboratorio de producción de microalgas del Instituto de Investigaciones Oceanológicas y sobre todo, por su apoyo y amistad incondicional que siempre me ha brindado, para él mi admiración.

A Dc. Victor Gendrop, M.C. Guillermo Torres, Dc. Luis McAnally y Dc. Arturo Siqueiros por sus críticas y atinados consejos para el mejoramiento de este escrito y sobre todo porque sé que en el futuro puedo contar con ellos, al igual que ellos conmigo. Para ellos mi respeto.

Un reconocimiento especial al Dc. Salvador Galindo por su gran accesibilidad y solidaridad que tuvo para conmigo. GRACIAS.

A las familias Caicedo Acosta y Shinohara Inowe, la primera por su apoyo absoluto para adentrarme en esta profesión; a la segunda por permitirme formar parte de su hogar, demostrarme tanto cariño y considerarme " El hijo descarriado ".

DEDICATORIA

A los autores de mis días:

GUADALUPE GONZALEZ DE WILBURN

Por ser mi confidente y darme tanto cariño, amor y ternura.

JORGE WILBURN GARCIA

Por enseñarme a tener fortaleza y valor en momentos difíciles.

A ambos, por su abnegación, constante estímulo y ofrecerme siempre lo mejor.

A mi abuelita:

ADELFA CUERVO VDA. DE GONZALEZ.

Porque siempre tiene un toque de ternura y cariño para conmigo.

A mis hermanos y cuñados:

JOSE ANTONIO Y CECILIA.

MARTHA GUADALUPE Y HORACIO RAFAEL.

RUTH ELNORA Y ALBERTO.

Porque en todo momento me han demostrado que lo son y lo mucho que valen.

A mis SOBRINOS:

Los que estan, los que vendran y el que se ha ido, por sembrar en mí sentimientos que nunca imagine.

Quien mucho los ama.

Jorge

RESUMEN

Se experimentó con *Pavlova lutheri*, la cual se cultivo con sulfato de amonio, nitrato de amonio, nitrato de calcio con amonio, urea y adiciones de bióxido de carbono, para conocer su rendimiento en producción con las distintas fuentes de nitrógeno. La concentración de nitrógeno de cada fertilizante fue fijada en 882.143 μ gr AT N/L establecida en base al medio f/2 de Guillard (1975). Un flujo de aire de 15 lts/min y tiempo promedio de suministro de CO_2 de tres minutos a 20 Kg/cm² fue suficiente para situar el pH en un intervalo de 7.2-7.5. Bajo estas condiciones se observó una buena asimilación de todas las fuentes de nitrógeno, con un predominio de urea, nitrato de amonio + CO_2 y nitrato de calcio con amonio en la producción final. Al utilizar CO_2 no siempre se incrementó la densidad celular en los sistemas. No se encontraron diferencias significativas a un intervalo de 95% en la producción con las distintas fuentes de nitrógeno. Los costos de producción comparados con el f/2 se redujeron notablemente siendo: urea 99.19%, nitrato de calcio con amonio 97.72%, nitrato de amonio 99.28% y sulfato de amonio 98.81%.

CONTENIDO

	PAGINA
INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES.....	4
OBJETIVO.....	8
MATERIALES Y METODOS.....	9
RESULTADOS.....	15
DISCUSIONES.....	33
CONCLUSIONES.....	40
SUGERENCIAS.....	41
LITERATURA CITADA.....	42
APENDICE I.....	50

LISTA DE FIGURAS

	PAGINA
Figura 1. Crecimiento poblacional de <i>Pavlova lutheri</i> cultivada con sulfato de amonio sin CO ₂ (A) y con CO ₂ (B).	19
Figura 2. Crecimiento poblacional de <i>Pavlova lutheri</i> cultivada con nitrato de amonio sin CO ₂ (A) y con CO ₂ (B).	21
Figura 3. Crecimiento poblacional de <i>Pavlova lutheri</i> cultivada con nitrato de calcio con amonio sin CO ₂ (A) y con CO ₂ (B).	24
Figura 4. Crecimiento poblacional de <i>Pavlova lutheri</i> cultivada con urea sin CO ₂ (A) y con CO ₂ (B).	26
Figura 5. Crecimiento poblacional de <i>Pavlova lutheri</i> cultivada con el medio f/2 sin CO ₂ (A) y con CO ₂ (B).	29
Figura 6. Costos de los medios de cultivo en el sistema de producción para 1,000 litros tomando como referencia el f/2.	31

LISTA DE TABLAS

PAGINA

Tabla I. Diseño experimental y pesos de los fertilizantes para preparar los medios de cultivo.	13
Tabla II. Diferencias significativas de las pruebas de comparación multiple con los diferentes tratamientos durante el tiempo de cultivo. Donde los números representan los grupos homogéneos para cada día de cultivo y las letras la producción promedio, aumentando alfabeticamente. Nivel de confianza 95%	16
Tabla III. Valores poblacionales promedio de <i>Pavlova lutheri</i> cultivada con sulfato de amonio sin CO ₂ (A) y con CO ₂ (B).	20
Tabla IV. Valores poblacionales promedio de <i>Pavlova lutheri</i> cultivada con nitrato de amonio sin CO ₂ (A) y con CO ₂ (B).	22
Tabla V. Valores poblacionales promedio de <i>Pavlova lutheri</i> cultivada con 0 nitrato de calcio con amonio sin CO ₂ (A) y con CO ₂ (B).	25
Tabla VI. Valores poblacionales promedio de <i>Pavlova lutheri</i> cultivada con urea sin CO ₂ (A) y con CO ₂ (B).	27
Tabla VII. Valores poblacionales promedio de <i>Pavlova lutheri</i> cultivada con el medio f/2 sin CO ₂ (A) y con CO ₂ (B).	30

Tabla VIII. Costos y rendimientos en la producción para 1,000 litros de cultivo con las diferentes fuentes de nitrógeno. Cotizando un dolar a \$ 2,700.	32
---	----

INTRODUCCION

Además del carbono, hidrógeno y oxígeno, las microalgas requieren de 13 a 15 elementos adicionales para crecer y reproducirse. La mayoría de estos nutrimentos suelen encontrarse en la superficie oceánica en cantidades suficientes para el crecimiento. Sin embargo, las concentraciones de nitrógeno suelen ser lo suficientemente altas para permitir que el fitoplancton crezca en las aguas de la superficie (Darley, 1987).

Las principales formas inorgánicas, nitratos, nitritos y amonio pueden ser utilizadas como fuentes de nitrógeno por la mayoría de las algas. La capacidad para usar varias formas de nitrógeno orgánico, particularmente urea, es bastante común entre estas. Aunque el fitoplancton puede disponer de fuentes inorgánicas u orgánicas, las dos formas más importantes de nitrógeno combinado son nitrato y amonio, las cuales pueden limitar la productividad fitoplanctónica o biomasa, tanto en ambientes marinos como en sistemas de cultivo (Syrett, 1981).

La forma de cultivo más usual, es aquella en la cual una solución acuosa de volumen limitado, conteniendo los nutrimentos inorgánicos y orgánicos necesarios, es inoculada con un número relativamente pequeño de células y expuesta a condiciones favorables de luz y temperatura

(Fogg, 1965). En la medida en que se han desarrollado las técnicas de acuicultura comercial, también los métodos de producción de algas unicelulares se han ido perfeccionando con el fin de garantizar la alimentación adecuada de las larvas y adultos de bivalvos, tanto desde el punto de vista cuantitativo como cualitativo (Alfonso y Martínez, 1987).

Independientemente de la eficiencia de los medios de cultivo, uno de los aspectos que requiere la atención sobre todo de los cultivadores de organismos filtroalimentadores, es una producción económica y masiva de fitoplancton, ya que por lo general, los medios tradicionales de cultivo se preparan con sales nutritivas que se obtienen de casas comerciales a precios elevados (Granados-Machuca y Buckle-Ramírez, 1984).

En muchos cultivos a nivel masivo, no se ha considerado la importancia de la concentración de bióxido de carbono (CO_2) y oxígeno (O_2), y el efecto que estos producen sobre la enzima carboxilaza ribulosa difosfato, la cual cataliza las reacciones de asimilación del CO_2 a la ribulosa 1-5 difosfato para la formación de carbohidratos. El efecto neto de la fotosíntesis es muy sencilla, el carbono en su forma oxidada y de más baja energía como bióxido de carbono es asimilado por el fitoplancton en su forma reducida y de mayor energía como carbohidrato (Konopka y Schnur, 1980., citado por Darley, 1987). Así,

la ocurrencia de la fotosíntesis se ve favorecida por altas concentraciones de CO_2 y ésta es inhibida en presencia de altas concentraciones de O_2 , llamandose a este proceso fotorespiración, afectando de esta manera la producción de microalgas (Tolbert, 1974).

Un gran número de especies de microalgas han sido cultivadas con diversos medios y niveles de producción, una de las más usadas es *Pavlova* (*Monochrysis*) *lutheri* que es una microalga perteneciente a la clase Prymnesiophyceae cuyo tamaño es de 5 a 6 micras (De Pauw, 1981). Las células son móviles, de color café-amarillo y carecen de pared celular, tiene dos flagelos diferentes en tamaño y un haptonema. Debido a su pequeño tamaño y alto valor nutritivo ha sido utilizada por muchos investigadores en estudios de cinética, nutrición y bioquímica (Green, 1975). Se ha cultivado a nivel masivo en acuacultura como alimento para estadios larvales y adultos de moluscos, principalmente ostiones (De Pauw, 1981; Palmer et al., 1975).

ANTECEDENTES

Son numerosas las investigaciones que han aportado nuevas alternativas para la producción de microalgas utilizando diversos medios de cultivo.

Davis y Ukeles (1961) realizaron cultivos en agua de mar enriquecida con nutrimentos y encontraron que el crecimiento fue ocasionalmente pobre. Así mismo, Ukeles (1965); Dunstan y Menzel (1971) demostraron que el agua de mar enriquecida con fertilizantes tanto inorgánicos como orgánicos generan una adecuada producción de alimento vivo para bivalvos.

