



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS

USO DE UN MEDIO ALTERNO AL F/2 PARA EL CULTIVO
DE *Isochrysis aff. galbana* (CLONE T-ISO)



TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN
OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA

ENRIQUE VALENZUELA ESPINOZA

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA

ENERO DE 1997

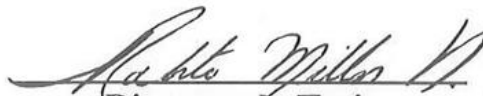
**USO DE UN MEDIO ALTERNO AL F/2 PARA EL CULTIVO
DE *Isochrysis aff. galbana* (CLONE T-ISO)**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA**

PRESENTA

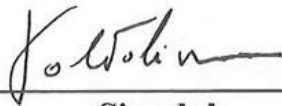
ENRIQUE VALENZUELA ESPINOZA

APROBADA POR:



Director de Tesis

Dr. Roberto Millán Núñez



Sinodal

Dr. Doménico Voltolina Lobina



Sinodal

Dr. José de Jesús Paniagua Michel

RESUMEN

El crecimiento, composición bioquímica y consumo de nitrato, fosfato y amonio fue estimado en cultivos estáticos de la microalga marina *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO), con la finalidad de comparar la cantidad y calidad de la biomasa producida con medio constituido con fertilizante agrícola y medio f/2 (control). La microalga creció en condiciones de temperatura controlada, flujo de aire de 4.5 L min^{-1} , salinidad de 33 ‰ e irradiancia de $110.32 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. De los cultivos, se realizaron cosechas diarias para determinar la densidad celular, composición bioquímica y consumo de nutrientes durante siete días de cultivo. La densidad celular promedio obtenida con medio f/2 y fertilizante agrícola es similar y no significativa ($p > 0.05$), con tasas de crecimiento promedio de 0.43 y 0.42 respectivamente. El contenido de proteína, mostró un incremento con el desarrollo del cultivo, con valores máximos de 7.33 pg cél^{-1} (45.31%) y 7.64 pg cél^{-1} (41.01%) al quinto día para medio control f/2 y experimental respectivamente. Se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en el contenido de proteína de *I. aff. galbana* (Clone T-ISO) para los días dos y sexto del cultivo entre control y experimental. Carbohidratos y lípidos disminuyen durante la fase de crecimiento exponencial de T-ISO, la cual termina al quinto día en ambos tratamientos. Se determinó que el contenido de carbohidrato es mayor en el control y significativo ($p > 0.05$) respecto al experimental para el día uno, mientras que, en el séptimo día ocurre lo contrario. Por el contrario, el contenido de lípido, es mayor en el experimental y significativo ($p > 0.05$) respecto al control solo para los días uno y cinco del cultivo. El contenido de clorofila *a* se incrementó exponencialmente con el desarrollo del cultivo y su concentración fue similar y no significativa en ambos medios de cultivo. El consumo de nutrientes en *I. aff. galbana* (Clone T-ISO) mostró que, durante los primeros cuatro días, el fosfato en medio con fertilizante agrícola es consumido 10 veces más rápido que en medio f/2. En cambio, el consumo de nitrato, en medio f/2 se incrementa en $555 \mu\text{M}$ del cuarto al séptimo día del cultivo. En el medio experimental, cuando nitrato y amonio son utilizados juntos, el amonio es consumido ocho veces más rápido que el nitrato en un período de cinco días y a concentraciones de $1.36 \mu\text{M}$ de amonio en el medio, el nitrato empieza a ser consumido. El costo del medio f/2 es ocho veces más elevado que el medio preparado con fertilizante agrícola. Se concluye que, el medio constituido por fertilizante agrícola iguala la producción en biomasa y contenido de constituyentes bioquímicos del medio f/2 y ubica a esta botecnia con gran perspectiva en la acuicultura por el bajo costo del medio para la producción de *I. aff. galbana* (Clone T-ISO).

INDICE

	PÁGINA
Dedicatoria	II
Agradecimientos	III
Lista de figuras	IV
Lista de tablas	VI
1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- ANTECEDENTES	3
3.- OBJETIVOS	5
4.- MATERIALES Y MÉTODOS	6
4.1- Cultivo de micro-algas	6
4.2- Experimentos de consumo de fosfato, nitrato y amonio	9
4.3.- Determinación de proteínas, carbohidratos y lípidos	9
4.4.- Determinación de clorofila α y feopigmentos	10
4.5.- Parámetros poblacionales	11
5.- RESULTADOS	12
5.1.- Crecimiento micro-algal	12
5.2.- Composición celular proximal y contenido de clorofila α	20
5.3.- Consumo de fosfato, nitrato y amonio	30
6.- DISCUSIÓN	36
6.1.- Crecimiento micro-algal	36
6.2.- Composición celular proximal y contenido de clorofila α	38
6.3.- Consumo de fosfato, nitrato y amonio	42
7.- CONCLUSIONES	45
8.- LITERATURA CITADA	46

DEDICATORIA

A la memoria de mi padre Carmen Valenzuela Mendoza quién con su esfuerzo hizo posible mi formación personal y profesional.

A mi madre Balvaneda Espinoza Valenzuela por enseñarme el camino y su constante preocupación y apoyo en todas las actividades que llevo a cabo.

A ambos por su cariño y comprensión.

A mi esposa Sandra Wood Peralta por su apoyo en la realización de este trabajo.

A mis hijos Paulina, Enrique y Ricardo por compartir su tiempo.

A mis compañeros y amigos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma de Baja California y en particular al Instituto de Investigaciones Oceanológicas por el apoyo y las facilidades prestadas para la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar los estudios de Maestría en Ciencias en Oceanografía Costera.

Al Dr. Roberto Millán Núñez por compartir sus experiencias, por el apoyo incondicional y por su dedicación en la dirección de esta investigación.

A los miembros del comité de tesis: Dr. Domenico Voltolina Lobina y Dr. Jesús Paniagua Michel quienes con sus excelentes observaciones y contribuciones mejoraron este trabajo.

Mi más sincero agradecimiento al M.C. Francisco Delgadillo H. por haberme facilitado el espacio de laboratorio y el material necesario para realizar el análisis de nutrientes.

Agradezco al C.M.C. Marco A. González G. por la ayuda brindada durante el desarrollo del trabajo.

También, se agradece de manera especial al M.C. Salvador Galindo B. por el apoyo logístico brindado.

Al Oc. Filiberto Núñez C. por su colaboración en el análisis de nutrientes y componentes bioquímicos.

A todas aquellas personas que de alguna u otra manera contribuyeron en la realización de este trabajo, a todos ellos mi reconocimiento. Gracias.

LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

- FIGURA 1.** Crecimiento promedio de *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) en 150 ml medio f/2 (A) y fertilizante agrícola. La barra vertical indica el error estandar. 13
- FIGURA 2.** Crecimiento promedio de *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) cultivada en medio f/2 (A) y fertilizante agrícola (B), limitados en 11.25 y 0.75 mg de NaNO₃, NaH₂PO₄ y NH₄NO₃, P₂O₅ en 1.65 L. La barra vertical indica el error estandar. 16
- FIGURA 3.** Crecimiento promedio de *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) en 18 L de cultivo con medio f/2 (A) y fertilizante agrícola. La barra vertical Indica el error estandar. 18
- FIGURA 4.** Contenido promedio de proteínas en *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) cultivada en 18 L con medio f/2 (A) y fertilizante agrícola (B). La Barra vertical indica el error estandar. 21
- FIGURA 5.** Contenido promedio de carbohidratos en *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) cultivada en 18 L con medio f/2 (A) y fertilizante agrícola(B). La barra vertical indica el error estandar. 22
- FIGURA 6.** Contenido promedio de lípidos en *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) cultivada en 18 L con medio f/2 (A) y fertilizante agrícola (B). La barra vertical indica el error estandar. 23
- FIGURA 7.** Variación en porciento del contenido de proteínas (A), carbohidratos (B) y lípidos (C) por célula en cultivo de 18 L de *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) con medio f/2 y fertilizante agrícola . La barra vertical indica el error estandar 25

- FIGURA 8.** Contenido promedio de clorofila *a* en *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) en cultivo de 18 L con medio *f/2* (A) y fertilizante agrícola (B). La Barra vertical indica el error estandar. 26
- FIGURA 9.** Contenido promedio de clorofila *a* por célula en *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) en cultivo de 18 L con medio *f/2* (A) y fertilizante agrícola (B). La barra vertical indica el error estandar. 27
- FIGURA 10.** Concentración promedio de fosfato en el medio y su consumo por *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) en cultivo de 18 L con medio *f/2* (A) y fertilizante agrícola (B). La Barra vertical indica el error estandar. 32
- FIGURA 11.** Concentración promedio de nitrógeno en el medio y su consumo por *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) en cultivo de 18 L con medio *f/2* (A) y fertilizante agrícola (B). La barra vertical indica el error estandar. 33

LISTA DE TABLAS

	PÁGINA
TABLA I. Composición del medio de cultivo en base a fertilizante agrícola.	6
TABLA II. Contenido promedio de metales traza expresado como $\mu\text{g/g}$ del fertilizante agrícola nitrato de amonio en muestras no digeridas (A) y digeridas (B).	7
TABLA III. Valores poblacionales promedio de <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (Clone T-ISO) cultivada en 150 ml con medio f/2 (A) y fertilizante agrícola (B).	14
TABLA IV. Valores poblacionales promedio de <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (Clone T-ISO) cultivada en medio f/2 (A) y fertilizante agrícola (B), limitados en 11.25 y 0.75 mg de nitrato de sodio, fosfato de sodio y nitrato de amonio, pentóxido de fósforo respectivamente en volumen de 1.65 L.	17
TABLA V. Valores poblacionales promedio de <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (Clone T-ISO) cultivada en 18 L con medio f/2 (A) y fertilizante agrícola (B).	19
TABLA VI. Composición proximal celular promedio de <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (Clone T-ISO) expresada como pg célula^{-1} y porcentaje de materia orgánica, en cultivo de 18 L con medio f/2 (A) y fertilizante agrícola.	28
TABLA VII. Concentración promedio de clorofila <i>a</i> y feofitina <i>a</i> por volumen de cultivo y unidad celular en <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (Clone T-ISO) cultivada con medio f/2 (A) y fertilizante agrícola (B).	29

TABLA VIII. Consumo promedio diario de nutrientes por *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) en cultivo de 18 L con medio f/2 (A) y fertilizante agrícola (B). 34

TABLA IX. Ionización de amonio a amoniaco en función del pH en 18 L de cultivo de *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) con fertilizante agrícola. 35

1. INTRODUCCIÓN

Los cultivos de microalgas pueden ser utilizados para diferentes propósitos. Para estudios de fisiología, citología o taxonomía, la cantidad de microalgas requerida es pequeña, pero para otras actividades, como cultivos de especies de importancia comercial, el requerimiento es mayor. Cuando se necesitan grandes cantidades de cultivos algales monoespecíficos, como es el caso de laboratorios productores de larvas y juveniles de bivalvos y crustáceos marinos de valor comercial, uno de los principales problemas que enfrentan estos laboratorios es el alto costo de la producción del alimento vivo, el cual es una parte sustancial del costo de la producción total. Coutteau y Sorgeloos (1992) calcularon que el costo del alimento contribuye con un 30% al costo total de la producción de semilla de bivalvos. A pesar de todos los esfuerzos por reemplazar las microalgas por alimento inerte, los acuaculturistas todavía dependen de la producción y uso de microalgas como alimento vivo para las larvas de las especies comercialmente importantes (ejemplo ostiones, almejas, mejillones, escalopas, camarones peneidos), que se alimentan con microalgas durante al menos una parte de su ciclo de vida (DePauw y Pruder, 1986).

Para el cultivo de microalgas se utilizan dos categorías principales de medios de cultivo: La primera consiste de medios complejos químicamente semidefinidos, constituidos por macro y micronutrientes de grado reactivo incluyendo factores orgánicos para el crecimiento (Mathiessen y Toner, 1966; Stein, 1973; Guillard, 1975; Ukeles, 1976). Estos medios son generalmente preparaciones de laboratorio, con un costo económico elevado y se emplean en sistemas de cultivo intensivo a pequeña escala. Cultivar microalgas a nivel comercial con estos medios resulta oneroso, lo cual ocasiona que las larvas y juveniles alimentados con esta microalgas, lleguen con un alto costo al mercado. La segunda categoría comprende medios preparados con productos químicos inorgánicos comercialmente disponibles a bajo costo, como son por ejemplo los fertilizantes agrícolas los cuales proveen los nutrientes primarios como el nitrógeno,

fósforo y potasio. Estos pueden ser utilizados donde se necesitan grandes cantidades de microalgas como es el caso de laboratorios productores de organismos acuáticos (De Pauw, 1981), contribuyendo a disminuir el costo de su producto final

Uno de los aspectos importantes a considerar en la producción de microalgas, es el tipo de medio de cultivo a utilizar. Para esto se deben considerar algunos problemas en la elaboración del medio, de acuerdo a sus constituyentes. Estos pueden ser resueltos dentro de los siguientes componentes: (1) elementos mayores y concentración total de sal; (2) fuente de nitrógeno; (3) pH; (4) elementos traza; (5) factores orgánicos y (6) estabilidad.

En la actualidad, existen numerosas formulaciones de medios de cultivo que proporcionan la concentración de sales nutritivas para un adecuado crecimiento de las microalgas. Tal es el caso de los medios desarrollados por Guillard y Ryther (1962), Mathiessen y Toner (1966), Walne (1970), Provasoli (1971) y Guillard (1975) entre otros. Estos medios han servido de base para el desarrollo de medios alternativos de bajo costo y la mayoría de las investigaciones sobre producción de microalgas, han centrado su atención en la sustitución de elementos mayores como nitrógeno y fósforo. Hasta ahora, se han realizado diversos trabajos en la elaboración de medios que incluyen el uso de sales de grado reactivo (Alfonso y Martínez, 1988), biodigeridos de excretas de vaca y gallina (Granados-Machuca y Bückle-Ramírez, 1984); extractos líquidos de macrofitas marinas (Paniagua-Michel y Bückle-Ramírez, 1985), fertilizantes agrícolas (Gonzalez-Rodríguez y Maestrini, 1984; Fabregas *et al.*, 1987; Herrero *et al.*, 1991; López-Elias y Voltolina, 1993).

A pesar de que existen diferentes alternativas para el cultivo de microalgas, ninguno de los trabajos citados previamente, contempla información concerniente al consumo de los nutrientes por las microalgas. Este aspecto no ha sido tomado en cuenta hasta ahora y es uno de los factores determinantes cuando se elabora un medio de cultivo, ya que la concentración de los nutrientes influye en la tasa de crecimiento del alga, composición

celular, contenido de clorofila, así como también en su rendimiento final. Además, existen pocas investigaciones donde el medio de cultivo esté constituido únicamente por nutrientes de uso agrícola.

2. ANTECEDENTES

En el pasado y aún en el presente, el cultivo de algas unicelulares ha sido llevada a cabo mediante el empleo de métodos simples y sofisticados. Estos métodos varían de acuerdo al sistema de cultivo empleado, ya sea semi-intensivo o intensivo o de acuerdo a la fuente y concentración de nutrientes utilizados (DePauw *et al.*, 1984).

El cultivo semi-intensivo, es una forma de producción algal comúnmente usada en acuicultura, se basa en la utilización de compuestos orgánicos e inorgánicos (fertilizantes agrícolas) con el propósito de incrementar la producción primaria en pozas y estanques de cultivo. En 1942, grandes volúmenes de algas fueron cultivadas al exterior con fertilizantes de jardinería en estanques de 11,355 litros (Loosanoff y Engle, 1942; Loosanoff, 1951). Este método fue simple y económico, sin embargo, la composición del fitoplancton fue inconsistente y no adecuada como alimento para larvas y juveniles de moluscos.

