

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

EFFECTO DE LA VARIACION DE LA CONCENTRACION
DE NITRATOS EN LA CAPTACION Y CRECIMIENTO
DEL ALGA Eucheuma uncinatum (Setch y Gard).



T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

O C E A N O L O G O

P R E S E N T A

VIRGINIA ALCANTARA MENDEZ

ENSENADA, B.C. JUNIO DE 1989.

RESUMEN

Se estudiaron las características nutricionales del nitrógeno en *Eucheuma uncinatum* mediante la medición de la velocidad de captación de nitrógeno y la velocidad de crecimiento en función de la concentración de nitratos y la determinación de nitrógeno crítico en el tejido.

Las mediciones se hicieron en cultivos mantenidos bajo condiciones controladas de luz, temperatura y nutrimentos, en el laboratorio.

El valor de nitrógeno crítico en el tejido fue de 1.56 %N y determinó el estado fisiológico de la planta y su relación con el crecimiento óptimo, que fue de 12.62 % diario. A su vez, este parámetro determinó el estado nutricional de la planta en forma directa, independientemente de la concentración ambiental del nutrimento.

La velocidad de captación mostró valores para la constante de afinidad K_m de 10.1 y velocidad máxima de 1.8 $\mu\text{g NO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y se encontró que a partir de la concentración de 50 $\mu\text{mol de NaNO}_3 \text{ l}^{-1}$ el alga mantuvo una velocidad de captación constante. Dichos resultados mostraron la interrelación entre el suministro del nutrimento y la razón de captación.

La velocidad de crecimiento mostró incrementos del 17 % diario para plantas cultivadas a concentraciones de 100 $\mu\text{mol NaNO}_3 \text{ l}^{-1}$ lo que indica que cuando no hay reservas de nutrimentos, las concentraciones externas (en este caso el medio de cultivo) influyen y el crecimiento es favorecido.

EFFECTO DE LA VARIACION DE LA CONCENTRACION DE NITRATOS
EN LA CAPTACION Y CRECIMIENTO DEL ALGA
Eucheuma uncinatum (Setch y Gard.) .

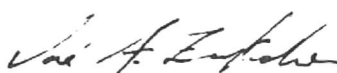


T E S I S

QUE P R E S E N T A

V I R G I N I A A L C A N T A R A M E N D E Z

A P R O B A D A P O R :



PRESIDENTE DEL JURADO
DR. JOSE ANTONIO ZERTUCHE GONZALEZ.



SINODAL PROPIETARIO
DR. JORGE DE LA ROSA VELEZ



SINODAL PROPIETARIO
M.C. ROBERTO MILLAN NUÑEZ



SINODAL SUPLENTE
M.C. RAMON CAJAL MEDRANO



SINODAL SUPLENTE
OC. ISAI PACHECO RUIZ

DEDICATORIA

A mis queridos padres

Arturo Alcántara Muñoz
Y
Ma. de Lourdes Méndez de Alcántara

por todo su apoyo, confianza, sacrificio, amor y comprensión que me son invaluableles. Y que con su esfuerzo lograron mi formación personal y profesional.

A mis hermanos

Elizabeth, Francisco Javier y Martín

por su unidad, confianza y cariño en el transcurso de mis estudios.

Para ti que llegaste a mi vida cambiándolo todo y con quien se queda lo mejor, no me olvides.

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

A DIOS por su constante compañía.

A mi director de tesis Dr. José Antonio Zertuche González por haber compartido sus conocimientos, su trabajo, su paciencia y su amistad conmigo.

A mis sinodales Dr. Jorge de la Rosa Velez, M.C. Roberto Millán Nuñez, M.C. Ramón Cajal Medrano y OC. Isai Pacheco Ruiz que con sus magnificas sugerencias y recomendaciones mejoraron el escrito de esta investigación.

Al M.C. Román Lizarraga Arciniega por su confianza, amistad e impulso para seguir siempre adelante.

A mis compañeros Chely Suárez, Lulu Ortega, Cui Cedillo, y Silvia Carreño por su amistad y apoyo a lo largo de la carrera y durante esta investigación.

A mis compañeros del Proyecto Macroalgas, Marquitos, Mauricio, Irma, Israel, Temo, Lucy, Lorena y Aida por su ayuda, amistad y por esos momentos de alegría.

A la Universidad Autónoma de Baja California, e Instituto de Investigaciones Oceanológicas por haber facilitado sus instalaciones y el material necesario para la realización de esta investigación.

A la Facultad de Ciencias Marinas y a mis profesores, quienes con su conocimiento desarrollaron mi formación profesional.

A mis amigos incondicionales Mary, Lidia, Celia y Domingo, por su sincera amistad, por su apoyo en momentos difíciles y por esas sonrisas que nunca olvidaré.

A las secretarias del I.I.O. Chayo, Horte, Magui, Rosita, y Araceli y a las secretarias de la F.C.M. Mary, Rosalba, Rosario, Nely, y Yoli por su amistad y todo el apoyo administrativo.

Y a todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron para que esta investigación se realizara.

CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCION	1
2. OBJETIVO	5
3. MATERIALES Y METODOS	6
4. RESULTADOS	15
5. DISCUSION	26
6. CONCLUSION	34
7. LITERATURA CITADA	35

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla I Crecimientos para <u>Eucheuma uncinatum</u> a diferentes intensidades de luz	9
Tabla II Crecimientos, % nitrógeno, % carbón y relación C/N en el tejido de <u>Eucheuma</u> <u>uncinatum</u> en función de la concentración de nitratos	16
Tabla III Prueba de comparación entre medias para el crecimiento de plantas cultivadas bajo diferentes concentraciones de nitratos	16
Tabla IV Diferencias físicas en las plantas de <u>Eucheuma uncinatum</u> para el experimento de nitrógeno crítico	17
Tabla V Velocidad de captación de nitratos para <u>Eucheuma uncinatum</u> a diferentes concentraciones $K_m = 10.1$ obtenida por sustitución en la ecuación de Lineweaver Burk	20
Tabla VI Prueba de comparación entre medias para la velocidad de captación a diferentes concentraciones de nitratos	20
Tabla VII Crecimientos para <u>Eucheuma uncinatum</u> a diferentes concentraciones de nitratos conservando la biomasa constante	24
Tabla VIII Prueba de comparación entre medias para el crecimiento a diferentes concentraciones de nitratos	24
Tabla IX Valores de crecimiento y suministro de nutrientes $N-NO_3$ en diferentes especies de macroalgas	28
Tabla X Valores de velocidad máxima y y constante de afinidad para captación de nitrógeno $N-NO_3$ en diferentes especies	30

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 Localización de la zona de muestreo en Bahía de los Angeles, B.C.	7
FIGURA 2 Crecimiento en función de la intensidad de luz para <u>Eucheuma uncinatum</u>	10
FIGURA 3 Crecimiento en función de la concentración de nitrógeno en el tejido para <u>Eucheuma uncinatum</u>	18
FIGURA 4a Velocidad de captación a diferentes concentraciones de nitratos para <u>Eucheuma</u> <u>uncinatum</u>	21
FIGURA 4b Obtención de la constante de afinidad y velocidad máxima por el método de Lineweaver Burk para cinética enzimática	22
FIGURA 5 Crecimientos de <u>Eucheuma uncinatum</u> a diferentes concentraciones de nitratos, con biomasa constante	25

INTRODUCCION

La disponibilidad de los nutrimentos en el medio ambiente marino, es uno de los factores reguladores del crecimiento y reproducción de las algas marinas (DeBoer, 1981). El nitrógeno es uno de los nutrimentos de importancia para la regulación del crecimiento y puede ser utilizado en sus diferentes formas como nitrato, nitrito, amonio y compuestos orgánicos (urea y N-orgánico) (Riley y Chester, 1971). Por lo menos desde hace 50 años, las variaciones del contenido de nitrógeno en las algas marinas ya se conocían, Hass y Hill, en 1933, encontraron que el nitrógeno total varía según las condiciones del medio ambiente (Hanisak, 1983).

Debido a que el crecimiento de las algas marinas puede ser limitado por nitrógeno, es de gran interés conocer la captación, el suministro y las razones de crecimiento que permitan explicar variaciones del crecimiento *in situ* y conocer su crecimiento potencial. Estos estudios a su vez, permitirían seleccionar condiciones favorables para el mantenimiento efectivo de sistemas de cultivo que optimicen la productividad (D'Elia y DeBoer, 1978).

Aunque existe amplia información concerniente a la nutrición en microalgas por nitrógeno, se conoce poco en relación a las macroalgas tanto en condiciones naturales como de laboratorio (DeBoer, 1981). A partir de los años

setenta el estudio del nitrógeno como limitante en el crecimiento de macroalgas se incrementó. Investigadores como Topinka y Robbins (1976), Hanisak y Harlin (1978), DeBoer (1979), Hanisak (1979), Harlin y Wheeler (1980), Ryther et al., (1981) y Probyn y Chapman (1982), realizaron mediciones de captación de nitrógeno y su efecto en el crecimiento bajo condiciones controladas.