La utilización de nutrimentos de diversa indole, como las harinas de pescado, de algodón, de girasol, de alfalfa, de soya, de sangre, de huesos, de lombriz, levadura de cerveza desecada, guano de aves y excremento de lombriz de tierra (casting) han servido de base para una producción económica de microalgas tanto en condiciones controladas de laboratorio como en cultivos externos (De la Cruz y Alfonso, 1975; De la Cruz, 1985; Alfonso y Leal, 1985; Alfonso y Nuñez, 1985; Leal *et al.*, 1985; Alfonso y Martínez, 1987).

Nuevamente a resurgido el interes en el uso de compuestos agrícolas, como sulfato de amonio, cloruro de amonio, superfosfatos, nitrato de calcio, nitrato de amonio

y urea como nutrimentos para el cultivo de microalgas a gran escala (De Pauw, 1981; Boyd et al., 1981; Guerrero et al., 1981; Riva y Lelong, 1981).

McCarthy (1971) citado por McCarthy (1972) realizó investigaciones relacionadas con la utilización de urea en 40 clones unialgales y encontró que 35 especies utilizaron el compuesto. Por otro lado, Ukeles (1965) empleo agua de mar artificial enriquecida con urea para el cultivo externo de *Monochrysis lutheri*, cuya producción al décimo día fue de 1,900,000 cél/ml. González-Rodríguez y Maestrini (1984) obtuvieron densidades de 1,600,000 cél/ml con *Pavlova pinguis* al décimosexto día de cultivo con fertilizantes agrícolas.

Uno de los principales problemas en cultivos masivos es el incremento del pH debido a la fotosíntesis. Guillard (1975) menciona que la aireación no es suficiente para controlar el pH y Fabregas et al. (1985) indican que el control del pH permite un mejor aprovechamiento de nutrimentos.

La adición de bióxido de carbono aparte de controlar los niveles de pH en sistemas de producción, es una fuente de carbono inorgánico, aumentando la densidad celular y prolongando el crecimiento (Palmer et al., 1975; Schrader, 1975; Gallegos et al., 1980). Pruder y Bolton (1979) señalan que la fijación del carbono del CO₂ varia

dependiendo del organismo, el medio de cultivo y el estado de crecimiento.

El Instituto de Investigaciones Oceanológicas (I.I.O.), la Facultad de Ciencias Marinas (F.C.M.) y el Centro de Investigaciones Científicas y Educación Superior de Ensenada (CICESE) han experimentado el cultivo de algas unicelulares con los medios convencionales f/2 de Guillard (1975) y Matthiessen y Torner (1966) (Islas-Olivares et al., 1978; Caceres-Martínez, 1979; Paniagua-Michel et al., 1986). Badillo-Castro (1989) obtiene una densidad aceptable de 2,071,409 cél/ml con *Monochrysis lutheri* en cultivo semicontinuo en volúmenes de 500 litros. Así mismo, Granados-Machuca y Buckle-Ramírez (1984); Paniagua-Michel y Buckle-Ramírez (1985) cultivaron esta flagelada con nutrimentos obtenidos de la descomposición líquida de estiércoles de vaca y gallina y con extractos líquidos de *Macrocystis pyrifera* y *Zostera marina* respectivamente, obteniendo buenos rendimientos poblacionales.

Recientemente se ha experimentado el cultivo en *Tetraselmis suecica* variando las concentraciones de nutrimentos (Velázquez-Magaña, 1989) y adicionando CO₂ (Valenzuela-Espinoza, 1988) encontrándose que el crecimiento es mejor cuando se usa la mitad de nutrimentos y CO₂.

Actualmente se han venido utilizando fertilizantes agrícolas de manufactura nacional en el cultivo de *Tetraselmis suecica* tanto en condiciones controladas de laboratorio como en cultivos externos y en diferentes niveles de cultivo, sin encontrarse diferencias generalmente significativas en la producción con respecto a los medios convencionales (Aviles-Sanchez, 1988; Herrera-Treviño, 1988; McAnally-Salas et al., en preparación).

Las demandas existentes de alimento y los altos costos involucrados en la producción hacen necesaria la búsqueda de nuevas fuentes de nutrimentos para el cultivo. Una alternativa la constituyen los fertilizantes agrícolas como única fuente de nitrógeno. De acuerdo a lo anterior se plantea si *Pavlova lutheri* es capaz de asimilar diferentes formas nitrogenadas orgánicas e inorgánicas y estudiar el efecto que estas producen sobre los cultivos en la producción.

OBJETIVO

El presente trabajo tiene como objetivo experimentar con diferentes fertilizantes agrícolas y bióxido de carbono para conocer cual fuente de nitrógeno es la más adecuada para el cultivo de *Pavlova lutheri*.

MATERIALES Y METODOS

Este estudio se llevó a cabo en el laboratorio de producción de microalgas del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California.

La cepa de *Pavlova lutheri* fue adquirida del National Marine Fisheries Service (NOAA) en 1984 y desde entonces es mantenida en cultivo unialgal.

Las condiciones de temperatura que se tuvieron en el cuarto de cultivo durante el desarrollo de los experimentos fue de 18 a 20 °C . El agua de mar se trató mediante filtros de cartucho (CUNO) de 3 y 1 micras y se desinfectó mediante un sistema de luz ultravioleta modelo H-50 (Islas et al., 1978).

Se mantuvo la cepa con el medio f/2 de Guillard (1975) en matraces Erlenmeyer de 250 ml, con un volumen de 100 ml de medio de cultivo, el cual se esterilizó en autoclave a 121 °C a 15 lbs/pulg² (1.05 Kg/cm²) de presión durante 10 minutos. Una vez enfriados, en una atmósfera aséptica generada por dos mecheros Bunsen se le agregaron las vitaminas previamente esterilizadas. Finalmente se inoculó con 3 ml del stock de microalgas existente con pipetas graduadas y esterilizadas.

Los cultivos en Erlenmeyer fueron expuestos a una fuente luminosa constante (1.008 watts/m^2) con lámparas fluorescentes tipo luz fría (Sylvania de 40 watts) por un período de siete días, tiempo en el cual el cultivo esta en óptimas condiciones de crecimiento, se agitaron diario para que ocurriera la difusión de nutrimentos y CO_2 y evitar la precipitación de los cultivos.

Los garrafones con capacidad de 20 lts fueron lavados y llenados con agua de mar, la desinfección se hizo por un método químico. Se preparó una solución de cloro (416 ml de cloro comercial aforados a 1000 ml con agua destilada), se agregan 0.25 ml/lts de esta solución a cada garrafón, se dejó reposar durante 12 hrs, al término de las cuales se le extraen 4 lts por medio de aireación y son añadidos 0.1 ml/lt de Tiosulfato de sodio (248.1 grs disueltos en 1000 ml de agua destilada), se mantuvo con aireación con un compresor de aire seco (conde 12) durante 2 hrs para neutralizar la acción del cloro (Pruder y Bolton, 1978).

Realizado lo anterior, los garrafones se colocaron en una atmósfera aséptica, se le agregaron los nutrimentos y vitaminas esterilizadas del medio f/2, se inocularon con 300 ml del cultivo obtenido en el primer nivel. Posteriormente fueron expuestos a una intensidad de luz constante proporcionada por cuatro lámparas fluorescentes

de luz fría Sylvania de 75 watts y un flujo de aire de 7.5 lts/min (medido con un flujómetro Gilmont).

Estuvieron bajo estas condiciones de 10-12 días para después ser transferidos a tanques de fibra de vidrio de 1.26 mts de diámetro por 40 cm de profundidad con un volumen útil de cultivo de 385 lts y 19300 cm² de exposición a la luz. En estos tanques se experimentó con el medio f/2 y los diferentes fertilizantes. Se utilizaron cuatro fertilizantes: sulfato de amonio, nitrato de amonio, nitrato de calcio con amonio y urea marca FERTIMEX como único nutrimento y fuente de nitrógeno. Se calculó la cantidad necesaria de nitrógeno para pesar los fertilizantes en base al medio f/2, siendo de 882.143 μ gr AT N/L. Los fertilizantes fueron pesados y disueltos en agua destilada para ser aplicados directamente sin ningún tratamiento previo.

Cada tanque fue llenado con agua de mar, se le adicionaron los nutrimentos correspondientes (1ml/lt) y se inoculó con un garrafón de cultivo concentrado; estos también tuvieron una fuente de luz constante que fue proporcionada por lámparas de 500 watts (Osram) provistas de un aro de metal y colocadas en la parte superior central del tanque, recibiendo una intensidad luminica superficial de 236 watts/m². La aireación fue de 15 lts/min para tener una mejor homogenización de los nutrimentos y favorecer la

exposición de las microalgas a la luz permaneciendo bajo estas condiciones siete días.

El CO_2 fue adicionado diariamente al cultivo hasta situar el pH a un intervalo de 7.2-7.5 con una manguera conectada al cilindro de este gas y provista de un peso en su extremo para que llegara al fondo. Durante las adiciones se suspendía el suministro de aire.

Se realizaron 10 experimentos cada uno con una replica correspondiendo la mitad sin adición de bióxido de carbono y la otra con adición (Tabla I).

Tabla I. Diseño experimental y pesos de los fertilizantes para preparar los medios de cultivo.

Medio de cultivo	bióxido de carbono	Número de experimentos	Cantidad (gr/lt).
Sulfato de amonio	Presente	2	58.22
	Ausente	2	
Nitrato de amonio	Presente	2	35.28
	Ausente	2	
Nitrato de calcio con amonio	Presente	2	74.0
	Ausente	2	
Urea	Presente	2	26.46
	Ausente	2	
f/2	Presente	2	75.0
	Ausente	2	

Se llevaron registros diarios de temperatura (termómetro ERTCO con escala de -1 a 51 °C y una precisión de 0.1 °C); pH (potenciometro Fisher modelo 156) y densidad de cultivo (espectrofotómetro Hatch DR/2) a una longitud de onda de 675 nm (Apéndice I).

Se estimaron los siguientes valores poblacionales: velocidad de crecimiento (k), tiempo de duplicación (TD), producción diaria (PD) y divisiones por día (D) (Guillard, 1973; De la Cruz y Alfonso, 1975).