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

En condiciones de laboratorio, McCarthy (1972) realizó investigaciones relacionadas con el uso de urea en 40 clones unialgales y encontró que 35 de ellos utilizaron el compuesto. Por su parte, Rubright y Harrell (1981) evaluaron urea peletizada y superfosfato triple granulado en pozas de cultivo de camarón. Encontraron que dos semanas después de la primera aplicación de los fertilizantes el contenido promedio de clorofila fue $28.92 \pm 4.91 \mu\text{g/l}$ contra $9.61 \pm 3.11 \mu\text{g/l}$ en pozas no fertilizadas. Por otra

parte, Boyd *et al.* (1981) mencionan que los fertilizantes líquidos son más eficientes por su alta solubilidad y generan mayor producción que los fertilizantes sólidos.

Ojeda y Afonso (1986) realizaron un estudio comparativo del crecimiento y composición bioquímica de tres especies de fitoplancton marino con cuatro fuentes de nitrógeno. Los resultados mostraron que el crecimiento de *Tetraselmis suecica* e *Isochrysis galbana* fue mayor al cultivarlas con nitrato, nitrito, urea y menor con amonio. En cambio *Chlorella* sp presentó crecimientos mayores en cultivo con amonio. Alfonso y Martínez (1988) formularon un medio de cultivo para microalgas marinas basado en diferentes concentraciones de macronutrientes y micronutrientes derivados del medio Miquel-Matue. Encontraron que el crecimiento de *Tetraselmis chui*, *Tetraselmis tetrahele* *Chaetoceros ceratosporum* y *Thalassiosira fluviatilis* hacen posible que el medio A-M (Alfonso-Martínez) pueda sustituir al medio Miquel-Mateu que tradicionalmente se usa en Cuba.

Cultivos de microalgas con medios no convencionales basados en fertilizantes agrícolas y extractos de suelo han sido realizados por Fabregas *et al.* (1987) y por Herrero *et al.* (1991), quienes obtienen densidades celulares máximas de 16.15×10^6 células ml^{-1} en concentraciones de $14 \mu\text{g N ml}^{-1}$ y concentración máxima de proteínas con $28 \mu\text{g N ml}^{-1}$. Así mismo, los medios no convencionales siempre produjeron mayor biomasa en comparación de los medios ES-Provasoli, F/2 y Walne. Iriarte y Buitrago (1992) determinaron que el cloruro de amonio a una concentración de 9 mM como la óptima para cultivos de *Chlorella* sp. Recientemente, Bustillos-Hurtado y López-Elias (1994), compararon la producción y composición química de *Tetraselmis* sp. y *Chaetoceros gracilis* con medios simplificados utilizando fertilizantes agrícolas. Ellos informan que la producción en biomasa así como el contenido de proteínas, lípidos y carbohidatos fue similar para las dos especies independientemente de los medios de cultivos empleado.

A pesar de todo el conocimiento teórico y práctico existente, todavía se necesitan estudios relacionados sobre el consumo de nutrientes para determinar los requerimientos

de sales inorgánicas de diferentes especies de microalgas en distintas condiciones de cultivo. Así mismo, también se requiere información concerniente sobre la calidad del alimento producido con fertilizantes inorgánicos. En este contexto, se considera que la fuente y concentración de nutrientes utilizados para el cultivo de microalgas son variables que afectarían el crecimiento y la composición bioquímica del fitoplancton en cultivo.

La presente investigación pretende realizar un estudio comparativo, para conocer la relación entre condiciones de cultivo, consumo de nutrientes y producción de microalgas en condiciones de laboratorio mediante el uso de fertilizante agrícola y el medio f/2 como fuente de nutrientes. Se consideró la hipótesis de que al utilizar el fertilizante agrícola como fuente de nutriente en los cultivos, se producirá igual o mejor densidad celular y contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos por célula que el medio f/2.

3. OBJETIVOS

Estimar la tasa de crecimiento, las divisiones por día y la producción diaria de *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) cultivada tanto con fertilizante agrícola como con medio f/2.

Determinar las tasas de consumo de nitrógeno (NO_3 , NH_4) y de fosfatos en el cultivo de *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) cultivada con fertilizante agrícola y medio f/2.

Determinar la composición bioquímica (proteínas, carbohidratos y lípidos), contenido de clorofila *a* y feofitina *a* de *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) cultivada con fertilizante agrícola y medio f/2.

4. MATERIALES Y MÉTODO

4.1. CULTIVO DE MICROALGAS

La microalga marina *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO), se obtuvo del Centro Para el Cultivo de Fitoplancton Marino (CCMP), Maine, USA. Se mantuvo en laboratorio a temperatura controlada de 20 ± 1 °C con el medio f/2 de Guillard (1975), el cual se empleó como control para esta investigación. El medio experimental alterno estuvo constituido por fertilizante agrícola y de jardinería, cuya composición se da en la tabla I, donde se indica la concentración final de los nutrientes por litro. Este medio tuvo que ser enriquecido con vitaminas del medio f/2 en la misma concentración.

Tabla I. Composición del medio de cultivo en base a fertilizante agrícola

Origen y marca comercial del producto	Compuesto químico	Porcentaje	Concentración final en el medio (mg L ⁻¹)
México-Fertimex	NH ₄ NO ₃	33.5%	36.8
USA-Subdury	P ₂ O ₅ *	44%	5.6
USA-KGRO	Fe-EDTA *	0.43%	5.4
USA-KGRO	Fe-No quelado	5.620%	70.7
USA-KGRO	MnSO ₄	0.087%	1.09
USA-KGRO	ZnSO ₄ *	0.087%	1.09
USA-KGRO	CuSO ₄ *	0.159%	2.00
USA-KGRO	Azufre	3.640%	45.84

Del fertilizante agrícola nitrato de amonio, se realizó el análisis de metales traza que se usan como micronutrientes en el cultivo. El propósito del análisis fue conocer si contenía elementos traza, en que proporción se encontraban y con cuanto contribuían al enriquecimiento del medio. Para el análisis se utilizó la técnica descrita por Loring y Rantla (1992) en muestras no digeridas y digeridas. Para las muestras no digeridas se procedió a pesar 1 g del compuesto y disolverlo en 50 ml de agua desionizada, de la solución se determinó el contenido de metales traza. El tratamiento de las muestras

digeridas consistió en pesar 1 g de nitrato de amonio, se le agregó 1 ml de ácido nítrico, 3 ml de ácido clorhídrico y 5 ml de ácido fluorhídrico concentrados y grado metal traza. Se calentó a 100 °C por inmersión completa en baño maría por 3 horas para poner así los metales en solución. El extracto se transfirió a matraces volumétricos de polipropileno de 50 ml mediante una piceta que contenía ácido bórico 1 M. Posterior a esto, se cuantificó el contenido de metales traza en un espectrofotómetro de absorción atómica, modelo Smith Hieftje 12 con horno de grafito TJA modelo CTF 188. En la tabla II se presentan los resultados del contenido promedio de metales traza en muestras no digeridas (A) y digeridas (B). Estos resultados indican que la concentración de elementos traza del fertilizante agrícola nitrato de amonio, resultó ser menor que la expresada en el medio f/2, por lo tanto se concluye que la contribución al enriquecimiento del medio con fertilizante agrícola no es significativa.

Tabla II. Contenido promedio de metales traza expresado en $\mu\text{g/g}$ del fertilizante agrícola nitrato de amonio en muestras no digeridas (A) y digeridas (B).

A					
Cobre	Aluminio	Cromo	Hierro	Manganeso	Zinc
0.1	130.12	0.377	107.74	3.20	0.438
B					
Cobre	Aluminio	Cromo	Hierro	Manganeso	Zinc
0.5	505	1	380.60	5.54	2.34

Para el cultivo de *Isochrysis aff. galbana* (Clon T-ISO) se utilizaron tres niveles escalonados entre sí. El primer nivel de cultivo fue en matraces Erlenmeyer en los cuales se preparó por triplicado 150 ml de medio basado en fertilizante agrícola y sus respectivos controles. Estos se esterilizaron en autoclave a 121 °C, 1.05 kg cm^{-2} de presión durante 10 minutos. Después, cada Erlenmeyer recibió asépticamente siete mililitros de T-ISO en condiciones controladas. El tiempo de cultivo en este nivel fue siete días con iluminación continua a una irradiancia de 72.24 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Biospherical Instruments Inc. 4),

proporcionada por lámparas fluorescentes (Sylvania de 75 watts). Se continuó el cultivo en Fernbach los cuales fueron preparados por triplicado conteniendo cada uno 1.5 L de medio constituido por fertilizante agrícola y sus respectivos controles. Tanto el cultivo control como experimental en Fernbach fueron limitados por nitrógeno y fósforo en concentración de 11.25 y 0.75 mg por cada 1.5 litros de medio de cultivo respectivamente. Se esterilizaron en autoclave a 121 °C, 1.05 kg cm⁻² de presión durante 10 minutos. Posteriormente, cada Fernbach recibió 150 ml de inóculo (obtenido del nivel Erlenmeyer) en condiciones asépticas y el tiempo de cultivo fue seis días con iluminación continua a una irradiancia de 99.28 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. El ensayo de limitación en los elementos mayores fue con el propósito de que las células utilizadas agotaran los nutrientes en el medio de cultivo Fernbach cuya biomasa obtenida fue utilizada como inóculo para el nivel experimental en garrafón y de esta manera no influyeran en el análisis de nutrientes. Previo al cultivo en garrafón, el agua de mar utilizada se trató con método químico para el cual se prepararon soluciones madre de cloro (416 ml de hipoclorito de sodio al 6% aforado a un litro con agua destilada) y tiosulfato de sodio (248.1 g aforado a un litro con agua destilada). De la solución madre de hipoclorito de sodio se utilizó 0.25 ml L⁻¹ de agua de mar a utilizar, se dejó reposar 24 horas. Posteriormente se neutralizó el efecto del cloro adicionado 0.1 ml de tiosulfato de sodio por litro de agua de mar, sometiendo a aireación por dos horas para completar la reacción (Pruder y Bolton, 1978). En los garrafones antes mencionados, se experimentó por triplicado con el medio de cultivo basado en fertilizantes agrícolas y sus respectivos controles f/2, donde cada unidad recibió 1.65 L de inóculo en condiciones asépticas. Las condiciones de cultivo fueron: Temperatura de cuarto entre 19 y 21 °C, flujo de aire de 4.5 L min⁻¹ mediante un compresor de aire seco (Conde 12), salinidad de 33 ‰ e iluminación continua con cuatro lámparas fluorescentes "luz de día" de 75 W que suministraban una irradiancia de 110.32 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En cada uno de los niveles de cultivo se cuantificó diario la densidad celular con cámara Neubauer de 0.1 mm de profundidad.

4.2. EXPERIMENTOS DE CONSUMO DE PO_4 , NO_3 Y NH_4 .

De los cultivos en garrafón, muestras diarias de 250 ml fueron cosechadas por triplicado para el inicio y a las 24 horas, posteriormente se filtraron 150 ml para el segundo día, el tercer y cuarto día se filtró 100 ml, mientras que, para los días quinto, sexto y séptimo se filtró 50 ml. El cambio en el volumen filtrado obedece a cambios en la densidad celular de los cultivos. El filtrado se realizó mediante el uso de filtros de fibra de vidrio GFC de 1.2 μm , y 47 mm de diámetro. Durante siete días se tomaron muestras diarias del medio filtrado para determinar la concentración de fosfatos, nitratos y amonio de acuerdo a las metodologías descritas por Parson *et al.* (1985). Con los datos de concentración de amonio y pH en los cultivos con fertilizantes, se calculó la cantidad de amonio que se ioniza en amoniaco mediante la ecuación de Henderson-Hasselbalch (Conn y Stumpf, 1980). Previo a la determinación se realizaron curvas de calibración para cada uno de los nutrientes. El consumo de los nutrientes se calculó por diferencia entre la concentración inicial y la concentración final entre el tiempo t_1 y t_2 .

4.3. DETERMINACION DE PROTEÍNAS, LÍPIDOS Y CARBOHIDRATOS

De los cultivos en garrafón, muestras diarias se cuantificaron durante siete días en cámara Neubauer de 0.1 mm de profundidad para conocer su densidad celular. Al inicio y a las 24 horas del cultivo se filtraron por triplicado 250 ml de muestra, para el segundo día se filtró 150 ml, en cambio, para el tercer y cuarto día se filtró 100 ml, mientras que, para el quinto, sexto y séptimo día se filtró 50 ml. El volumen filtrado varió debido al incremento en la densidad celular de los cultivos. Para el filtrado se utilizaron filtros de fibra de vidrio GFC A/C de 1 μm previamente incinerados a 450 °C por 7 horas, los cuales fueron almacenados en un congelador a -20 °C para su posterior análisis.

Para la determinación de proteínas, lípidos y carbohidratos, se realizaron las curvas de calibración respectivas utilizando: Seroalbumina bovina para proteínas, D-Glucosa para carbohidratos y ácido esteárico para lípidos. Tales determinaciones se efectuaron en un

espectrofotómetro Baush and Lomb Spectronic 2000. Las proteínas fueron extraídas de acuerdo al procedimiento descrito por Raush (1981), y cuantificadas por el método de Bradford (1976). Para carbohidratos se utilizó la mezcla fenol sulfúrico descrito por Kochert (1978a), previa hidrólisis de la muestra con 10 ml de ácido sulfúrico 2 N. La cuantificación de lípidos se estimó por el método de Pande *et al.* (1963), y la extracción se hizo según Bligh y Dyer (1959).

4.4. DETERMINACION DE CLOROFILA *a* Y FEOPIGMENTOS.

De los cultivos en garrafón, 10 ml de muestra se filtraron por triplicado a través de filtros de membrana de nitrocelulosa de 0.45 μm de poro y 25 mm de diametro. Los filtros que contenían la muestra se colocaron en tubos de centrifuga, con 8 ml de acetona al 90% y fueron sonicados por cinco minutos. Se almacenaron por 12 horas de extracción en obscuridad a 4 °C, agitando después de las primeras 8 horas para asegurar una mejor extracción. Posteriormente se aforaron a 10 ml y se centrifugaron a 1190 x g por 10 minutos. Para estimar la concentración de clorofila, los extractos se leyeron en absorbancia a longitudes de onda: 750, 665, 645, y 630 nm en un espectrofotómetro Spectronic 2000. Después se acidificó cada una de las muestras con dos gotas de HCl al 10% y de nuevo se leyeron a las mismas longitudes de onda para determinar el efecto de los feopigmentos (Parson *et al.*, 1985). Para el cálculo de las concentraciones de los pigmentos se utilizaron las ecuaciones de Millan-Nuñez y Alvarez-Borrogo (1978).

4.5. PARAMETROS POBLACIONALES

De los resultados obtenidos se calculó, la tasa de crecimiento específica (μ) de cada condición de cultivo mediante las ecuaciones descritas por Guillard (1973).

$$\mu = \frac{\text{Ln}(N_2) - \text{Ln}(N_1)}{t_2 - t_1}$$

Donde:

μ = Tasa de crecimiento específica en días

N_1 = Es el número de células al tiempo t_1

N_2 = Es el número de células al tiempo t_2

t_1 y t_2 = Son el tiempo inicial y final en días

Para convertir la tasa de crecimiento (μ) calculada con la expresión anterior, a número de divisiones por día, se divide entre el logaritmo natural de 2.

$$D = \frac{\mu}{\ln(2)} = \frac{\mu}{0.693}$$

Donde:

D = Número de divisiones por día

μ = Tasa de crecimiento específica

El tiempo de duplicación (TD) es el valor recíproco del número de divisiones por día y se calcula como sigue:

$$TD = \frac{1}{D}$$

Donde:

TD = Tiempo de duplicación en días

D = Divisiones por día

La producción diaria (PD) se estimó en base a la diferencia del número de células producidas entre el tiempo t_1 y el tiempo t_2 .

Los resultados de la biomasa microalgal, contenido de proteínas, lípidos, carbohidratos y clorofila a obtenidos con ambos medios de cultivo, se contrastaron estadísticamente mediante un análisis de varianza de una vía ($p > 0.05$) (Zar, 1984).