Un parámetro que permite determinar el estado nutricional del alga en forma directa e independiente de la concentración ambiental de nutrientes, es el nitrógeno crítico. Hanisak (1979), definió el nitrógeno crítico, como "la concentración interna del nutriente que marca los límites del crecimiento del alga, donde el aumento y la disminución de las concentraciones indican reserva de nutrientes o deficiencia de los mismos". Las evidencias de que el crecimiento puede estar limitado por nitrógeno han sido observadas mediante este parámetro en especies como: Codium fragile (Sur.) Har. (Hanisak, 1979), Gracilaria tikvahiae Mac Lachlan (Hanisak, 1982; Lapointe y Duke, 1984), Ascophyllum nodosum, C. fragile, Chondrus crispus (Harv.) Kütz., Fucus vesiculosus y Laminaria saccharina (Asare y Harlin, 1983).

Los estudios de la captación del nutriente y su relación con el crecimiento de macroalgas han utilizado los parámetros de la cinética enzimática; la constante de afinidad (K_m) y la velocidad máxima (V_{max}) han

sido aplicados en estudios nutricionales de macroalgas para obtener factores que caractericen la captación del nutrimento y el incremento en biomasa (Topinka y Robbins, 1976; Chapman y Craigie, 1977; Hanisak y Harlin, 1978; Topinka, 1978; DeBoer, 1979; Probyn y Chapman, 1982; Lapointe y Duke, 1984 y Lapointe, 1985).

Se han llevado a cabo algunos trabajos para observar el efecto que tiene el nitrógeno inorgánico en el crecimiento y producción de coloides. DeBoer (1979), estudió el efecto del amonio en el crecimiento y contenido de carragenano en Neogardhiella baileyi (Kurtz.) y de agar en Gracilaria foliifera (Forskal). Este autor encontró que las razones de crecimiento fueron en aumento hasta mantenerse constantes al incrementar la concentración de nitrógeno, mientras que el contenido de ficocoloide aumentó a concentraciones bajas de nitrógeno.

La realización de estudios en especies de importancia económica, como Gelidium robustum (Rodríguez-Carrillo, 1987) y Gigartina canaliculata (González-Gómez, 1988), muestran que el crecimiento y rendimiento de agar y carragenano se optimizan al fertilizar sus cultivos con nitrógeno.

Eucheuma uncinatum (Setchell & Gardner) es otra especie importante comercialmente por su contenido de carragenano. A la fecha se han realizado estudios en esta especie mediante investigaciones encaminadas al desarrollo de su cultivo, Polne et al., (1980, 1981 y 1982) y Zertuche et al (1986 y

1987). Sin embargo aún quedan por estudiar sus requerimientos nutricionales, lo que motiva a realizar esta investigación, con la finalidad de conocer sus limitaciones *in situ*, así como la posibilidad de optimizar su estrategia de cultivo.

OBJETIVO

Conocer las características nutricionales del nitrógeno en Eucheuma uncinatum, mediante la determinación de la velocidad de captación y la velocidad de crecimiento en función de la concentración de nitratos (NaNO_3), y la determinación de nitrógeno crítico en el tejido.

MATERIALES Y METODOS

Aproximadamente un kilo de la especie Eucheuma uncinatum fue colectada en Bahía de los Angeles, B.C. (FIGURA 1).

Las plantas vivas, dentro de bolsas de plástico que contenían agua de mar y guardadas en hieleras, fueron transportadas hasta los laboratorios del Instituto de Investigaciones Oceanológicas, en la U. A. B. C.

Posteriormente las plantas fueron limpiadas de epifitas y flora de acompañamiento y colocadas en un tanque al aire libre de 90 litros de capacidad, con agua de mar sin reciclar y movimiento con flujo de aire continuo durante 15 días para su acondicionamiento.

Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo Provasoli (Bold y Wynne, 1978) fue preparado con agua de mar libre de nutrientes (contenida en el tanque de aclimatación), con una salinidad de 33 o/oo y filtrada con papel Whatman no. 40 y con filtro de membrana Millipore. Fue esterilizado por 15 minutos y posteriormente enriquecido con vitaminas (B_{12} , Tiamina y Biotina) y dióxido de germanio para evitar contaminación por diatomeas.

Condiciones de cultivo

La temperatura del cultivo fue de $22^{\circ}\text{C} \pm 1$ controlada con un termocirculador CH/P modelo 2006 conectado a una

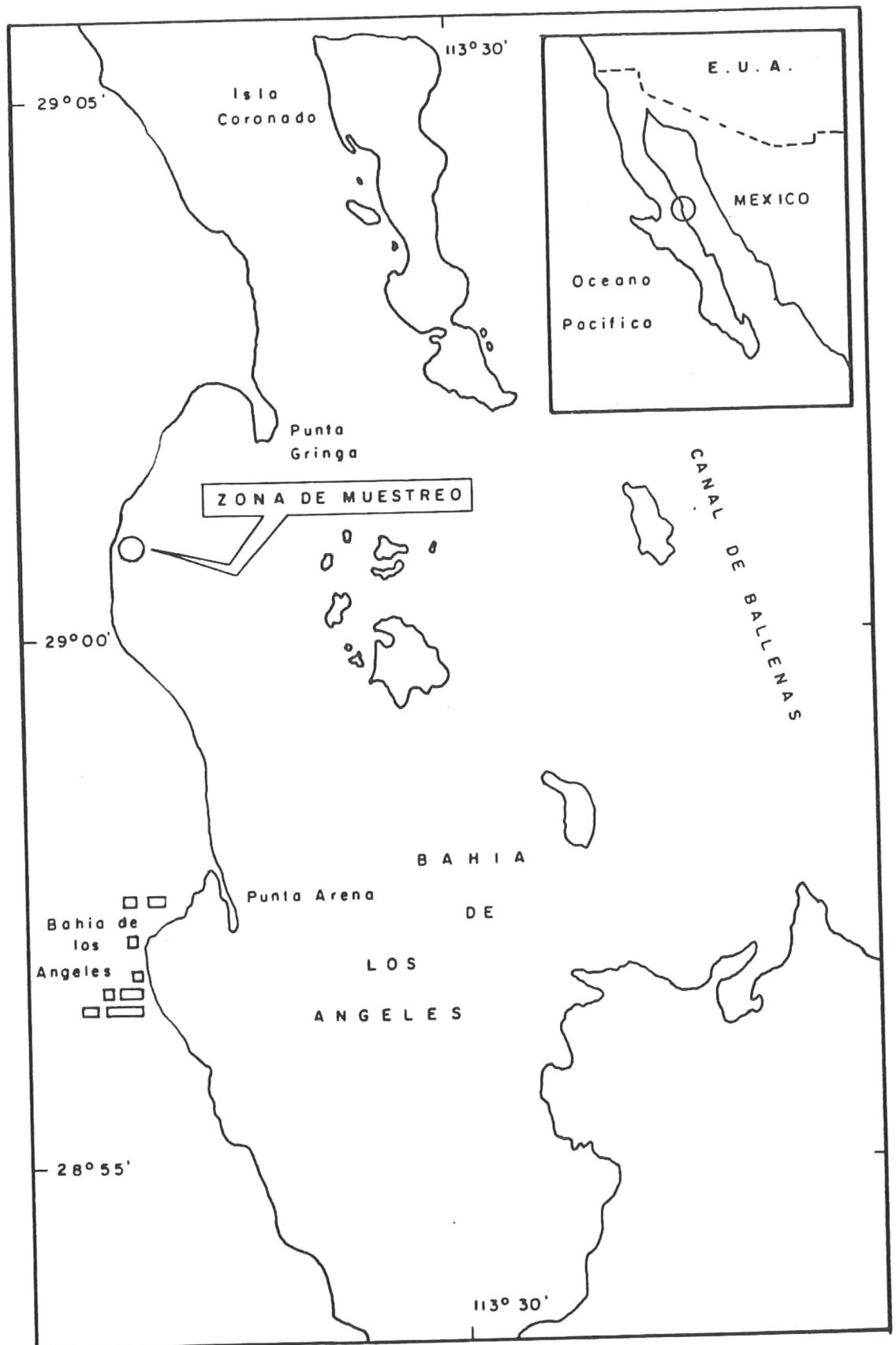


FIGURA 11

Localización de la zona de muestreo en Bahía de Los Angeles, B.C., MEX. (Tomado de Hurtado Luis, 1988).

placa de gradientes. El fotoperiodo usado fue de 14:10 luz-
 oscuridad, y regulado con un reloj interruptor. Estas
 condiciones fueron sugeridas como óptimas para el
 crecimiento de *Eucheuma uncinatum* por Polne *et al.*, (1981 y
 1982) y Zertuche *et al.*, (1987). La intensidad de luz fue
 de $249.04 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y ésta fue determinada mediante un
 experimento preliminar a cinco diferentes intensidades de
 luz medidas con un irradiómetro GLS-100 Biospherical
 Instrument, y reguladas con malla plástica de 1 mm de luz
 que cubría los matraces que contenían a las plantas. Los
 resultados de intensidad de luz y sus razones de
 crecimiento, se muestran en la tabla I y figura 2.