Para el tratamiento estadístico de los datos se realizaron pruebas de Normalidad (Prueba de Kolmogorov-Smirnov) y Homogeneidad de varianzas (Prueba de Bartlett) como requisito previo para manejar estadística paramétrica (Steel y Torrie, 1985).

Para determinar las diferencias significativas en la densidad para cada día de cultivo con los diferentes tratamientos se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) a un nivel de confianza del 95%; para los días que presentaron diferencias entre tratamientos se hicieron pruebas de comparación múltiple.

RESULTADOS

Durante el desarrollo de ésta investigación la temperatura de los cultivos tuvo una mínima de 15.3 °C y una máxima de 24.4 °C, con un promedio de 22.17 °C.

El pH en los cultivos sin CO₂ fluctuó entre 7.8 y 9.1 con un promedio de 8.43 y en los cultivos con CO₂ fue de 7.9 y 8.3 con un promedio de 8.09. La salinidad se mantuvo constante a 32 ‰.

El tiempo promedio de adición de CO₂ fue de tres minutos a una presión de 20 Kg/cm² ajustando el pH a un intervalo de 7.2-7.5.

Las pruebas de análisis de varianza (ANOVA) de una vía entre tratamientos mostraron diferencias significativas en la densidad para cada día de cultivo, a excepción del día uno, en el cual todos los tratamientos fueron homogéneos. La tabla II muestra el resultado de las pruebas de comparación múltiple para los días de cultivo, en el día tres hubo cinco grupos homogéneos estadísticamente diferentes, para los días seis y siete el único medio diferente fue el f/2+CO₂.

Tabla II. Diferencias significativas de las pruebas de comparación múltiple con los diferentes tratamientos durante el tiempo de cultivo. Donde los números representan los grupos homogéneos para cada día de cultivo y las letras la producción promedio; aumentando alfabeticamente. Nivel de confianza 95%.

Tratamientos.	Tiempo de cultivo							
	Día0	Día1	Día2	Día3	Día4	Día5	Día6	Día7
sulfato de amonio	1f	1g	2g	5i	4i	3j	2j	2j
sulfato de amonio+CO ₂	2i	1i	3i	4h	3g	3g	2g	2f
nitrate de amonio	1b	1d	1e	4g	3h	3h	2i	2i
nitrate de amonio+CO ₂	1c	1b	1a	1a	1b	2b	2c	2d
nitrate de calcio con amonio	1b	1c	1b	2c	2c	2f	2e	2e
nitrate de calcio con amonio+CO ₂	1g	1g	2f	4h	3f	3i	2h	2h
urea	1a	1a	1c	2d	2d	2c	2d	2c
urea+CO ₂	1h	1h	2h	3e	2c	2e	2f	2g
f/2	1e	1f	2f	4f	2e	2d	2b	2b
f/2+CO ₂	1d	1e	1d	2b	1a	1a	1a	1a

Todas las graficas indican que se presentó la fase de retardo en los cultivos y el crecimiento exponencial ocurrió a partir del día uno. Los valores poblacionales se calcularon hasta el quinto día de cultivo para todos los medios debido a que los fertilizantes muestran un pobre crecimiento a partir de dicho día.

Las curvas de crecimiento y valores poblacionales de *Pavlova lutheri* cultivada con sulfato de amonio se muestran en la figura 1 y Tabla III respectivamente. El experimento sin CO₂ inició con 494,811 cél/ml, alcanzó una densidad de 1,983,957 cél/ml. Cuando se adicionó CO₂ el cultivo empezó con 448,649 cél/ml y generó una producción de 2,172,660 cél/ml. La fase de crecimiento exponencial para el cultivo sin CO₂ ocurrió en los días uno y dos con una velocidad de crecimiento (k) de 0.56 y 0.81 divisiones por día (D), cuando se adiciono CO₂ la fase de crecimiento exponencial ocurrió del día uno al tres, con una velocidad de crecimiento (k) de 0.50 y 0.72 divisiones por día (D). Se obtuvo la máxima producción sin adición de CO₂ al segundo día y con CO₂ al tercer día.

Al utilizar nitrato de amonio se generó una producción final de 2,036,870 cél/ml iniciando el cultivo con 564,603

cél/ml. Al adicionar CO_2 la producción fue mayor con 2,458,640 células/ml iniciando con 564,480 células/ml ocurriendo la fase de crecimiento exponencial en los días uno y dos (Fig. 2). En la Tabla IV se localizan los valores poblacionales, se obtuvieron velocidades de crecimiento (k) de 0.98 y 0.61 con 1.41 y 0.88 divisiones por día (D). Las máximas producciones diarias (PD) correspondieron al segundo día.

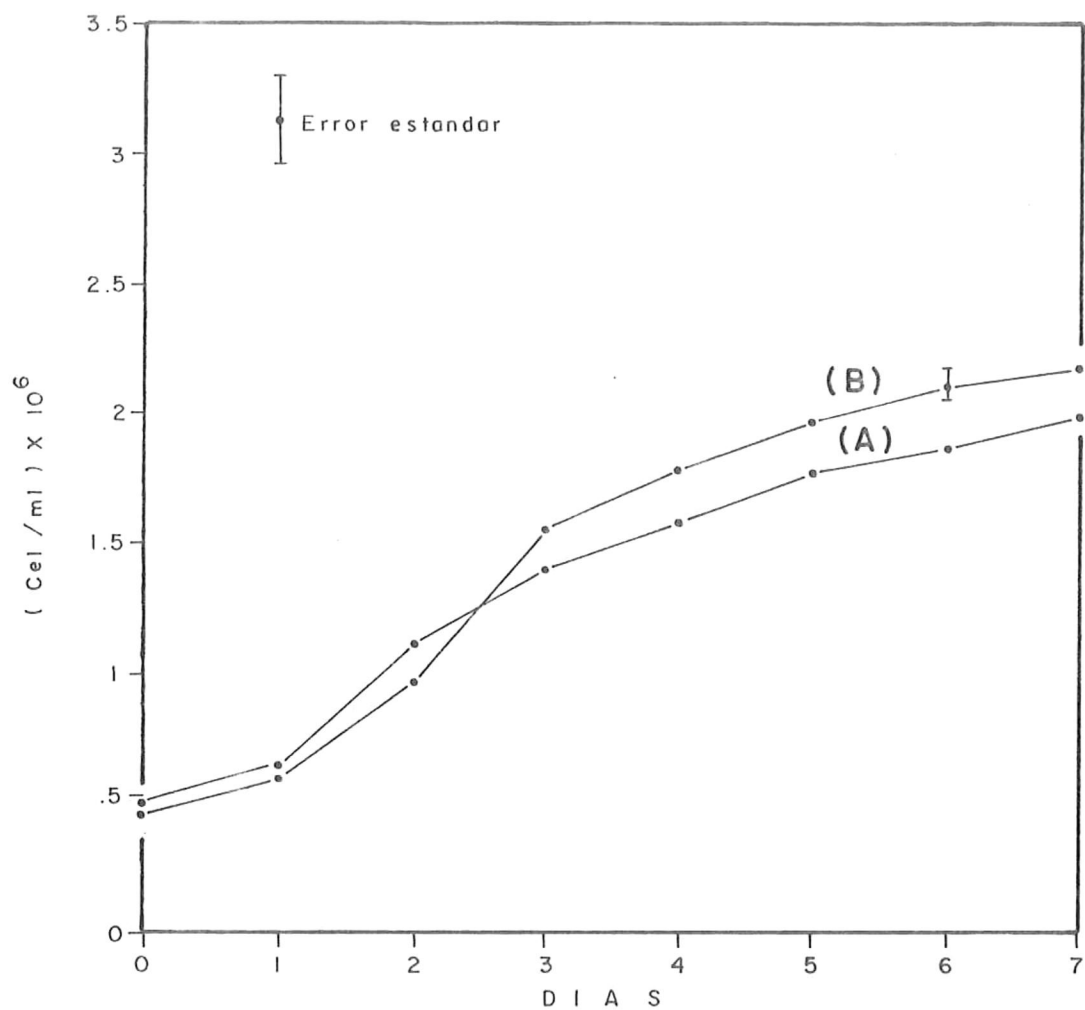


FIGURA 1 - CRECIMIENTO POBLACIONAL DE Pavlova lutheri
CULTIVADA CON SULFATO DE AMONIO SIN CO_2 (A)
Y CON CO_2 (B).

Tabla III. Valores poblacionales promedio de *Pavlova lutheri* cultivada con sulfato de amonio sin CO₂ (A) y con CO₂ (B)

A

Tiempo (día)	Concentración (cél/ml)	K	TD (días)	D (div/día)	PD (cél/ml)
0	494,811	*	*	*	*
1	634,766	0.25	2.77	0.36	139,955
2	1,118,007	0.56	1.24	0.81	483,241
3	1,410,479	0.23	3.01	0.33	292,472
4	1,584,578	0.12	5.78	0.17	174,099
5	1,766,668	0.11	6.30	0.16	182,090
6	1,867,391	0.06	11.56	0.09	100,723
7	1,983,957	0.06	11.56	0.09	116,566
Promedios		0.25	3.82	0.36	

B

Tiempo (día)	Concentración (cél/ml)	K	TD (días)	D (div/día)	PD (cél/ml)
0	448,649	*	*	*	*
1	587,867	0.27	2.57	0.39	139,218
2	970,233	0.50	1.39	0.72	382,366
3	1,560,849	0.48	1.44	0.70	590,616
4	1,779,177	0.13	5.33	0.19	218,328
5	1,970,773	0.10	6.93	0.14	191,596
6	2,104,150	0.06	11.56	0.09	133,377
7	2,172,660	0.04	17.33	0.06	68,510
Promedios		0.29	3.53	0.43	

