



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE
BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS**

EFECTO DE LA VARIACION DE CIANOCOBALAMINA
(B₁₂) SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA MICROALGA
Tetraselmis suecica KYLIN (1935) BUTCH.



CURSO DE TITULACION
"BIOLOGIA MARINA"

MEMORIA
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
OCEANOLOGO
PRESENTA:
JOAQUIN FAUSTO CORDOVA RICARDEZ

ENSENADA, B. C., FEBRERO DE 1988

RESUMEN

Se llevó a cabo un experimento en el que se cultivó durante diez días la microalga Tetraselmis suecica, con la finalidad de conocer la variación de crecimiento bajo diferentes concentraciones de vitamina B₁₂. Se prepararon volúmenes de 75 ml de los medios de Matthiessen y Toner (1966) y f/2 de Guillard (1973), utilizando los macronutrientes de Guillard y el EDTA, tris, micronutrientes y vitaminas de Matthiessen y Toner. Se varió la concentración de Cianocobalamina (B₁₂), de 1.0 µg/l (testigo), 0.75 µg/l, 0.50 µg/l, 0.25 µg/l y 0.0 µg/l. Al décimo día del experimento, en el medio control se obtuvo una densidad poblacional de 4.72×10^6 cel/ml, y en los medios en los que se utilizó concentración de 0.75 µg/l, la densidad poblacional fue de 4.03×10^6 cel/ml, en la concentración 0.50 µg/l, las densidades poblacionales fueron de 4.82×10^6 cel/ml, en 0.25 µg/l, la densidad poblacional fue de 5.51×10^6 cel/ml, y en 0.0 µg/l, la densidad poblacional fue de 5.8×10^6 cel/ml. Se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis a los valores de las densidades poblacionales obtenidas al octavo día entre el promedio de original y réplica, encontrándose que no difieren significativamente al nivel del 5%, presentando un comportamiento similar en las tasas de crecimiento. Bajo estas condiciones es posible cultivar Tetraselmis suecica sin agregar Cianocobalamina al medio de cultivo, lo que no representa un ahorro significativo en el costo total de producción.

EFFECTO DE LA VARIACION DE CIANOCOBALAMINA
(B₁₂) SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA MICROALGA
Tetraselmis suecica KYLIN (1935) BUTCH.

M E M O R I A
CURSO DE TITULACION
BIOLOGIA MARINA

QUE PRESENTA:

JOAQUIN FAUSTO CORDOVA RICARDEZ.

APROBADO POR:

Antonio Silva Loera
Presidente del Jurado
M.C. ANTONIO SILVA LOERA

Eliseo Almanza Heredia
Sinodal Propietario
OC. ELISEO ALMANZA HEREDIA

Raul Aguilar Rosas
Sinodal Propietario
OC. RAUL AGUILAR ROSAS

Enrique Baltazar Valenzuela
Sinodal Suplente
OC. ENRIQUE BALTAZAR VALENZUELA.

Guillermo Torres Moye
Sinodal Suplente
M.C. GUILLERMO TORRES MOYE

DEDICATORIA

A mis padres: Joaquín Córdova Burelo y Justina Ricárdez Rodríguez, a quienes debo todo lo que soy.

A mis hermanos: Guadalupe Clementina, Salvador Vicente, Víctor Manuel, Raúl, Luis Benito, por su cariño y apoyo durante toda nuestra vida.

A mi esposa: Guadalupe Gómez Castro, por compartir conmigo todo lo que representa este trabajo, dandome su cariño, apoyo y comprensión.

A mis hijos: Salomón, Mónica, Raquel y Carmelita, quienes me dan su cariño y las fuerzas necesarias para seguir luchando por un futuro mejor.

A mis cuñadas: Felisa, Beatriz y Mirna por su comprensión y confianza.

A mi cuñado y compadre: Juan Sánchez Iñiguez por todo su apoyo y confianza que me han motivado para seguir adelante.

A todos mis sobrinos, como un ejemplo a seguir.

A todos los que me quieren y tienen confianza en mí, dedico con mucho cariño el presente trabajo, fruto de esfuerzos y sacrificios.

AGRADECIMIENTOS

A mi Director de Tesis M.C. Antonio Silva Loera, por su dirección y apoyo durante la realización del presente trabajo.

A mis Sinodales: Oc. Eliseo Almanza Heredia, Oc. Raúl Aguilar Rosas, Oc. Enrique Baltazar Valenzuela y M.C. Guillermo Torres Moyé, por sus muy valiosas críticas y sugerencias al presente trabajo.

Al Profr. Clemente Zavala Domínguez, por todas las facilidades otorgadas para poder realizar este trabajo.

A todos mis amigos del C.E.T.i.s. No. 67 de Cholula, Pue., por brindarme su amistad y ayuda desinteresada cuando mas la necesité.

A todos ellos y a quienes de una u otra forma hicieron posible la — realización del presente trabajo, les doy mi sincero y eterno agradecimiento.

CONTENIDO

	Página
INTRODUCCION	1
OBJETIVO	5
MATERIALES Y METODOS	6
MEDIOS DE CULTIVO	6
REGISTRO DEL CRECIMIENTO DE MICROALGAS	9
ANALISIS ESTADISTICO	10
RESULTADOS	11
DISCUSION	21
CONCLUSION	24
RECOMENDACIONES	25
LITERATURA CITADA	26
ANEXOS	29

LISTA DE TABLAS

TABLA		Página
I	Valores poblacionales de <u>T. suecica</u> a nivel Erlenmeyer en el medio de cultivo con 1.0 $\mu\text{g}/\text{l}$ de B ₁₂ (testigo). Tomando los valores promedio entre original y replica.	12
II	Valores poblacionales de <u>T. suecica</u> a nivel Erlenmeyer en el medio de cultivo con 0.75 $\mu\text{g}/\text{l}$ de B ₁₂ . Tomando los valores promedio entre original y réplica.	12
III	Valores poblacionales de <u>T. suecica</u> a nivel Erlenmeyer en el medio de cultivo con 0.50 $\mu\text{g}/\text{l}$ de B ₁₂ . Tomando los valores promedio entre original y réplica.	13
IV	Valores poblacionales de <u>T. suecica</u> a nivel Erlenmeyer en el medio de cultivo con 0.25 $\mu\text{g}/\text{l}$ de B ₁₂ . Tomando los valores promedio entre original y réplica.	13
V	Valores poblacionales de <u>T. suecica</u> a nivel Erlenmeyer en el medio de cultivo con 0.0 $\mu\text{g}/\text{l}$ de B ₁₂ . Tomando los valores promedio entre original y réplica.	15

LISTA DE FIGURAS

Fig.		Página
1	Gráfica de la densidad poblacional de <u>T. suecica</u> en el medio de cultivo con 1.0 $\mu\text{g}/\text{l}$ de B_{12} (testigo). Tomando los valores promedio entre original y réplica.	16
2	Gráfica de la densidad poblacional de <u>T. suecica</u> en el medio de cultivo con 0.75 $\mu\text{g}/\text{l}$ de B_{12} . Tomando los valores promedio entre original y réplica.	17
3	Gráfica de la densidad poblacional de <u>T. suecica</u> en el medio de cultivo con 0.50 $\mu\text{g}/\text{l}$ de B_{12} . Tomando los valores promedio entre original y réplica.	18
4	Gráfica de la densidad poblacional de <u>T. suecica</u> en el medio de cultivo con 0.25 $\mu\text{g}/\text{l}$ de B_{12} . Tomando los valores promedio entre original y réplica.	19
5	Gráfica de la densidad poblacional de <u>T. suecica</u> en el medio de cultivo con 0.0 $\mu\text{g}/\text{l}$ de B_{12} . Tomando los valores promedio entre original y réplica.	20

INTRODUCCION.

Uno de los factores mas importantes, tanto a nivel experimental como comercial, es el contar con una producción de alimento vivo, esencial para la alimentación de los estadios larvales de moluscos, crustáceos y peces cultivables (Droop, 1975). Por este motivo es indispensable contar con una producción suficiente y confiable de microalgas. Generalmente se requiere producir varias especies de microalgas para la alimentación de diversos organismos en los diferentes estadios de su ciclo de vida, porque la combinación de dos o mas especies resulta un mejor alimento (Shiraishi y Provasoli, 1959).

El tipo de cultivo de fitoplancton mas usual, es aquel en que un medio de volumen limitado conteniendo los nutrientes orgánicos e inorgánicos es inoculado con un número relativamente pequeño de células y expuesto a condiciones favorables de luz y temperatura (Fogg, 1975). En general los medios de cultivo mas utilizados se basan en el medio enriquecido f de Guillard y Ryther (1962). Así se han desarrollado los medios f/2 de Guillard (1973) y el de Matthiessen y Toner (1966), (Anexo I).