5. RESULTADOS

5.1. CRECIMIENTO MICRO-ALGAL

Isochrysis aff. *galbana* (clone T-ISO) creció en cultivo estático por siete días. La temperatura en el cultivo control (f/2) como experimental fluctuó entre 18-21 °C con promedio de 19.7 ± 0.68 °C. El pH inicial en el cultivo control y experimental fue 7.7 y 7.8 respectivamente. Al final del experimento, se registraron unidades de pH de 8.9 en el control f/2 y 8.5 en el experimental. La salinidad se mantuvo en 33 ‰.

El crecimiento promedio de la microalga con medio f/2 y fertilizante agrícola en volumen de 150 ml (cepa) se presenta en la figura 1A-B respectivamente. Después de un período de adaptación de 24 horas las células presentan un crecimiento exponencial. La concentración celular inicial para este nivel de cultivo fueron 2.67×10^5 y 2.40×10^5 células ml^{-1} respectivamente. El crecimiento exponencial se encontró entre los días 1-4 tanto para el control como experimental, obteniéndose densidades celulares máximas de 6.38×10^6 y 6.35×10^6 células ml^{-1} al séptimo día de cultivo (Tabla IIIA-B). La tasa de crecimiento promedio (μ) para ambos cultivos fue 0.45 y 0.46 con 0.65 y 0.67 divisiones por día. La máxima producción diaria (PD) se obtuvo al tercer día en el medio f/2, en tanto que, el cultivo con fertilizante agrícola presentó dos máximos, uno al cuarto día y otro al sexto día del cultivo.

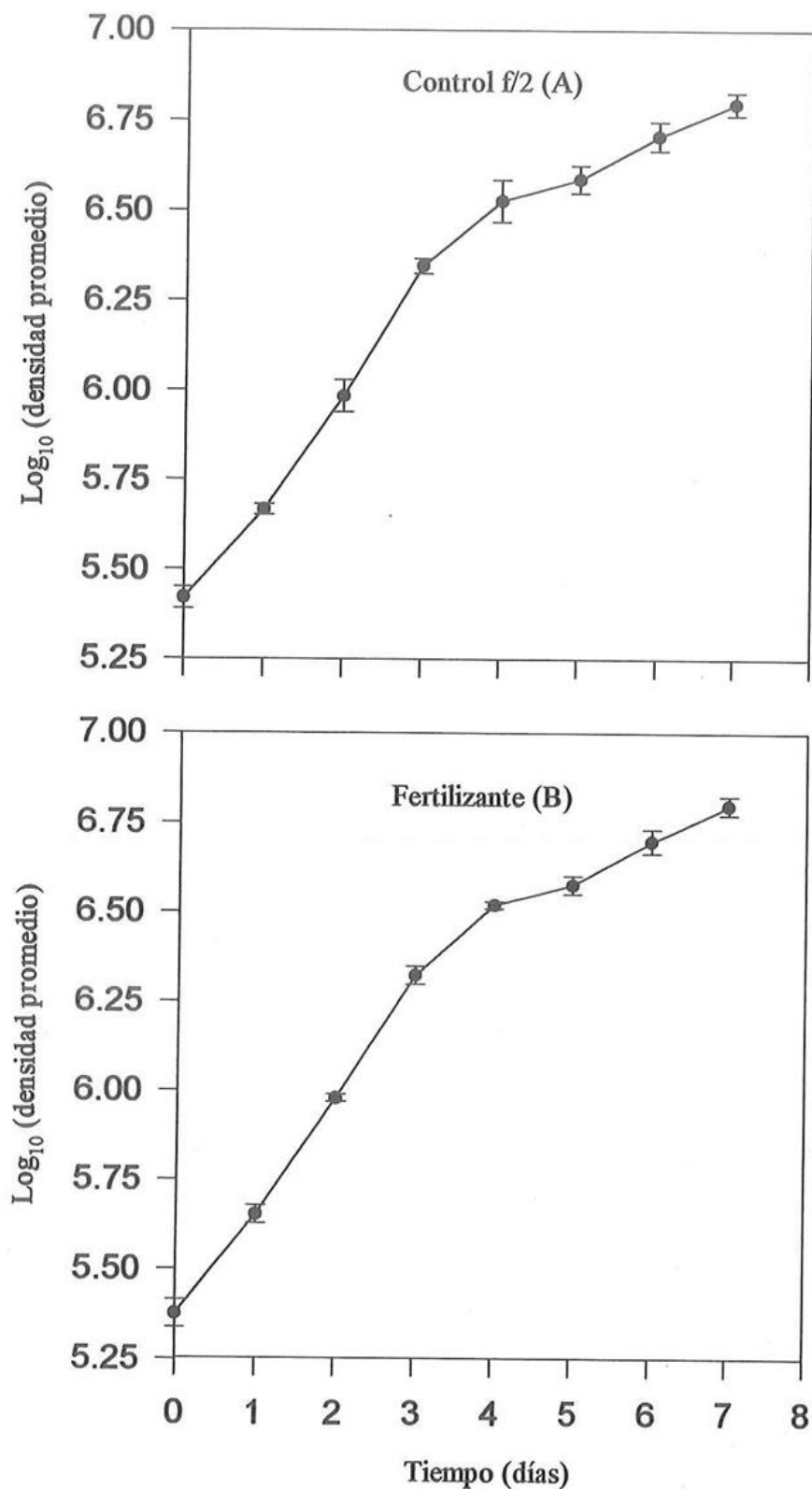


Figura 1. Crecimiento promedio de *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) en 150 ml de medio f/2 (A) y fertilizante agrícola (B). La barra vertical indica el error estandar.

Tabla III. Valores poblacionales promedio de *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) cultivada en 150 ml con medio f/2 (A) y fertilizante agrícola (B).

A

Tiempo (días)	Concentración (células ml ⁻¹)	μ	TD (días)	D (div/día)	PD (células ml ⁻¹)
0	267 777	-	-	-	-
1	467 221	0.56	1.23	0.81	199 444
2	977 777	0.74	0.93	1.07	510 556
3	2 248 888	0.83	0.83	1.20	1 271 111
4	3 411 109	0.42	1.65	0.60	1 162 221
5	3 908 332	0.13	5.33	0.18	497 223
6	5 147 220	0.28	2.47	0.40	1 239 000
7	6 383 331	0.21	3.30	0.30	1 236 111
	promedio	0.45	2.24	0.65	

B

Tiempo (días)	Concentración (células ml ⁻¹)	μ	TD (días)	D (div/día)	PD (células ml ⁻¹)
0	240 553	-	-	-	-
1	458 888	0.64	1.08	0.92	218 335
2	958 888	0.74	0.93	1.07	500 000
3	2 137 777	0.80	0.86	1.16	1 178 889
4	3 338 887	0.45	1.54	0.64	1 201 110
5	3 827 776	0.13	5.33	0.18	488 889
6	5 105 553	0.29	2.39	0.41	1 277 777
7	6 352 774	0.22	3.15	0.31	1 247 221
	promedio	0.46	2.18	0.67	

En la figura 2A-B se observan las densidades de la microalga en los cultivos en Fernbach (1.65 L) que estuvieron limitados por nitrógeno y fósforo. Estos cultivos empezaron con 5.6 y 5.2×10^5 células ml^{-1} , en los cuales se observa un crecimiento exponencial en los primeros tres días. Después del tercer día, se observa el efecto de la limitación de elementos mayores en su crecimiento, donde su biomasa final en el medio f/2 fue 2.81×10^6 células ml^{-1} , mientras que, con fertilizante agrícola se obtuvo 3.03×10^6 células ml^{-1} . Aunque existió mayor producción con fertilizante agrícola, la tasa de crecimiento promedio y divisiones por día son similares en los ensayos antes mencionados (Tabla IVA-B). Además, se denotó que a partir del tercer día, la tasa de crecimiento en el cultivo con medio f/2 permanece constante con valores de $\mu=0.10$, lo cual indica que el cultivo se encontraba en fase estacionaria de su ciclo de crecimiento. Sin embargo, para el cultivo que creció con fertilizante agrícola, se observa una variabilidad en su tasa de crecimiento a partir del tercer día.

La densidad celular que se obtuvo en volumen de 18 L, se presenta en la figura 3A-B con medio f/2 y fertilizante agrícola. La concentración inicial en los experimentos fueron 2.4 y 2.5×10^5 células ml^{-1} respectivamente. En el primer día, se observó en ambos cultivos un período de adaptación donde no existe un incremento significativo en la biomasa celular y a partir del cual, se inició el crecimiento exponencial hasta el quinto día, obteniéndose densidades celulares finales de 5.16×10^6 y 5.19×10^6 células ml^{-1} . Los valores poblacionales se presentan en las tablas VA-B. La tasa de crecimiento promedio para el cultivo con medio f/2 fue 0.43 y 0.42 para el fertilizante agrícola. Sus respectivas divisiones por día fueron 0.62 y 0.61 y la máxima producción diaria ocurrió al quinto día en ambos tratamientos. Después del quinto día de cultivo, la tasa de crecimiento permanece constante con valores de $\mu=0.20$ en el medio control f/2 y $\mu=0.10$ para el experimental con fertilizante. Lo anterior evidencia, que los cultivos en este período de tiempo se encontraban al principio de la fase estacionaria de su ciclo de crecimiento.

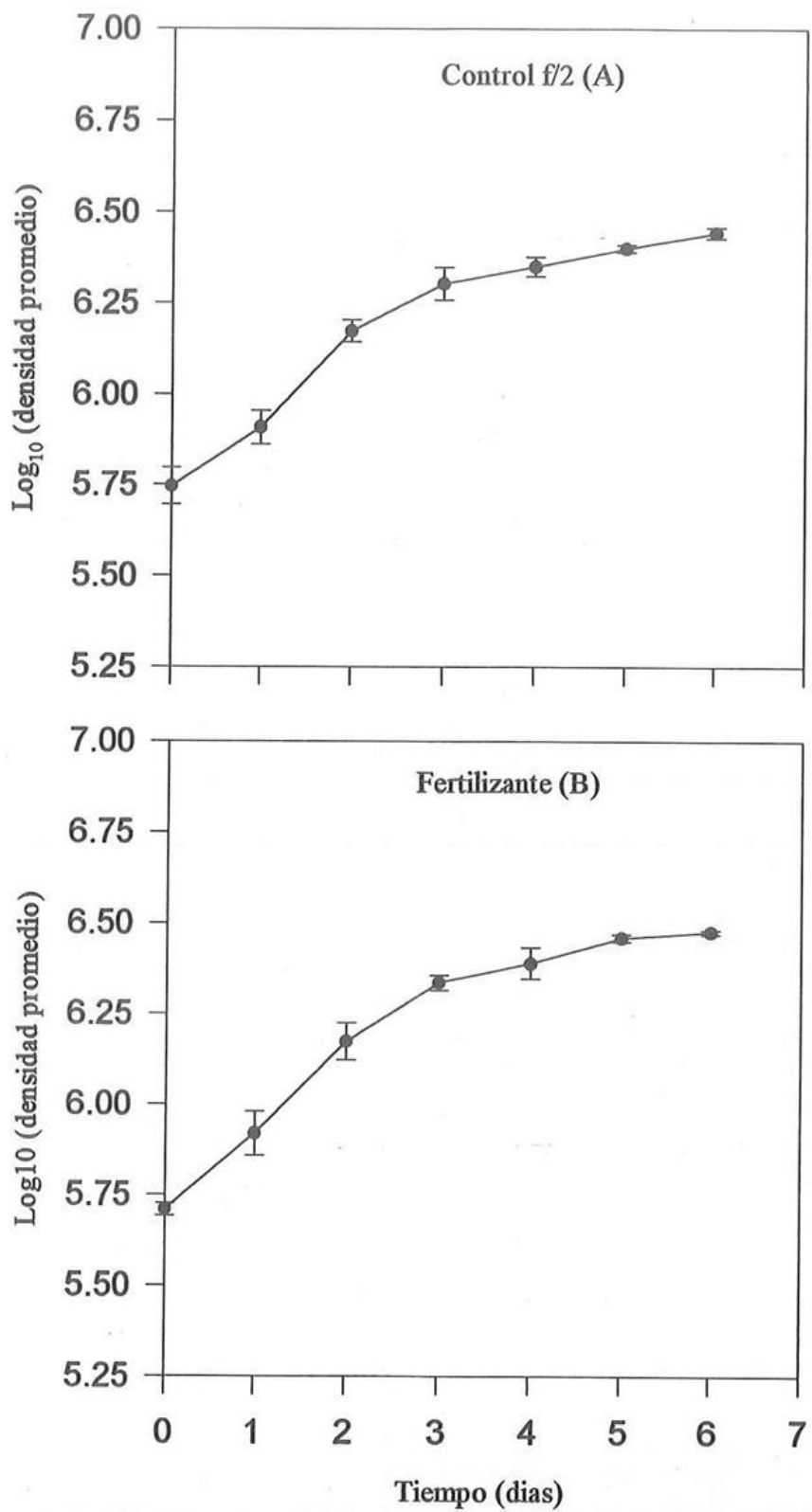


Figura 2. Crecimiento promedio de *Isochrysis aff. galbana* (Clone T-ISO) cultivada en medio f/2 (A) y fertilizante agrícola (B), limitados en 11.25 y 0.75 mg de NaNO₃, NaH₂PO₄ y NH₄NO₃, P₂O₅ en 1.65 L. La barra vertical indica el error estandar.

Tabla IV. Valores poblacionales promedio de *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) cultivada en medio f/2 (A) y fertilizante agrícola (B), limitados en 11.25 y 0.75 mg de nitrato de sodio, fosfato de sodio y nitrato de amonio, pentóxido de fósforo respectivamente en volumen de 1.65 L.

A

Tiempo (días)	Concentración (células ml ⁻¹)	μ	TD (días)	D (div/día)	PD (Células ml ⁻¹)
0	568 888	-	-	-	-
1	826 110	0.37	1.87	0.53	257 222
2	1 516 666	0.61	1.13	0.88	690 556
3	2 044 442	0.30	2.31	0.43	527 776
4	2 272 221	0.10	6.93	0.14	227 779
5	2 536 109	0.11	6.30	0.15	263 888
6	2 811 109	0.10	6.93	0.14	275 000
	promedio	0.26	4.24	0.37	

B

Tiempo (días)	Concentración (células ml ⁻¹)	μ	TD (días)	D (div/día)	PD (Células ml ⁻¹)
0	520 553	-	-	-	-
1	844 444	0.48	1.44	0.69	323 891
2	1 516 666	0.59	1.17	0.85	672 222
3	2 205 554	0.37	1.87	0.53	688 888
4	2 488 886	0.12	5.77	0.17	283 332
5	2 905 553	0.16	4.33	0.23	416 667
6	3 033 332	0.04	17.32	0.05	127 779
	promedio	0.29	5.31	0.42	