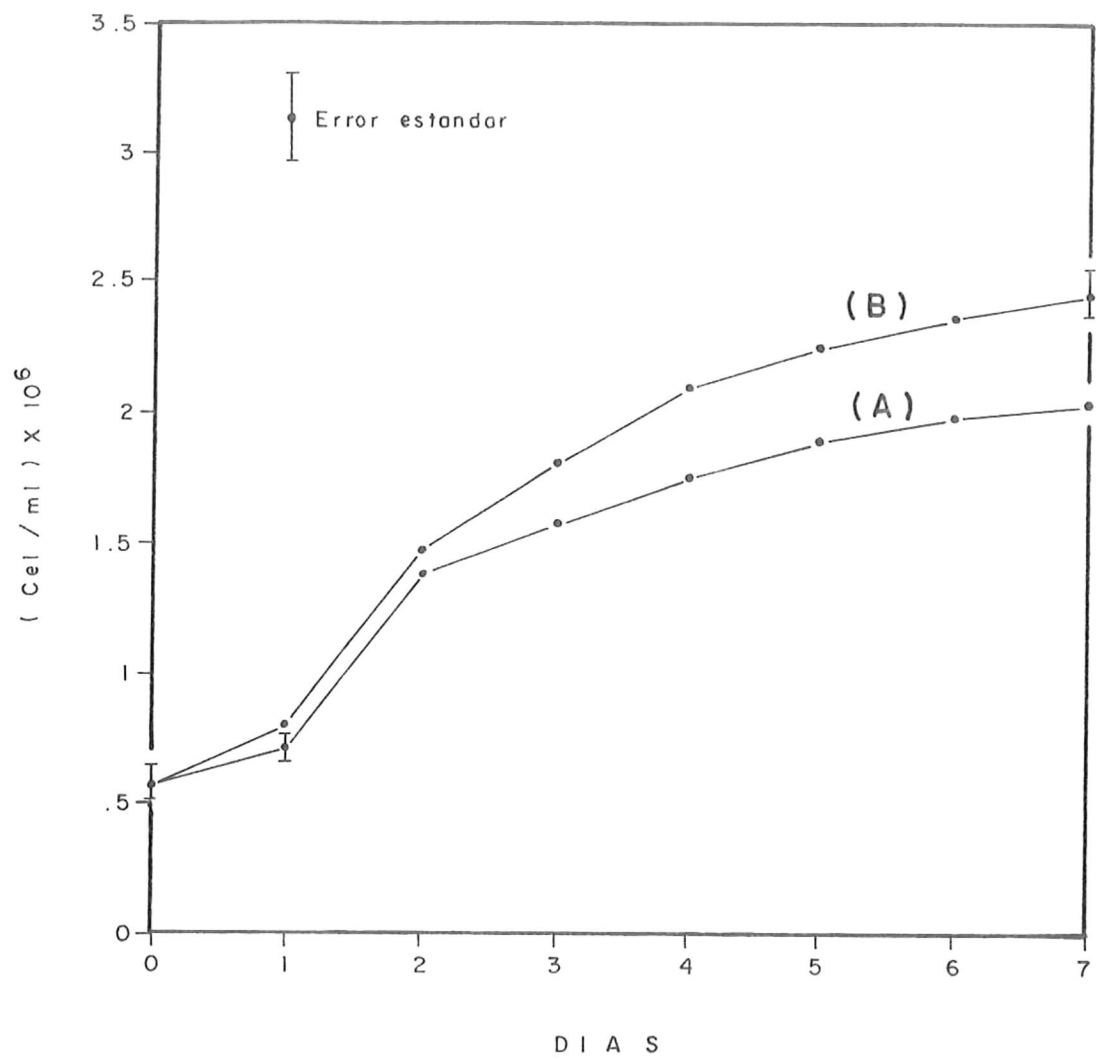


FIGURA 2 - CRECIMIENTO POBLACIONAL DE Pavlova lutheri
CULTIVADA CON NITRATO DE AMONIO SIN CO_2 (A)
Y CON CO_2 (B).

Tabla IV. Valores poblacionales promedio de *Pavlova lutheri* cultivada con nitrato de amonio sin CO₂ (A) y con CO₂ (B).

A

Tiempo (día)	Concentración (cél/ml)	K	TD (días)	D (div/día)	PD (cél/ml)
0	564,603	*	*	*	*
1	705,681	0.22	3.15	0.32	141,078
2	1,387,984	0.98	0.71	1.41	682,303
3	1,584,578	0.13	5.33	0.19	196,594
4	1,754,317	0.10	6.93	0.14	169,739
5	1,892,982	0.08	8.66	0.12	138,611
6	1,983,957	0.05	13.86	0.07	90,975
7	2,036,870	0.02	34.66	0.03	52,913
Promedios		0.30	4.95	0.44	

B

Tiempo (día)	Concentración (cél/ml)	K	TD (días)	D (div/día)	PD (cél/ml)
0	564,480	*	*	*	*
1	800,872	0.35	1.98	0.51	236,392
2	1,479,171	0.61	1.14	0.88	678,299
3	1,816,705	0.21	3.30	0.30	337,534
4	2,103,963	0.14	4.95	0.20	287,258
5	2,255,978	0.07	9.90	0.10	152,015
6	2,370,309	0.05	34.66	0.03	114,331
7	2,458,640	0.04	17.33	0.06	88,331
Promedios		0.27	4.25	0.40	

El crecimiento de esta flagelada cuando estuvo en presencia de nitrato de calcio con amonio se muestra en la figura 3, la máxima concentración fue de 2,285,072 cél/ml que correspondió al cultivo sin CO₂ que inició con 564,603 cél/ml, con CO₂ fue de 2,050,325 cel/ml iniciando con 471,791 cél/ml mostrando la fase de crecimiento exponencial en los días uno y dos. En la tabla V se localizan los valores poblacionales con una velocidad de crecimiento (k) de 0.61 y 0.88 divisiones por día (D) para ambos experimentos. Las máximas producciones diarias se presentaron al segundo día.

Con urea como fuente de nitrógeno el máximo crecimiento fue de 2,473,757 cél/ml que correspondió al cultivo sin CO₂ que mostro la fase de crecimiento exponencial en los días uno y dos. Cuando se adicionó CO₂ se produjeron 2,172,660 cél/ml al quinto día de cultivo, con la fase de crecimiento exponencial del primer al tercer día para después iniciarse la fase estacionaria (Fig. 4). Las velocidades de crecimiento (k) fueron de 0.51 y 0.58 respectivamente, siendo de 0.74 y 0.84 las divisiones por día (D). La máxima producción diaria (PD) se presentó al segundo día con CO₂ y al tercer día sin CO₂ (Tabla VI).

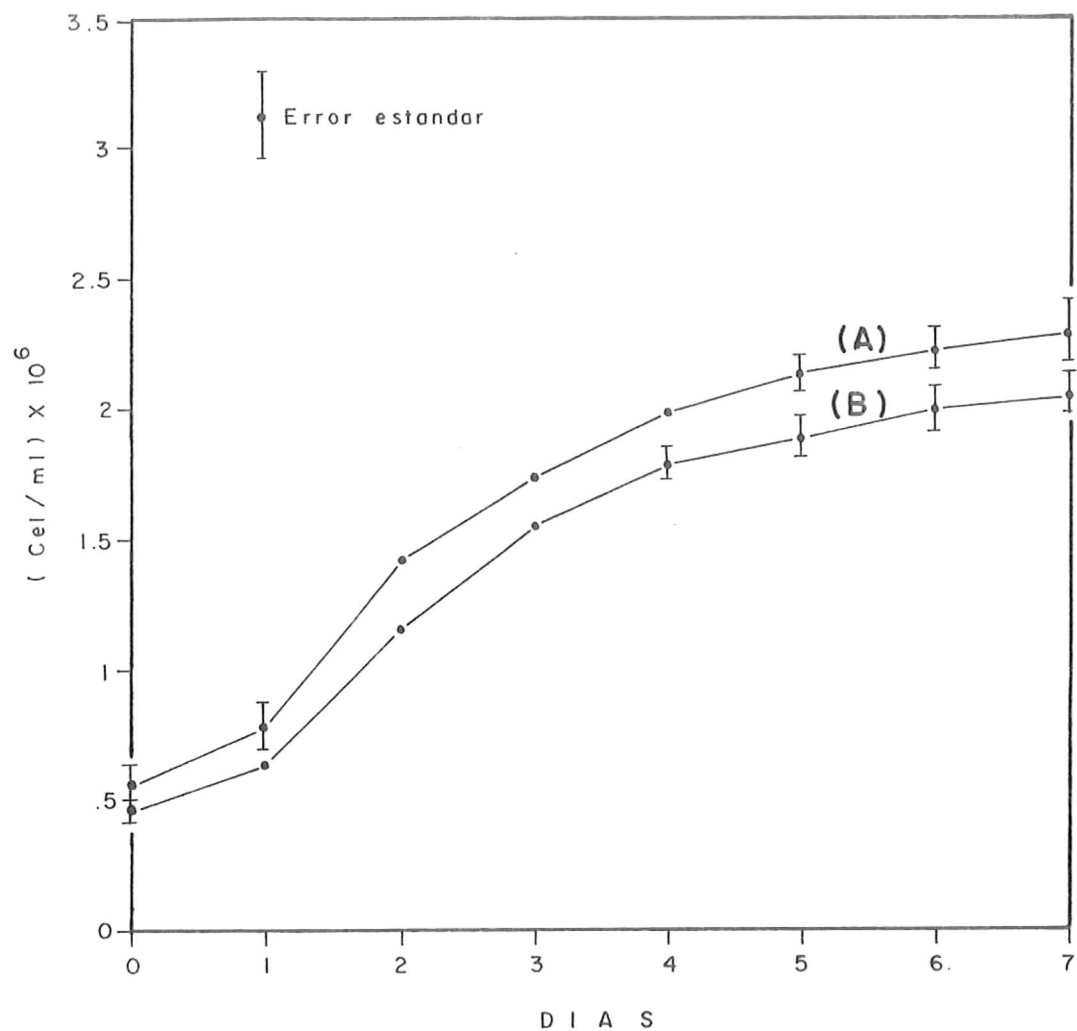


FIGURA 3-CRECIMIENTO POBLACIONAL DE *Pavlova lutheri* CULTIVADA CON NITRATO DE CALCIO CON AMONIO SIN CO₂ (A) Y CON CO₂ (B).