Para que un medio de cultivo de microalgas sea el adecuado, es necesario controlar ciertos factores fisicoquímicos y ambientales, así como la concentración de nutrientes esenciales de los cuales depende el éxito del cultivo, estos requerimientos se pueden clasificar en dos grupos:

a).- Requerimientos nutricionales.- Nitratos, fosfatos, silicatos, elementos traza, agentes quelantes y factores orgánicos del crecimiento (vitaminas).

b).-- Requerimientos fisicoquímicos y ambientales.-- pH, salinidad, bióxido de carbono, temperatura, iluminación y aireación.

Por lo anterior es práctica común que los medios comerciales tradicionales para el cultivo de fitoplancton, se preparen enriqueciendo el agua de mar (filtrada y esterilizada) con reactivos que se obtienen de casas comerciales, provocando un alto costo en los cultivos acuaculturales.

Las vitaminas son factores orgánicos nutricionales requeridos para el crecimiento continuo en las especies de fitoplancton. Una o mas vitaminas como la Cianocobalamina (B_{12}), Tiamina ó Biotina, son requeridas en muy bajas concentraciones para usarlas como cofactores por los organismos. Estas pueden ser producidas por el mismo organismo o tomadas del medio (Morris, 1980). De casi 400 clones de microalgas estudiadas, se sabe que el 44% requieren B_{12} , 21% Tiamina y 4% Biotina, en una concentración entre 1 y 100 ng/l (Provasoli y Carlucci, 1974).

El medio de cultivo seleccionado es una combinación de los medios de Guillard (1973) y Matthiessen y Toner (1966), (Anexo III) y la microalga seleccionada es Tetraselmis suecica, debido a que requiere un mínimo de mantenimiento en su cultivo, y es considerada como una especie de alto valor alimenticio, para la alimentación de larvas, semillas y adultos de crustáceos y moluscos (Davis y Guillard, 1958; Imai, 1967; Griffith et al, 1973).

En la bibliografía revisada no se encontraron los requerimientos vitamínicos de Tetraselmis suecica, pero se ha estudiado la concentración de B_{12} para Cyclotella nana por Carlucci y Silbernagel (1967), --

quienes determinaron que la fijación de carbono radioactivo por células con carencia de B_{12} (starvation) del alga probada en condiciones controladas, es proporcional a las concentraciones de vitamina en la muestra, y si el período de incubación es continuado por varios días, el número de células en el medio es proporcional a la concentración de vitamina B_{12} . Encontraron un rango de 0.05 a 3 ng de B_{12} por litro y un valor medio de 0.2 ng de B_{12} por litro para Cyclotella nana.

Bladbeer (1971), determinó que Tetraselmis suecica tiene una capacidad muy rápida para la fijación de B_{12} , de 10^3 a 10^4 veces, su requerimiento mínimo y que puede ser conservado hasta por seis generaciones.

Un estudio realizado por Aguirre-Muñoz (1981) en el que se cultivó Tetraselmis suecica por un período de veinte días sin agregar vitaminas al medio f/2 de Guillard (1973), esterilizando por calor y utilizando microalgas sin tratamiento previo para reducir su concentración interna de vitaminas, no reportó diferencias significativas con los resultados obtenidos para el mismo medio agregando vitaminas.

Tetraselmis suecica, pertenece al Phylum Prasinophyta, es un alga elipsoidal, con el extremo posterior agudo y el extremo anterior de cuatro lóbulos y es conocida también como Platymonas sp. Tiene de 7 a 9 micras de diametro y de 10 a 16 micras de largo y un color verde brillante con cuatro flagelos móviles. Es una especie eurihalina, con capacidad de formar esporas cuyos limites de tolerancia a variables físicas es muy amplio. Posee una pared celular delgada formada principalmente de carbohidratos (Padilla, 1975), a lo que Epifanio (1979) atribuye su lenta digestibilidad al compararla con Isochrysis galbana. Esta microalga

crece bien a una intensidad de luz de 1000 a 2000 lux, una temperatura de 18 a 22 °C, a pH de 7.5 a 8 y salinidad de 25 a 30 partes ‰ . Por estas razones, es una especie de considerable potencial de cultivo a gran escala.

OBJETIVO.

Observar el efecto de la variación de la concentración de vitamina B₁₂, en el medio de cultivo sobre el crecimiento de Tetraselmis suecica para conocer si es un factor limitante en su desarrollo y poder reducir su concentración o eliminarla del medio de cultivo, reduciendo de esta manera los costos en su producción.

MATERIALES Y METODOS.

Este trabajo fue realizado en las instalaciones del Instituto de - Investigaciones Oceanológicas (I.I.O.) de la U.A.B.C., Ensenada, B.Cfa., México. El agua de mar utilizada (filtrada y pasada por U. V.) así como la cepa de Tetraselmis suecica, se obtuvieron del laboratorio de microalgas de este mismo Instituto.

MEDIOS DE CULTIVO.

De los medios de cultivo de Guillard, (1973) y Matthiessen y Toner (1966), se eligieron las menores concentraciones de nutrientes (Anexo - II), diseñándose así un medio modificado que fue utilizado como control y medio básico durante todo el experimento (Anexo III). Los elementos que intervienen en la elaboración de un medio de cultivo (Anexo I) se clasifican en dos tipos: solución stock primaria y solución stock secundaria. La solución stock primaria es concentrada, y la secundaria es una dilución a partir de la primaria.

El medio modificado, utilizado en el experimento fue el siguiente:

NUTRIENTES (Solución stock primaria):

Nitrato de sodio - - - - -	75 g/l
Fosfato monosódico - - - - -	5 g/l
EDTA férrico - - - - -	10 g/l
Tris (buffer) - - - - -	200 g/l (ajustar pH a 7.5 , - aprox. 130 ml de HCl al 30%).

METALES TRAZA:

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

Preparación del secuestrante (solución stock secundaria):

El secuestrante se prepara con 10 g de EDTA férrico, y un mililitro de cada una de las soluciones primarias de los metales traza y se afora a un litro.

VITAMINAS (soluciones stock primarias):

Biotina - - - - -	10 mg/100 ml
Cianocobalamina (vitamina B ₁₂) - - -	10 mg/100 ml
Tiamina - - - - -	2 g/100 ml

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

PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO:

Con las soluciones stock se procedió a preparar el medio de cultivo:

En un matraz aforado de un litro, se pusieron 500 ml de agua de mar y se agregó un ml de las siguientes soluciones stock: nitratos, - -

fosfatos, secuestrante y tris, finalmente se aforó a un litro con agua de mar filtrada y radiada con U. V. En diez matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad, se colocaron 75 ml de medio de cultivo, en cada uno de ellos. Los matraces conteniendo el medio de cultivo se colocaron en la autoclave para su esterilización (15 min. a 15 libras/pulg²). Concluido el procedimiento de esterilización, se dejó enfriar el medio de cultivo durante 24 horas, para posteriormente agregar las vitaminas e inocular. Para evitar la contaminación de los medios de cultivo, se realizó lo anterior en presencia de dos mecheros tipo Bunsen.

El procedimiento para agregar las vitaminas e inocular fue el siguiente: utilizando pipetas graduadas de un ml y con escala de 0.01 ml se agregó un ml de Tiamina y un ml de Biotina en cada uno de los diez matraces (original y réplica). En el caso de la vitamina B₁₂ se preparó un testigo agregando un ml de la solución stock secundaria de dicha vitamina al medio de cultivo, correspondiendo la concentración del testigo a 1.0 µg/l, lo cual representa el 100% de su concentración original de acuerdo al medio de Matthiessen y Toner (1966). Posteriormente se prepararon las muestras problema agregando al medio de cultivo 0.75 ml, 0.50 ml, 0.25 ml y 0.0 ml correspondiendo a las concentraciones de 0.75, 0.50 0.25 y 0.0 µg/l respectivamente. Se utilizó una pipeta esterilizada para cada vitamina, y las soluciones stock secundarias de vitaminas no tuvieron ajuste de pH, ni esterilización por ser utilizadas inmediatamente después de su preparación.

Todos los matraces (original y réplica), fueron inoculados con un ml de cultivo monoaxénico de Tetraselmis suecica en estado de crecimiento exponencial. La densidad inicial promedio de todos los matraces fue

de 69.60×10^3 células por ml. Los matraces fueron colocados para su incubación en el cuarto de cultivo, bajo condiciones de iluminación constante, proporcionada por tubos fluorescentes de luz blanca fría. La temperatura del laboratorio se mantuvo en un rango de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, lo cual se logró mediante una unidad de aire acondicionado.