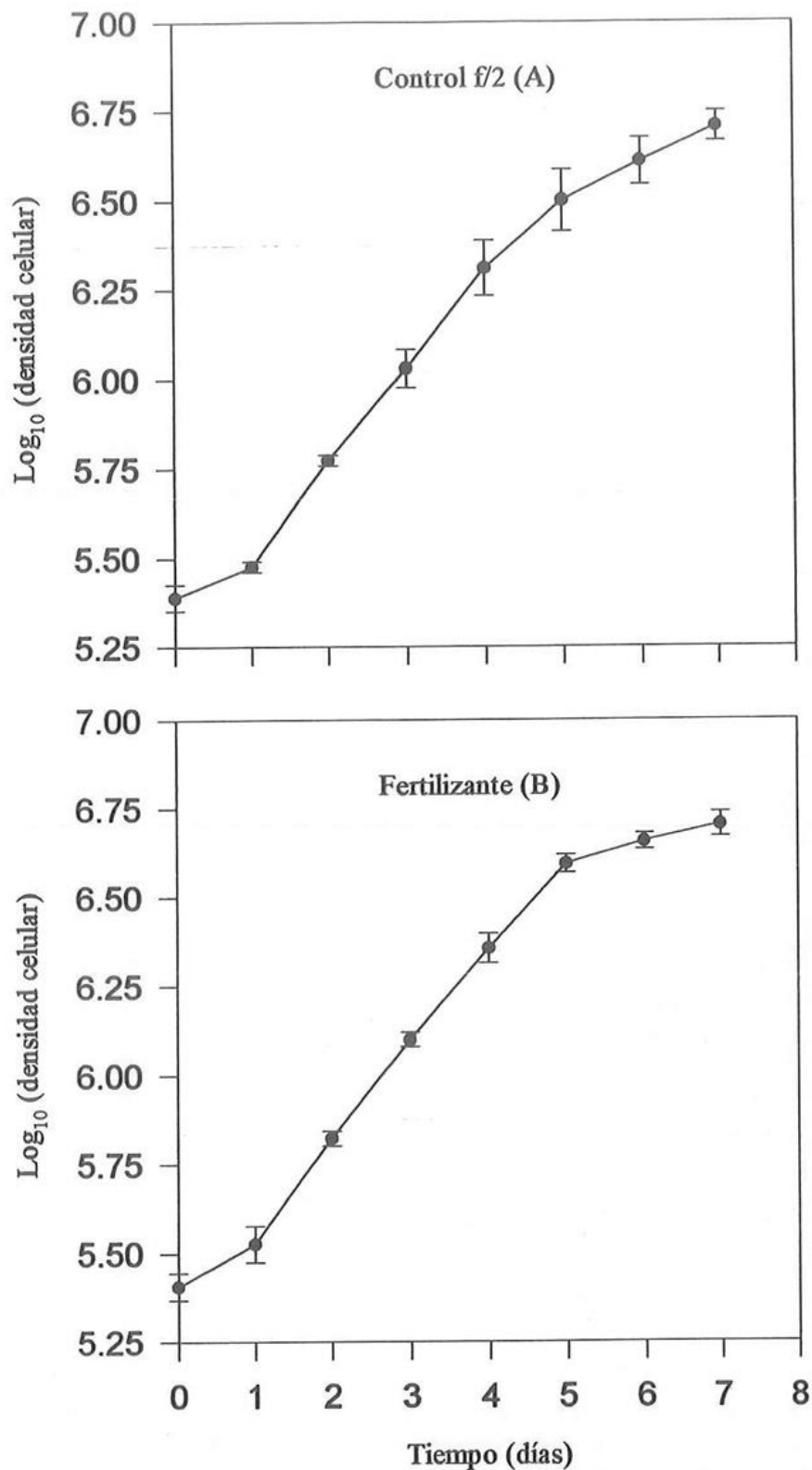


Figura 3. Crecimiento promedio de *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) en 18 L de cultivo con medio f/2 (A) y fertilizante agrícola (B). La barra vertical indica el error estandar.

Tabla V. Valores poblacionales promedio de *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) cultivada en 18 L con medio f/2 (A) y fertilizante agrícola.(B).

A

Tiempo (días)	Concentración (células ml ⁻¹)	μ	TD (días)	D (div/día)	PD (células ml ⁻¹)
0	248 888	-	-	-	-
1	303 332	0.20	3.46	0.28	54 444
2	602 221	0.68	1.01	0.99	298 889
3	1 094 444	0.60	1.15	0.86	492 223
4	2 079 999	0.64	1.08	0.92	985 555
5	3 249 998	0.45	1.44	0.69	1 169 999
6	4 166 664	0.25	2.77	0.36	916 666
7	5 161 109	0.21	3.30	0.30	994 445
	promedio	0.43	2.0	0.62	

B

Tiempo (días)	Concentración (células ml ⁻¹)	μ	TD (días)	D (div/día)	PD (células ml ⁻¹)
0	258 333	-	-	-	-
1	342 777	0.28	2.47	0.40	84 444
2	678 332	0.68	1.01	0.99	335 555
3	1 272 221	0.63	1.10	0.90	593 889
4	2 307 777	0.60	1.15	0.86	1 035 556
5	3 955 554	0.54	1.28	0.78	1 647 777
6	4 583 330	0.14	4.95	0.20	627 776
7	5 191 665	0.13	5.33	0.18	608 335
	promedio	0.42	2.47	0.61	

5.2. COMPOSICION CELULAR PROXIMAL Y CONTENIDO DE CLOROFILA

a

Los resultados del análisis de la composición proximal celular de *Isochrysis aff. galbana* (clone T-ISO) se resumen en la tabla VIA-B. Cuando las células de la fase estacionaria del cultivo en Fernbach fueron transferidas a la condición experimental de 18 L, no se detectaron proteínas por célula al inicio del experimento con la metodología utilizada (Fig. 4A-B). En cambio, se observó un incremento en el contenido de carbohidratos, cuyo valor promedio fue de $12.11 \text{ pg célula}^{-1}$ el cual representa el 57.21% del contenido orgánico de la célula cultivada en medio f/2, contra $10.53 \text{ pg célula}^{-1}$ cuyo porcentaje orgánico fue 50 en el medio con fertilizante agrícola. Del mismo modo, la fracción de lípidos en el medio f/2 y fertilizante agrícola mostró valores promedio de 9.02 (42.76%) y $10.65 (49.95\%) \text{ pg célula}^{-1}$ respectivamente.

Después de 24 horas de cultivo, se denotó un incremento progresivo en el contenido de proteínas por célula hasta el quinto día del cultivo (Fig. 4A-B), encontrándose diferencias significativas ($p > 0.05$) entre el control y experimental para el segundo y sexto día. Contrariamente, el contenido de carbohidratos (Fig. 5A-B) y lípidos (Fig. 6A-B) disminuyen para el mismo período de tiempo señalado arriba. Estos resultados coinciden con los datos de producción de biomasa microalgal, cuya fase de crecimiento exponencial dura hasta el quinto día tanto en medio f/2 como en medio con fertilizante agrícola.

Valores máximos de proteínas por célula fueron obtenidos en el medio constituido por fertilizante agrícola. Estos valores fueron $7.64 \text{ pg célula}^{-1}$ (41.04%) para el cultivo con fertilizante, mientras que el medio f/2 presentó $7.33 \text{ pg célula}^{-1}$ (45.31%). Después del quinto día, la producción de proteínas por célula empieza a disminuir (Fig. 4A-B), en tanto que, los carbohidratos y lípidos se incrementan en el cultivo con fertilizante agrícola (Figs. 5B; 6B). En el medio f/2, los productos de reserva no presentan variación en su concentración (Figs. 5A; 6A).

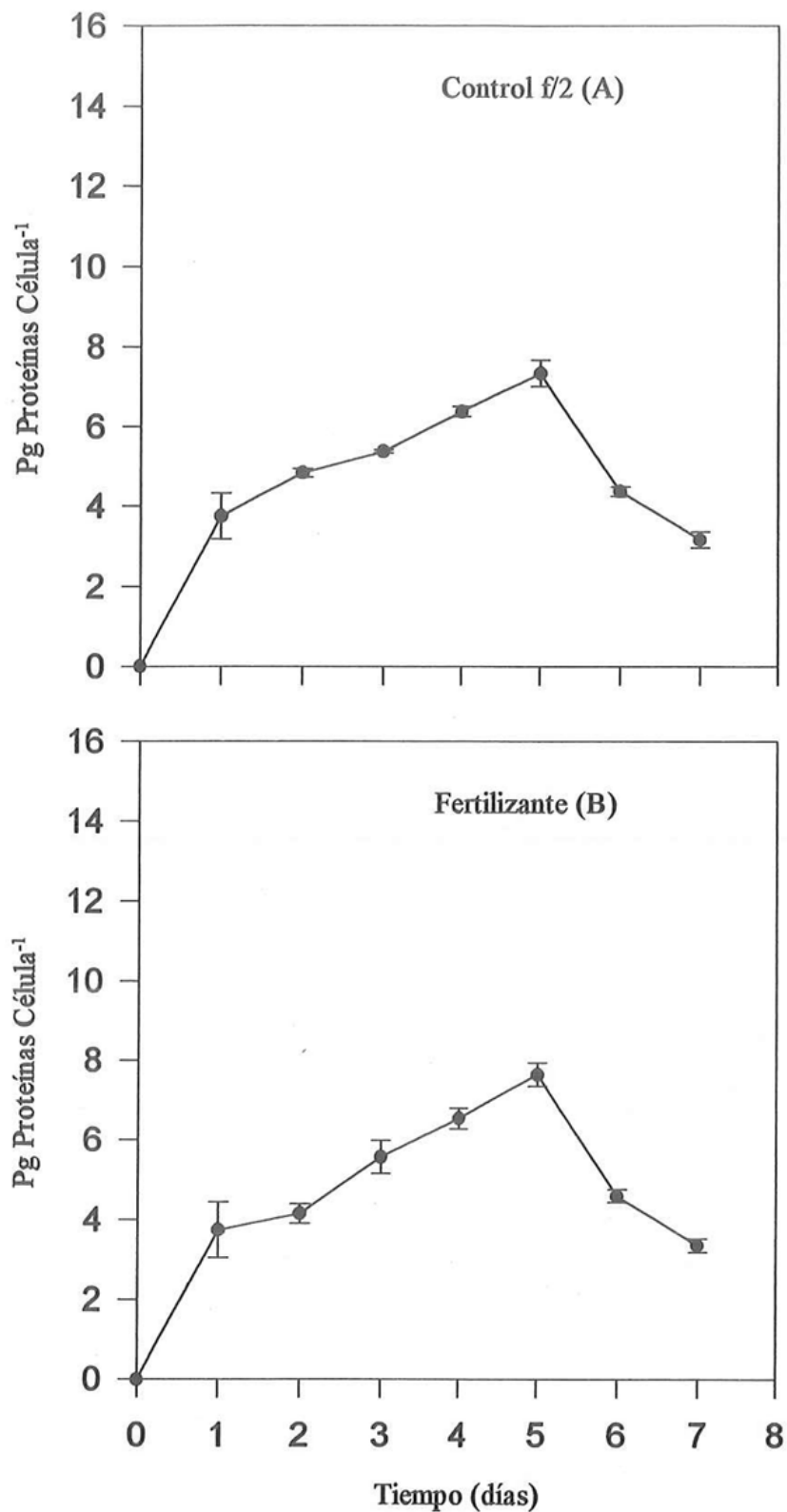


Figura 4. Contenido promedio de proteínas en *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) cultivada en 18 L con medio f/2 (A) y fertilizante agrícola (B). La barra vertical indica el error estandar.

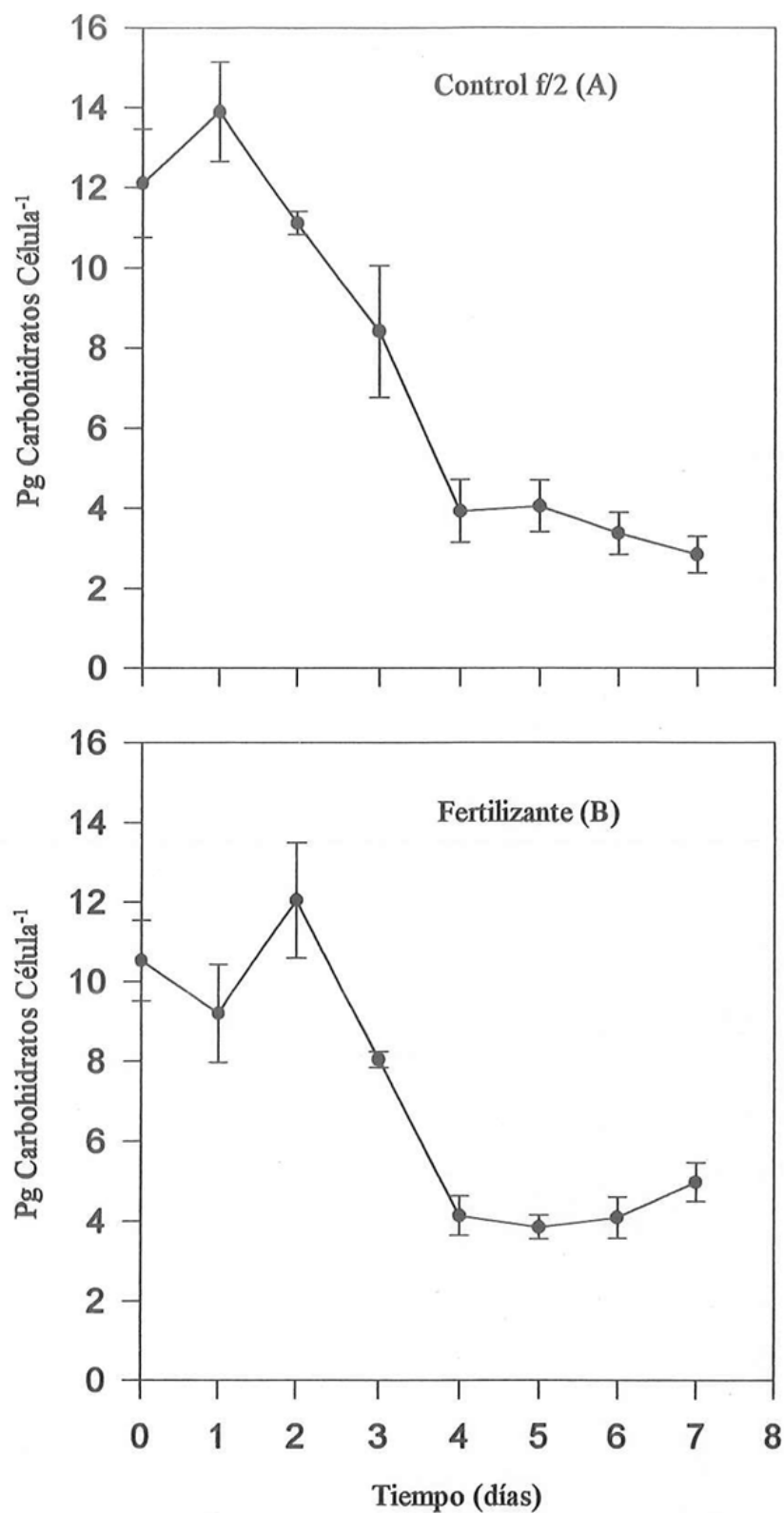


Figura 5. Contenido promedio de carbohidratos en *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) cultivada en 18 L con medio f/2 (A) y fertilizante agrícola (B). La barra vertical indica el error estandar.

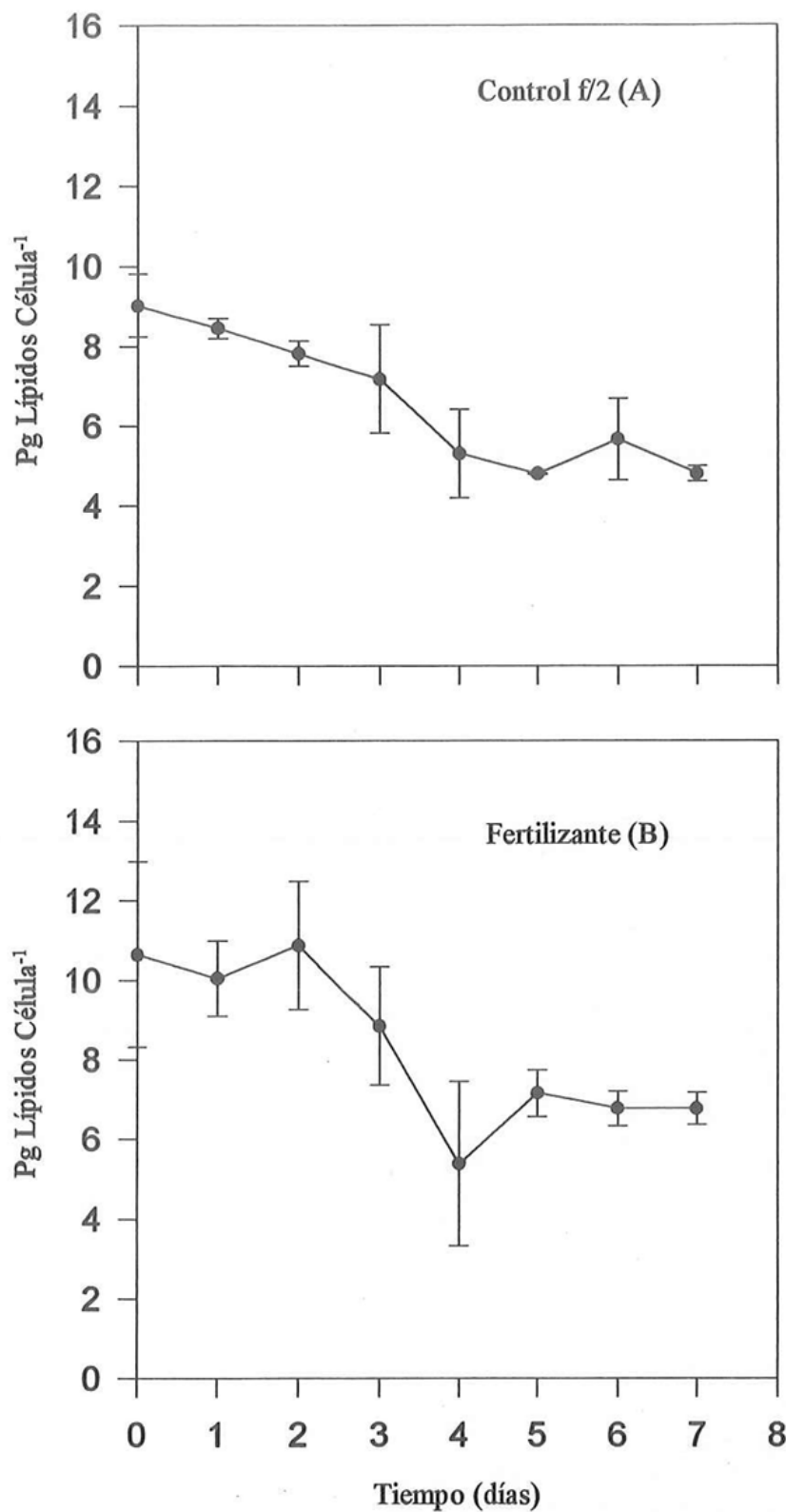


Figura 6. Contenido promedio de lípidos en *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) cultivada en 18 L con medio f/2 (A) y fertilizante agrícola (B). La barra vertical indica el error estandar.