Las razones de crecimiento se obtuvieron mediante la
 fórmula (Penniman, 1983):

$$C = [(W_t / W_o)^{1/t} - 1] \times 100$$

donde C = crecimiento W_t = peso al tiempo t
 t = tiempo W_o = es el peso inicial

La intensidad de luz en donde se obtuvo el mayor
 crecimiento fue considerada como constante en el experimento
 de nitrógeno crítico y velocidad de crecimiento para
 asegurarse de que la luz no fuera un limitante.

TABLA I

CRECIMIENTOS PARA Eucheuma uncinatum A DIFERENTES
INTENSIDADES DE LUZ.

INTENSIDAD $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	CRECIMIENTO C % día ⁻¹
431.67	15.87 ± 0.16
249.04	16.86 ± 0.10
166.03	10.80 ± 0.37
106.25	6.61 ± 0.19
35.69	0.97 ± 0.03

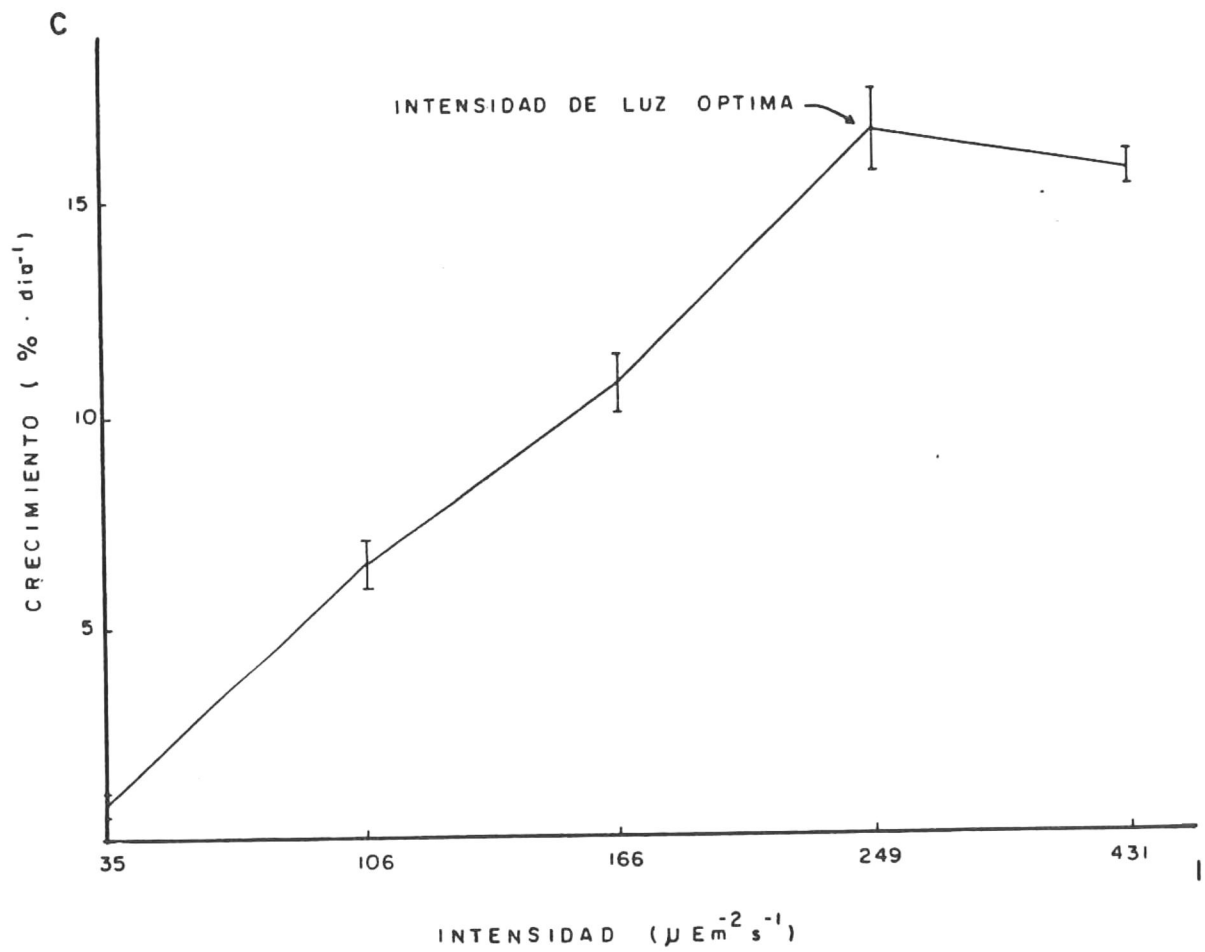


FIGURA 2

Crecimiento en función de la intensidad de luz para *Eucheuma uncinatum*. Las barras indican valores máximos y mínimos.

Nitrógeno crítico

Se colocaron tres ápices de aproximadamente cinco centímetros de longitud de diferentes plantas en matraces Erlenmeyer de 1 litro que contenían medio de cultivo Provasoli (Bold y Wynne, 1978) y seis diferentes concentraciones de nitratos (NaNO_3) (4, 10, 20, 50, 100 y 200 $\mu\text{mol l}^{-1}$), y un control de (0.015 $\mu\text{mol l}^{-1}$). Las plantas se mantuvieron bajo cultivo durante 21 días. El medio de cultivo fue cambiado cada tercer día. Las plantas fueron limpiadas y pesadas y se determinó su razón de crecimiento en cada cambio y su razón de crecimiento promedio por día.

Al final del experimento, las plantas se secaron a peso constante, a una temperatura de 60 °C, y se analizó su contenido de nitrógeno y carbono con un cromatógrafo de gases Carbón/Hidrógeno/Nitrógeno Carlo Erba modelo 1106 Elemental Analyzer en la Universidad de Nueva York, en Stony Brook.

Velocidad de captación de nitratos

El método utilizado para medir la velocidad de captación fue el de frascos múltiples, en el cual cada frasco contiene material algal y diferentes concentraciones de nutrientes (Hanisak y Harlin, 1978 y Wheeler, 1981).

Para este experimento la determinación de la captación (UPTAKE), indicó cuanto nutriente captó la

planta, independientemente de como lo hizo (por difusión, transporte activo, etc.) y esto fue reflejado por la pérdida de la concentración del nutrimento en el medio de cultivo.

Este experimento se realizó en un incubador PRESICION con una temperatura controlada de $22^{\circ}\text{C} \pm 1$ y una intensidad de luz de $224.13 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Los tiempos de captación fueron de 1 hora y fueron determinados por ensayos previos que indicaron que las plantas captaron el sustrato a su máximo.

Las plantas libres de epifitas y con pesos aproximados de 1 g fueron colocadas en frascos de 250 ml que contenían medio de cultivo Provasoli (Bold y Wynne, 1978). Se trabajó por triplicado con seis concentraciones de nitratos: 4, 10, 20, 50, 100 y $200 \mu\text{mol l}^{-1}$. Posteriormente se tomaron 25 ml de muestra del medio de cultivo para cada concentración y sus réplicas. El análisis de nitratos se llevó a cabo por reducción en columna de Cadmio, según lo descrito por Strickland y Parsons, (1972).

Mediante la variación de la concentración en el medio de cultivo y el tiempo de captación se determinó la velocidad de captación en la planta. Para determinar el valor fue utilizada la fórmula de Probyn y Chapman, (1982):

$$V = \frac{\Delta n}{t * X}$$

donde V = velocidad de captación ($\mu\text{g NO}_3$ g peso seco⁻¹ hora⁻¹)

n = diferencia entre la concentración inicial y la concentración final de nitrógeno en el medio de cultivo

t = tiempo en horas

X = peso seco en gramos

También, la velocidad máxima (V_{max}) y la constante de afinidad (K_m) fueron obtenidas por el método de Lineweaver Burk para cinética enzimática (VER FIGURA 4b).

Velocidad de crecimiento

Se colocaron tres ápices de aproximadamente cinco centímetros de longitud de diferentes plantas en matraces Erlenmeyer de 1 litro que contenían medio de cultivo Provasoli (Bold y Wynne, 1978) y seis diferentes concentraciones de nitratos ($NaNO_3$): 4, 10, 20, 50, 100 y 200 $\mu mol\ l^{-1}$.

Las plantas se mantuvieron bajo cultivo durante 45 días. Cada semana las plantas se cosechaban dejando el tejido nuevo y quedando la biomasa inicial, requisito de este experimento para determinar la velocidad de crecimiento.

El medio de cultivo fue cambiado cada tercer día. Las plantas fueron limpiadas y pesadas y se determinó su razón de crecimiento en cada cambio. Al final de seis semanas se determinó la razón de crecimiento promedio por día.