Tabla V. Valores poblacionales promedio de *Pavlova lutheri* cultivada con nitrato de calcio con amonio sin CO₂ (A) y con CO₂ (B).

A

Tiempo (día)	Concentración (cél/ml)	K	TD (días)	D (div/día)	FD (cél/ml)
0	564,603	*	*	*	*
1	777,236	0.32	2.17	0.46	212,633
2	1,433,243	0.61	1.14	0.88	656,007
3	1,741,887	0.20	3.46	0.29	308,644
4	1,983,957	0.13	5.33	0.19	242,070
5	2,131,343	0.07	9.90	0.10	147,386
6	2,228,209	0.04	17.33	0.06	96,866
7	2,285,072	0.03	23.10	0.04	56,863
Promedios		0.26	4.4	0.38	

B

Tiempo (día)	Concentración (cél/ml)	K	TD (días)	D (div/día)	FD (cél/ml)
0	471,791	*	*	*	*
1	634,766	0.30	2.31	0.43	162,975
2	1,167,820	0.61	1.14	0.88	533,054
3	1,560,849	0.29	2.39	0.42	393,029
4	1,791,766	0.13	5.33	0.19	230,917
5	1,880,479	0.05	13.86	0.07	88,713
6	1,997,584	0.06	11.55	0.09	117,105
7	2,050,325	0.03	23.10	0.04	52,741
Promedios		0.27	5.00	0.40	

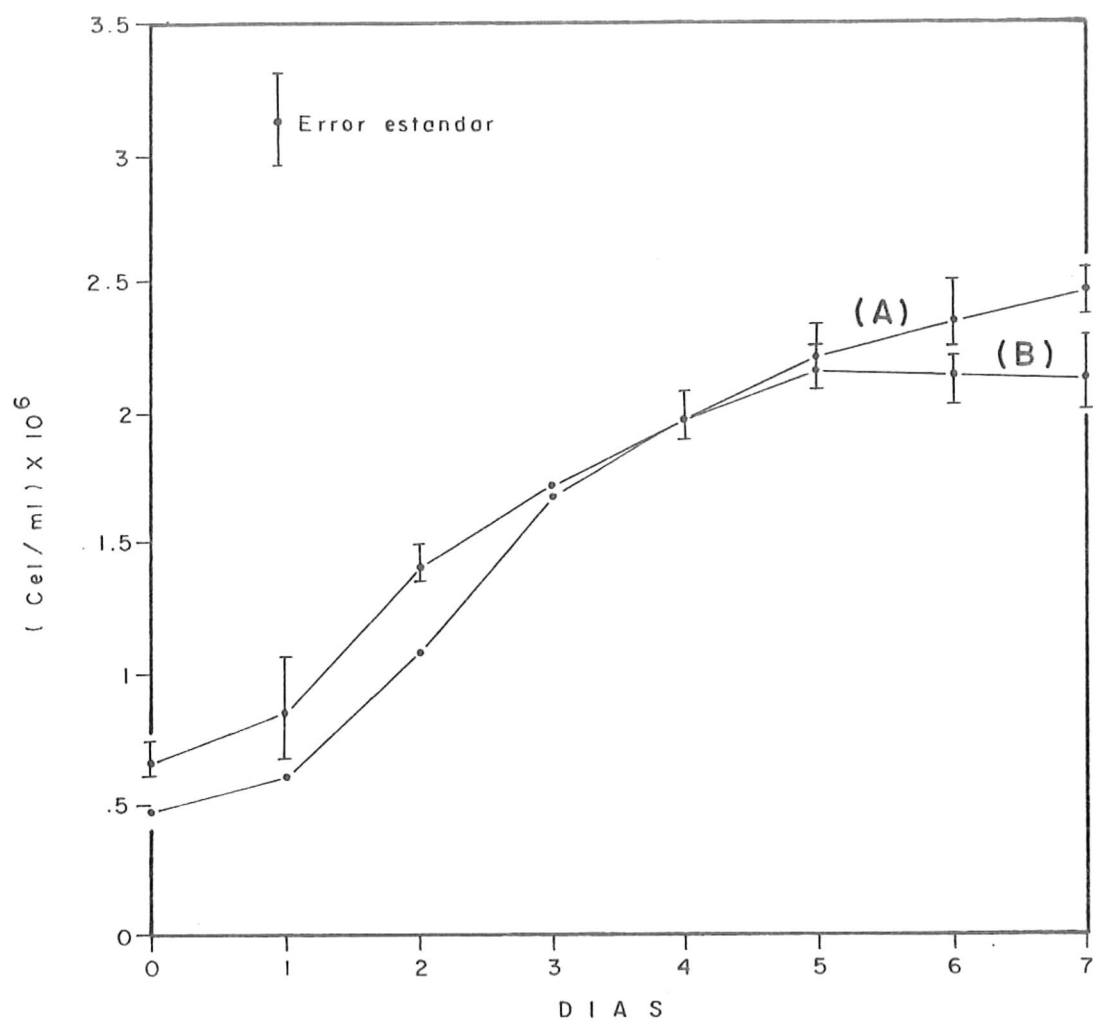


FIGURA 4 = CRECIMIENTO POBLACIONAL DE *Pavlova lutheri* CULTIVADA CON UREA SIN CO₂ (A) Y CON CO₂ (B).

Tabla VI. Valores poblacionales promedio de *Pavlova lutheri* cultivada con urea sin CO₂ (A) y con CO₂ (B).

A

Tiempo (día)	Concentración (cél/ml)	K	TD (días)	D (div/día)	FD (cél/ml)
0	658,403	*	*	*	*
1	850,105	0.26	2.66	0.38	191,702
2	1,422,092	0.51	1.36	0.74	571,987
3	1,729,613	0.20	3.46	0.29	307,521
4	1,971,299	0.13	5.33	0.19	241,686
5	2,228,209	0.12	5.78	0.17	256,910
6	2,343,000	0.05	13.86	0.07	114,791
7	2,473,757	0.06	11.55	0.09	130,757
Promedios		0.24	3.71	0.35	

B

Tiempo (día)	Concentración (cél/ml)	K	TD (días)	D (div/día)	FD (cél/ml)
0	471,670	*	*	*	*
1	611,254	0.26	2.66	0.38	139,584
2	1,093,171	0.58	1.19	0.84	481,917
3	1,680,568	0.43	1.61	0.62	587,397
4	1,983,957	0.17	4.08	0.25	303,389
5	2,172,660	0.09	7.70	0.13	188,703
6	2,145,657	-0.02	-34.66	-0.03	-27,003
7	2,132,294	0	0	0	-13,363
Promedios		0.30	3.44	0.44	

El crecimiento de la microalga en presencia del medio f/2 se indica en la figura 5. Los cultivos iniciaron con 517,953 y 541,216 cél/ml alcanzando concentraciones finales de 2,625,590 y 3,032,194 cél/ml en ausencia y presencia de CO_2 respectivamente, ocurriendo las fases de crecimiento exponencial en los días uno y dos. Las velocidades de crecimiento (k) fueron de 0.58 y 0.73 y con 0.84 y 1.05 divisiones por día (D), siendo al segundo día las máximas producciones diarias (Tabla VII).

La evaluación de los precios para cultivar 1,000 litros en este sistema de producción con respecto al medio f/2 reflejó una reducción de costos usando estos fertilizantes agrícolas (Fig. 6). El cilindro de CO_2 de 25 kgs (50 lbs) se cotizo en \$ 25,000 pudiendo aumentar los costos de producción significativamente, los rendimientos en producción para estas fuentes de nitrógeno se encontraron arriba del 65% tomando como referencia el f/2+ CO_2 (Tabla VIII).

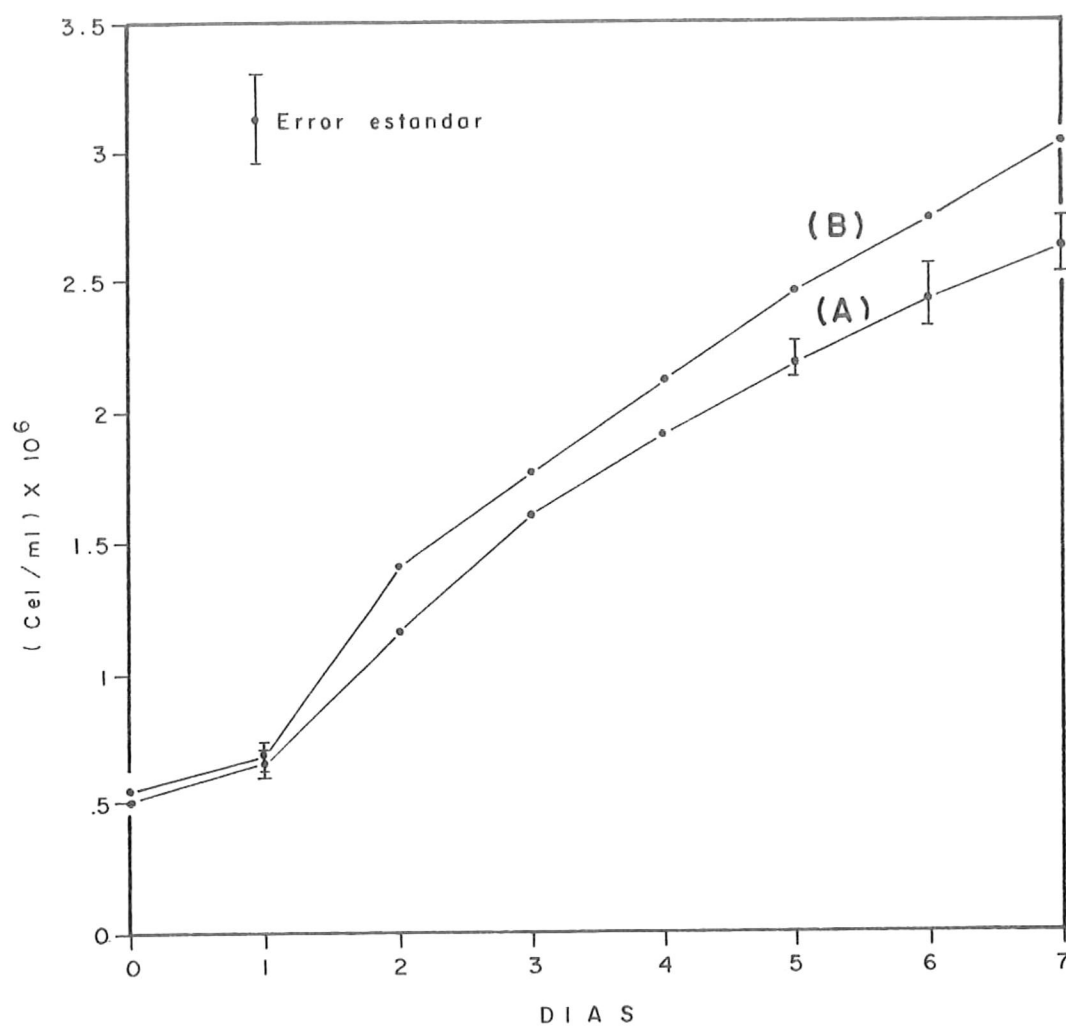


FIGURA 5 - CRECIMIENTO POBLACIONAL DE *Pavlova lutheri* CULTIVADA CON EL MEDIO f/2 SIN CO₂ (A) Y CON CO₂ (B).