Al analizar el contenido de constituyentes por célula en porciento de materia orgánica presente en cada una de las fracciones antes mencionadas, se observa que en proteínas hubo un incremento marcado hasta el quinto día y posteriormente disminuyó, mientras que carbohidratos y lípidos disminuyeron hasta el quinto día y posteriormente presentan una ligera tendencia a aumentar después del quinto día, (Fig. 7).

El contenido en clorofila *a* por volumen de cultivo y unidad celular se muestran en las figuras 8, 9 y tabla VIIA-B. Durante el período de cultivo, la concentración de clorofila *a* por célula varió de 0.19×10^{-1} hasta 4.24×10^{-1} pg célula⁻¹ en el medio f/2 (control), mientras que, en el cultivo con fertilizante agrícola presentó valores en el intervalo de $0.67-4.16 \times 10^{-1}$ pg célula⁻¹. La producción de clorofila *a* por unidad de volumen de cultivo muestra un incremento exponencial hasta el séptimo día en el cultivo con medio f/2, con valores máximos de producción de $2,188.66$ pg $\times 10^6$ L⁻¹ (Fig. 8A; Tabla VIIA). Esta misma respuesta se observó en el cultivo con fertilizante agrícola pero su duración fue hasta el sexto día, a partir del cual, se denota una disminución en el contenido de clorofila cuyo valor máximo fue $2,164.44$ pg $\times 10^6$ L⁻¹ (Fig. 8B; Tabla VIIB).

El contenido de clorofila *a* por célula en los primeros dos días se incrementa en 3.86×10^{-1} pg célula⁻¹ en la condición experimental de fertilizante agrícola, contra 3.06×10^{-1} pg célula⁻¹ del medio f/2. El mayor contenido en clorofila *a* por célula se obtuvo al cuarto día de cultivo en fertilizante agrícola (Fig. 9B), con valor de 4.63×10^{-1} pg célula⁻¹, en tanto que, en el medio f/2 el valor máximo (4.24×10^{-1} pg célula⁻¹) de clorofila *a* se presentó al séptimo día. La producción de clorofila por célula tiende a disminuir después del cuarto día en el cultivo con fertilizante agrícola, mientras que en el cultivo control (f/2) ocurre lo contrario (Fig. 9A-B). En el mismo período de tiempo indicado arriba, la concentración de feofitina *a* empieza a detectarse (Tabla VIIA-B).

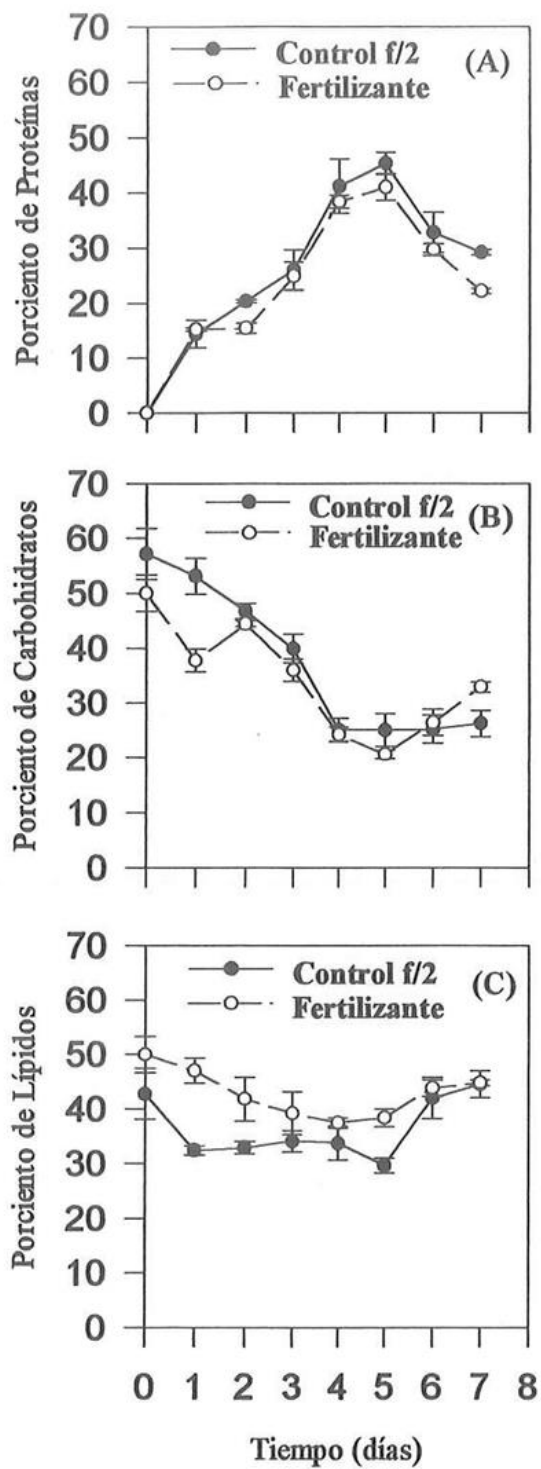


Figura 7. Variación en porcentaje del contenido de proteínas (A), carbohidratos (B) y lípidos (C) por célula en cultivo de 18 L de *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) con medio f/2 y fertilizante agrícola. La barra vertical indica el error estándar

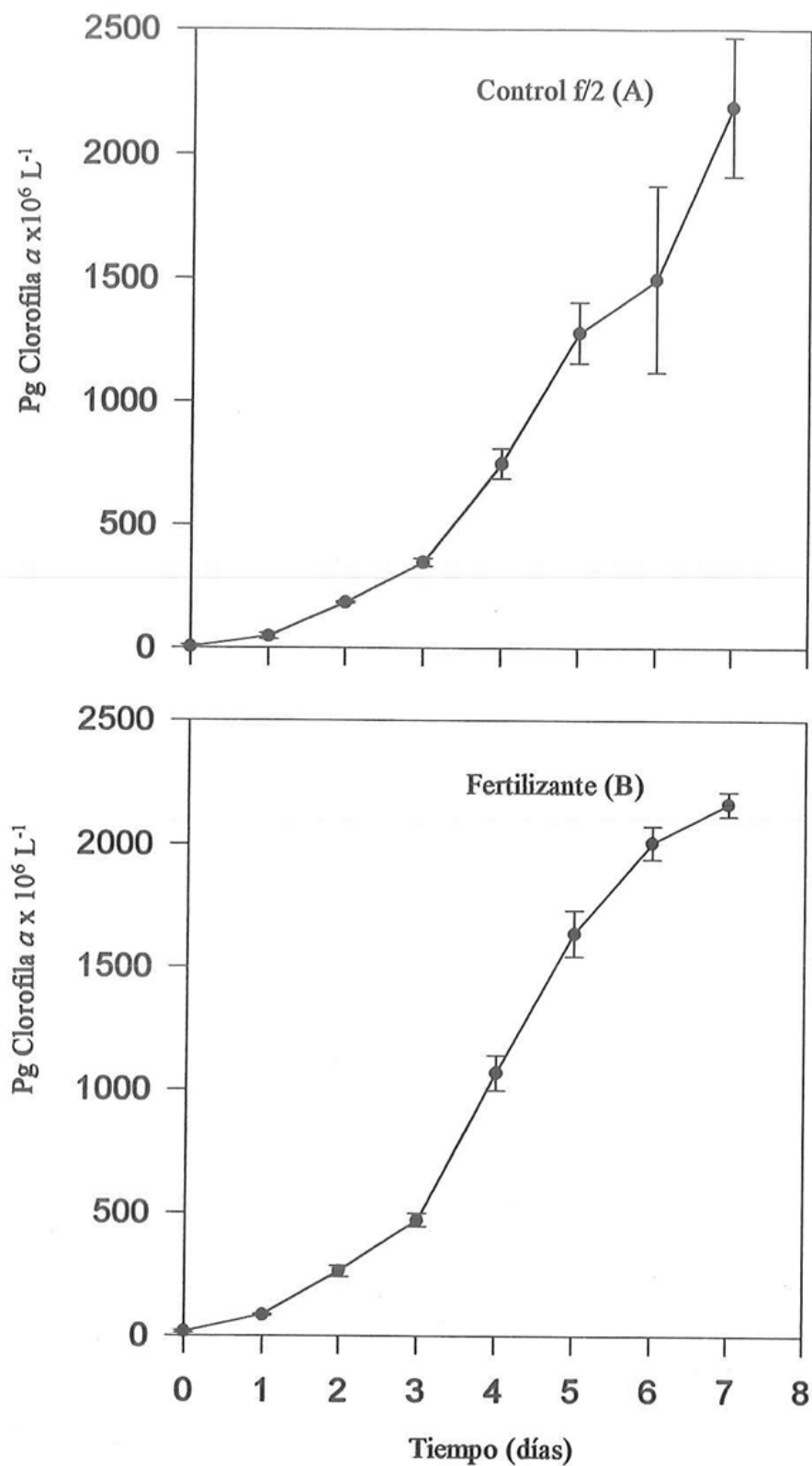


Figura 8. Contenido promedio de clorofila *a* en *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) en cultivo de 18 L con medio f/2 (A) y fertilizante agrícola (B). La barra vertical indica el error estandar.

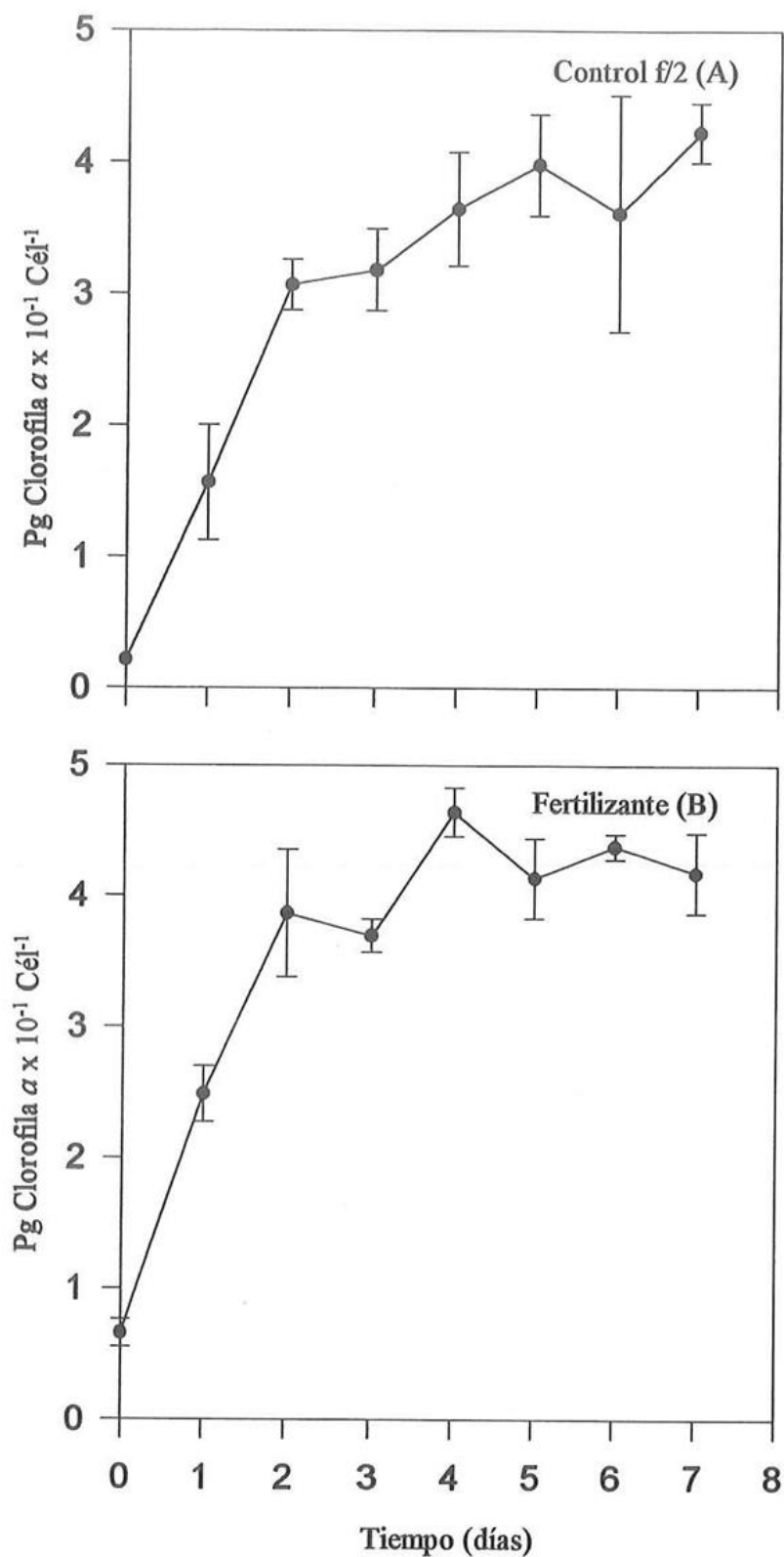


Figura 9. Contenido promedio de clorofila *a* por célula en *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) en cultivo de 18 L con medio f/2 (A) y fertilizante agrícola (B). La barra vertical indica el error estandar.

Tabla VI. Composición proximal celular promedio de *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO), expresada como pg célula⁻¹ y porcentaje de materia orgánica, en cultivo de 18 L con medio f/2 (A) y fertilizante agrícola (B).

A

Tiempo (días)	Proteínas		Carbohidratos		Lípidos	
	pg cél ⁻¹	%	pg cél ⁻¹	%	pg cél ⁻¹	%
0	0	0	12.11	57.21	9.02	42.76
1	3.75	14.40	13.91	53.19	8.45	32.37
2	4.85	20.37	11.12	46.76	7.82	32.86
3	5.38	26.01	8.42	39.91	7.17	34.06
4	6.38	41.19	3.94	25.05	5.31	33.74
5	7.33	45.31	4.06	25.00	4.80	29.66
6	4.38	32.86	3.38	25.15	5.60	41.97
7	3.17	29.25	2.85	26.22	4.81	44.50

B

Tiempo (días)	Proteínas		Carbohidratos		Lípidos	
	pg cél ⁻¹	%	pg cél ⁻¹	%	pg cél ⁻¹	%
0	0	0	10.53	50.05	10.65	49.95
1	3.74	15.25	9.20	37.34	11.60	46.99
2	4.15	15.41	12.04	44.49	10.87	41.79
3	5.57	24.88	8.05	35.93	8.85	39.17
4	6.54	38.36	4.14	24.19	6.38	37.42
5	7.64	41.01	3.84	20.60	7.16	38.34
6	4.59	29.73	4.09	26.40	6.78	43.84
7	3.35	22.22	4.98	32.91	6.77	44.85

Tabla VII. Concentración promedio de clorofila *a* y feofitina *a* por volumen de cultivo y unidad celular en *Isochrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) cultivada en 18 L con medio f/2 (A) y fertilizante agrícola (B).