Análisis estadísticos

Para verificar los resultados de los diferentes experimentos se aplicó la prueba de distribución normal Kolmogorov Smirnov, la prueba de homogeneidad de varianzas de Scheffe-Bc y la prueba de comparaciones múltiples de promedios; para comparar la homogeneidad entre las varianzas y las medias entre los diferentes tratamientos (Sokal y Rohlf, 1981). El nivel de significancia para todos los análisis estadísticos fue del 0.05

RESULTADOS

Nitrógeno crítico

Los porcentajes encontrados en el tejido mostraron valores mínimos y máximos para nitrógeno de 0.96 a 3.84%, para carbón de 22.4 a 29% y crecimiento porcentual diario de 8.05 a 11.25, respectivamente.

Los criterios utilizados para determinar un valor de nitrógeno crítico de 1.56 %N fueron a que durante 21 días de experimentación, el crecimiento tuvo cambios mínimos que oscilaron entre el 11 y 12 % diario. Además de observaciones que mostraron las diferencias físicas de las algas (color, longitud, frondosidad, etc.) las cuales indicaron de una forma subjetiva los cambios a través del tiempo y dieron una idea del estado físico de la planta. La prueba entre medias para el crecimiento indicó que no había diferencias significativas a partir de la concentración interna de nitrógeno de 1.56 % con valores de crecimiento igual a 12.62 % diario (TABLAS II, III y IV).

Los valores de crecimiento de 12.62 % diario fueron los crecimientos mas altos y las plantas de mejor estado físico y pesos mayores. El porcentaje de nitrógeno determinado y su crecimiento, indicaron que la planta no se encontró limitada por nitratos (FIGURA 3).

TABLA II

CRECIMIENTOS, % NITROGENO, % CARBON Y RELACION C/N EN EL
TEJIDO DE *Eucheuma uncinatum*, EN FUNCION DE LA CONCENTRACION
DE NITRATOS.

CONCENTRACION	CRECIMIENTO	NITROGENO	CARBONO	C / N
$\mu\text{mol NO}_3^- \text{ l}^{-1}$	C % dia^{-1}	%	%	
4.70	8.05 ± 0.17	0.96 ± 0.09	24.5 ± 0.79	25.5 ± 0.7
10.35	11.16 ± 0.36	1.01 ± 0.13	24.4 ± 1.3	24.6 ± 2.7
19.76	10.70 ± 0.14	1.25 ± 0.23	23.1 ± 0.3	21.3 ± 1.2
50.81	11.72 ± 0.10	1.19 ± 0.06	24.8 ± 0.8	20.8 ± 0.6
100.52	12.62 ± 0.04	1.56 ± 0.15	24.8 ± 2.6	19.2 ± 4.9
200.45	11.26 ± 0.80	3.84 ± 0.40	29.0 ± 2.0	7.6 ± 0.3

TABLA III

PRUEBA DE COMPARACION ENTRE MEDIAS PARA EL CRECIMIENTO
DE PLANTAS CULTIVADAS BAJO DIFERENTES CONCENTRACIONES
DE NITRATOS (NIVEL DE CONFIANZA 0.05)

GRUPO	4.70	10.35	19.76	50.81	100.52	200.45
4.70	-	S	S	S	S	S
10.35	S	-	NS	NS	S	NS
19.76	S	NS	-	NS	S	NS
50.81	S	NS	NS	-	NS	NS
100.52	S	S	S	NS	-	S
200.45	S	NS	NS	NS	S	-

TABLA IV

DIFERENCIAS FISICAS EN LAS PLANTAS DE *Eucheuma uncinatum*
PARA EL EXPERIMENTO DE NITROGENO CRITICO.

CONC.	EPIF.	COLOR	FIRMEZA	FRONDOSIDAD	GROSOR	LONGITUD
CONT	POCAS	ROSA CLARO	MUY POCA	NADA	BAJO	5.0
4	NO	ROSA CLARO	POCA	NADA	BAJO	5.5
10	NO	ROSA ROJO	MEDIANA	POCO	BAJO	5.5
20	NO	ROSA ROJO	MEDIANA	POCO	BAJO	6.0
50	NO	ROJO	FIRME	MEDIANA	MEDIANO	10.0
100	NO	ROJO FUERTE	MUY FIRMES	ALTA	ALTO	15.0
200	MUCHA	ROJO	FIRME	POCA	ALTO	7.0

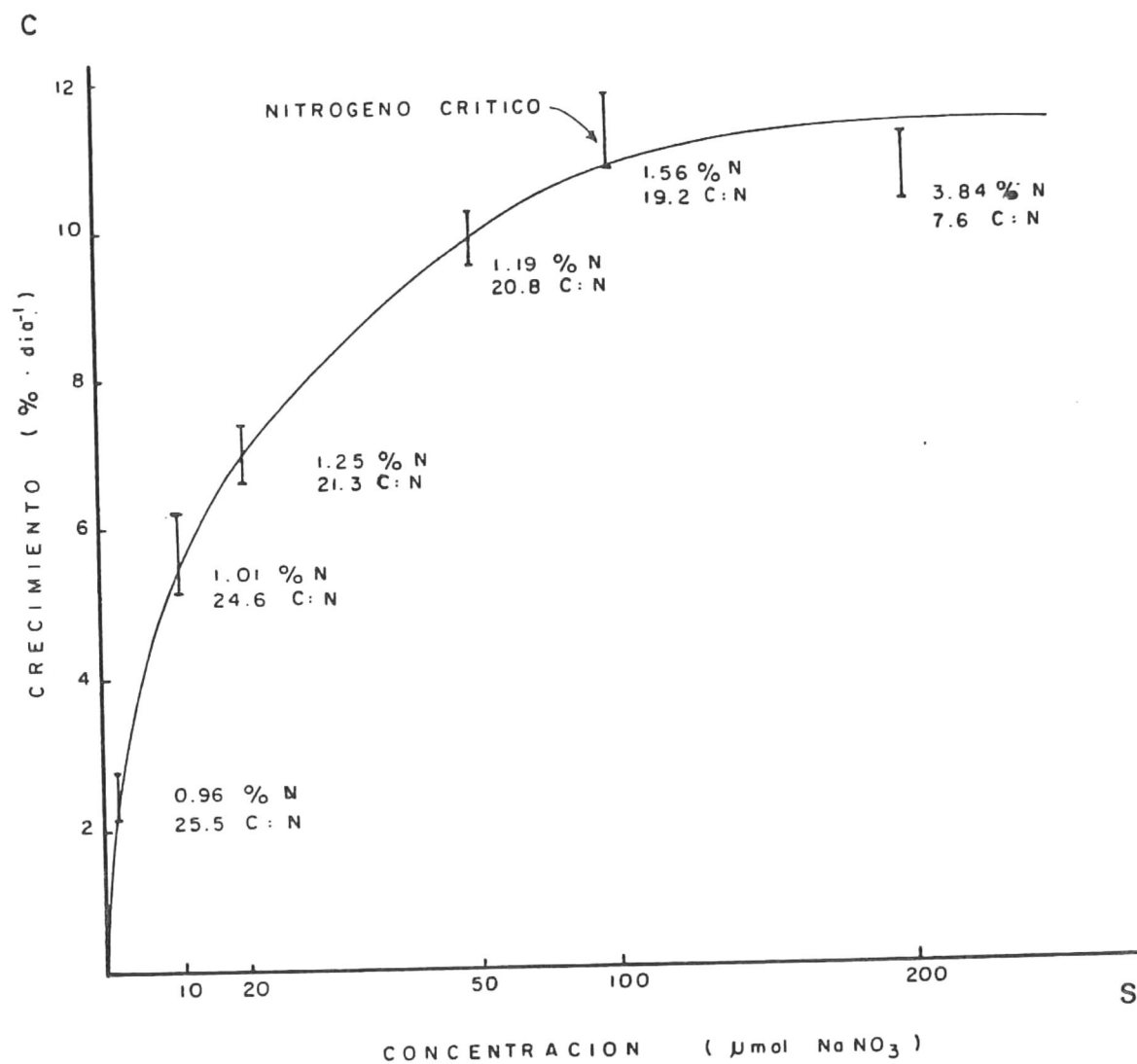


FIGURA 3

Crecimiento en función de la concentración de Nitrógeno en el tejido para Eucheuma uncinatum. Las barras indican valores máximos y mínimos.

Velocidad de captación de nitratos

La velocidad de captación se incrementó en función de la concentración de nitratos de 0.02 a 1.4 $\mu\text{mol N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$. A partir de la concentración de 50 $\mu\text{mol NaNO}_3 \text{ l}^{-1}$ la velocidad de captación permaneció constante, con valor de 1.8 $\mu\text{g NO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (TABLA V).