Tabla VII. Valores poblacionales promedio de *Pavlova lutheri* cultivada con el medio f/2 sin CO₂ (A) y con CO₂ (B).

A

Tiempo (día)	Concentración (cél/ml)	K	TD (días)	D (div/día)	PD (cél/ml)
0	517,953	*	*	*	*
1	658,403	0.24	2.89	0.35	140,450
2	1,167,820	0.58	1.19	0.84	509,417
3	1,620,266	0.32	2.17	0.46	452,446
4	1,918,741	0.17	4.08	0.25	298,475
5	2,186,303	0.13	5.33	0.19	267,562
6	2,429,637	0.11	6.30	0.16	243,334
7	2,625,590	0.08	8.66	0.12	195,953
Promedios		0.29	3.13	0.42	

B

Tiempo (día)	Concentración (cél/ml)	K	TD (días)	D (div/día)	PD (cél/ml)
0	517,953	*	*	*	*
1	681,915	0.25	2.77	0.36	140,699
2	1,421,843	0.73	0.95	1.05	739,928
3	1,766,668	0.22	3.15	0.32	344,825
4	2,117,511	0.18	3.85	0.26	350,843
5	2,458,191	0.15	4.62	0.22	340,680
6	2,734,683	0.11	6.30	0.16	276,492
7	3,032,194	0.10	6.93	0.14	297,511
Promedios		0.31	3.07	0.44	

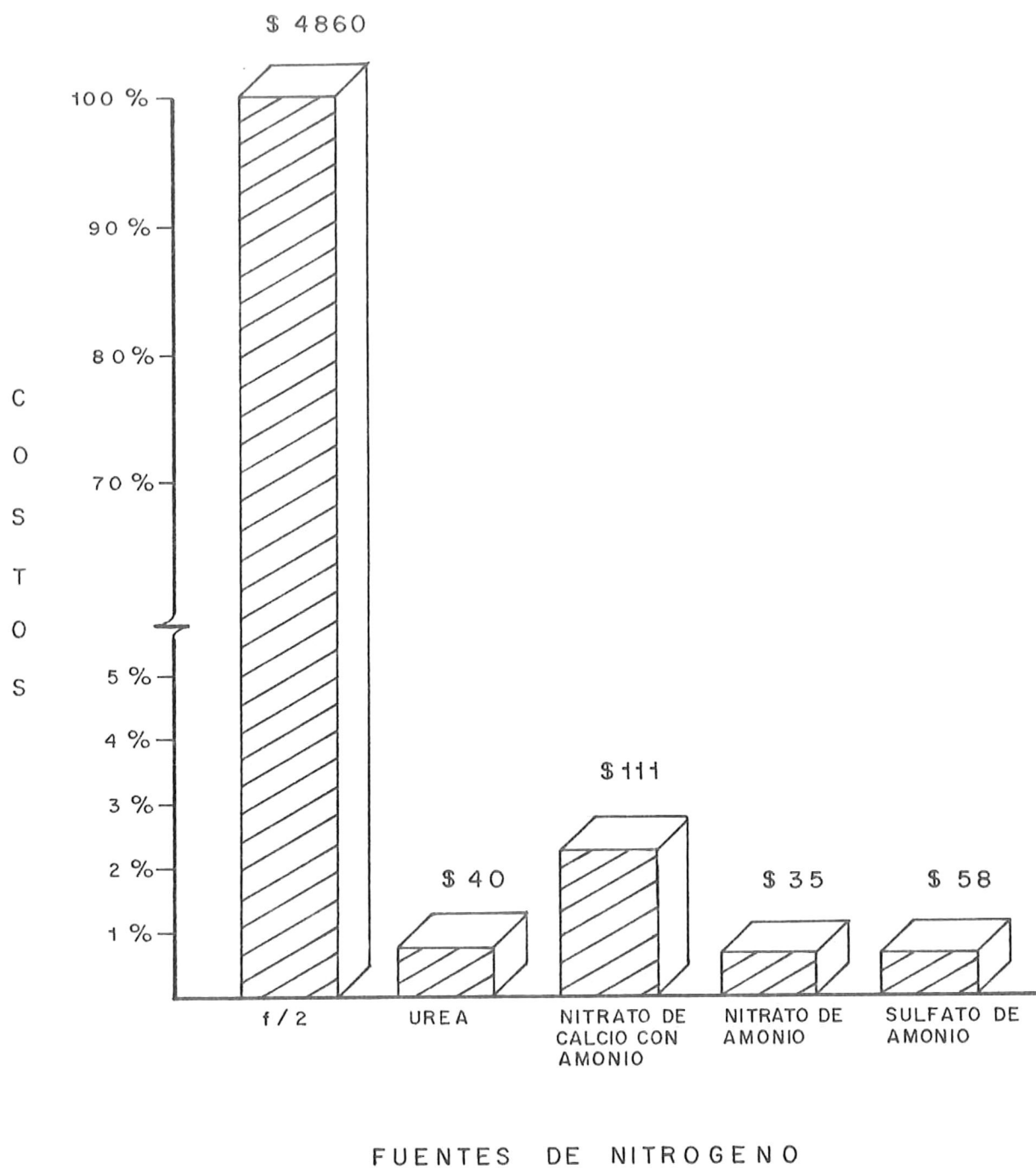


FIGURA 6 - COSTOS DE LOS MEDIOS DE CULTIVO EN EL SISTEMA DE PRODUCCION PARA 1,000 LITROS TOMANDO COMO REFERENCIA EL f / 2 .

Tabla VIII. Costos y rendimientos en la producción para 1,000 litros de cultivo con las diferentes fuentes de nitrógeno. Cotizando un dolar a \$2,700.

Medios de cultivo	Costo (pesos)	Reducción de costos	Rendimiento en producción
f/2+CO ₂	****	****	100%
f/2	4,860	100%	86.59%
urea+CO ₂	****	****	71.65%
urea	39.69	99.19%	81.58%
nittrato de calcio con amonio+CO ₂	****	****	67.61%
nittrato de calcio con amonio	111	97.72%	75.36%
nittrato de amonio+CO ₂	****	****	81.08%
nittrato de amonio	35.28	99.28%	67.17%
sulfato de amonio+CO ₂	****	****	71.65%
sulfato de amonio	58.22	98.81%	65.42%

NOTA: Un cilindro de CO₂ de 25 Kgs vale \$25,000.

DISCUSIONES

Durante los experimentos, se presentó la fase de retardo que duro un día, pero la densidad siguió incrementandose, lo cual puede representar una ventaja en sistemas de producción a gran escala, ya que se puede reducir el tiempo de cultivo y la presencia de sustancias tóxicas como producto de la actividad metabólica de las células. Fox (1983) analiza la presencia de esta fase y la atribuye a productos exógenos y desactivación de enzimas.

Los resultados obtenidos indican que cuando se utilizó sulfato de amonio en ausencia de bióxido de carbono, se registró menor densidad final que al adicionar CO_2 (Fig. 1; Tabla III), sin embargo, no hubo diferencias significativas a partir del quinto día de cultivo pero sí en los días cero, dos, tres y cuatro (Tabla II). En ambos experimentos las velocidades de crecimiento, tiempo de duplicación y divisiones celulares fueron diferentes. Ineludiblemente el CO_2 fue la diferencia en la densidad final después del quinto día, y esto demuestra que *Pavlova lutheri* es capaz de asimilarlo como fuente de carbono inorgánico (Pruder y Bolton, 1978; 1979). La diferencia en biomasa final, posiblemente se deba a que el CO_2 , además de controlar el pH proporciona mejores condiciones pudiendo incrementar el

contenido de carbono inorgánico en el medio necesario para el proceso de fotosíntesis y además, puede equilibrar el tampón bicarbonato. Esto originó una mayor producción, ya que entre mayor densidad algal, el consumo de CO_2 se incrementa y una disminución de este trae como consecuencia menor producción. Esto también ha sido observado por otros autores como Fabregas *et al.* (1984) y Darley (1987) quienes señalan que el CO_2 es un factor limitante en sistemas masivos de producción.

Cuando se cultivo con nitrato de amonio, se obtuvieron mayores densidades finales (Fig. 2; Tabla IV), que con el sulfato de amonio, pero no fueron significativamente diferentes (Tabla II) siendo las velocidades de crecimiento, tiempo de duplicación y divisiones celulares similares en promedio al quinto día de cultivo sin y con CO_2 . Esto puede deberse a que los cultivos tuvieron una fuente de nitrógeno combinada en forma de nitrato, el cual es más indispensable que el sulfato, por ser el nitrógeno la base para la formación de proteínas (Laing y Helm, 1981). Se ha demostrado que *Pavlova lutheri* utiliza preferentemente amonio (Caperon y Meyer, 1972), aunque posteriormente se comprobó que esta especie puede utilizar simultaneamente ambas formas nitrogenadas para el crecimiento (Caperon y Ziemann, 1976); lo cual involucra un ahorro energético, ya que el amonio es incorporado

directamente al metabolismo, mientras que el nitrato debe ser reducido a nitrito y amonio para su utilización (Syrett, 1981).