A

Tiempo (días)	Clorofila <i>a</i>		Feofitina <i>a</i>	
	pg x 10 ⁶ L ⁻¹	pg x 10 ⁻¹ cél ⁻¹	pg x 10 ⁶ L ⁻¹	pg x 10 ⁻³ cél ⁻¹
0	4.88	0.19	-	-
1	47.32	1.56	-	-
2	184.86	3.06	-	-
3	346.40	3.16	-	-
4	749.25	3.60	15.55	7.4
5	1279.64	3.93	-	-
6	1496.06	3.59	14.22	3.4
7	2188.66	4.24	50.21	9.7

B

Tiempo (días)	Clorofila <i>a</i>		Feofitina <i>a</i>	
	pg x 10 ⁶ L ⁻¹	pg x 10 ⁻¹ cél ⁻¹	pg x 10 ⁶ L ⁻¹	pg x 10 ⁻³ cél ⁻¹
0	17.32	0.67	-	-
1	85.09	2.48	-	-
2	261.97	3.86	-	-
3	470.61	3.69	-	-
4	1069.88	4.63	8.60	3.7
5	1637.59	4.13	15.55	3.9
6	2008.23	4.38	22.88	4.9
7	2164.44	4.16	74.87	14.4

5.3. CONSUMO DE FOSFATO, NITRATO Y AMONIO

La concentración de fosfato en el medio de cultivo y su consumo por *Isochrysis aff. galbana* (Clone T-ISO), durante siete días de cultivo, se presentan en la figura 10A; tabla VIIIA. La primera parte (tres días) del cultivo con medio *f/2*, estuvo caracterizada por un marcado enriquecimiento de fosfato (42.02 μM). Después de 72 horas de cultivo, se observó que la concentración de fosfato disminuye de 42.01 a 38.15 μM , presentando un máximo en el consumo de fosfatos de 30.24 μM en el 6 día de cultivo. Cuando las células estuvieron creciendo en el medio constituido por fertilizante agrícola (Fig 10B; Tabla VIIIB), el fosfato disminuye con el transcurso del tiempo, encontrando un máximo en el consumo a partir del tercer día que corresponde a 34.22 μM , el cual representa el 81% del contenido inicial de fosfato. A partir de este día, el fosfato permaneció invariable hasta el séptimo día de cultivo.

En relación al consumo de nitrato se encontró que *I. aff. galbana* (Clone T-ISO) puede utilizar nitrato o amonio para su crecimiento, siendo este último el que consume con mayor rapidez. El consumo de nitrógeno en forma de nitrato y amonio en medio *f/2* y fertilizante agrícola se indica en la figura 11A-B. En la figura 11A, se observa que conforme transcurre el tiempo de cultivo, la concentración inicial de 858.4 μM NO_3 disminuye a 109.5 μM en un período de siete días, producto del incremento en el número de células en el cultivo. Se encontró que el consumo promedio diario en la condición *f/2* fue 106.9 μM , mientras que, en el cultivo con fertilizante agrícola el consumo de nitrato fue de 3.8 a 7.6 μM durante los primeros cuatro días (Fig. 11B; Tabla VIIIB). En cambio, se observó que durante este mismo tiempo, el amonio disminuyó de 377.19 a 35.84 μM . determinandose que el consumo promedio diario de amonio fue mayor en las primeras 24 horas (154.53 μM) después de la inoculación, seguido de un agotamiento conforme transcurrió el tiempo de cultivo. A partir de 35.8 μM de amonio residual el consumo de nitratos aumenta y conforme disminuye el amonio, el nitrato también disminuye,

detectándose valores mínimos de 1.36 μM de amonio contra 280.6 μM de nitrato para el séptimo día de cultivo con fertilizante agrícola (Fig. 11B; Tabla VIII B).

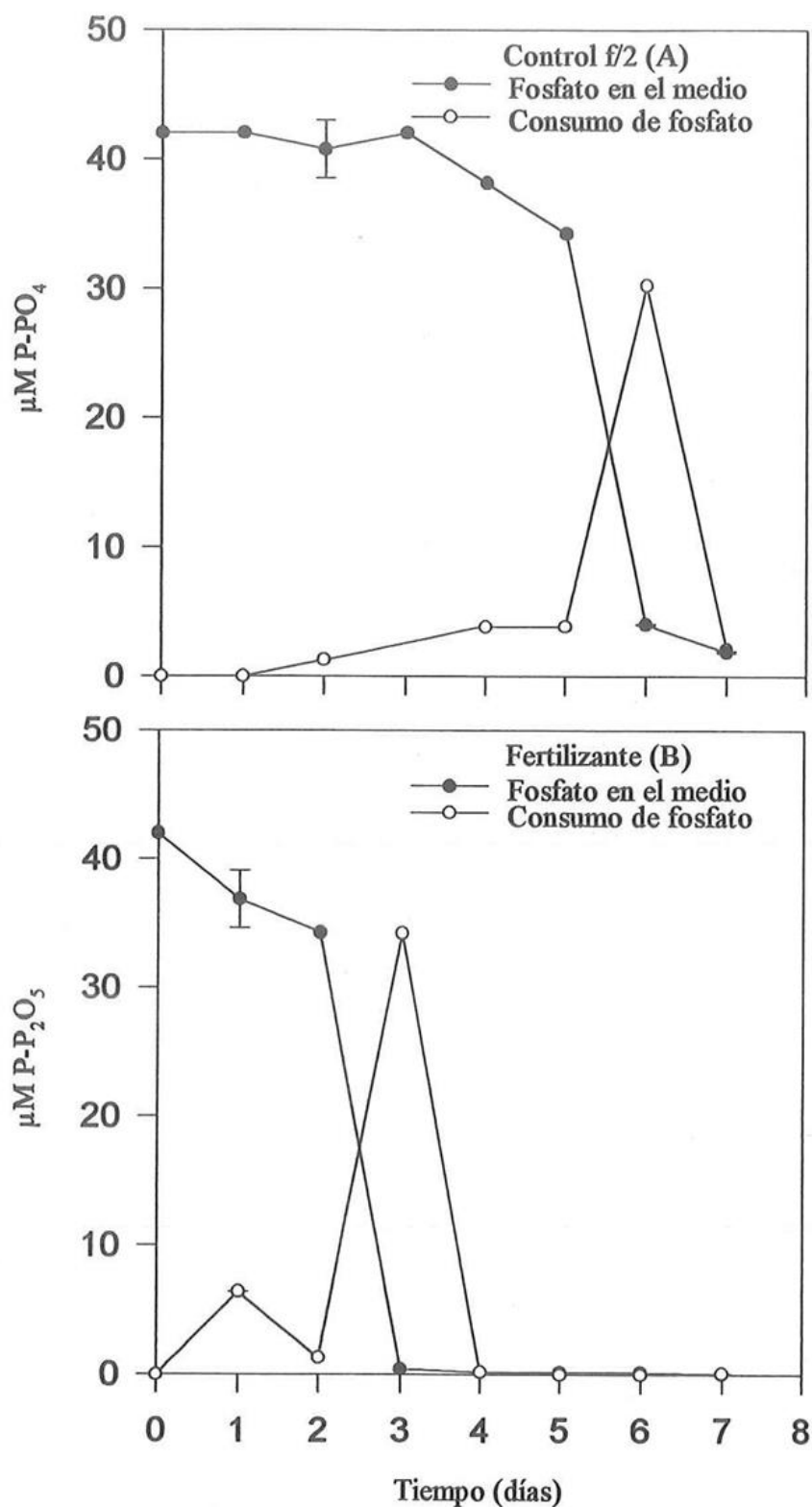


Figura 10. Concentración promedio de fosfato en el medio y su consumo por *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) en cultivo de 18 L con medio f/2 (A) y fertilizante agrícola (B). La barra vertical indica el error estándar.

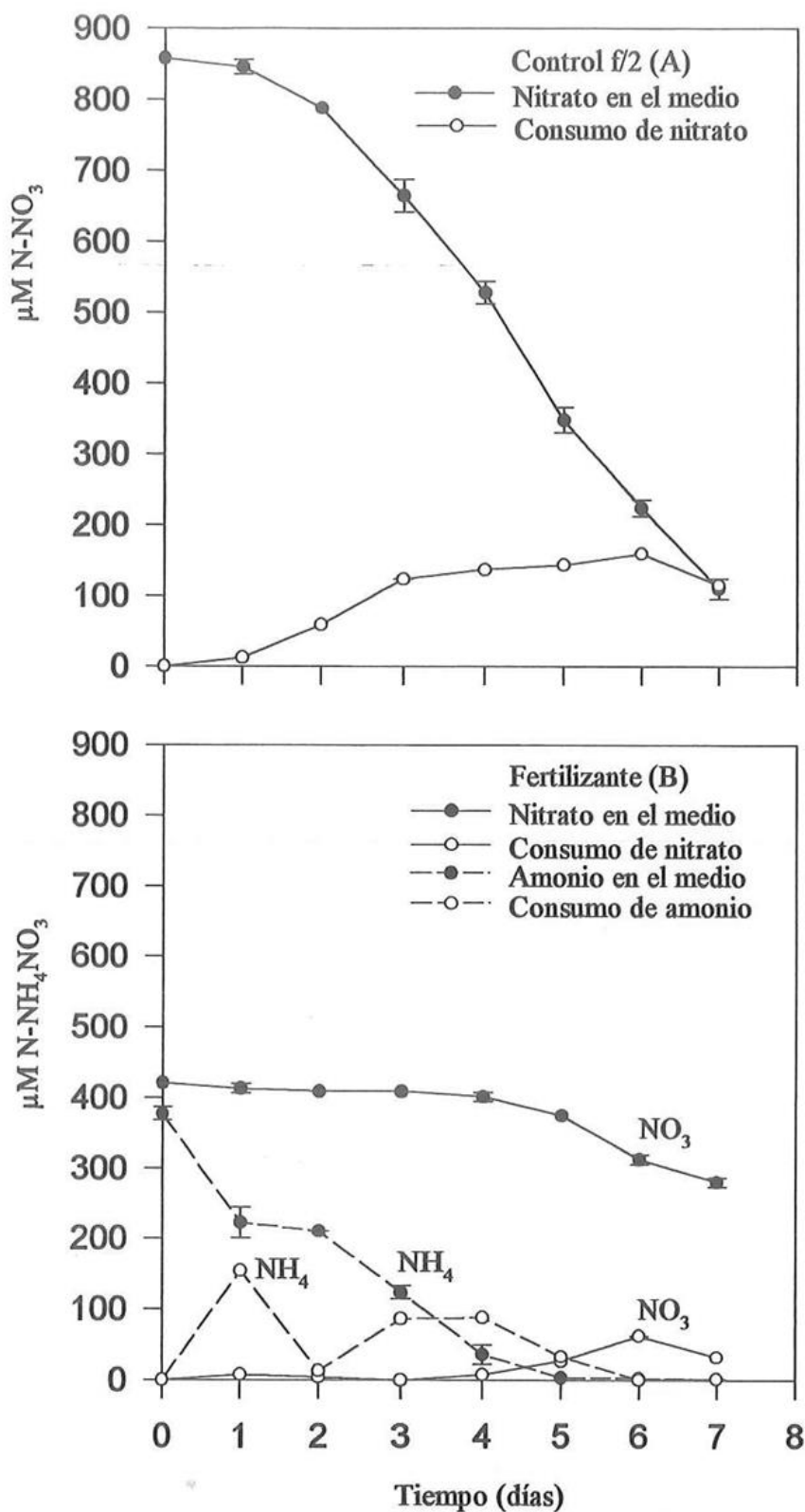


Figura 11. Concentración promedio de nitrógeno en el medio y su consumo por *Isochrysis aff. galbana* (Clone T-ISO) en cultivo de 18 L con medio f/2 (A) y fertilizante agrícola (B). La barra vertical indica el error estándar.

Tabla VIII. Consumo promedio diario de nutrientes por *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) en cultivo de 18 L con medio f/2 (A) y fertilizante agrícola (B).

A

Tiempo (días)	Fosfato residual (μM)	Consumo fosfato (μM)	Nitrato residual (μM)	Consumo nitrato (μM)	Consumo de nitrógeno del nitrato (μg)
0	42.01	-	858.4	-	-
1	42.01	-	846.2	12.2	178.8
2	40.73	1.28	787.7	58.5	819.0
3	42.01	-	664.5	123.2	1,724.8
4	38.15	3.86	527.6	136.9	1,916.6
5	34.27	3.88	348.2	143.4	2,007.6
6	4.03	30.24	224.3	159.9	2,238.6
7	1.91	2.12	109.5	114.8	1,607.2

B

Tiempo (días)	Fosfato residual (μM)	Consumo fosfato (μM)	Nitrato residual (μM)	Consumo nitrato (μM)	Consumo de nitrógeno del nitrato (μg)	Amonio residual (μM)	Consumo amonio (μM)	Consumo de nitrógeno del amonio (μg)
0	42.02	-	420.5	-	-	377.19	-	-
1	35.56	6.45	412.9	7.6	106.4	222.66	154.53	2,163.42
2	34.27	1.29	409.1	3.8	53.2	210.09	12.57	175.98
3	0.42	34.22	409.1	-	-	123.84	86.25	1,207.5
4	0.21	0.21	401.5	7.6	106.4	35.84	88.00	1,232.0
5	0.17	-	374.9	26.6	372.4	3.12	32.72	458.08
6	0.17	-	312.5	62.4	873.6	2.74	0.38	5.32
7	0.06	0.11	280.6	31.9	446.6	1.36	1.38	19.32

Los resultados del cálculo de ionización de amonio a amoniaco en función del pH, se presentan en la tabla IX, donde se observa un incremento en la concentración de amoniaco para los cuatro primeros días, mostrando un máximo de 15.48 μM de amoniaco para el tercer día de cultivo en fertilizantes que representa el 7.3%. Después del cuarto día la cantidad de amonio que se ioniza en amoniaco no es significativa, encontrándose que del total del amonio presente (377.19 μM) solo 54.5 μM se ionizan en amoniaco en función del pH.

Tabla IX. Ionización de amonio a amoniaco en función del pH en 18 L de cultivo de *Isochrysis aff. galbana* (Clone T-ISO) con fertilizante agrícola.

Tiempo (días)	pH	NH ₄ (μM)	NH ₃ (μM)
0	-	-	-
1	7.8	377.19	11.74
2	8.1	222.09	13.80
3	8.17	210.09	15.48
4	8.27	123.84	11.48
5	8.35	35.84	1.14
6	8.37	3.12	0.36
7	8.37	2.74	0.31
8	8.47	1.36	0.19

6. DISCUSIÓN

Las principales variables que influyen en el cultivo y producción de *Isochrysis aff galbana* (clone T-Iso) son: temperatura, salinidad, luz y pH. Los tres primeros se mantuvieron constantes, dado que, variaciones en más de uno produce interrelaciones en la respuesta microalgal. Por ejemplo, se ha encontrado que la temperatura junto con la luz son factores que determinan el tiempo de duplicación de la especie. En los experimentos realizados, la temperatura se mantuvo en el intervalo óptimo reportado para *I. galbana* (Kinne, 1976). Estudios realizados por Dohler y Biermann (1985) han demostrado que la asimilación de nitrógeno en forma de nitrato y amonio es afectada por la salinidad. En este estudio la salinidad se mantuvo constante en 33‰ la cual se considera óptima para el cultivo de *I. galbana* (Fabregas *et al.*, 1985). Referente a la luz, esta se mantuvo en $110.32 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Investigaciones realizadas por Syrett (1981), han demostrado que la reducción de nitrato a nitrito depende estrictamente de la luz y normalmente cesa tan pronto como la luz es suspendida. La luz también tiene efectos sobre la producción primaria como un agente que modifica los requerimientos de nutrientes, así como también tiene efecto sobre la naturaleza de los productos de la fotosíntesis. En todos los cultivos, el medio fue estabilizado con TRIS y el pH en el medio ensayado se mantuvo en el intervalo óptimo (7.7-8.5) para el crecimiento de *I. aff. galbana* (T-ISO). Ensayos llevados a cabo con varias especies de microalgas mostraron que las variables tales como salinidad, concentración de nutrientes, luz afectan la velocidad de crecimiento tanto en forma individual como de manera interactiva (Terlizzi y Karlander, 1980).