La curva de velocidad de captación (Figura 4a), mostró un comportamiento semejante a la ecuación de cinética enzimática de Michaelis-Menten. En esta curva se observa el incremento de la velocidad por captación del nutrimento para posteriormente estabilizarse indicando la saturación de la planta.

El análisis de comparación múltiple mostró diferencias significativas para la velocidad de captación y determinó que a partir de la concentración de 50 $\mu\text{mol NaNO}_3 \text{ l}^{-1}$ la captación llegó a su máximo (TABLA VI).

Los valores de velocidad máxima y constante de afinidad obtenidos por el método de Lineweaver-Burk fueron 1.8 y 10.1 $\mu\text{g NO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente (FIGURA 4b).

Velocidad de crecimiento

El crecimiento de las plantas mostró un incremento en función de la concentración de 9.26 a 17.30 % diario, disminuyendo fuertemente a 9.66 % diario a concentraciones de 200 $\mu\text{mol NaNO}_3 \text{ l}^{-1}$ (TABLA VII).

El crecimiento de plantas sometidas a cultivos con

TABLA V

VELOCIDAD DE CAPTACION DE NITRATOS PARA *Eucheuma uncinatum* A DIFERENTES CONCENTRACIONES, $K_m = 10.1$ (obtenida por sustitución en la ecuación de Lineweaver Burk).

CONCENTRACION $\mu\text{mol NO}_3 \text{ l}^{-1}$	CAPTACION $\mu\text{mol NO}_3 \text{ g}^{-1}$	VELOCIDAD MAXIMA $\mu\text{g NO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$
CONTROL	0.18 ± 0.003	0.0263 ± 0.001
4.70	2.46 ± 0.003	0.3237 ± 0.001
10.35	9.07 ± 0.003	1.1165 ± 0.001
19.80	16.35 ± 0.003	1.4155 ± 0.001
50.82	17.11 ± 0.003	1.7882 ± 0.02
100.52	17.16 ± 0.003	1.8005 ± 0.02
200.45	17.08 ± 0.003	1.8235 ± 0.02

TABLA VI

PRUEBA DE COMPARACION ENTRE MEDIAS PARA LA VELOCIDAD DE CAPTACION A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NITRATOS (NIVEL DE CONFIANZA 0.05)

GRUPO	4.70	10.35	19.76	50.81	100.52	200.45
CONTROL	S	S	S	S	S	S
4.70	-	S	S	S	S	S
10.35	S	-	S	S	S	S
19.76	S	S	-	S	S	S
50.81	S	S	S	-	NS	NS
100.52	S	S	S	NS	-	NS
200.45	S	S	S	NS	NS	-

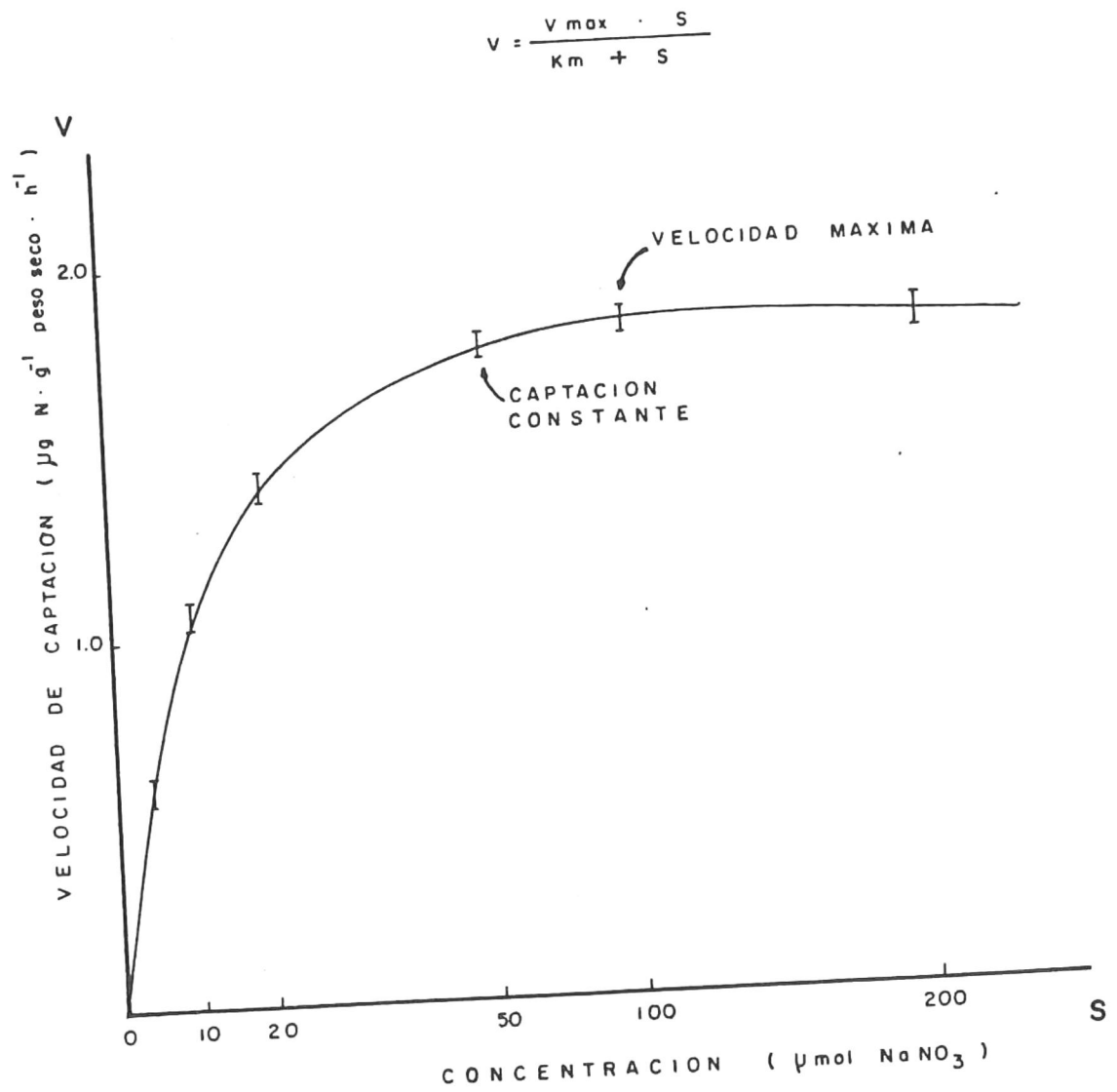


FIGURA 4a

Velocidad de captación para diferentes concentraciones de nitratos para Eucheuma uncinatum. Las barras indican valores máximos y mínimos.