Cuando se adicionó CO_2 a los cultivos con nitrato de amonio, se incrementó significativamente la densidad poblacional los días tres, cuatro y cinco (Tabla II) ya que la asimilación del nitrato se ve favorecida por la presencia del CO_2 y la luz, los cuales aumentan la tasa fotosintética y la actividad de la nitrato reductasa permitiendo que el nitrato sea asimilado más eficientemente (Packard, 1973). Observaciones similares han sido realizadas por Malone *et al.* (1975) quienes postulan que el nitrógeno incorporado en el protoplasma está determinado por la razón fotosintética de la microalga.

Con nitrato de calcio con amonio, *Pavlova lutheri* registró significativamente mayor densidad sin adición de CO_2 (Fig. 3; Tabla V) que con adición de CO_2 para los días dos, tres, cuatro y cinco (Tabla II). Sin embargo, sus velocidades de crecimiento, tiempos de duplicación y divisiones celulares son muy similares. La diferencia en producción quizá se debió a que el calcio haya cambiado las características químicas del medio de cultivo, provocando que el CO_2 adicionado no fuera asimilado por el organismo, ya que la fijación del CO_2 varía dependiendo de las condiciones químicas del cultivo y de la especie (Pruder y

Bolton, 1979) así como de la asimilación del nitrato (Horrigan y McCarthy, 1981). Por otro lado, cuando éste medio de cultivo estuvo en ausencia de CO_2 , la producción final fue mayor que con los otros fertilizantes a excepción de la urea, indudablemente el calcio ayudó a la formación de la nitrato reductasa que interviene en la reducción del nitrato, favoreciendo su asimilación, reflejándose en un incremento de la producción final (Devlin, 1980).

De los fertilizantes experimentados la urea resultó la mejor fuente de nitrógeno para el crecimiento ya que ésta microlaga presenta el sistema enzimático ureasa, que le permite la asimilación de la urea. Se alcanzó mayor densidad final que con los otros fertilizantes en ausencia de CO_2 (Fig. 4; Tabla VI). Cuando se adicionó CO_2 al cultivo se obtuvo menor densidad, pero esta diferencia solo fue significativa para los días dos y tres (Tabla II), sin embargo su velocidad de crecimiento y número de divisiones celulares fueron mayores. Aunque estos experimentos registraron distintas concentraciones finales, el cultivo con CO_2 generó mayores divisiones, lo cual favoreció la rápida asimilación del nutrimento ocasionando quizá un posible agotamiento a partir del quinto día de cultivo donde se presentó la fase estacionaria del ciclo de crecimiento.

En este experimento en particular, posiblemente se presentó un estrés fisiológico en la especie, que se puede atribuir a una disminución del pH intracelular, ya que la urea al ser asimilada es reducida a CO_2 y amonio, lo cual puede ocasionar desactivación de enzimas (Syrett, 1981). Resultados similares han sido reportados por Antia et al. (1975) y Kinne (1976) quienes indican que *Pavlova lutheri* alcanza mayores densidades con urea y nitrato que con amonio, lo cual concuerda con lo encontrado en esta investigación.

Con el medio f/2 las densidades finales fueron mayores (Fig. 5; Tabla VII), aunque los valores poblacionales son semejantes sin y con CO_2 . Cuando se utilizó CO_2 se aumentó significativamente la producción en este cultivo para los días cuatro, cinco, seis y siete (Tabla II) ya que los nutrimentos fueron mejor aprovechados resultando en mayor incremento poblacional de *Pavlova lutheri*. Definitivamente la diferencia con los fertilizantes fue la calidad de los nutrimentos, ya que, estos tienen una elaboración y procesado industrial más específico que los fertilizantes, además contienen los nutrimentos esenciales en cantidades adecuadas reflejandose esto en un incremento en la densidad poblacional con respecto a las otras fuentes nitrogenadas (Ukeles, 1976; Moal et al.; 1978).

El crecimiento en los cultivos con fertilizantes agrícolas disminuye en general al quinto día pero no existen diferencias significativas entre ellos y el f/2 en los días seis y siete (Tabla II), esto puede deberse a que el abastecimiento de nutrimentos es escaso para sostener el crecimiento de la población algal (Droop, 1975; Fox, 1983) y el organismo empieza a usar el nitrógeno almacenado para satisfacer sus necesidades metabólicas (Caperon y Meyer, 1972).

Aunque las fuentes de nitrógeno usadas no tienen un grado reactivo con respecto al medio convencional, no se encontraron diferencias significativas en la producción final con el f/2 (Tabla II) dando un buen crecimiento en el sistema, esto puede sugerir que estas microalgas cultivadas con estos fertilizantes pueden constituir un buen alimento para bivalvos (Ocampo-Aranda, en preparación).

Una posible desventaja del CO_2 es que puede aumentar considerablemente los costos de producción a gran escala (Tabla VIII) y además, no incrementó de una manera significativa la densidad algal en los sistemas de producción con los fertilizantes agrícolas a excepción del medio convencional (Tabla II), inclusive con urea y nitrato de calcio con amonio la producción fue mayor sin CO_2 (Figs. 3 y 4), ocasionando gastos innecesarios.

El usar fertilizantes agrícolas para el cultivo masivo de microalgas involucra una reducción de gastos considerable hasta en un 99.28 % con respecto al medio convencional (Fig. 6; Tabla VIII). Uno de los inconvenientes de los fertilizantes es el desconocimiento de las sustancias químicas que los conforman y se ha encontrado que el contenido de nitrógeno varia dependiendo del fertilizante y aún de lotes del mismo fertilizante (González-Rodríguez y Maestrini, 1984).

CONCLUSIONES

Todos los fertilizantes agrícolas produjeron un crecimiento aceptable de *Pavlova lutheri*.

Las mejores fuentes de nitrógeno para el crecimiento de esta microalga fueron: urea, nitrato de amonio + CO_2 y nitrato de calcio con amonio.

La adición de CO_2 a los tratamientos con los fertilizantes no incrementó de una manera consistente la producción de microalgas como el caso del f/2.

Los costos de producción con los fertilizantes agrícolas probados se reducen hasta en un 99.28% respecto al medio f/2.

SUGERENCIAS

1.- Experimentar el efecto del alimento producido en base a fertilizantes agrícolas sobre la sobrevivencia y crecimiento de larvas de bivalvos.

2.- Determinar la composición bioquímica de *Pavlova lutheri* bajo estas condiciones.

3.- Utilizar estas fuentes de nitrógeno como nutrimentos para diferentes especies de microalgas y determinar sus rendimientos en producción.

LITERATURA CITADA

- Alfonso, E. y Leal, S., 1985. Ensayos sobre alimentación de protozoos de *Penaeus notialis* en el laboratorio. Univ. de la Habana, Rev. de Invest. Mar., 6(1): 79-86.
- Alfonso, E. y Martínez, L., 1987. Comparación del volumen celular y del crecimiento de *Tetraselmis* spp. con diferentes fertilizantes. Univ. de la Habana, Rev. Invest. Mar., 8(3): 13-22.
- Alfonso, E. y Nuñez, M.C., 1985. Uso de nuevos fertilizantes para cultivar fitoplancton. Univ. de la Habana, Rev. de Invest. Mar., 6(1): 3-13.
- Antia, J.N., Berland, R.B., Bonin, J.D. y Maestrini, S.Y., 1975. Comparative evaluation of certain organic and inorganic sources of nitrogen for phototrophic growth of marine microalgae. J. Mar. Biol. Ass. U.K., 55: 591-539.
- Aviles-Sanchez, R., 1988. Efecto de la variación en la concentración de nitrato de amonio en el crecimiento de la microalga *Tetraselmis suecica* Kylin (1935) Butcher. Ensenada, B.C., F.C.M., U.A.B.C., Tesina profesional, 32 pp.
- Badillo-Castro, S.A., 1989. Determinación de la dilución óptima del cultivo semicontinuo de la microalga *Monochrysis lutheri* en tanques de 400 litros. Ensenada, B.C., F.C.M., U.A.B.C., Tesis profesional, 54 pp.
- Boyd, E.C., Musig, Y. y Tucker, L., 1981. Effects of three phosphorus fertilizers on phosphorus concentrations and phytoplankton production. Aquaculture, 22: 175-180.

- Caceres-Martínez, C., 1979. Cultivo continuo de la microalga *Monochrysis lutheri* bajo condiciones rudimentarias. Ensenada, B.C., F.C.M., U.A.B.C., Tesis profesional, 51 pp.
- Caperon, J. y Meyer, J., 1972. Nitrogen-limited growth of marine phytoplankton. I. Changes in population characteristics with steady-state growth rate. Deep-Sea Research., 19: 601-618.
- Caperon, J. y Ziemann, D.A., 1976. Synergistic effects of nitrate and ammonium ion on the growth and uptake kinetics of *Monochrysis lutheri* in continuous culture. Mar. Biol., 36: 73-84.
- Darley, M.W., 1987. Biología de las Algas. Enfoque fisiológico. Ed. Limusa, 236 pp.
- Davis, C.H. y Ukeles, R., 1961. Mass culture of phytoplankton as foods for Metazoans. Science, 134: 562-564.
- De la Cruz, S. y Alfonso, E., 1975. Cultivo masivo de algas planctónicas marinas mediante fertilización. Univ. de la Habana, Rev. de Invest. Mar., 8(17): 1-25.
- De la Cruz, A., 1985. Crecimiento de fitoplancton en cultivo bialgal. Univ. de la Habana, Rev. Invest. Mar., 6(2-3): 109-116.
- De Pauw, N., 1981. Use and production of microalgae as food for nursery bivalves. p. 35-69. En: Nursery Culturing of Bivalve Molluscs. Claus, N.C., De Pauw, N. y Jaspers, E. (Eds.). EMS. Special Pub. 7. European Mariculture Society, Bredene, Belgium, 394 pp.
- Devlin, M.R., 1980. Fisiología Vegetal Ed. Limusa, 517 pp.