REGISTRO DEL CRECIMIENTO DE MICROALGAS.

Después de inocular los recipientes de cultivo se procedió a realizar el registro de la densidad poblacional, para identificar las diferentes fases que presenta un cultivo en el proceso de crecimiento. Se muestreó en períodos de 24 horas a partir de las 12:30 horas del día 19 de agosto de 1987, tomando de cada uno de los diez matraces (original y réplica) un ml de cultivo, previa homogenización del mismo, utilizando para tal fin pipetas esterilizadas de un ml y realizando la operación cerca de la flama de un mechero tipo Bunsen, para evitar que se contaminaran los cultivos.

El conteo de las células se llevó a cabo con un hematocitómetro tipo Neubauer de 0.1 mm de profundidad. Las muestras se fijaron con dos gotas de lugol para fitoplancton marino, versión ácida a fin de inmovilizarlas y lograr un mejor conteo. Con la finalidad de reducir el error (humano) en el conteo, se contó el número de células para seis cámaras del original y su respectiva réplica, determinando posteriormente su promedio. Los cálculos de densidad y parámetros poblacionales, (divisiones por día (K), tasa de crecimiento específico (MU), producción diaria (PD) y tiempo medio de generación (TG)) se realizaron de acuerdo a Paniagua-Michel et al (1986) (Anexo V y VI).

ANALISIS ESTADISTICO

A los resultados obtenidos para el octavo día, que corresponde al término de la fase exponencial, se les aplicó análisis de varianza no paramétrico Kruskall-Wallis (Sokal y Rohlf, 1979), utilizando los valores de las lecturas promedio entre original y réplica.

RESULTADOS.

La tabla I (testigo) corresponde a la concentración de $1.0 \mu\text{g/l}$ de B_{12} , y muestra que la mayor densidad se obtuvo el noveno día, comenzando la fase estacionaria el décimo día, el valor máximo para K se presentó el tercer día coincidiendo con el valor máximo de MU, la PD máxima fue el quinto día y el valor mínimo de TG también se presentó el tercer día.

La tabla II, corresponde a la concentración de $0.75 \mu\text{g/l}$ de B_{12} , - muestra que la mayor densidad se obtuvo el noveno día, comenzando la fase estacionaria al décimo día, el valor máximo de K se presentó el tercer día coincidiendo con el valor máximo de MU, la PD máxima fue el - quinto día y el valor mínimo de TG también se presentó el tercer día.

La tabla III, corresponde a la concentración de $0.50 \mu\text{g/l}$ de B_{12} , muestra que la mayor densidad se obtuvo el noveno día comenzando la fase estacionaria el décimo día, el valor máximo de K se presentó el segundo día coincidiendo con el valor máximo de MU, la PD máxima fue el - septimo día y el valor mínimo de TG también se presentó el segundo día.

La tabla IV, corresponde a la concentración de $0.25 \mu\text{g/l}$ de B_{12} , - muestra que la mayor densidad se obtuvo el noveno día, comenzando la fase estacionaria el décimo día, el valor máximo de K se presentó el segundo día coincidiendo con el valor máximo de MU, la PD máxima fue el - noveno día y el valor mínimo de TG también se presentó el segundo día.

TABLA I.- Valores poblacionales de T. suecica a nivel Erlenmeyer en el medio de cultivo con 1.0 $\mu\text{g/l}$ de B_{12} (testigo). Tomando los valores promedio entre original y réplica.

DIA	DEN x 1000 (cel/ml)	K (div/día)	MU (cel/ml/día)	PD x 1000 (cel/día)	TG (día)
0	69.600				
1	93.200	0.4216	0.1269	23.6000	0.7140
2	203.200	1.1245	0.3385	110.0000	0.2677
3	269.800	1.7209	0.5130	466.5999	0.1749
4	1239.400	0.8879	0.2673	569.5997	0.3391
5	2385.800	0.9449	0.2844	1146.4001	0.3186
6	3175.199	0.4124	0.1241	789.3994	0.7300
7	3585.000	0.1751	0.0527	409.8008	1.7189
8	3888.000	0.1171	0.0352	302.9995	2.5716
9	4854.800	0.3204	0.0964	966.8003	0.9396
10	4724.399	-0.0393	-0.0118	-130.4004	-7.6634

TABLA II.- Valores poblacionales de T. suecica a nivel Erlenmeyer en el medio de cultivo con 0.75 $\mu\text{g/l}$ de B_{12} . Tomando los valores promedio entre original y réplica.

DIA	DEN x 1000 (cel/ml)	K (div/día)	MU (cel/ml/día)	PD x 1000 (cel/día)	TG (día)
0	69.600				
1	75.000	0.1076	0.0324	5.4000	2.7977
2	141.800	0.9189	0.2766	66.8000	0.3276
3	713.400	2.3309	0.7017	571.5999	0.1291
4	1307.600	0.8742	0.2631	594.1997	0.3444
5	2323.400	0.8293	0.2496	1015.8003	0.3630
6	2905.000	0.3223	0.0970	581.6001	0.9340
7	3350.000	0.2056	0.0619	445.0000	1.4640
8	3961.600	0.2419	0.0728	611.5996	1.2443
9	4375.000	0.1432	0.0431	413.4004	2.1021
10	4036.600	-0.1161	-0.0350	-338.4004	-2.5918

TABLA III.- Valores poblacionales de T. suecica a nivel Erlenmeyer en el medio de cultivo con 0.50 $\mu\text{g/l}$ de B_{12} . Tomando los valores promedio entre original y réplica.

DIA	DEN x 1000 (cel/ml)	K (div/día)	MU (cel/ml/día)	PD x 1000 (cel/día)	TG (día)
0	69.600				
1	86.400	0.3119	0.0939	16.8000	0.9651
2	275.000	1.6704	0.5028	188.6000	0.1802
3	646.600	1.2335	0.3713	371.5999	0.2441
4	1288.800	0.9951	0.2995	642.1997	0.3025
5	2216.600	0.7823	0.2355	927.8000	0.3848
6	2334.600	0.0748	0.0225	118.0000	4.0229
7	4132.799	0.8240	0.2480	1798.1992	0.3653
8	3631.200	-0.1867	-0.0562	-501.5991	-1.6126
9	4866.600	0.4225	0.1272	1235.3999	0.7125
10	4820.399	-0.0138	-0.0041	-46.2002	-21.8744

TABLA IV.- Valores poblacionales de T. suecica a nivel Erlenmeyer en el medio de cultivo con 0.25 $\mu\text{g/l}$ de B_{12} . Tomando los valores promedio entre original y réplica.

DIA	DEN x 1000 (cel/ml)	K (div/día)	MU (cel/ml/día)	PD x 1000 (cel/día)	TG (día)
0	69.600				
1	70.000	0.0080	0.0024	0.4000	37.6228
2	252.400	1.8560	0.5587	183.4000	0.1622
3	713.400	1.4933	0.4495	459.9999	0.2016
4	1141.400	0.6780	0.2041	428.0000	0.4440
5	2108.400	0.8854	0.2665	967.0000	0.3400
6	2871.000	0.4454	0.1341	762.5996	0.6758
7	3530.000	0.2981	0.0897	659.0005	1.0098
8	3926.600	0.1536	0.0462	396.5996	1.9596
9	5605.000	0.5134	0.1546	1678.4004	0.5863
10	5518.999	-0.0223	-0.0067	-86.0010	-13.4941

La tabla V, corresponde a la concentración de $0.0 \mu\text{g}/\text{l}$ de B_{12} , muestra que la mayor densidad se obtuvo el décimo día y el valor máximo de K se presentó el tercer día coincidiendo con el valor máximo de MU, la PD máxima fue el noveno día, y el valor mínimo de TG también se presentó el tercer día.

Se presentan cinco gráficas de la densidad poblacional de T.suecica para cada día de cultivo, correspondiendo a la figura 1 (testigo), a la concentración de $1.0 \mu\text{g}/\text{l}$ de B_{12} . Las figuras 2, 3, 4 y 5 corresponden a las concentraciones de 0.75, 0.50, 0.25 y $0.0 \mu\text{g}/\text{l}$ de B_{12} respectivamente. En las cinco gráficas se puede observar una gran similitud en la forma y los valores, de tal manera que si se sobreponen, tienden a formar una sola curva.

Los resultados de las pruebas de Ji cuadrado y Kolgomorov-Smirnov, indican que los datos no presentaron distribución normal, motivo por el cual se empleo el análisis de varianza no paramétrico de Kruskall-Wallis, aplicado a los valores promedios de original y réplica, de las lecturas obtenidas en el hematocitómetro al octavo día y aplicando un nivel de significancia del 5%, no presentaron diferencias significativas en la densidad poblacional, entre el medio de control, y las diferentes concentraciones de vitamina B_{12} utilizadas.