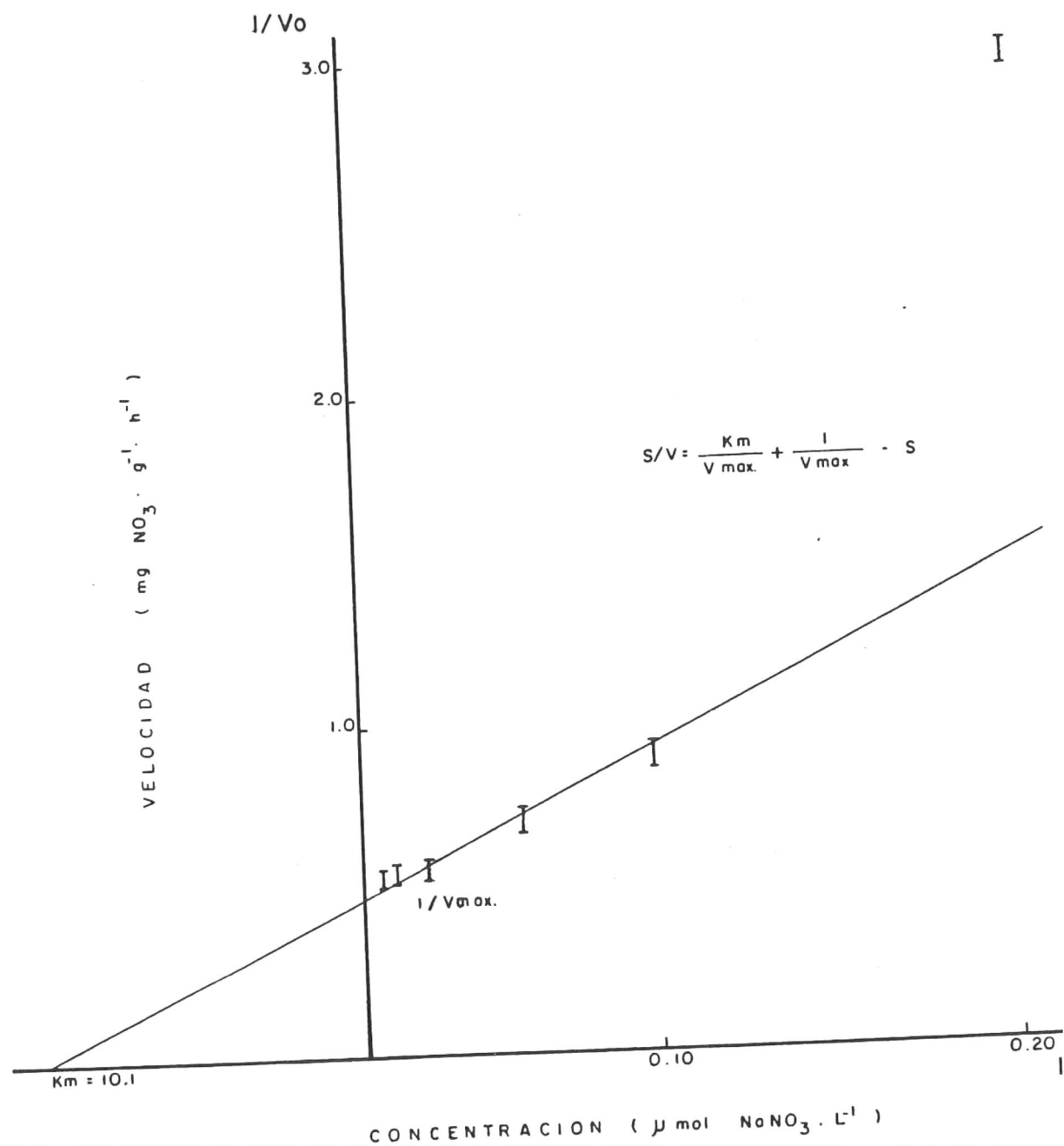


FIGURA 4b

Obtención de la constante de afinidad (K_m) y velocidad máxima ($V_{máx.}$) por el método de Lineweaver - Burk para cinética enzimática. Las barras indican valores máximos y mínimos.

concentraciones de $100 \mu\text{mol NaNO}_3 \text{ l}^{-1}$ fue el mayor, con valores del 17.26 % diario. Sin embargo, el valor mínimo de crecimiento de 9.26 % diario fue para plantas cultivadas a concentraciones de $4 \mu\text{mol NaNO}_3 \text{ l}^{-1}$ lo que indicó que el crecimiento de la planta se encontraba limitado por nutrientes.

Una comparación múltiple de promedios determinó diferencias significativas para todos los crecimientos excepto para las concentraciones de nitratos de 10 y 200 μmol . Las plantas cultivadas a 200 μmol tendieron a desintegrarse mientras crecían, lo que evitó la medición de su incremento en peso (TABLA VIII y FIGURA 5).

La Figura 5 muestra los crecimientos de Eucheuma uncinatum a diferentes concentraciones de nitratos y refleja claramente la velocidad de crecimiento, favoreciendo a la concentración de $100 \mu\text{mol NaNO}_3 \text{ l}^{-1}$ para la obtención de los mayores crecimientos.

TABLA VII

CRECIMIENTOS PARA *Eucheuma uncinatum* A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NITRATOS CONSERVANDO LA BIOMASA CONSTANTE.

CONCENTRACION	CRECIMIENTO
$\mu\text{mol NO}_3^- \text{ l}^{-1}$	C % dia^{-1}
4.70	9.26 ± 1.56
10.35	9.80 ± 0.89
19.76	12.70 ± 1.57
50.82	16.35 ± 0.01
100.52	17.30 ± 0.01
200.45	9.66 ± 0.76

TABLA VIII

PRUEBA DE COMPARACION ENTRE MEDIAS PARA EL CRECIMIENTO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NITRATOS (NIVEL DE CONFIABILIDAD DEL 0.05).

GRUPO	4.70	10.35	19.76	50.81	100.52	200.45
4.70	-	NS	S	S	S	S
10.35	NS	-	S	S	S	NS
19.76	S	S	-	S	S	S
50.81	S	S	S	-	S	S
100.52	S	S	S	S	-	S
200.45	S	NS	S	S	S	-

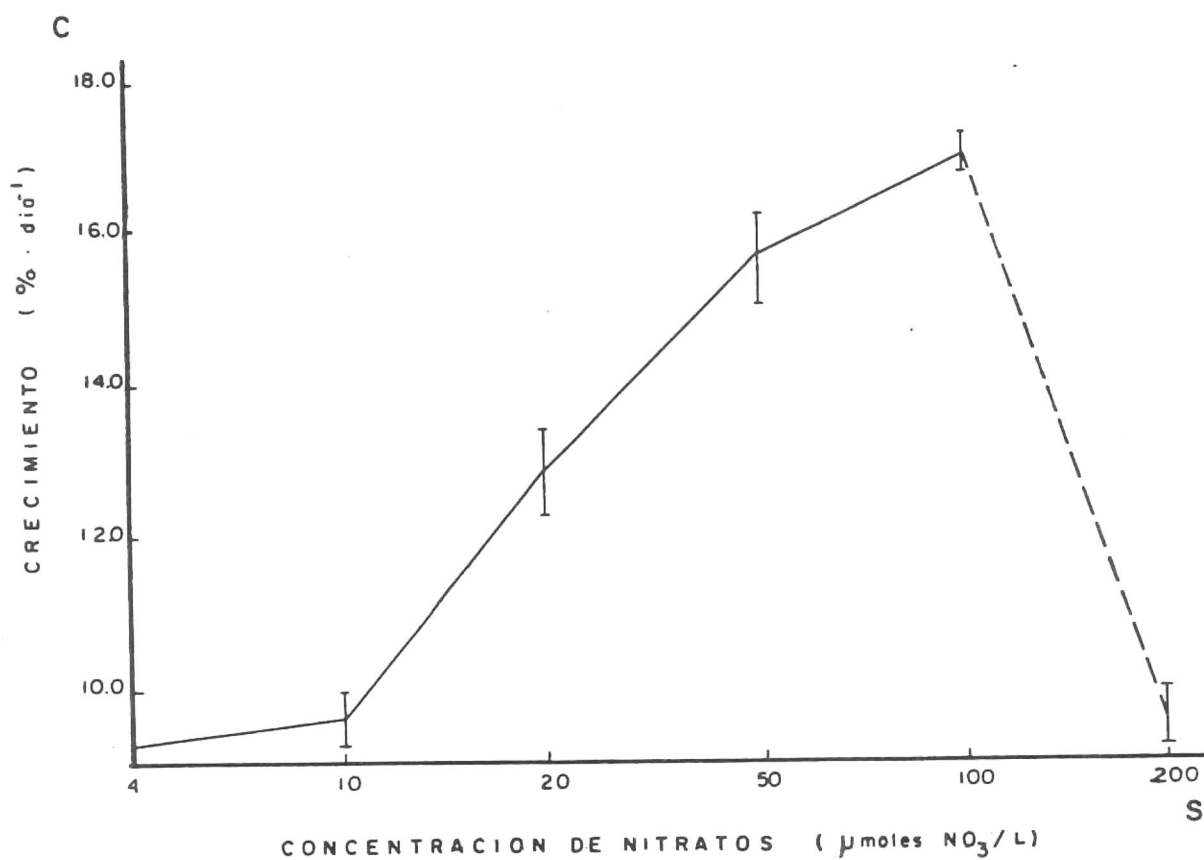


FIGURA 5

Crecimientos de Eucheuma uncinatum a diferentes concentraciones de nitratos, con biomasa constante. Las barras indican valores máximos y mínimos.

DISCUSIONES

El valor de nitrógeno crítico de Eucheuma uncinatum (1.56 %N), comparado con los reportados en otras algas es menor. Hanisak (1979 y 1982), encontró para C. fragile y G. tikvahiae valores de 1.86 y 2 %N en el tejido. Asare y Harlin (1983) reportaron para A. nodosum, C. fragile, C. crispus, E. vesiculosus y L. saccharina valores de 2.5, 2.8, 5.0, 2.5 y 2.5, respectivamente.

Esto debió a que no se pudo llevar a cabo una comparación plena, ya que la mayoría de los estudios realizados para nitrógeno crítico, han sido para especies de habitat templado; existiendo una diferencia con E. uncinatum que pertenece a un habita subtropical. A su vez, existe también la diferencia tanto en Phyllum como en condiciones de cultivo; sin embargo, la comparación se llevó a cabo porque nos brinda una idea del nivel al que E. uncinatum se encuentra. La concentración de nitrógeno en el tejido (1.56% N) marcó los límites del crecimiento del alga y a su vez determinó que el aumento y la disminución de las concentraciones indicaron reserva o deficiencia de nitratos.

La razón de carbón : nitrógeno disminuyó en proporción a la concentración del nitrógeno en el tejido, mientras ésta última iba en aumento la razón disminuyó de un 25 a un 7.6%, lo que se esperaba debido a la acumulación de nitrógeno y crecimiento de la planta. Marshall-Darley (1987) explica que los síntomas de deficiencia de nitrógeno

en las algas marinas produce menores tasas de crecimiento, menor contenido de ficocitrina (algas rojas) y mayores proporciones de C:N. Conforme la acumulación de nitrógeno ocurre, las tasas de crecimiento aumentan y las proporciones de C:N disminuyen, ya que la planta no se encuentra limitada por nitrógeno.