- Droop, M.R., 1975b. The chemostat in mariculture. En: 10 th European Symp. Mar. Biol., Ostend, Belgium., 1: 17-23.
- Dunstan, W.M. y Menzel, W.D., 1971. Continuous Cultures of natural populations of phytoplankton in dilute treated sewage effluent. Limnol. Oceanogr., 16(4): 623-632.
- Fabregas, J., Herrero, C., Cabezas, B. y Viega, M., 1984. Growth of the marine microalga (*Tetraselmis suecica*) in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. Aquaculture, 42: 207-215.
- Fabregas, J., Herrero, C., Cabezas, B. y Albade, J., 1985. Mass culture and biochemical variability of the marine microalga (*Tetraselmis suecica*) Kylin (Butch). with high nutrient concentration. Aquaculture, 49: 231-244.
- Fogg, G.E., 1965. Algal cultures and phytoplankton ecology. University of Wisconsin. Press. London, 175 pp.
- Fox, M.J., 1983. Intensive algal culture techniques. p. 15-41. En: CRC Handbook of Mariculture. Vol. I. Crustacean Aquaculture, 442 pp.
- Gallegos, L.C., Hornberger, G.M. y Kelly, M.G., 1980. Photosynthesis-light relationships of a mixed culture of phytoplankton in fluctuating light. Limnol. Oceanogr., 25(6): 1082-1092.
- Granados-Machuca, C. y Buckle-Ramirez, L.F., 1984. Cultivo de las microalgas *Monochrysis lutheri* y *Skeletonema costatum* con nutrientes producidos por estiércoles digeridos. An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. México, 11(1): 241-256.

- Green, J.C., 1975. The fine-structure and taxonomy of the haptophycean flagellate *Pavlova lutheri* (Droop). Comb. Nov. (= *Monochrysis lutheri* Droop). J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 55: 785-793.
- González-Rodríguez, E. y Maestrini, S.Y., 1984. The use of some agricultural fertilizers for the mass production of marine algae. Aquaculture, 36: 245-256.
- Guerrero, V.S., Farina, T. y Silva, A.A., 1981. Large-scale outdoor algal production for rearing seed oyster and clams to juvenile stage. p. 117-139. En: Nursery Culturing of Bivalve Molluscs. Claus, C.N., De Pauw, N. t Jaspers, E. (Eds.). EMS. Special Pub. 7. European Mariculture Society, Bredene, Belgium, 394 pp.
- Guillard, R.R.L., 1973. Division rates. En: Handbook of Phycological Methods. Stein, J.R. (Ed.). London., Cambridge University. Press, p. 181-194.
- Guillard, R.R.L., 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. p. 29-60. En: Culture of Marine Invertebrates Animals. Smith, W.L. and M.H. Chanley (Eds.). Plenum Publishing Corp., New York, 338 pp.
- Herrera-Treviño, J.R., 1988. El fertilizante agrícola como alternativa en cultivos externos para la producción masiva de *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch. Ensenada, B.C., F.C.M., U.A.B.C., Tesis profesional, 47 pp.
- Horrigan, S.G. y McCarthy, J.J., 1981. Urea uptake by phytoplankton at various stages of nutrient depletion. J. of plankton Research, 3(3): 403-414.

- Islas-Olivares, R., Gendrop-Funes, V. y Miranda, A.G., 1978. Infraestructura basica para la obtención de larvas (semilla) de ostion japonés (*Crassostrea gigas*) y ostion europeo (*Ostrea edulis*) en Baja California. Ciencias Marinas, 5(2): 73-86.
- Kinne, O., 1976. Cultivation of Marine Organisms: Water-quality Management and technology. p. 19-300. En: Marine Ecology, O. Kinne (Ed); Wiley-Interscience, Londres, 578 pp.
- Laing, I. y Helm, M.M., 1981. Factors affecting the semicontinuous production of *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butch in 200-l vessels. Aquaculture, 22:173-248.
- Leal, S., Alfonso, E. y Gainza, A., 1985. Recomendaciones sobre la alimentación de larvas de camarones *Penaeus notialis* y *P. schmitti* en cultivo. Univ. de la Habana, Rev. de Invest. Mar., 6(1): 87-93.
- Malone, C.T., Garside, C., Haines, C.K., Roels, A.O., 1975. Nitrate uptake and growth of *Chaetoceros* sp. in large outdoor continuous cultures. Limnol. Oceanogr., 20: 9-19.
- Matthiessen, G.C. y Torner, R.C., 1966. Possible methods of improving the shellfish Industry of Martha's Vineyard, Duke's Country, Massachusetts, Mar. Res. Found. Mass., IV + 138.
- McAnally-Salas, L.S., Valenzuela-Espinoza, E. y Reynoso-Rimuldi, E.M. Crecimiento de *Tetraselmis suecica* en tanques rústicos de 4,000 litros utilizando fertilizante agrícola Triple 17 como medio de cultivo. Ciencias Marinas. En preparación.
- McCarthy, J.J., 1972. The uptake of urea by natural populations of marine phytoplankton. Limnol. Oceanogr., 17: 738-748.

- Moal, J., Samain, J.F. y LeCooz, J.R., 1978. C/N et controle de la physiologie des cultures de phytoplancton. From Mc.Crusky, D.S., Berry, A.S., Physiology and Behaviour of Marine Organisms, Pergamon, Press, 338 pp.
- Ocampo-Aranda, F.J. Efecto de *Monochrysis lutheri* cultivada con fertilizantes agricolas sobre el crecimiento de larvas de *Mytilus edulis* hasta su metamorfosis. Ensenada, B.C., U.A.B.C., F.C.M., Tesis profesional. En Preparación.
- Packard, T.T., 1973. The light dependence of nitrate reductase in marine phytoplankton. Limnol. Oceanogr., 18(3):466-469.
- Palmer, F.E., Ballard, K.A. y Taub, F.B., 1975. A continuous culture apparatus for the mass production of algae. Aquaculture, 6: 313-319.
- Paniagua-Michel, J. y Buckle-Ramírez, L.F., 1985. Cultivo en condiciones controladas de *Monochrysis lutheri* y *Skeletonema costatum* con extractos de macrofitas marinas. An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. México, 12(1): 59-70.
- Paniagua-Michel, J., Buckle-Ramírez, L.F., Granados-Machuca, C. y Loya-Salinas, D.H., 1986. Manual de metodologías y alternativas para el cultivo de microalgas. Ensenada, B.C. Informe especial. CICESE., 94 pp.
- Pruder, G.D. y Bolton, E.T., 1978. System configuration and performance: Bivalve molluscan mariculture. Proc. of the Nineth Annual Meeting World Mariculture Society, 747-759 p.
- Pruder, G.D. y Bolton, E.T., 1979. The role of CO₂ enrichment of aerating gas in the growth of an estuarine diatom. Aquaculture, 17: 1-15.

- Riva, A. y Lelong, P., 1981. Growth of juvenile bivalve molluscs associated with continuous culture of natural marine phytoplankton. p. 253-268. En: Nursery Culturing of Bivalve Molluscs. Claus, N.C., De Pauw, N., y Jaspers, E. (Eds.). EMS. Special Pub. 7. European Mariculture Society, Bredene, Belgium, 394 pp.
- Schrader, L.E., 1975. CO₂ Metabolism and Productivity in C₃ Plants: An Assesment. p. 385-396. En: CO₂ Metabolism and Plant Productivity. Burris, R.H. and Black, C.C. University Park Press. 431 pp.
- Sorokin, C., 1973. Dry weight, packed cells volume and optical density. En: J.R. Stein (Ed.), Handbook of Phycological methods. Cambridge Univ. Press, London. 321-343 p.
- Steel y Torrie., 1986. Bioestadística. Principios y procedimientos. Ed. McGraw-Hill., 622 pp.
- Syrett, P.J., 1981. Nitrogen metabolism of microalgae. En: Platt (Ed.). Physiological bases of phytoplankton ecology. Can. Bull. Fish. Aquat. Sci., 210: 182-210.
- Tolbert, N.E., 1974. Photorespiration. p. 474-504. En: W.D.P. Stewart (Ed.). Algal Physiology and Biochemistry. Blackwell, Oxford.
- Trotta, P., 1981. A simple and inexpensive system for continuous monoxenic mass culture of marine microalgae. Aquaculture, 22: 383-387.
- Ukeles, R., 1965. A simple method for the mass culture of marine algae. Limnol. Oceanogr., 10: 492-495.
- Ukeles, R., 1976. Cultivation of Plants. p. 367-466. En: Marine Ecology. O. Kinne (Ed.), 3(1) Wiley-Interscience. Londres, 578 p.

- Valenzuela-Espinoza, E., 1988. Producción masiva de *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch (Prasinophyceae) bajo diferentes concentraciones de nutrientes en condiciones controladas. Ensenada, B.C., F.C.M., U.A.B.C., Tesis profesional, 44 pp.
- Velazquez-Magaña, S., 1989. Contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos en *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch con diferentes concentraciones de nutrientes en cultivo semicontinuo. Ensenada, B.C., F.C.M., U.A.B.C., Tesis profesional, 40 pp.

APENDICE I

Para la cuantificación espectrofotométrica del crecimiento, se determinó la longitud de onda óptima (675 nm), de acuerdo al método descrito por Sorokin (1973). Las siguientes ecuaciones se obtuvieron a partir de diez pares de datos por el método de mínimos cuadrados.

$$\begin{aligned} \text{i) } Y &= 20301597.26 (X) + 65707.38601 \\ r &= 0.9624 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{ii) } Y &= 9015414.78 (X) + 831304.7626 \\ r &= 0.9954 \end{aligned}$$

Donde:

Y = Concentración en cél/ml.

X = Absorbancia

La regresión (i) se utilizó para valores comprendidos entre 87.5 a 100% de Transmitancia y la (ii) para valores de 87.5 a 15.5% de Transmitancia.