TABLA V.- Valores poblacionales de T. suecica a nivel Erlenmeyer en el medio de cultivo con 0.0 $\mu\text{g/l}$ de B_{12} . Tomando los valores promedio entre original y réplica.

DIA	DEN x 1000 (cel/ml)	K (div/día)	MU (cel/ml/día)	PD x 1000 (cel/día)	TG (día)
0	69.600				
1	76.600	0.1381	0.0416	7.0000	2.1798
2	211.600	1.4660	0.4413	135.0000	0.2053
3	708.400	1.7433	0.5248	496.7999	0.1727
4	1095.000	0.6283	0.1891	386.6001	0.4791
5	1993.400	0.8643	0.2602	898.3999	0.3483
6	2726.600	0.4519	0.1360	733.1997	0.6662
7	3356.600	0.2999	0.0903	630.0000	1.0038
8	3515.000	0.0665	0.0200	158.4004	4.5250
9	5281.599	0.5875	0.1768	1766.5986	0.5124
10	5788.399	0.1322	0.0398	506.8008	2.2772

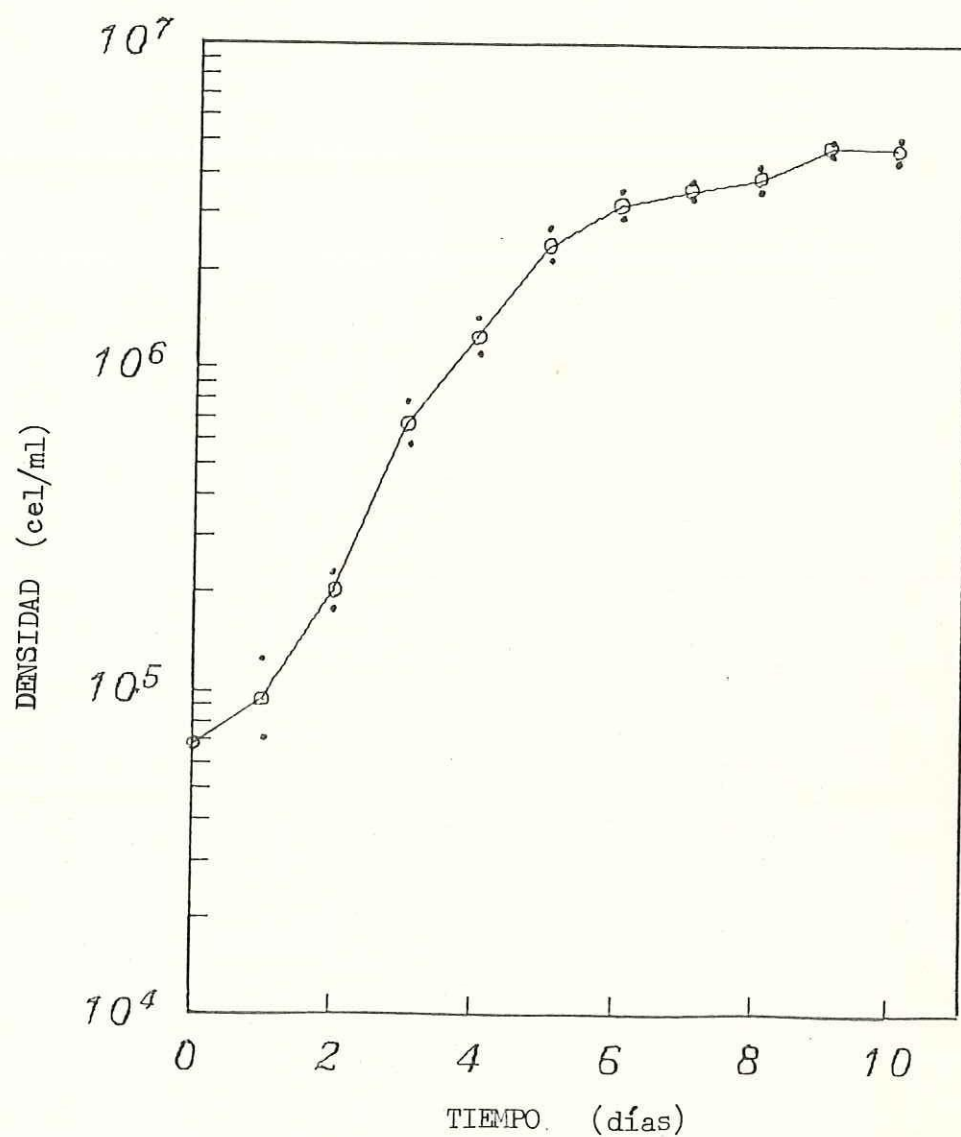


FIGURA 1.- Densidad poblacional de *T. suecica* en el medio de cultivo con $1.0 \mu\text{g/l}$ de B_{12} (testigo). Tomando los valores promedio entre original y réplica. Los puntos fuera de la curva representan los valores del original y la réplica.

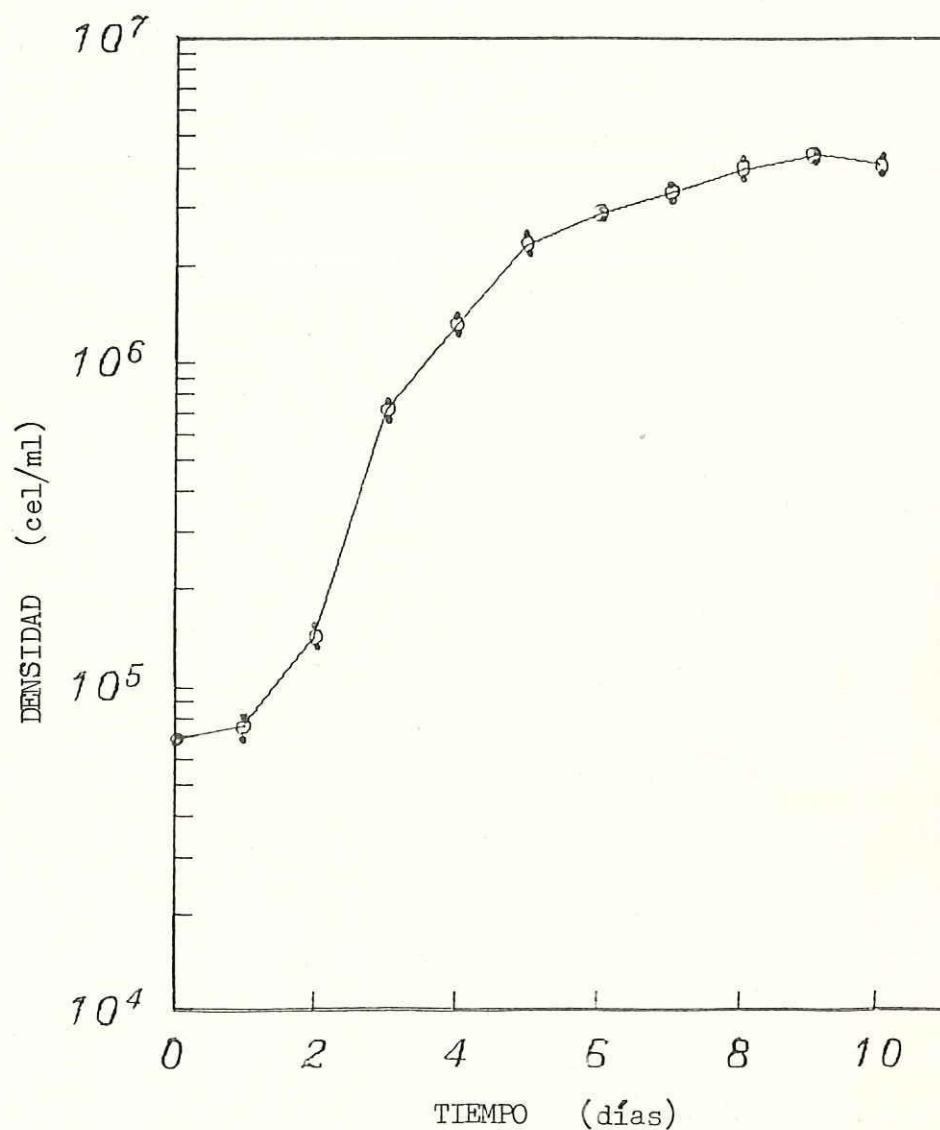


FIGURA 2.- Densidad poblacional de *T. suecica* en el medio de cultivo con $0.75 \mu\text{g/l}$ de B_{12} . Tomando los valores promedio entre original y réplica. Los puntos fuera de la curva representan los valores del original y la réplica.