El crecimiento de Eucheuma uncinatum (12.65 % diario) comparado con otros estudios realizados para esta misma especie fue un poco más alto. Polne et al., (1981 y 1982) y Zertuche et al., (1987), obtuvieron crecimientos del 11 y 8% diario respectivamente, con suministro de nitratos y fosfatos para cultivos en tanques exteriores. Para plantas cultivadas con agua de mar libre de nutrientes, Eucheuma uncinatum tuvo comportamientos similares a los obtenidos por Polne et al., (1981) con valores del 4% diario para los estudios de Polne y de 3.5 % diario en el presente estudio. Otros valores de crecimiento para especies cultivadas en laboratorio con suministro de nitratos son reportados en la tabla IX. Dicha tabla muestra crecimientos óptimos en diferentes especies usando al nitrato de sodio como sustrato.

El hecho de que Eucheuma uncinatum cultivada bajo condiciones controladas de laboratorio, haya alcanzado crecimientos más altos a los reportados en estudios anteriores, es debido al buen control de irradiación sobre las plantas mediante experimentos previos para evitar que la

TABLA IX

VALORES DE CRECIMIENTO Y SUMINISTRO DE NUTRIENTES (N-
NO₃) EN DIFERENTES ESPECIES DE MACROALGAS. (Obtenida de
Hanisak, 1983).

ESPECIE	CRECIMIENTO C % día ⁻¹	CONCENTRACION μmol NO ₃ l ⁻¹	REFERENCIA
<u>Gelidium robustum</u>	2.96 %	100 μmol	Rodriguez 1987
<u>Gracilaria foliifera</u>	12.0 %	45 μmol	D'Elia y DeBoer 1978
<u>Gracilaria tikvahiae</u>	12.3 %	OSMOCOTE	Zertuche et al 1988
<u>Neogarddiella baileyi</u>	10.5 %	25 μmol	D'Elia y DeBoer 1978
<u>Eucheuma uncinatum</u>	11.0 %	50 μmol	Polne et al 1981
<u>Eucheuma uncinatum</u>	8.0 %	100 μmol	Zertuche et al 1987
<u>Eucheuma uncinatum</u>	12.6 %	100 μmol	*

* PRESENTE INVESTIGACION

luz fuese limitante. Otro efecto que favoreció el crecimiento de *Eucheuma* fue el trabajar con temperaturas óptimas determinadas anteriormente en estudios dentro del proyecto y sugeridas por Zertuche *et al.*, (1987), ya que la temperatura influye en la captación por el efecto en la difusión (puede acelerarla o retrasarla), en el transporte e incorporación de iones al medio ambiente y también por el efecto que puede causar a los sistemas enzimáticos (inhibición de la nitroreductasa) (Lobban, *et al.*, 1985).

La determinación del nitrógeno crítico permitirá conocer el estado nutricional de la planta en forma directa, independientemente de la concentración ambiental de nutrimentos.

El valor de velocidad de captación para *E. uncinatum* ($1.9 \mu\text{g NO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) fue menor a los de otras plantas como: *C. fragile*, *E. spiralis*, *G. tikvahiae*, *Hypnea musiformis*, *L. longicruris*, *M. pyrifera* y *N. baileyi* (TABLA X). Sin embargo los valores de saturación, comparados con las constantes de saturación media para la captación de nitratos en algas marinas, se encuentran por lo general entre 1 y $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ (Marshall-D., 1987). La constante de afinidad determinada (10.1) fue intermedia presentando alta afinidad por el sustrato de nitratos (TABLA X). En este tipo de experimentos los valores altos, bajos, mayores o menores son relativos, ya que cada planta tiene su velocidad de captación particular, incluyendo las variaciones dentro de

TABLA X

VALORES DE VELOCIDAD MAXIMA ($\mu g \cdot g \text{ peso seco}^{-1} \cdot h^{-1}$) Y
CONSTANTE DE AFINIDAD PARA CAPTACION DE NITROGENO ($N-NO_3$) EN
DIFERENTES ESPECIES.

ESPECIE	Km	Vmax	AUTOR
<u>Codium fragile</u>	1.2 a 7.6	2.8 a 10.9	Hanisak y Harlin 1978
<u>Fucus spiralis</u>	1.4 a 2.5	5.6 a 12.8	Topinka 1978
<u>Gracilaria tikvahiae</u>	9.7	2.5	D'Elia y DeBoer 1978
<u>Hypnea muciformis</u>	28.5	4.9	Haines y Wheeler 1978
<u>Laminaria longicrucis</u>	7.0 a 9.6	4.1 a 5.9	Harlin y Craige 1978
<u>Macrocystis pyrifera</u>	22.4 a 30.5	8.7 a 13.1	Haines y Wheeler 1978
<u>Neogardhiella baileyi</u>	11.7	2.4	D'Elia y DeBoer 1978
<u>Eucheuma uncinatum</u>	10.1	1.8	*

* PRESENTE INVESTIGACION

la misma especie. Así, por definición, valores "pequeños" de K_m muestran una alta afinidad, siendo la constante de captación dependiente de la velocidad máxima (Lobban, 1985).

Factores como temperatura, luz (óptimas) y movimiento continuo son importantes para llevar a cabo una buena captación. La relación entre la velocidad de captación y la concentración extracelular del nutrimento (medio de cultivo) se describe claramente en la figura 4b, por la expresión de la función de Lineweaver Burk para cinética enzimática.

Una aplicación práctica de la medición de este parámetro es que permite seleccionar diseños para el mantenimiento efectivo de sistemas de cultivo y optimizar su productividad. Un ejemplo es el caso de Gigartina y Chondrus (Marshall - Darley, 1987) en donde ha sido posible seleccionar cepas de rápido crecimiento junto con mejoramientos adicionales que incrementan los rendimientos y propiedades químicas de los hidrocoloides que se producen. También es posible manipular el ambiente de los cultivos para estimular la producción de estos compuestos ya que varias especies de algas rojas tienen mayor contenido de hidrocoloides cuando crecen durante cierto periodo a bajas concentraciones de nitrógeno.

El experimento de velocidad de crecimiento, mostró la posibilidad de incrementar los crecimientos favorablemente, esto debido a que un factor biológico importante que influye es la concentración del sustrato (nitratos) y su velocidad

para captarlo, incluyendo su historia nutricional.

En este experimento el mantener la biomasa constante (por medio de cosecha) significó trabajar siempre con tejido joven, lo que influyó para que las plantas captaran mejor el nutriente e incrementara su crecimiento. Además su historia nutricional refleja que en el caso de Eucheuma uncinatum cuando no tiene reserva de nutrimentos, las concentraciones externas (en este caso el medio de cultivo) influyen y el crecimiento se favorece (Wheeler, 1981 y Gerard, 1982 a y b).

Cuando se trabajó a concentraciones de $200 \text{ } \mu\text{mol NO}_3^- \text{ l}^{-1}$ las plantas mostraron un comportamiento negativo, es decir, no hubo un incremento en peso. Esto debido probablemente a la sobresaturación por altas concentraciones de nutrimentos que pudieron ser tóxicas e inhibir el crecimiento. En este experimento, las plantas tendieron a desintegrarse mientras crecían lo que dificultó la medición del crecimiento. Es por eso que en los análisis estadísticos no fueron observadas diferencias significativas entre plantas cultivadas con 10 y $200 \text{ } \mu\text{mol NO}_3^-$.

Cuando se piensa en dietas nutricionales para cultivos extensivos, este tipo de estudios son importantes, ya que el conocimiento de la aplicación de concentraciones de nutrimentos permitirían mantener una producción constante, e inclusive mejores en los especímenes. Rodríguez-Carrillo, (1987), trabajando con Gelidium robustum (productora de

agar), mostrò incrementos en su crecimiento con valores del 2.96 al 4.90 % diario, cuando trabajò con concentraciones de 100 μmol de nitratos para cultivos en tanques exteriores. Zertuche et al., (1987) y en la actualidad lleva a cabo investigaciones con Eucheuma uncinatum (productora de carragenano) logrando conservar su crecimiento durante todo un año para cultivos en tanques exteriores.

El uso de parámetros cinéticos como el nitrògeno crítico, velocidad de captaciòn y velocidad de crecimiento, ayudan a conocer los factores que afectan la captaciòn, la interrelaciòn entre el suministro de nutrimentos, la razòn de captaciòn y las razones de crecimiento y ayuda a predecir la ventaja competitiva de una especie a otra cuando el nutrimento es limitante.

CONCLUSIONES

Existe una relación entre el crecimiento y la determinación del contenido de nitrógeno crítico en el tejido ya que permite conocer el estado nutricional de la planta en forma directa, independientemente de la concentración de nutrientes.

Eucheuma uncinatum, presentó velocidades de captación constante a partir de los $50 \text{ } \mu\text{mol NaNO}_3 \text{ l}^{-1}$.