6.1. CRECIMIENTO MICRO-ALGAL

Entre los diferentes componentes que conforman un medio de cultivo, la fuente y concentración de nutrientes puede causar cambios importantes en el crecimiento de especies microalgales (Kaplan *et al.*, 1986). En el presente estudio al comparar el crecimiento de los cultivos entre los medios con fertilizante agrícola y medio f/2 en

volumen de 150 ml, se encontró que no existen diferencias significativas al 95% de confiabilidad, obteniéndose concentraciones celulares similares durante los siete días de cultivo (Fig. 1A-B). Lo anterior indica que el medio de cultivo experimental con fertilizante no afectó la tasa de crecimiento de *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) debido a que, en ambos medios de cultivo el crecimiento exponencial se produjo en el mismo período de tiempo (1-4 días), con tasa de crecimiento y divisiones celulares por día similares (Tabla IIIA-B). Este medio puede sustituir al medio *f/2* en los volúmenes pequeños que tradicionalmente se utilizan para el mantenimiento de cepa de *I. aff. galbana* (T-ISO) así como la producción de inóculo para grandes volúmenes. Aunque, la efectividad del medio experimental se midió en este nivel de cultivo por la densidad celular de los cultivos, sin embargo, este medio también favorece a las células en cuanto a su composición, ya que, los resultados del experimento se observa que el medio experimental con fertilizante no afectó la composición bioquímica de (T-ISO) (Tabla VIA-B). Los cultivos realizados en Fernbach estuvieron limitados por nitrógeno y fósforo para su crecimiento, con el propósito de que las células agotaran las reservas endógenas de estos nutrientes y conocer la relación entre el consumo de nutrientes y la biomasa microalgal en volúmenes de 18 litros. Se encontró que la producción en biomasa que se obtuvo con fertilizante agrícola fue mayor que la obtenida con medio *f/2* (Fig. 2A-B). Esta diferencia se debe principalmente a que cuando se suministra al cultivo nitrato y amonio, este último es consumido más rápido (Wheeler, 1983), lo cual se tradujo en mayor tasa de crecimiento y divisiones por día (Tabla IVA-B). Sin embargo, ambos cultivos entran al ciclo de crecimiento estacionario con baja densidad celular producto de la limitación de nutrientes. Esto también ha sido reportado previamente por Wikfors (1986), quien indica que bajas concentraciones de nitrógeno en forma de nitrato de sodio (0.913 mM) limitan el crecimiento de especies planctónicas en cultivo. Aunque el consumo de nitrógeno y fósforo no fue medido en los experimentos de limitación, las subsecuentes determinaciones en el nivel de cultivo superior indican que después de siete días de crecimiento algal,

mostraron que *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) consume 744.9 μM de un total de 854.4 μM de nitrato y virtualmente todo el fosfato contenido en el medio es consumido (Tabla VIIIA-B). Esta especie algal acumuló los carbohidratos y lípidos al final del período del cultivo.

Estudios realizados por Fabregas *et al.* (1985; 1986 a, b), han mostrado que variaciones en la composición del medio de cultivo pueden provocar cambios importantes en la tasa de crecimiento y en la composición bioquímica de las microalgas. En el presente estudio, lo anterior no ocurrió ya que, al utilizar fertilizante agrícola para el cultivo en volumen de 18 litros, la producción que se obtuvo fue prácticamente la misma que la obtenida con medio f/2 (Fig. 3A-B), aunque se observó que del día uno al sexto, la media muestral de la concentración de células en fertilizante era mayor que con el f/2. Esto implica, que el cultivo puede ser utilizado ya sea, para alimentación de organismos fitoalimentadores o como inóculo para niveles de producción de mayor volumen. Lo antes expuesto, demuestra que la fuente y concentración de elementos que conformaron el medio de cultivo experimental reunió los requerimientos de sales inorgánicas necesarias para promover el crecimiento de *I. aff. galbana* (T-ISO) hasta el séptimo día. Además, no se presentaron diferencias significativas al 95% de confianza en la tasa de crecimiento de T-ISO entre el cultivo experimental y control f/2 (Tabla VA-B).

6.2 COMPOSICIÓN CELULAR PROXIMAL Y CONTENIDO DE CLOROFILA

a

Respecto a la composición bioquímica de *I. aff. galbana* (T-ISO), la concentración de proteínas, carbohidratos y lípidos al inicio del experimento (día cero) en el cultivo con fertilizante agrícola y medio f/2, las células mostraron un alto contenido de carbohidratos y lípidos. Aunque, no se detectó contenido de proteína para el inicio del experimento, se sabe que fisiológicamente no es posible la supervivencia de células sin proteínas. Esto se atribuye a los niveles de detección de la metodología utilizada (Fig. 4A-B).

La alta proporción de productos de reserva (Tabla VIA-B), se debe a que, la población algal utilizada como inóculo estuvo limitada por nitrógeno y fósforo y aunque las células permanecen metabólicamente activas en el cultivo, no se dividen, pero frecuentemente continúan fijando carbono, lo cual ocasiona que continúen acumulando carbohidratos y/o lípidos (Antia *et al.*, 1963; Myklestad, 1974).

Al reestablecer la concentración de nutrientes, el contenido de proteínas (expresado como peso por célula o como porcentaje, Fig. 4A-B; Fig. 7), mostró un incremento con el desarrollo del cultivo, con valores máximos de 7.33 pg cél⁻¹ (45.31%) y 7.64 pg cél⁻¹ (41.01%) al quinto día de cultivo para el medio control f/2 y el experimental respectivamente. El contenido de proteínas en el medio f/2 es mayor y significativo ($p > 0.05$) respecto al medio experimental solo en el día dos, en tanto que, en el sexto día ocurrió lo contrario. Esto se compara favorablemente con lo obtenido por Whyte (1987) quien encuentra una tendencia similar para *I. aff. galbana* (T-ISO) y los valores obtenidos son de 33.44% de proteína para la fase exponencial y 42.31% para la estacionaria. También, Brown (1991) encuentra para el clon T-ISO un contenido proteico de 6.8 pg cél⁻¹. De igual forma, Herrero *et al.* (1991) determinan valores de 9.57 pg cél⁻¹ de proteínas para *I. galbana* cultivada en medio con nutrientes comerciales (algal 1) y 8.3 pg cél⁻¹ con medio f/2.

Tales comparaciones muestran que los resultados obtenidos en este estudio, son similares con los encontrados en la literatura y confirma la hipótesis de que la fuente y concentración de fertilizante agrícola produce la misma biomasa y cantidad de proteína que el medio f/2. En relación al contenido de carbohidratos y lípidos, se determinó que el contenido de carbohidratos es mayor en el control y significativo ($p > 0.05$) respecto al experimental para el primer día, mientras que, para el séptimo día se estimó lo contrario. Lo mismo ocurrió para lípidos, donde, el contenido es mayor y significativo ($p > 0.05$) entre experimental y control, para el primer y quinto día del cultivo. Ambos constituyentes

disminuyeron durante la fase de crecimiento exponencial, la cual terminó al quinto día en los dos tratamientos (Tabla VA-B).

En la última parte de la fase exponencial, se denotó un ligero incremento en carbohidratos y mayor en lípidos. Estos resultados sugieren que cambios en la composición bioquímica celular están influenciados por la concentración de nutrientes en el medio. Se ha encontrado, que los carbohidratos son reserva intermedia en algunas algas (Marker, 1965), debido a que a veces son requeridos cuando el nitrógeno llega a ser limitante para las enzimas esenciales en la síntesis de lípidos. Consecuentemente en cualquier condición donde las proteínas disminuyen en *I. aff. galbana* (T-ISO) ambos carbohidratos y lípidos se incrementan (Fig. 7). Esto también ha sido observado por Helm y Laing (1987) quienes en condiciones similares de cultivo, cuantifican para T-Iso un contenido total de 21.1% de lípidos; Fernandez-Reiriz *et al.* (1989) determinan 3.4 y 5.3 $\mu\text{g c\acute{e}l}^{-1}$ de carbohidratos y lípidos para *I. galbana* y Brown (1991), para *I. aff. galbana* (T-ISO) obtiene valores de 1.8 y 5.9 $\mu\text{g c\acute{e}l}^{-1}$ de carbohidratos y lípidos respectivamente, cuyo valor representa el 12.9 y 23%. Estos resultados son consistentes con lo encontrado en este trabajo y claramente muestran una relación entre la concentración de nutrientes con la composición bioquímica y el estado fisiológico de las células.

La clorofila *a* es otro de los componentes celulares que sirven como índice confiable para estimar la biomasa de microalgas en cultivo. Los resultados presentados en esta investigación indican que existe un paralelismo entre los valores de clorofila *a* por volumen de cultivo, peso de constituyente por célula y el crecimiento poblacional de *I. aff. galbana* (T-ISO) (Fig. 8, 9). Durante el cultivo, se observó un incremento exponencial en el contenido de clorofila conforme transcurrió el tiempo, encontrándose valores máximos de 2188.6 $\mu\text{g} \times 10^6 \text{ L}^{-1}$ ($4.24 \times 10^{-1} \mu\text{g c\acute{e}l}^{-1}$) en medio f/2 y 2164.44 $\mu\text{g} \times 10^6 \text{ L}^{-1}$ ($4.16 \mu\text{g} \times 10^{-1} \text{ c\acute{e}l}^{-1}$) con fertilizante agrícola. El contenido de clorofila no solo depende de la densidad celular y su contenido de pigmento en cada condición de cultivo, sino que también, depende de la irradiancia ya que, al disminuir esta en el cultivo, existe un

aumento en el contenido de clorofila por célula. Lo anterior, se explica en base al proceso de fotoadaptación fitoplanctónica, el cual consiste en aumentar el contenido de pigmentos fotosintéticos al disminuir la irradiancia. Esto ocurrió en los cultivos en los cuales se registró $1.148 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiancia al interior del recipiente al final del experimento (séptimo día). Observaciones similares han sido realizadas por López-Muñoz *et al.* (1992) quienes encuentran que a baja irradiancia el contenido de clorofila es mayor que a irradiancia de $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, donde obtienen valores de $0.71 \text{ pg célula}^{-1}$. Aunque estos autores obtuvieron mayor contenido de clorofila *a* por célula, también analizaron muestras de mayor densidad celular ($26.59 \times 10^6 \text{ células ml}^{-1}$), en cambio la densidad celular obtenida en esta investigación es cinco veces menor y su contenido promedio de clorofila *a* al séptimo día para la condición f/2 y fertilizante agrícola fue 0.42 y $0.41 \text{ pg célula}^{-1}$, que representa la mitad del valor antes citado. Por su parte, Brown (1991), determinó para el clon T-ISO $0.29 \text{ pg célula}^{-1}$ de clorofila *a* al cultivar en ciclo de 12:12 luz:oscuridad e irradiancias entre $70\text{-}80 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En cambio, Fabregas *et al.* (1985), al cultivar *I. galbana* con regimen de 12:12 luz-oscuridad y variando la concentración de nitrato encontró que a concentración de 64 mM obtiene $0.09 \text{ pg célula}^{-1}$ de clorofila *a*. Los resultados analizados en esta investigación, indican que a partir del quinto día de cultivo, la producción de clorofila no es significativa en relación a los primeros días. El incremento registrado en el contenido de feofitina *a*, refleja cambios en el estado fisiológico (envejecimiento) de las células producto de las condiciones del cultivo. Sin embargo, al comparar los resultados de este trabajo con los realizados por Fabregas *et al.* (1985), Brown (1991), se encontró que los valores de clorofila *a* obtenidos son mayores (Tabla VIIA-B). Investigaciones realizadas por White y Payne (1987) señalan que cambios en el contenido de clorofila no son necesariamente indicativos de cambios en la biomasa o viceversa. El nitrógeno un componente de la molécula de la clorofila, puede estimular la producción de clorofila sin afectar el crecimiento.

6.3. CONSUMO DE FOSFATOS, NITRATOS Y AMONIO

Los resultados de los experimentos sobre el consumo de nutrientes presentados aquí, muestran que el consumo de fosfato durante cuatro días de cultivo en el medio f/2 es solo 3.86 μM , en cambio en el cultivo con fertilizante agrícola, el consumo inició desde el primer día y es 10 veces mayor para el mismo período de tiempo (Fig. 10A-B; Tabla VIIIA-B). Esta diferencia en el consumo de este nutriente en ambos tratamientos, puede ser explicada de acuerdo a lo siguiente: Cuando las células son introducidas en un medio nuevo para su crecimiento, es de esperarse un período de adaptación, en el cual, pueden vivir y reproducirse utilizando fuentes endógenas de fosfato, los cuales fueron acumulados como polifosfatos en granulos citoplasmáticos. Esto indica, que no todo el nutriente disponible en el medio de cultivo limita el crecimiento, sino también el reservorio interno de la célula. Cuando *I. aff. galbana* (T-ISO), agotó su reserva de fosfato, e incrementó su biomasa en el cultivo, la demanda en el consumo de fosfato se incrementó (Fig. 10A-B) y este consumo depende también de la concentración interna de la célula.

Al correlacionar las curvas de crecimiento de *I. aff. galbana* (T-ISO) (Fig.3A-B) con el consumo de fosfato en ambos medios de cultivo, se encontró, que después del quinto día, la tasa de crecimiento de T-ISO y su contenido de proteína disminuyen, mientras que, los carbohidratos y lípidos empiezan a aumentar al final del período de cultivo (Tabla VIA-B), tanto en el medio control como experimental. Esto sugiere que, el reservorio de polifosfatos regula directa o indirectamente la tasa de crecimiento. En concentraciones limitantes de fosfato, no existe división celular, en cambio, existe un incremento en el volumen celular, donde todos los polifosfatos son movilizados para la síntesis de macromoléculas tales como DNA, RNA y proteínas (Rhee, 1973; 1974).

En el caso del consumo de nitrato, se puede observar en la figura 11A; tabla VIIIA, que la concentración de nitrato en el medio control disminuye conforme transcurre el tiempo del cultivo. Durante los primeros tres días el consumo de nitrato fue solo 193.9 μM , en cambio para los cuatro días restantes su consumo se incrementó en 555 μM .

Cuando nitrato y amonio son utilizados juntos en el cultivo (Fig. 11B; Tabla VIIB), se observó que no existe un consumo significativo de nitrato, caso contrario ocurre con el amonio el cual se consume ocho veces más rápido que el nitrato en un período de tiempo de cinco días. Esto implica que, algún tipo de control intracelular regula el consumo de nitrato y su posterior reducción en el interior de la célula. Trabajos previos citan preferencia en el consumo de amonio sobre el nitrato, debido al menor esfuerzo energético requerido para su consumo por las microalgas y también se ha demostrado que el consumo de nitrato es reducido en presencia de amonio en el medio, debido a que la nitrato reductasa activa no esta formada mientras el amonio esté presente como la fuente mayor de nitrógeno y la nitrato reductasa activa es formada cuando las células agotan el amonio del medio de cultivo (Syrett, 1981; Wheeler, 1983). Esto mismo puede ser observado en los resultados presentados en la figura 11B; tabla VIIB, donde al quinto día de cultivo, la concentración de amonio presentó valores de $3.12 \mu\text{M}$, a partir del cual, se inició el consumo de nitrato y conforme avanza el tiempo de cultivo, disminuye la concentración de amonio hasta $1.36 \mu\text{M}$, con un aumento en el consumo de nitrato. Estos resultados son similares a los reportados por Dortch *et al.* (1991) quienes encontraron que altas concentraciones de amonio, inhiben el consumo de nitrato.