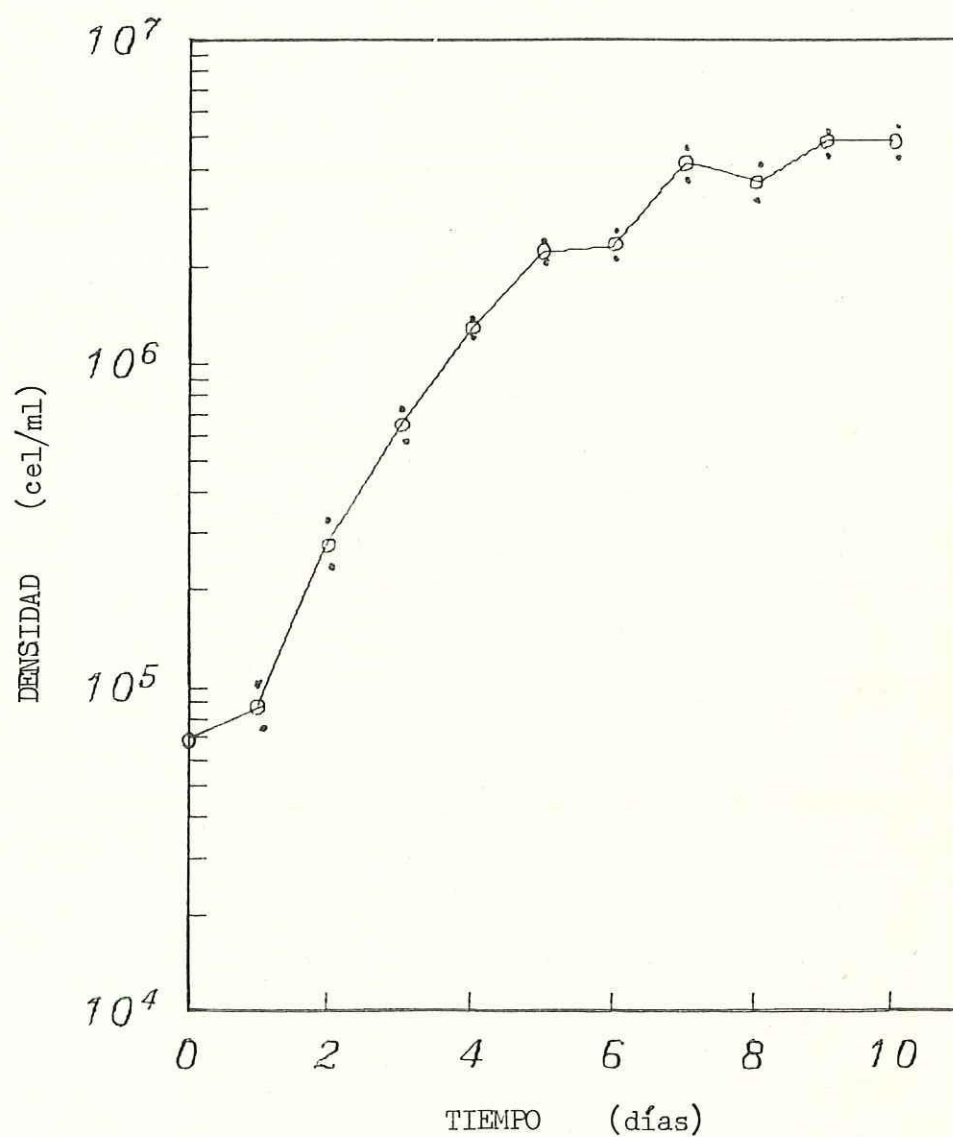


FIGURA 3.- Densidad poblacional de *T. suecica* en el medio de cultivo con 0.50 μ g/l de B₁₂. Tomando los valores promedio entre original y réplica. Los puntos fuera de la curva representan los valores del original y la réplica.

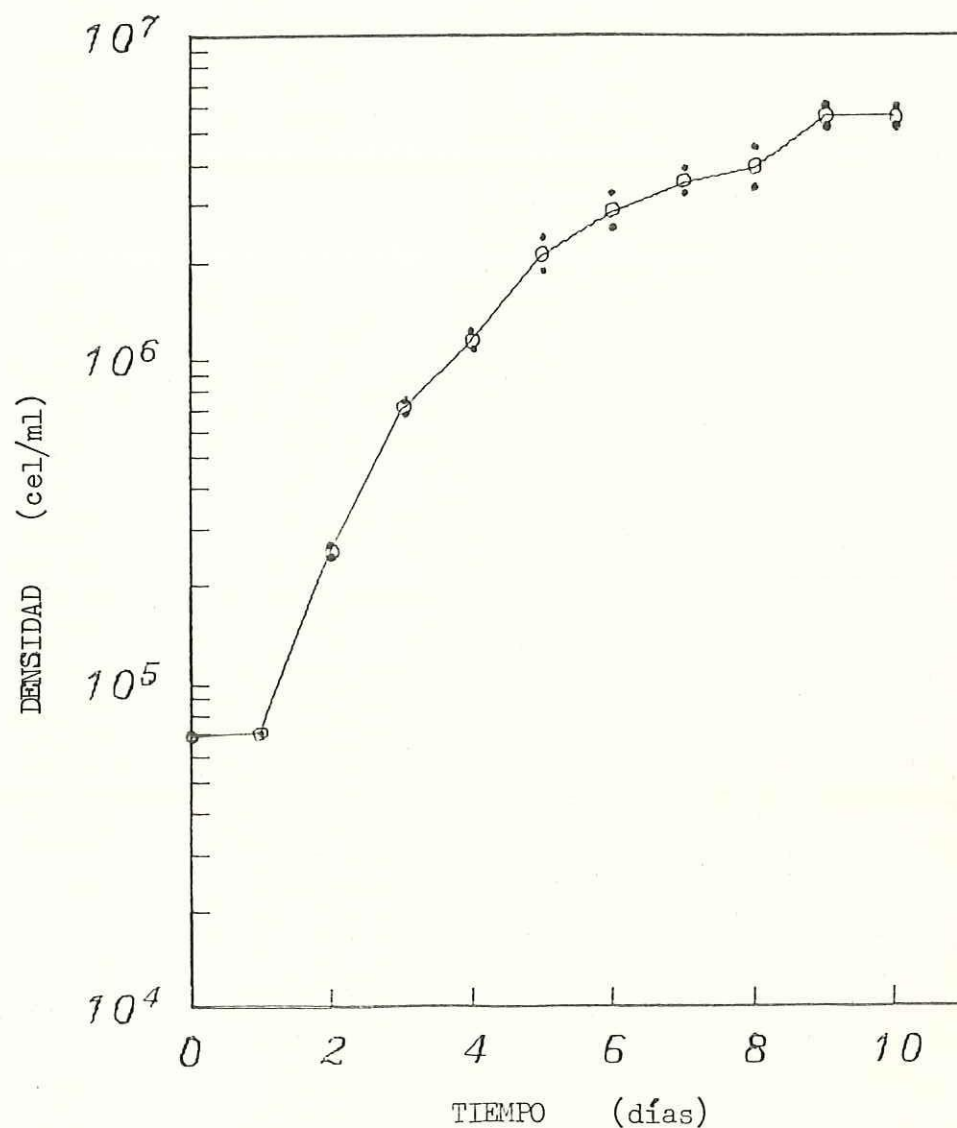


FIGURA 4.- Densidad poblacional de T. suecica en el medio de cultivo con $0.25 \mu\text{g/l}$ de B_{12} . Tomando los valores promedio entre original y réplica. Los puntos fuera de la curva representan los valores del original y la réplica.