La velocidad de crecimiento mostró la posibilidad de aumentar los crecimientos hasta en un 17 % diario cuando los cultivos de Eucheuma uncinatum fueron mantenidos a concentraciones de $100 \text{ } \mu\text{mol NaNO}_3 \text{ l}^{-1}$.

LITERATURA CITADA

- Asare, S. O. y M. M. Harlin. (1983). Seasonal fluctuations in tissue nitrogen for five species of perennial macroalgae in Rhode Island sound. J. Phycol. 19: 254-257.
- Bohinsky, R. C. (1985). Bioquímica. Fondo Educativo Interamericano. 345 pp.
- Bold, H. C. y M. J. Wynne. (1978). Introduction to the algae structure and reproduction. Prentice Hall, Inc. Englewood Cliffs, N. J. 706 pp.
- Chapman, A. F. O., and J. S. Craigie. (1977). Seasonal growth in Laminaria longicruris: relations with dissolved inorganic nutrients and internal reserves of nitrogen. Mar. Biol. 40: 197-205.
- DeBoer J. A., H. J. Guigli, T. L. Israel y C. F. D'Elia. (1978). Nutritional studies of two red algae. Growth rate as a function of nitrogen source and concentration. J. Phycol. 14: 261-266.

DeBoer, J. A. (1979). Effects of nitrogen enrichment on growth rate and phycocolloid content in Gracilaria foliifera and Neogardhiella baileyi (Florideophyceae). In: Nineth International Seaweed Symposium. Santa Barbara, Ca. 20 - 27 August, 1977. pp. 263-271.

DeBoer, J. A. (1981). Nutrients. In: Biology of Seaweeds, Botanical Monographs. V. 17. (Christopher S. Lobban and Michael J. Wynne. Eds. Ch. 10). University of California Press. pp. 356 - 391 .

D'Elia C.F. and J. A. DeBoer. (1978). Nutritional studies of two red algae. II. Kinetics of ammonium and nitrate uptake. J. Phycol. 14: 266 - 272.

Gerard, V. (1982a). In situ rates of nitrate uptake by Gigant Kelp, Macrocystis pyrifera (L.). Agardh: Tissue differences, environmental effects, and predictions of nitrogen - limited growth. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. Vol. 62. pp. 211 - 214. Elsevier Biomedical Press.

Gerard, V. (1982b). In situ water motios and nutrient uptake by the Gigant Kelp Macrocystis pyrifera. Marine Biology 69. pp. 51 - 54.

- González Gómez, M.A. (1988). Efecto de los nitratos en el crecimiento y producción de carragenano en Gigartina canaliculata (Harv.) en tanques de cultivo. Tesis Profesional Facultad de Ciencias Marinas. U.A.B.C. pp. 42.
- Haines, K. C. and P. A. Wheeler. (1978). Ammonium and nitrate uptake by the marine macrophytes Hypnea musciformis (Rhodophyta) and Macrocystis pyrifera (Phaeophyta). J. Phycol. 14: 319 - 324.
- Hanisak, M. D. and M. Harlin. (1978). Uptake of inorganic nitrogen by Codium fragile subsp. tormentosoides (Chlorophyta). J. Phycol. 14: 450-454.
- Hanisak, M.D. (1979). Nitrogen limitation of Codium fragile ssp. tormentosoides as determined by tissue analysis. Mar. Biol. 50 : 319-332.
- Hanisak, M. D. (1982) The nitrogen status of Gracilaria tikvahiae in natural and mariculture systems as determined by tissue analysis. International Phycology Congress. St. John's Newfoundland, Canada. pp. A-20.
- Hanisak, M.D. (1983). The nitrogen relationships of marine macroalgae. Chapter 19. In: Nitrogen in the marine environment (E.J. Carpenter and D.G. Capone. Eds.) Academic Press. New York, pp. 699 - 730.

- Harlin, M. and Craigie J. (1978). Nitrate uptake by Laminaria longicruris (Phaeophyceae). Journal Phycol. 14 : 464 - 467 pp.
- Harlin, M. and P. Wheeler. (1980). Nutrient uptake. In: Handbook of Phycological Methods. Ecological Field Methods: Macroalgae. Ch. 24. (Mark M. Littler and Diane S. Littler. Eds.) Cambridge Univ. Press. pp. 493-510.
- Lapointe, B. and C. Duke. (1984). Biochemical strategies for growth of Gracilaria tikvahiae in relation to light intensity and nitrogen availability. J. Phycol. 20: 488-495.
- Lapointe, B. (1985). Strategies for pulsed nutrient supply to Gracilaria cultures in the florida keys: interactions between concentration and frequency of nutrient pulses. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 93: 211-222.
- Lobban, S. P. Harrison and M. Duncan. (1985). Nutrients. In: The physiological ecology of seaweed. Ch. 6. Cambridge University Press. U.S.A. New York. pp. 75-110.
- Marshall, Darley W. (1987). Biologia de las Algas. Enfoque fisiológico. Edit. Limusa. 230 pp.

- Penniman, C.A. (1983). Ecology of Gracilaria tikvahiae McLachlan (Gigartinales, Rhodophyta) in the Great Bay Estuary, New Hampshire. Ph. D. Thesis University of the New Hampshire. pp. 267.
- Polne, M. A. Gibor and M. Neushul. (1980). The use of ultrasound, for the removal of macro-algae epiphytes, Bot. Mar. 23: 731-734.
- Polne, M., M. Neushul and A. Gibor (1981). Growing Eucheuma uncinatum in culture, domestication of a marine crop plant. Xth International Seaweed Symp. pp. 115-122.
- Polne, M. (1982). Studies towards the Domestication of Eucheuma uncinatum a Carrageenan Producing Red Alga. A dissertation submitted in partial satisfaction of the requirements for the degree of Doctor in Phycology. University California, Santa Barbara. pp. 273.
- Probyn, T.A. and A.R. Chapman. (1982). Nitrogen uptake characteristics of Chordaria flagelliformis (Phaeophyta) in batch mode and continuous mode experiments. Mar. Biol. 71: 129 - 133.
- Riley J.P. and Chester R. (1971). Introduction to Marine Chemistry. Academic Press Inc. pp.465.

- Rodriguez Carrillo, M.I. (1987). Efecto de la concentración y fuente de nitrógeno en el crecimiento de Gelidium robustum (Gardn.) Hollenb. and Abb. (Rhodophyta, Gelidiales). en cultivo. Tesis Profesional Facultad de Ciencias Marinas. U.A.B.C., Ensenada, B.C. 36 pp.
- Ryther J.H., N. Corwin, T.A. DeBusk and L.D. Williams. (1981 / 1982). Nitrogen uptake and storage by the red alga Gracilaria tikvahiae (McLachlan, 1979). Aquaculture 26: 107 - 115. Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam.
- Sokal, R. y J. Rohlf. (1981 a). Biometry. 2a. Edición W. H. Freeman and Co. U.S.A.
- Sokal, R. y J. Rohlf. (1981 b). Tablas estadísticas. 2a. Edición W.H. Freeman and Co. U.S.A.
- Strickland J. y T. Parsons. (1972). Método para la determinación de nitratos. (Traducción del: Practical Handbook of Sea Water Analysis). Fisheries Research Board of Canada, Ottawa. Bulletin 167, 2a. ed. 143-47 .
- Topinka A. y J. Robbins. (1976). Effects of nitrate and ammonium enrichment on growth and nitrogen physiology in Fucus spiralis. Limnology Oceanography. 21: 659-64.
- Topinka, A. (1978). Nitrogen uptake by Fucus spiralis (Phaeophyceae). J. Phycol. 14: 241 - 247.

- Wheeler, A. P. (1981). Nutrients. In: Handbook of Phycological Methods. Ecological Field Methods: Macroalgae. Ch. 3. (Mark M. Littler and Diane S. Littler). Cambridge Univ. Press. pp. 53 - 64.
- Zertuche, González J.A. (1986). Maricultivo y extracción química de algas de valor comercial en Baja California. Memorias del Intercambio académico sobre investigaciones en el Mar de Cortéz. CICTUS - CONACyT, Hermosillo, Son. 372-380 pp.
- Zertuche, G. J.A., E.Z. García y B.H. Brinkhuis. (1987). Cultivo en Tanques exteriores del alga roja Eucheuma uncinatum, del Golfo de California. Revista de Ciencias Marinas 13 (2) : 1-10.
- Zertuche, G. J.A. y Pacheco R. I. (1987). Crecimiento del alga roja subtropical Eucheuma uncinatum en una Bahía del Pacífico templado. Resúmenes del VII Congreso Nacional de Oceanografía. 95 pp.
- Zertuche, G. J.A., Schlenk, G.C. y Brinkhuis, B. (1988). Cultivo de Gracilaria tikvahiae (McLahlan) (Rhodophyta, Gigartinales) en aguas no protegidas. Revista Ciencias Marinas; 14(1):15-29 pp.