Por lo que se refiere al consumo de nitrógeno, los resultados claramente indican que en el medio f/2 la biomasa microalgal de *I. aff. galbana* (Clone T-ISO) consume mayor cantidad de nitrógeno comparado con el medio constituido por fertilizantes agrícolas (Tabla VIII). Sin embargo, al final del experimento en ambos cultivos se obtienen densidades celulares similares. Las diferencias probablemente se deben a que el consumo no necesariamente denota necesidades metabólicas ya que, del total de nitrógeno consumido, parte de este es convertido a nitrógeno proteico y parte es almacenado en la célula, debido a que la velocidad de síntesis de proteínas es menor que la velocidad de captación, lo cual permite que siempre exista un reservorio de este elemento en la célula. Además, los calculos de ionización del amonio (NH_4) a amoniaco (NH_3) indican que del

total de amonio utilizado (377.19 μM) solo 54.5 μM son ionizados a amoniaco por cambios en la condición de protones en el medio (Tabla IX). Estudios sobre acumulación de nitrógeno en microalgas marinas han sido realizados por Dortch (1992), quién encuentra que diatomeas en cultivos con alta concentración de nitrógeno, las células consumen abundante nitrógeno y solo parte de este es convertido en proteína.

Aunque los resultados descritos arriba indican un consumo preferencial de amonio por parte de *I. aff. galbana* (T-ISO), esto no representó ninguna ventaja particular, ya que se obtuvieron tasas de crecimiento y producción en biomasa similares en ambos tratamientos e inclusive el contenido bioquímico de T-ISO presentó la misma tendencia y concentración al utilizar medio *f/2* y fertilizante agrícola. Esto confirma la hipótesis que la fuente y concentración de nutrientes utilizados para el cultivo no afectaron el crecimiento y composición bioquímica de *I. aff. galbana* (T-ISO).

El uso de fertilizante agrícola para el cultivo de *I. aff. galbana* (T-ISO), constituye una alternativa viable para reducir los costos de producción. La cantidad de nutrientes requeridos para enriquecer 1,000 litros de agua de mar utilizando el procedimiento descrito por Guillard (1975) representa un costo de 16.2 dólares americanos, mientras que con fertilizante agrícola, el costo se reduce a 2.0 dólares. Lo anterior es de gran importancia por el bajo costo del nutriente, además de ser ocho veces más económico, iguala la producción tanto en biomasa como en contenido de constituyentes bioquímicos del método tradicional *f/2*, ubicando a esta biotecnia con gran perspectiva en la acuicultura.

7. CONCLUSIONES

La biomasa microalgal obtenida con el medio constituido con fertilizante agrícola es similar a la producida con el medio f/2 para el mismo período de tiempo de cultivo.

El cultivo con fertilizante agrícola produce cantidades similares de proteínas, carbohidratos y lípidos que el cultivo con medio f/2 y la fuente y concentración de nutrientes derivados de fertilizante agrícola, no causó cambios importantes en la biomasa y la composición bioquímica de *Isochrysis. aff. galbana* (T-ISO) durante siete días de cultivo.

El contenido de clorofila *a* en el cultivo con fertilizante agrícola es similar al obtenido con el medio f/2 durante siete días de cultivo.

El análisis de nutrientes mostró que el contenido de fosfato en el medio f/2 y fertilizante agrícola, es agotado por *I. aff. galbana* (T-ISO) a partir del quinto día de cultivo.

El costo de producción se reduce significativamente (ocho veces más económico) al utilizar fertilizante agrícola .

8. LITERATURA CITADA

- Alfonso, E. y L. Martínez. 1988. Medio de cultivo para microalgas marinas. pp. 67-70. En: *Larvicultura de Camarones peneidos. Volumen I. Programa Iberoamericano de Ciencias y Tecnología para el Desarrollo. Subprograma II-Acuicultura.* 227 pp.
- Antia, N.J., C.D. McAllister., T.R. Parsons., K. Stephens y J.D.H. Strickland. 1963. Further measurements of primary production using a large volume plastic sphere. *Limnol. Oceanogr.* 8: 166-183.
- Bligh, E.G. y W.J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- Boyd, E.C., Y. Musig y L. Tucker. 1981. Effects of three phosphorus fertilizers on phosphorus concentrations and phytoplankton production. *Aquaculture*, 22: 175-180.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method of total lipid extraction and purification. *Can. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- Brown, M.R. 1991. The amino-acid sugar composition of 16 species of microalga used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 145: 79-99.
- Bustillos-Hurtado, C. y J.A. López-Elias. 1994. Composición química de dos especies de microalgas en dos fases de crecimiento, cultivadas en medios simplificados. *Oceanología*, 1(2): 133-148.
- Conn, E.E. y Stumpf, P.K. 1980. *Bioquímica fundamental.* Tercera edición. Editorial limusa. México. 631 pp.
- Coutteau, P. y Sorgeloos. 1992. The use of algal substitutes and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs: an international survey. *J. Shellfish Res.* 11: 467-476.
- DePauw, N. 1981. use and production of microalgae as food for nursery bivalves. En Claus, N. DePauw y E. Jaspers (eds.). *Eur. Maric. Soc. Spec. Publ. 7*, Bredene, Belgium: 35-69.
- DePauw, N., J. Morales y G. Parsoone. 1984. Mass culture of microalgae in aquaculture systems: Progress and constraints. *Hidrobiología.* 116/117: 121-134.
- DePauw, N. y G. Pruder. 1986. Use and production of microalgae as food in aquaculture. En: H. Rosenthal y G.J. Sindermann (eds.). *Realism in Aquaculture: Achievements, Constraints, Perspectives.* M. Bilio. H. Bredene: European Aquaculture Society. 77-106

- Dohler, G. y I. Biermann. 1985. Effect of salinity on ^{15}N -ammonia and ^{15}N -nitrate assimilation fo *Bellerochea yucatannsis* and *Thalassiosira rotula*. Biophysiol. Pflanzen, 180: 589-598.
- Dortch, Q., P.A. Thompson y P.J. Harrison. 1991. Short-term interaction between nitrate and ammonium uptake in *Thalassiosira pseudonana*: Effect of preconditioning nitrogen source and growth rate. Marine Biology. 110: 183-193.
- Fabregas, J., C. Herrero., B. Cabezas y J. Abalde. 1985. Mass culture and biochemical variability of the marine microalgae *Tetraselmis suecica* Kylin (Butch) with high nutrient concentrations. Aquaculture, 49 (3-4): 231-244.
- Fabregas, J., C. Herrero., J. Abalde y B. Cabezas. 1985. Growth, chlorophyll *a* and protein of the marine microalgae *Isochrysis galbana* in batch cultures with different salinities and high nutrient concentrations. Aquaculture, 50:1-11.
- Fabregas, J., C. Herrero., J. Abalde., R. Liao y B. Cabezas. 1986a. Biomass production and biochemical variability of the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with high nutrient concentrations. Aquaculture, 53: 187-199.
- Fabregas, J., C. Herrero., B. Cabezas y J. Abalde. 1986b. Biomass production and biochemical composition in mass culture of the marine microalgae *Isochrysis galbana* (Parke) at varing nutrient concentration. Aquaculture, 53: 101-113.
- Fabregas, J., L. Toribio., J. Albalde., B. Cabezas y C. Herrero. 1987. Approach to biomass production of the marine microalgae *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butch using common garden fertilizer and soil extract as cheap nutrient supply in batch culture. Aquacultural Engineering, 6: 141-150.
- Fernández-Reiriz, M.J., A. Perez-Camacho., M.J. Ferreiro., J. Blanco., M. Planas., M.J. Campos y U. Labarta. 1989. Biomass production and variation in the biochemical profile (Total protein, Carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. Aquaculture, 83: 17-37.
- González-Rodríguez, E. y S.Y. Maestrini. 1984. The use of some agricultural fertilizers for the mass production of marine algae. Aquaculture, 36: 245-256.
- Granados-Machuca, C. y L.F. Bückle. 1984. Cultivo de las microalgas *Monochrysis lutheri* y *Skeletonema costatum* con nutrientes producidos por estiércoles digeridos. An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univer. Nal. Autón. México, 1, 1 (1): 241-256.
- Guillard, R.R.L. y J.H. Ryther. 1962. Studies of marine planktonic diatoms, I: *Cyclotella nana* Husted and *Denotula confervacea* (Cleve). Can. J. Microbiol. 8: 229-239.

- Guillard, R.R.L. 1973. Division rates. En: Stein, J.R. (ed.). Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge University Press, 289-313.
- Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrate. En: Smith, W.L. y M.H. Chanley (eds.). Culture of Marine Invertebrates Animals. Plenum Publishing Corp. New York., pp. 29-60.
- Helm, M.M. y I. Laing. 1987. Preliminary observations on the nutritional value of "*tahiti*" *Isochrysis* to bivalve larvae. *Aquaculture*, 62: 281-288.
- Herrero, C., C. angeles., J. Fabregas y J. Abalde. 1991. Yields in biomass and chemical constituents of four commercially important marine microalgae with different culture media. *Aquaculture Engineering*, 10. 99-110.
- Iriarte, F. y E. Buitrago. 1992. Determinación de la concentración y fuente óptima de nitrógeno en cultivos de *Chlorella* sp. usadas como inóculo de cultivos masivos. pp. 39-45. En: Larvicultura de Camarones Peneidos. Volumen I Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Subprograma II-Acuicultura. 277 pp.
- Kaplan, D., A. E. Richmond., Z. Dubinsky y S. Aaronson. 1986. Algal nutrition. En: A. Richmond (ed.), Handbook of microalgal mass culture, CRC. Press, Boca Raton, Fl. pp. 147-197.
- Kinne, O. 1976. Marine ecology, 3(1) Wiley-Interscience. Londres, 578 pp.
- Kochert, G. 1978a. Carbohydrate determination by phenol-sulfuric acid method. En: J.A. Hellebust y J.S. Craige (eds.). Handbook of Physiological and Biochemical methods. Cambridge Univ. Press, London, pp. 95-97.
- Loosanoff, V.L. 1951. Culturing phytoplankton on a large scale. *Ecology*, 32(4): 748-750.
- Loosanoff, V.L. Y J.B. Engle. 1942. Use of complete fertilizers in cultivation of microorganisms. *Science*, 95: 487-488.
- López-Eliás, J. y D. Voltolina. 1993. Cultivos semicontinuos de cuatro especies de microalgas con un medio no convencional. *Ciencias Marinas*, 19(2): 169-180.
- López-Muñoz, I., J. Abalde y C. Herrero. 1992. Crecimiento y contenido de pigmentos de cuatro especies de microalgas marinas cultivadas con diferentes temperaturas e intensidades de luz. *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*, 3: 59-65.
- Loring, D.H. y R.T.T. Rantla. 1992. Manual for the geochemical analysis of marine sediments and suspended particulate matter. *Earth Sciences Reviews*, 32:235-283.

- Marker, A.F.H. 1965. Extracellular carbohydrate liberation in the flagellate *Isochrysis galbana* and *Prymnesium parvum*, J. Mar. Biol. Assoc. UK, 45: 755-772.
- Mathiessen, G.C. y R.C. Toner. 1966. Possible methods of improving the shellfish industry of Martha's Vineyard, Duke's Country, Massachusetts. Mar. Res. Found. Mass., IV+138.
- McCarthy, J.J. 1972. The uptake of urea by natural populations of marine phytoplankton. Limnol. Oceanogr., 17: 738-748.
- Millan-Núñez, R. y S. Alvarez-Borrogo. 1978. Ecuaciones espectrofotométricas tricómicas para la determinación de clorofilas *a*, *b*, *y c* y sus feofitinas. Ciencias Marinas, 5(1): 47-55.
- Myklestad, S. y A. Haug. 1972. Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt. I. Effect of the concentration of nutrients in the culture medium. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 9: 125-136.
- Myklestad, S. 1974. Production of carbohydrates by marine planktonic diatoms. I. comparison of nine different species in culture. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 15: 261-274.
- Ojeda, A. y A. Alfonso. 1986. Estudio comparativo y composición química de tres especies fitoplanctónicas utilizando cuatro fuentes de nitrógeno. Inf. Tec. Inst. Esp. Oceanogr. 45: 4-11.
- Pande, S.V., R. Parvin y T. Venkatasubramanian. 1963. microdetermination of lipids and serum total fatty acids. Analytical Biochemistry, 6 : 415-425.
- Paniagua, J.M. y L.F. Bückle-Ramírez. 1985. Cultivo en condiciones controladas de *Monochrysis lutheri* y *Skeletonema costatum* con extractos de macrofitas marinas (fitoplancton). An. Inst. Cien. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. México, 12(1): 59-70.
- Parson. T.R. y M. Takahashi. 1973. Biological Oceanographic processes. Pergamon Press, Inc. New York. NY, pp. 39-49.
- Parson, T.R., Y. Maita y C.M. Lalli. 1985. A. Manual of Chemical and biological methods for seawater analysis. First Edition. Ed. Pergamon Press. Inc. New York .173 pp.
- Provasoli. L. 1971. Media and prospects for the cultivation of marine algae. En: J.R. Rosowski y B.C. Parker (eds.). Selected papers in phycology. University of Nebraska, Lincoln p: 499-604.

- Pruder, G.D. y E.T. Bolton. 1978. System configuration and performance: Bivalve Molluscan Mariculture. Proceeding of the Ninth Annual Meeting World Mariculture Society. p. 747-759.
- Raush, T. 1981. The estimation of micro-algal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomass I. *Hidrobiología*, 78: 237-251.
- Rhee, G-Yull. 1973. A continuous culture study of phosphate uptake, growth rate and polyphosphate in *Scenedesmus* sp. *J. Phycol.* 9: 495-506.
- Rhee, G-Yull. 1974. Phosphate uptake under nitrate limitation by *Scenedesmus* sp and its ecological implications. *J. Phycol.* 10: 470-475.
- Rubright, S.J. y J.L. Harrell. 1981. Responses of phytoplanktonic and benthic communities to fertilizers and feed applications in shrimp mariculture ponds. *J. World Maricul. Soc.* 12(1): 281-299.
- Shifrin, N.S. y S.W. Chisholm. 1981. Phytoplankton lipids: interspecific difference and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles. *J. Phycol.* 374-384.
- Stein, J.R. (ed). 1973. Handbook of phycological Methods. Culture methods and growth measurement. Cambridge university Press, Cambridge, 448 pp.
- Syrett, P.J. 1981. Nitrogen metabolism of microalgae. En: T. Platt (ed.). Physiological bases of phytoplankton ecology. *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci.*, 210: 182-210.
- Terlizzi, D.E., Jr. y E.P. Karlander. 1980. Growth of the coccoid nanoplankton (Eustigmatophyceae) from the Chesapeake Bay as influenced by light, temperature, salinity and nitrogen source in factorial combination. *J. Phycol.*, 16: 364-368.
- Ukeles, R. 1976. Cultivation of plants; 4.1. Unicellular plants. En: O. Kinne (ed.). *Marine Ecology*. John Wiley & Sons, New York, 3: 367-466.
- Walne, P.R. 1970. Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria* and *Mytilus*. *Fish. Invest.* London, Serie 2, 24(5):1-62.
- Wheeler, P.A. 1983. Phytoplankton nitrogen metabolism. En: E.J. Carpenter y D.G. Capone (eds.). *Nitrogen in the marine environment*. Academic Press, Inc. New York. 309-346.
- Whyte, J.N.C. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture*, 60: 231-241.

Wikfors, G.H. 1986. Altering growth and gross chemical composition of two microalgal molluscan food species by varying nitrate and phosphate. *Aquaculture*, 59: 1-14.

Zar, J.H. 1984. *Bioestatistical analysis*. Second edition. Ed. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs. N.J. 718 pp.