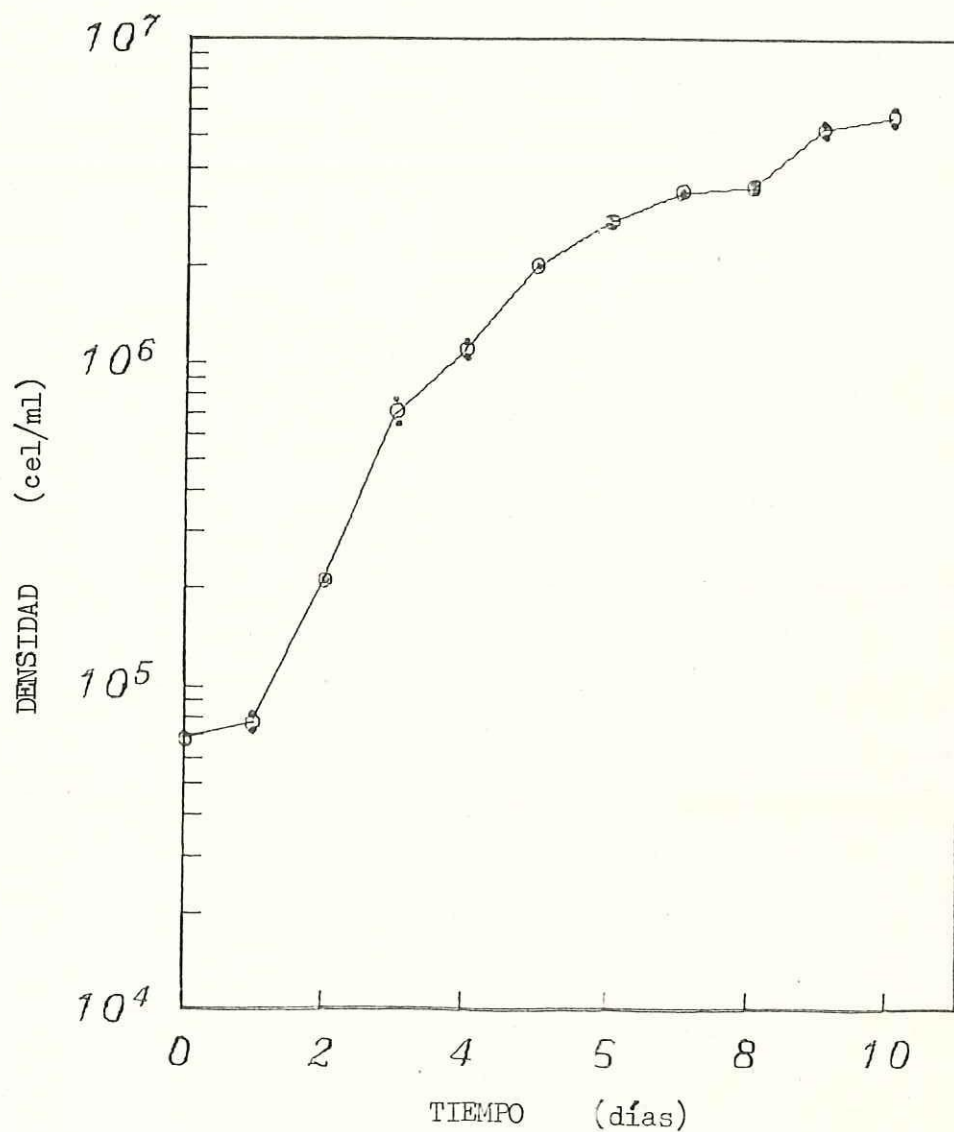


FIGURA 5.- Densidad poblacional de T. suecica en el medio de cultivo con 0.0 μ g/l de B₁₂. Tomando los valores promedio entre original y réplica. Los puntos fuera de la curva representan los valores del original y la réplica.

DISCUSION.

Se observa que el número máximo de divisiones por día (K), se obtuvo entre el segundo y el tercer día y que existe una relación directamente proporcional entre este y la tasa de crecimiento específico (MU). Una vez adaptadas las células al medio y teniendo una gran cantidad de nutrientes disponibles, la velocidad de multiplicación se identifica como una forma geométrica. La fase exponencial es la más importante porque indica que el cultivo debe cosecharse, transferirse o diluirse debido al incremento en densidad, puede presentarse del segundo al tercer día después de inoculado el medio y prolongarse hasta cuatro días. Si se controla la dilución del cultivo, esta fase puede prolongarse por semanas (Morris, 1980). La relación entre los parámetros anteriores (K y MU) y el tiempo medio de generación (TG) son inversamente proporcionales debido a que cuando el cultivo presenta un número máximo de divisiones por día, su crecimiento específico también es máximo, pero el tiempo que tardan en generarse las células es mínimo. Cuando el cultivo entra en la fase estacionaria, los valores de K y MU disminuyen debido a la reducción de los nutrientes, pero el valor de TG se incrementa, en esta fase el número de células permanece aproximadamente estacionario, en ocasiones esta fase apenas se detecta, presentandose en su lugar la fase de muerte en la cual los valores de K y MU decrecen rapidamente al incrementarse el número de células muertas y las condiciones desfavorables así como el aumento de bacterias, hongos y espuma, producto de la destrucción celular que generan el colapso total del cultivo, presentandose un rápido incremento para los valores de TG (Paniagua-Michel et al. 1986). Los valores de los parámetros poblacionales son de mucha impor-

tancia para conocer y comprender el comportamiento de un cultivo de microalgas y compararlo con las fases presentadas por un cultivo ideal — (Fogg, 1975). La duración de cada fase puede acortarse, alargarse o apenas reconocerse, dependiendo de diversos factores como: temperatura, — fuente de luz, constitución del medio de cultivo, tamaño del inóculo y estado fisiológico del alga.

La producción diaria máxima se presentó entre el quinto y el noveno día después de inocular el medio, debido a que se encuentra el cultivo en la última parte de la fase exponencial e inicio de la fase estacionaria, presentando densidades muy altas que no representan un elevado porcentaje en la producción diaria, pero si un número de células — grande que no guarda ninguna relación con los demás parámetros poblacionales.

La observación de los resultados de crecimiento poblacional obtenidos para las cinco diferentes concentraciones de B₁₂ en el cultivo de T. suecica, muestran valores muy bajos durante el primer día de cultivo (fase de inducción) incrementándose rápidamente para obtener un valor máximo en el noveno día (fase exponencial y estacionaria) y disminuir — a partir de este momento (fase de muerte) mostrando las cuatro fases principales del crecimiento de algas descrito por Fogg (1975). Entre el cultivo control y las diferentes concentraciones de vitamina B₁₂ estudiadas, no se observaron diferencias significativas al nivel de 95%; atribuyéndose a que la especie posiblemente no requiera esta vitamina — como un elemento limitante al crecimiento o porque la concentración interna de esta es lo suficientemente grande que permite a la microalga —

seguir creciendo, aún cuando la concentración externa de vitamina llegue a un punto crítico, debido a que puede tener una concentración interna - de 10^4 veces su requerimiento (Bladbeer, 1971) la cual puede guardar hasta por seis generaciones. Un estudio realizado por Aguirre-Muñoz (1981) en el que cultivó T.suecica por un período de veinte días sin agregar vitaminas al medio f/2 de Guillard (1973), esterilizado por calor y utilizando microalgas sin reducir su concentración interna de vitaminas, no reportó diferencias significativas con los resultados obtenidos para el mismo medio agregando vitaminas, encontrándose que se puede cultivar dicha especie sin agregar vitaminas al medio, lo cual coincide con los resultados obtenidos en el presente estudio; considerando que las concentraciones de B_{12} en el agua de mar son elevadas comparadas con los requerimientos de esta vitamina (Carlucci y Silbernagel, 1967). En base a datos obtenidos en el laboratorio de acuicultura del Instituto de -- Investigaciones Oceanológicas de la U.A.B.C., sobre el gasto de B_{12} en 1987 para el cultivo de microalgas utilizando el medio f/2 de Guillard (1973). Actualmente se preparan entre quinientos mil y setecientos mil litros de medio al año, con un gasto total de 0.5 g de B_{12} , si el costo de B_{12} según el catálogo SIGMA 87, es de 26.20 dólares por gramo, esto representa un costo anual de 13.10 dólares, lo que no constituye un -- fuerte gasto en el costo total de los cultivos, debido a que se desconocen los cambios de Pool genético que puedan presentar las microalgas a largo plazo no es recomendable quitar la vitamina B_{12} , pues podría tener consecuencias negativas, pero es posible que reduciendo la concentración de estos nutrientes mas costosos y que se utilizan en mayor cantidad, sí represente un considerable ahorro económico.

CONCLUSION.

Las densidades poblacionales obtenidas para T.suecica no presentaron variaciones significativas al octavo día, utilizando los valores — promedio entre original y réplica a un nivel de significancia del 5% en tre el testigo ($1.0 \mu\text{g}/\text{l}$ de B_{12}) y las concentraciones a estudiar — — (0.75 , 0.50 , 0.25 y $0.0 \mu\text{g}/\text{l}$ de B_{12}), el reducir la concentración de vi tamina B_{12} en el medio hasta el nivel de $0.0 \mu\text{g}/\text{l}$ no representa un re— ducción significativa en los costos de producción.

RECOMENDACIONES.

De una manera auxiliar, si se intenta conocer si T. suecica es realmente una microalga autotrofa, se sugiere determinar la concentración de B₁₂ en agua de mar esterilizada por calor y someter a dicha especie a un ayuno de B₁₂ (21 días) hasta consumir sus reservas internas, y cultivarla durante diez días en medios cuya concentración total de B₁₂ fluctúe entre 0.05 y 10 ng/l, determinando su densidad poblacional cada 24 horas.

LITERATURA CITADA.

- Aguirre Muñoz Alfonso, (1981). Estudios con un cultivo semicontinuo de Tetraselmis suecica KYLIN (1935): nutrientes, vitaminas, desinfección del medio con UV y producción del sistema a largo plazo. Tesis de Licenciatura, Escuela Superior de Ciencias Marinas de la U.A.B.C. Ensenada, B.Cfa., México. pp. 66.
- Bradbeer C., (1971). Transport of vitamin B₁₂ in Ochromonas malhamensis. Arch. Biochem. Biophys., 144: 184-92.
- Carlucci A.F. and Silbernagel S.B., (1967). Bioassay of seawater. IV. The determination of dissolved biotin in seawater using ¹⁴C uptake by cells of Amphidinium carteri. Can. J. Microbiol., 13:979-86.
- Davis, H.C. and Guillard, R.R., (1958). Relative value of ten genera of microorganisms as foods for oysters and clam larvae. U.S. Fish Wildl. Serv., Fish. Bull., 136 (58):293-304.
- Droop, M.R., (1975). The chemostat in mariculture. In: 10th European Sump. Mar. Biol., Ostend, Belgium, 1:17-23.
- Epifanio, C.E., (1979). Growth in bivalve molluscs: nutritional effects of two or more species of algae in diets fed to the american oyster Crassostrea virginica (GMELIN) and the hard clam Mercenaria mercenaria (L.). Aquaculture, 18:1-12.
- Fogg, Q.E., (1975). Algal cultures and phytoplankton ecology. 2nd. edition. The University of Wisconsin Press., 175 pp.
- Griffith, G.W., M.A. Kenslow and L.A. Ross, (1973). A mass culture method for Tetraselmis sp. a promising food for larval crustaceans. In: Proc. 4th. Ann. Workshop Wld. Mar. Soc., Monterey, México. J. Avault (ed.) pp. 209-294.

- Guillard, R.R.L., (1973). Division rates. In: J.R. Stein (ed), Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements. London. Cambridge Univ. Press. pp. 289-311.
- Guillard, R.R.L and Ryther, J.H., (1962). Studies on marine planktonic diatoms. I. Cyclotella nana Husted and Detonula confervaceae - - (Clave). Can. J. Microbiol. 8:229-239.
- Imai, T., (1967). Mass production of molluscs by means of rearing the larvae in tanks. Venus. 25:159-167.
- Matthiessen, G.C. and Toner, R.C., (1966). Possible methods of improving the shellfish industry of Martha's Vineyard, Duke's County, Massachusetts. Marine Research Foundation, Edgartown, Mass., 138 pp.
- Morris, I., (1980). The Physiological Ecology of Phytoplankton. University of California Press, Berkeley and Los Angeles. 9:329-368.
- Padilla, M.G., (1975). Crecimiento poblacional de Tetraselmis suecica - (Chlorophyceae) en ambiente controlado. Rev. Biol. Mar., Valparaíso, 15 (3):287-296.
- Paniagua Michel, J., Buckle Ramírez, F., Granados Machuca, C. y Loya Salinas, D., (1986). Manual de Metodologías y Alternativas para el Cultivo de Microalgas. Informe especial OC-86-01. C.I.C.E.S.E. — Ensenada, B. Cfa., México. 94 pp.
- Provasoli, L. and Carlucci, A.F., (1974). Vitamins and growth regulators. In: Stewart W. D. P. (ed), Algal Physiology and Biochemistry, pp. 741-87. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Shiraishi, K. and Provasoli, L., (1959). Growth Factors as supplements to inadequate algae foods for Tigriopus japonicus. Tohoku J. Agr. - Res. 10 (1):89-96.

Sokal, R.R. and F.J. Rohlf, (1979). Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica. H. Blume Ediciones. Primera edición española 1979. 832 pp.

A N E X O

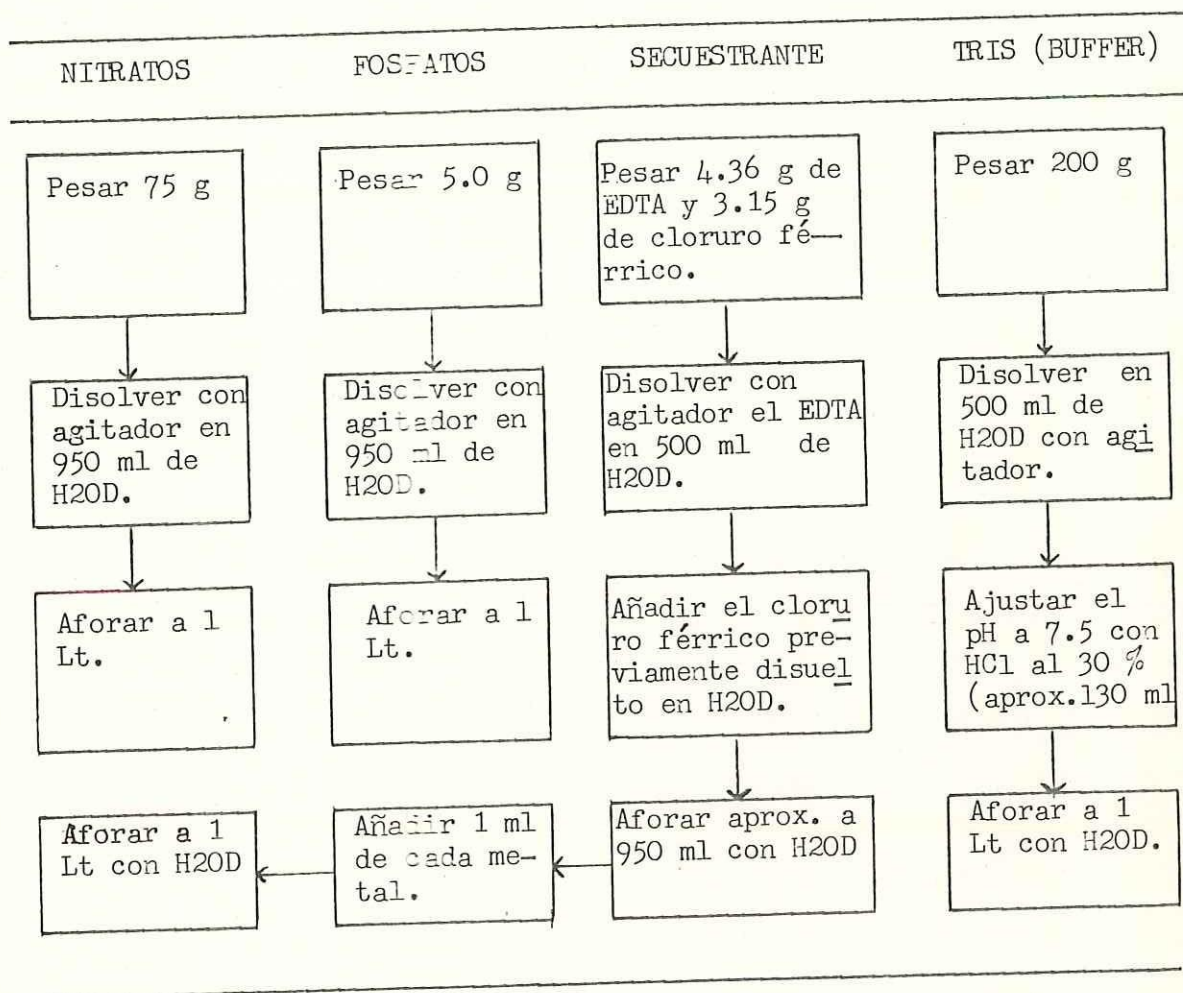
	Página
I.- Medios de cultivo mas usados.	30
II.- Rutina seguida en la preparación de los macronutrientes para los medios de cultivo.	31
III.- Diseño del medio modificado f/2 de Guillard, 1973 y Matthiessen y Torner, 1966, utilizado como medio básico.	32
IV.- Rutina a seguir en la preparación de la solución — stock primaria de vitaminas para los medios de cultivo.	33
V.- Curva de crecimiento ideal de microalgas en medios de volumen limitado (Tomado de Fogg, 1975).	34
VI.- Cálculos de densidad y parámetros poblacionales realizados de acuerdo a Paniagua-Michel et al. (1986).	35

ANEXO I.— Medios de cultivo mas usados. (Cantidades para un litro de —
agua de mar filtrada).

	GUILLARD	MATTHIESSEN Y TORNER
Nutrientes mayores	75 mg	150.0 mg
NaNO ₃	5 mg	10.0 mg
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	15-30 mg	30.0 mg
Metales traza		
Na ₂ . EDTA	4.36 mg	Fe. EDTA 10.0 mg
FeCl ₃ . 6H ₂ O	3.15 mg	- - -
Cu SO ₄ . 5H ₂ O	0.01 mg	1.96 mg
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.022 mg	4.4 mg
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.01 mg	2.0 mg
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0.18 mg	36.9 mg
Na ₂ MoO ₄ . 4H ₂ O	0.006 mg	1.26 mg
Vitaminas		
B1	0.10 mg	200 μ g
Biotina	0.50 μ g	1.0 μ g
B12	0.50 μ g	1.0 μ g

ANEXO II.- Rutina seguida en la preparación de los macronutrientes para los medios de cultivo.

Preparación de Nutrientes.



ANEXO III.- Diseño del medio modificado f/2 de Guillard, (1973) y Matthiessen y Toner, (1966) utilizado como medio básico.
(Cantidades para un litro de agua de mar filtrada).

INGREDIENTES:	CANTIDADES:
---------------	-------------

Nutrientes mayores:

NaNO_3	75 mg
$\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{a}$	5 mg

Metales traza

Fe, EDTA	10.0 mg
$\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.96 mg
$\text{Zn SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.4 mg
$\text{Co Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.0 mg
$\text{Mn Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	36.9 mg
$\text{Na}_2\text{M}_2\text{O}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.26 mg

Vitaminas

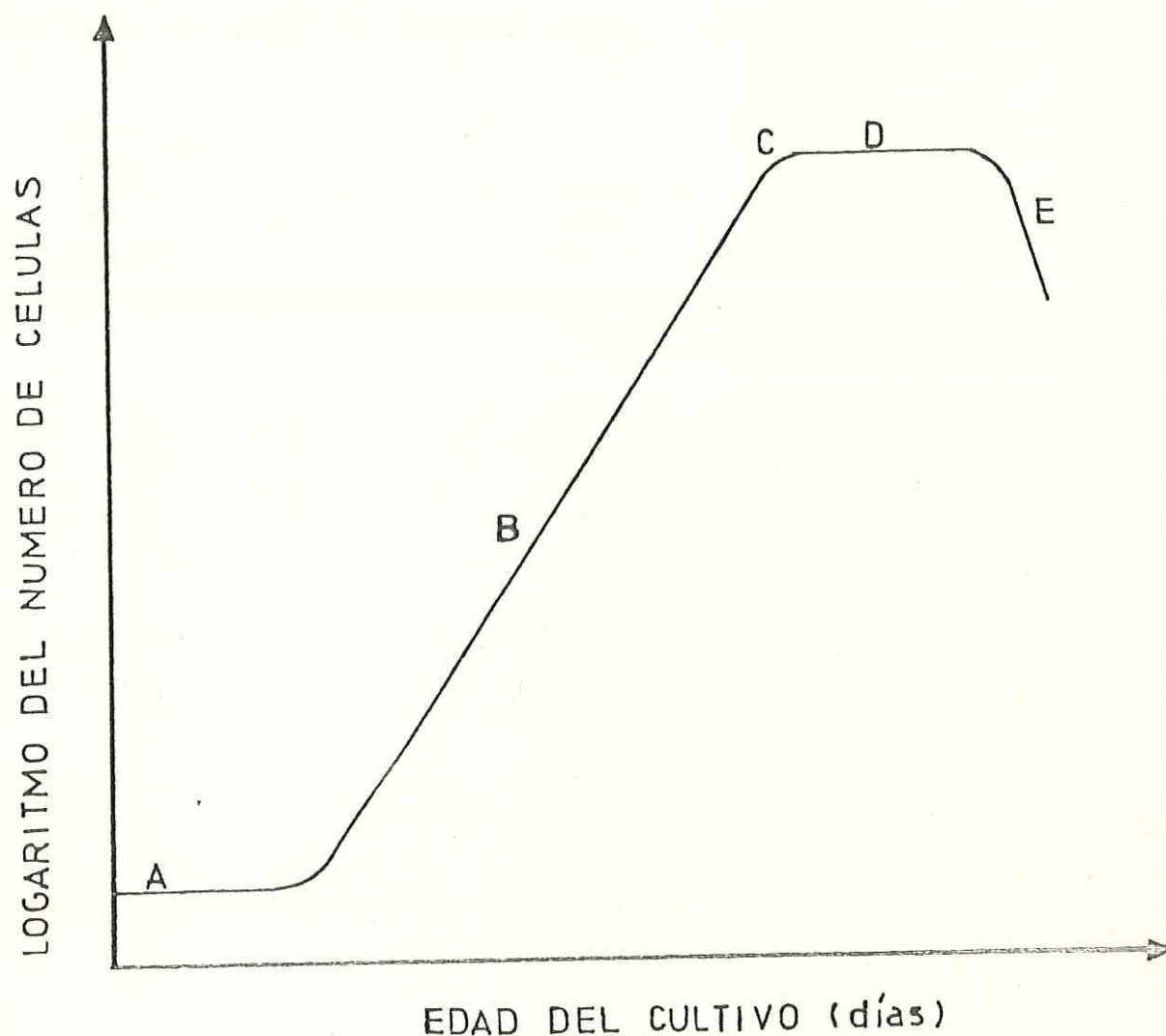
B ₁	200 μg
Biotina	1.0 μg
B ₁₂	1.0 μg

ANEXO IV.- Rutina a seguir en la preparación de la solución stock primaria de vitaminas para los medios de cultivo.

Concentrado (solución stock primaria).

B ₁₂	BIOTINA	TIAMINA
Pesar 10 mg con balanza analítica. ↓ Disolver en 50 ml de H₂O. ↓ Aforar a 100 ml.	Pesar 10 mg con balanza analítica. ↓ Disolver en 50 ml de H₂O. ↓ Aforar a 100 ml.	Pesar 2 g con balanza analítica. ↓ Disolver en 50 ml de H₂O. ↓ Aforar a 100 ml.

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



ANEXO V.- Curva de crecimiento ideal de microalgas en medios de volumen limitado. A. fase de inducción; B. fase de crecimiento exponencial; C. fase de declinamiento relativo del crecimiento; D. fase estacionaria y E. fase de muerte (Tomado de Fogg, 1975).

ANEXO VI.

CALCULOS DE DENSIDAD.

Con un Hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad, la densidad de microalgas se calcula de acuerdo a la siguiente relación:

$$D = (F + F.D. + M) \times C \times 10 \times 1000 \text{ cels/ml} \quad (1)$$

Donde:

D= densidad del cultivo.

F= fijador (mls)

F.D.= factor de dilución (mls)

$$F.D. = \frac{V_f}{v_i}$$

V_f= Volumen final de la muestra diluida (mls)

v_i= volumen inicial de la muestra (mls)

M= Milímetros de muestra utilizados

C= Número de células promedio contadas

10= factor de multiplicación debido a la profundidad del Hematocitómetro

1000= valor para convertir a milímetros

Con el fijador Utermohl o Lugol no es necesario hacer correcciones para incrementos de volumen, así que F no se utiliza. Si el Hematocitómetro es de 0.2 mm de profundidad la densidad se calcula de la siguiente forma:

$$D = (F + F.D. + M) \times C \times 1000 \text{ cels / ml} \quad (2)$$

En este caso, C es el número de células de la cuantificación de los 5 cuadros de cada cámara. Si se cuentan varias cámaras se debe calcular un promedio del número de cámaras contadas.

CALCULO DE PARAMETROS POBLACIONALES.

Los principales parámetros del crecimiento de un cultivo de células se calculan como a continuación.

1.- Las divisiones por día (K) se calculan de acuerdo a Guillard - (1973):

$$k = (3.322/T2-T1) * (\log N2/N1)$$

Donde:

3.322= Factor de conversión del logaritmo base 2
a base 10 (3.322=log₂ 10)

N1= Concentración celular al tiempo T1

N2= Concentración celular al tiempo T2

2.- La tasa de crecimiento específico () estimada como lo recomienda E.P.A. (1971) para ensayos con microalgas:

$$= \frac{\log (N2/N1)}{T2 - T1} \text{ día}^{-1}$$

3.- El tiempo medio de generación (Tg) se determina como lo recomienda Eppley y Strickland (1968):

$$T_g = \frac{\log 2 (T_2 - T_1)}{\log N_2 - \log N_1} = \frac{\log 2}{k}$$

4.- La producción diaria de microalgas se valora según De la Cruz y Alfonso, 1975:

$$P.D. = \frac{N_2 - N_1}{T_2 - T_1}$$